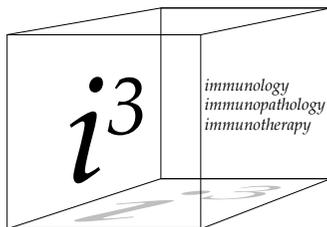


DES Biologie Médicale
Cambodge - septembre 2009

CM4.2
Activation lymphocytaire B



- **I. Intro: rappel sur Anticorps et Lymphocytes B**
 - **Structure des Ig**
 - **Diversité isotypique et idiotypique**
 - **Origine de la diversité**

- **II. Stimulation antigénique des LyB et mise en place de la réponse humorale**
 - **Nature des antigènes (thymo-dépendent/ indépendant)**
 - **Coopération cellulaire**
 - **La réponse germinative:**
 - maturation d'affinité
 - commutation de classe
 - Cellules mémoire

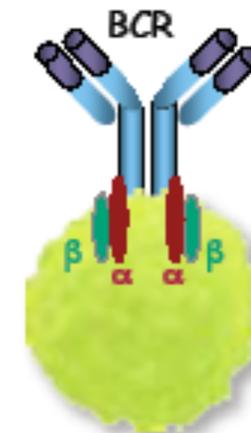
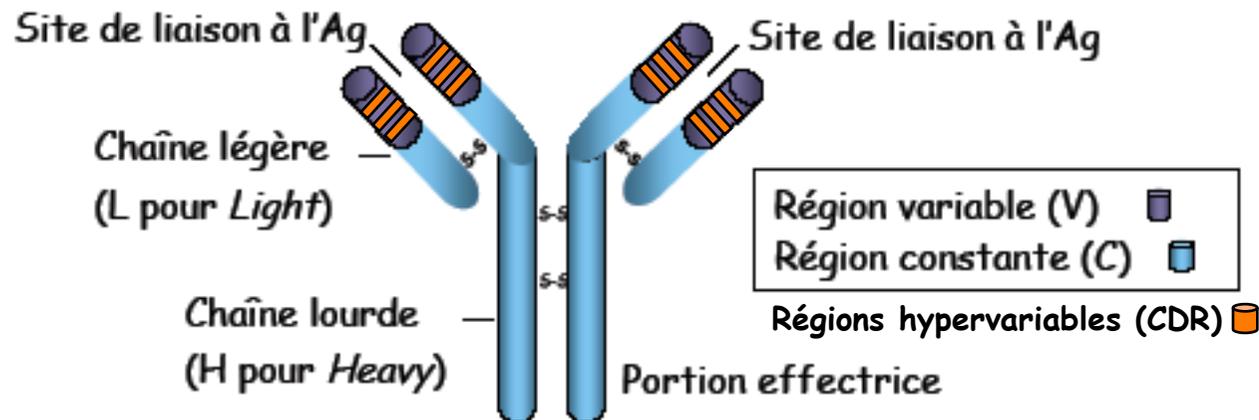
- **III. Echappement des micro-organismes à la réponse anticorps**

I. Rappels:

Anticorps : *Structure, Diversité, Origine*

Anticorps et Réponse humorale

- Anticorps : protéines sériques, du groupe des gammaglobulines, aussi appelées immunoglobulines ou Ig soluble
- Sécrétés après recrutement, activation et différenciation en **plasmocytes** des lymphocytes B suite au contact Antigène - Récepteur membranaire (BCR ou Ig membranaire)



Lymphocyte B

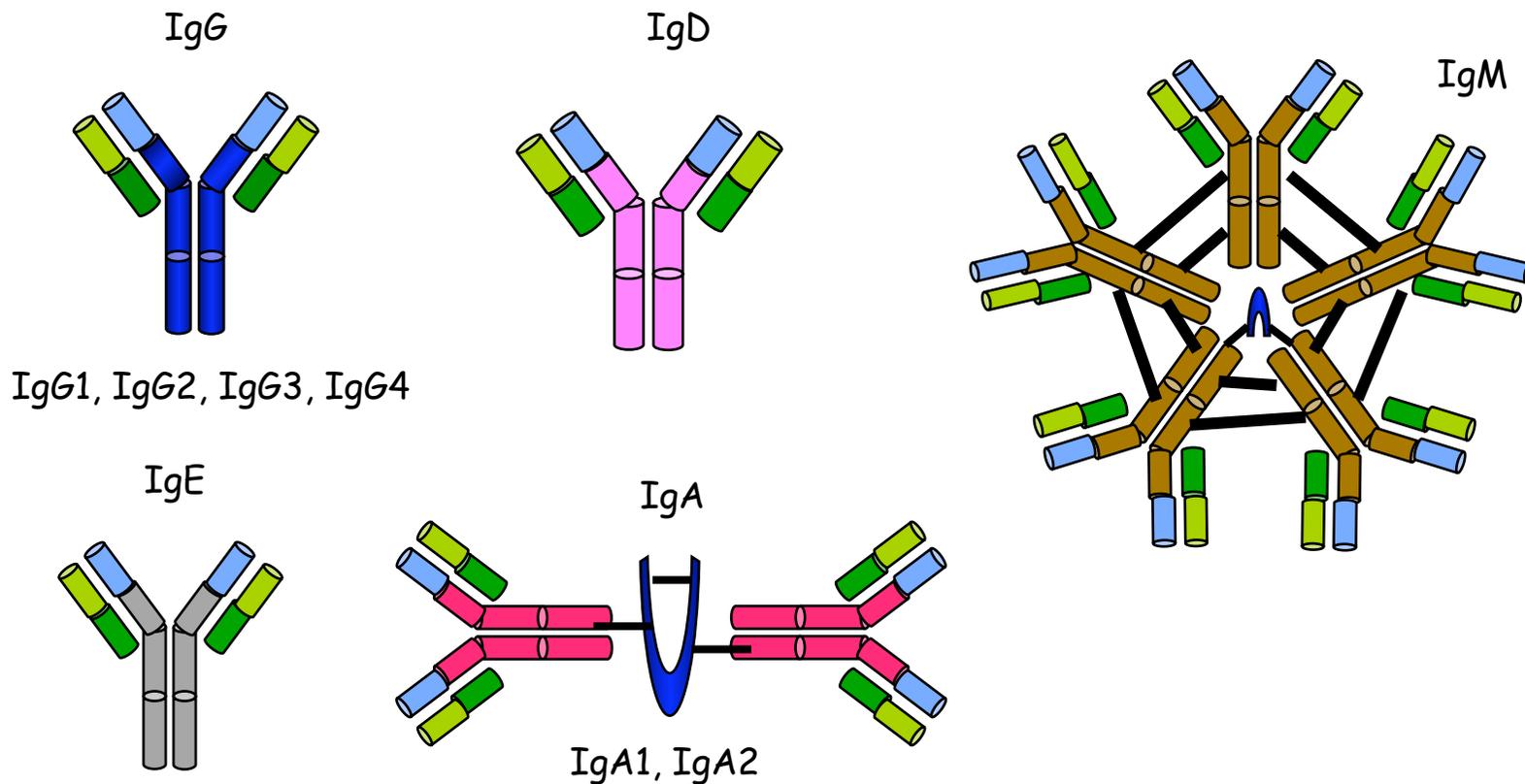
Molécule hétérodimérique
 4 chaînes polypeptidiques :
 • 2x (H : 50 Kda)
 • 2x (L : 22 Kda)

Liaison disulfure intrachaîne
 Formation de domaines de type « Ig »
 • 110 AA
 • Repliement en feuillets plissés Beta

- BCR est responsable de la reconnaissance de l'antigène
 - Les chaînes intracellulaires Iga-Igb assurent la transmission du signal

Classes d'Immunoglobulines

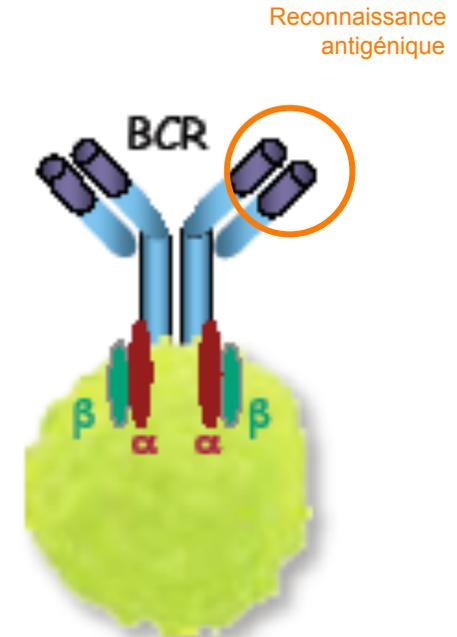
- Variabilité de la partie constante = **VARIABILITÉ ISOTYPIQUE**
- L'isotype est défini d'après la chaîne lourde
- 5 Classes d'Ig: M (μ), D (δ), G (γ), A (α), E (ϵ)
- Sous-classes pour IgG et IgA (**variabilité allotypique**)
- Propriétés fonctionnelles spécifiques



Reconnaissance antigénique

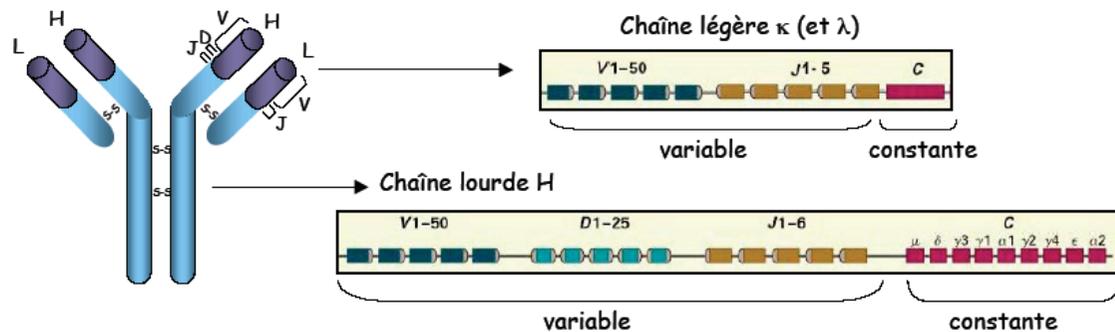
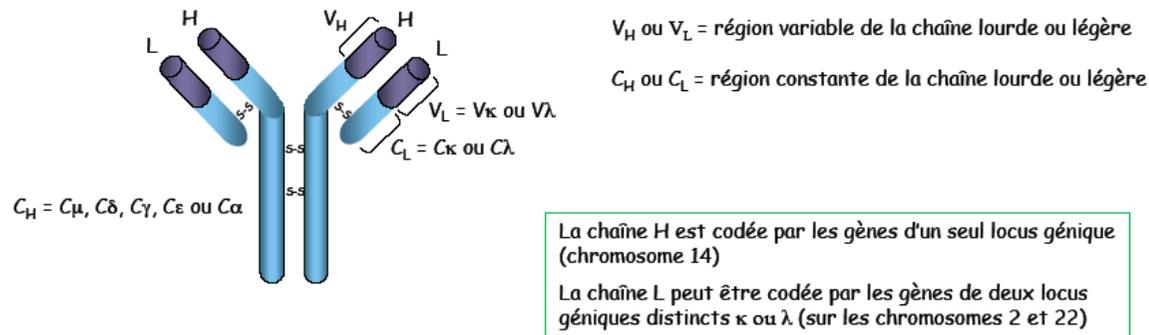
Variabilité **idiotypique**

- Reconnaissance et fixation directe de l'Ag par le **BCR** au niveau de la **région variable**
- Chaque lymphocyte B exprime un récepteur de spécificité unique
- Grande diversité de spécificité (10^{13} régions variables différentes en théorie)
- L'ensemble des cellules B produits définit le **RÉPERTOIRE PRIMAIRE** (Diversité répertoire = diversité de la spécificité antigénique)
- Seules les cellules exprimant le récepteur approprié pourront lier avec une grande affinité un antigène particulier (recrutement) et ainsi s'activer
=**SELECTION CLONALE**



Diversité de la spécificité antigénique: origine génétique

- La région V est formée par l'association de segments géniques.
- Les régions V sont composés de segments: V, D, J ou V, J
- H, L: loci géniques différents (H, K, L : chromosome 14, 2, 22)



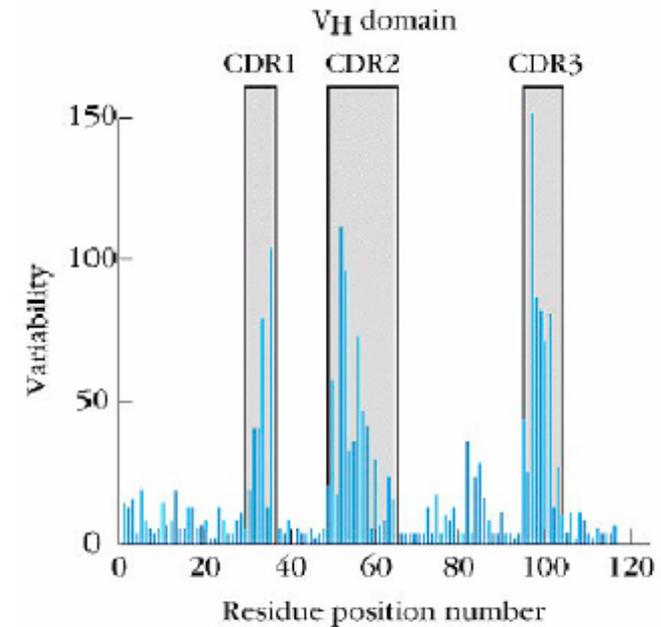
Origine de la diversité:

- Diversité combinatoire
- Diversité jonctionnelle
- Hypermutation

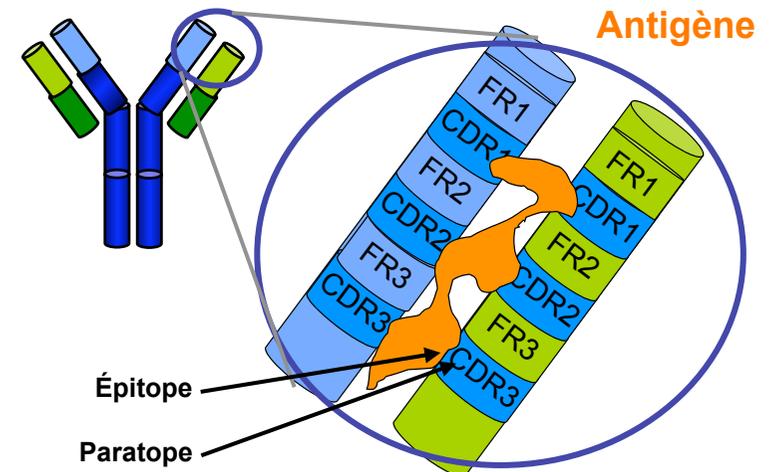
• Cf cours « Imm Fonda »

Domaines de liaison à l'Ag

- Site de fixation défini par des séquences **hypervariables** au sein de la région variable
- 3 Zones hypervariables: CDR1, 2, 3 dans chaque région V
- **CDR**= Complementary Determining Regions
- Entre les CDR se trouvent les régions charpentes (Framework Regions): **FR1 -4** qui présentent peu de variabilité



La séquence des régions V est plus variable au niveau des CDR



Liaison antigénique

- Interactions entre les acides aminés (AA) des CDR (**paratope**) et l'antigène (**épitope**)
- Complémentarité de conformation entre épitope et paratope
- Epitopes **linéaires** ou continus: AA juxtaposés dans la structure primaire
- Epitopes **conformationnels** ou discontinus : composés d'AA éloignés dans la structure primaire mais regroupés dans la protéine)

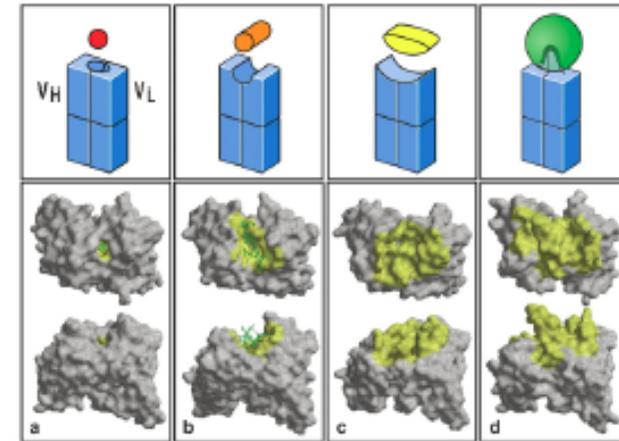
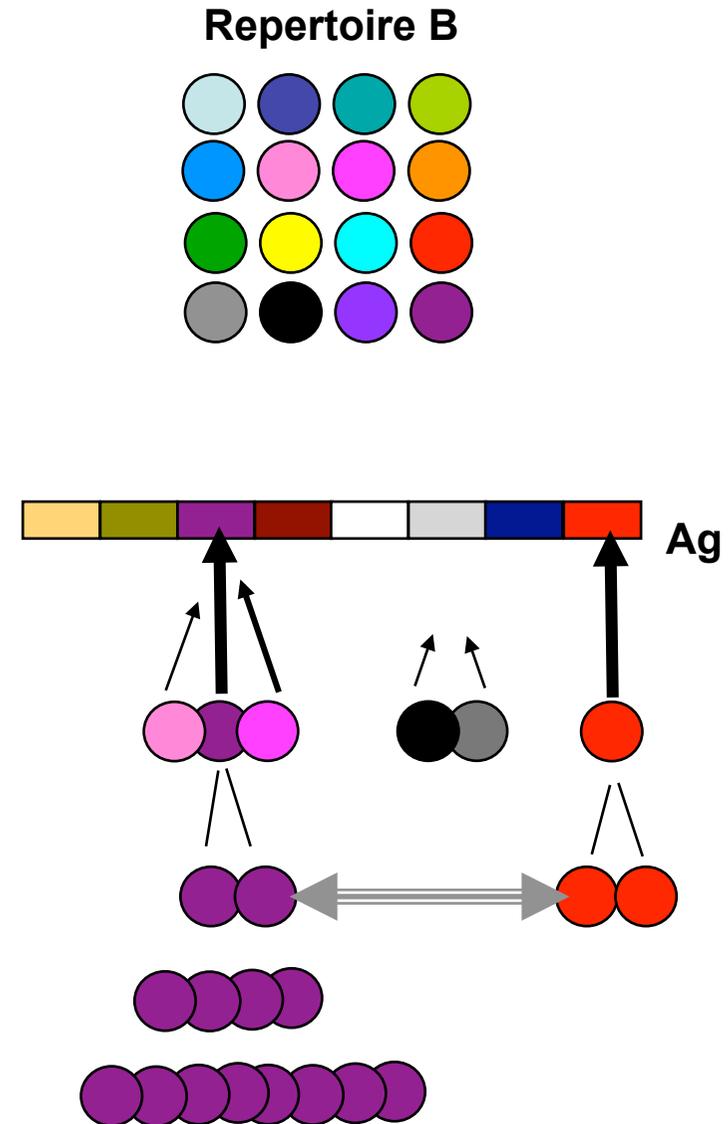


Figure 2-8 Immunobiology, 6th Ed. Oxford Science 2004

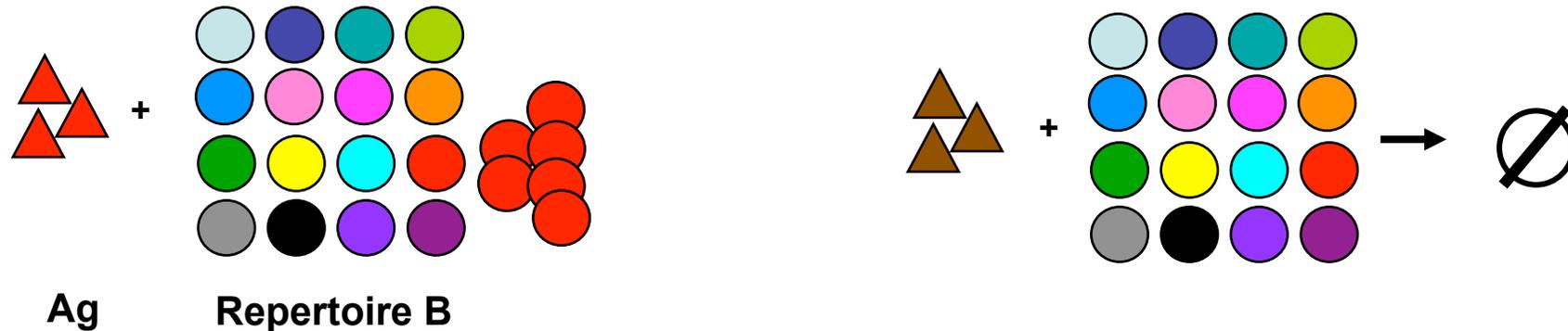


Diversité du répertoire et Immunodominance

- La large diversité du répertoire autorise l'établissement d'une réponse contre la plupart des antigènes / des micro-organismes = Immunocompétence
- Les protéines possèdent généralement de nombreux épitopes potentiels
- Cependant, les réponses s'établissent contre seulement certains épitopes = Notion d'**Immunodominance**
- Mécanismes de l'Immunodominance:
 - Compétition entre les différents BCR reconnaissant les épitopes présents
 - Compétition homéostatique des LyB activés
- Conséquences en vaccination



Non-réponse: Absence de sélection clonale



- Non-répondeur
- Peu fréquent dans le cadre d'infection par micro-organismes
- Eventuellement si nombre d'antigènes est limité:
 - Protéines
 - Cas des vaccins sous-unitaires: 10% des sujets vaccinés HBs
- Plus fréquemment l'état de non-répondeur est lié à des déficits immunitaires plus sévères ou des trous dans répertoire T

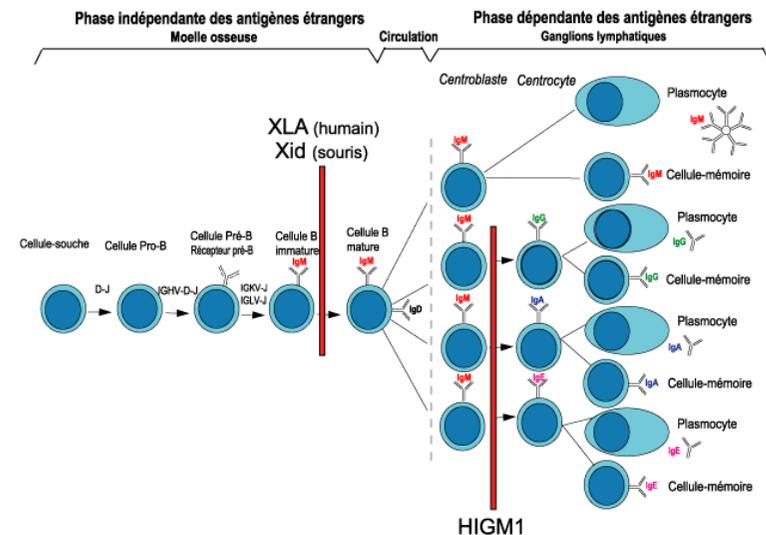
Cas des déficits immunitaires « B »

Importance des anticorps dans la lutte microbienne

- **Déficits immunitaires B :**
 - **Inné :** Déficit génétique; ex: maladie de Bruton = Agammaglobulinémie congénitale (Défaut Tyr Kinase)
 - **Acquis:** Au cours du myélome multiple, de certaines leucémies (leucémie myéloïde chronique), de pathologies liées aux immunoglobulines (gammopathie).

- **Infections opportunistes**

- **Infections bactériennes : +++**
 - Streptocoque, Méningocoque, Haemophilus et Giardia, Pseudomonas, Proteus, Serrata, Nocardia
- **Infections virales:**
 - Infections respiratoires
 - Immunothérapie par IVIG hyperimmunes
- **Infections parasitaires : giardiases**



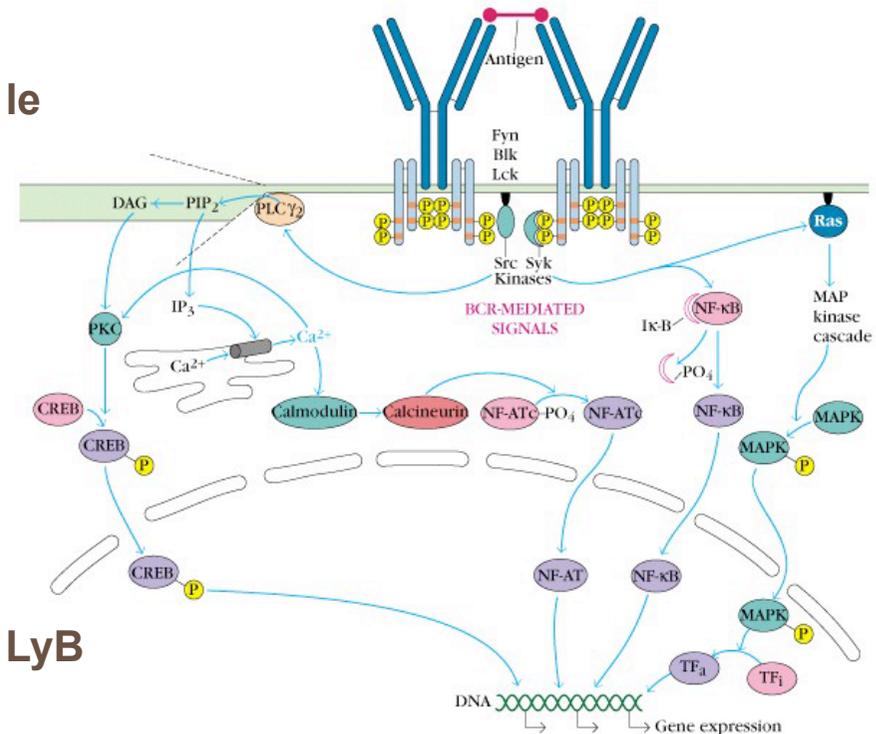
XLA: Maladie de Bruton ou Agammaglobulinémie liée à l'X due à des mutations du gène BTK (Xid chez la souris)

HIGM1: Hyperimmunoglobulinémie liée à l'X (syndrome d'hyper-IgM lié à l'X) due à des mutations du gène CD40L.

II. Stimulation antigénique et mise en place de la réponse humorale

Sélection et activation des lymphocytes B

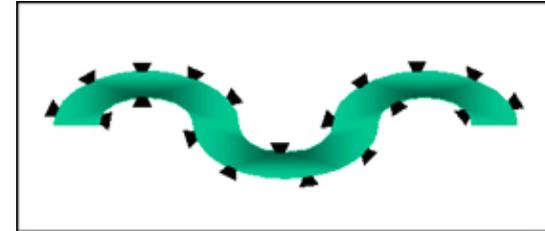
- Reconnaissance directe de l'épitope par le BCR
- Pontage des BCR
- Transduction signal
- **Antigène = 1er signal**
- Généralement insuffisant pour activer le LyB
- Nécessité d'un « **help** » à l'exception de certains Ag
 - **Ag Thymo-indépendants**
 - Activation indépendante des LyT helper
 - **Ag Thymo-dépendants**
 - Activation dépendante des LyT helper



Cas des antigènes thymo-indépendants

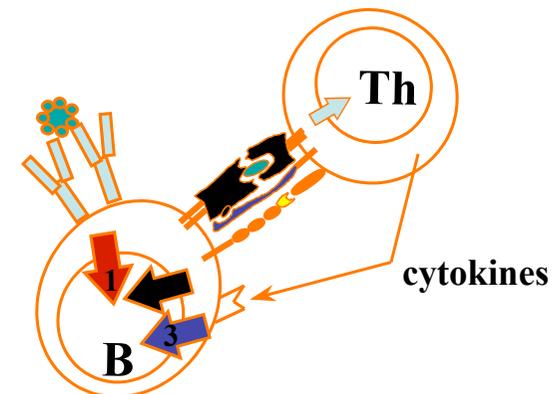
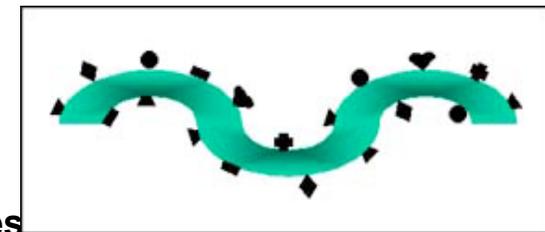
- **Ag Thymo-indépendants**

- sont classiquement des substances polymériques.
- 2 types:
 - Type 1: Sucres
=mitogènes: Activateurs polyclonaux (indépendant de la spécificité antigénique).
Ex: Lipopolysaccharide (LPS) de paroi des bactérie Gram⁻
 - Type 2: Protéines multivalentes
=molécules présentant des motifs répétitifs.
Ex: flagelline bactérienne



- **Ag Thymo-dépendants**

- Antigènes protéiques solubles (peu de répétition des déterminants antigéniques)
- Activation nécessite l'aide des LyT :
 - Interactions moléculaires
 - Surface des LyT CD4 activés
= **signal 2**
 - Cytokines
 - Sécrétées par LyT CD4 activés
= **signal 3**



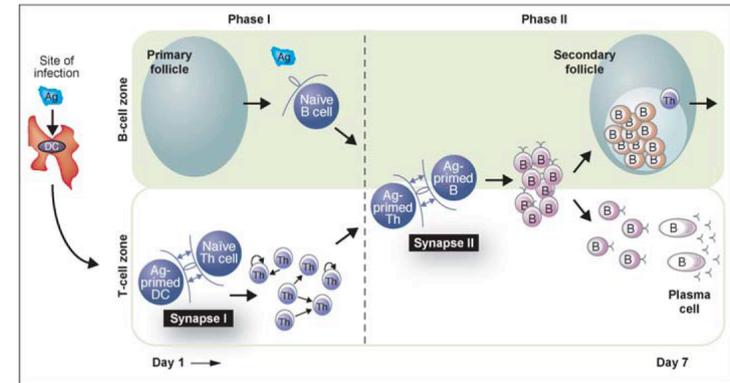
Signaux requis pour l'activation des LyB thymo-dépendants

- **3 signaux:**

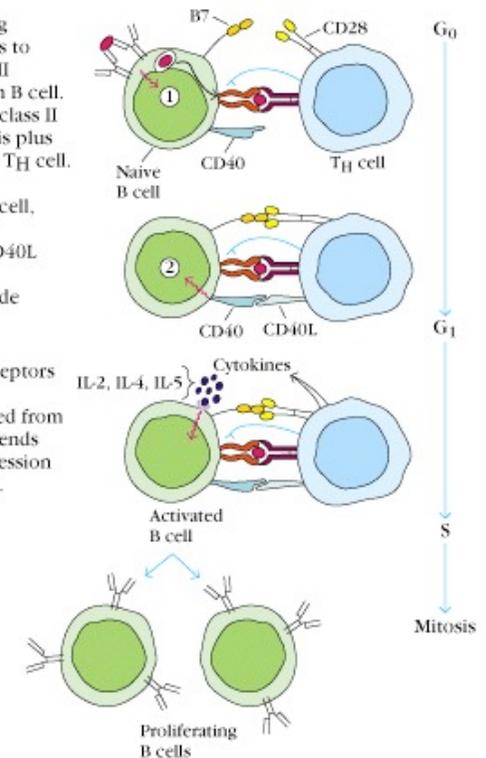
- **Signal 1: BCR + Ag**
= *signaux de compétence*
- **Signal 2 : Interaction entre LyB-LyT**
 - Présentation des Ag par LyB pré-activé
 - Interaction moléculaire avec molécule de co-stimulation des LyT helper
- **Signal 3: Cytokines**
 - Stimule la prolifération
 - = *signaux de progression*
 - Détermine la différenciation des Ly B naifs en LyB effecteurs

- **Résultats:**

- **Prolifération extra-folliculaire et différenciation en plasmocytes à courte durée-vie sécrétant des anticorps de faible affinité d'isotype IgM**



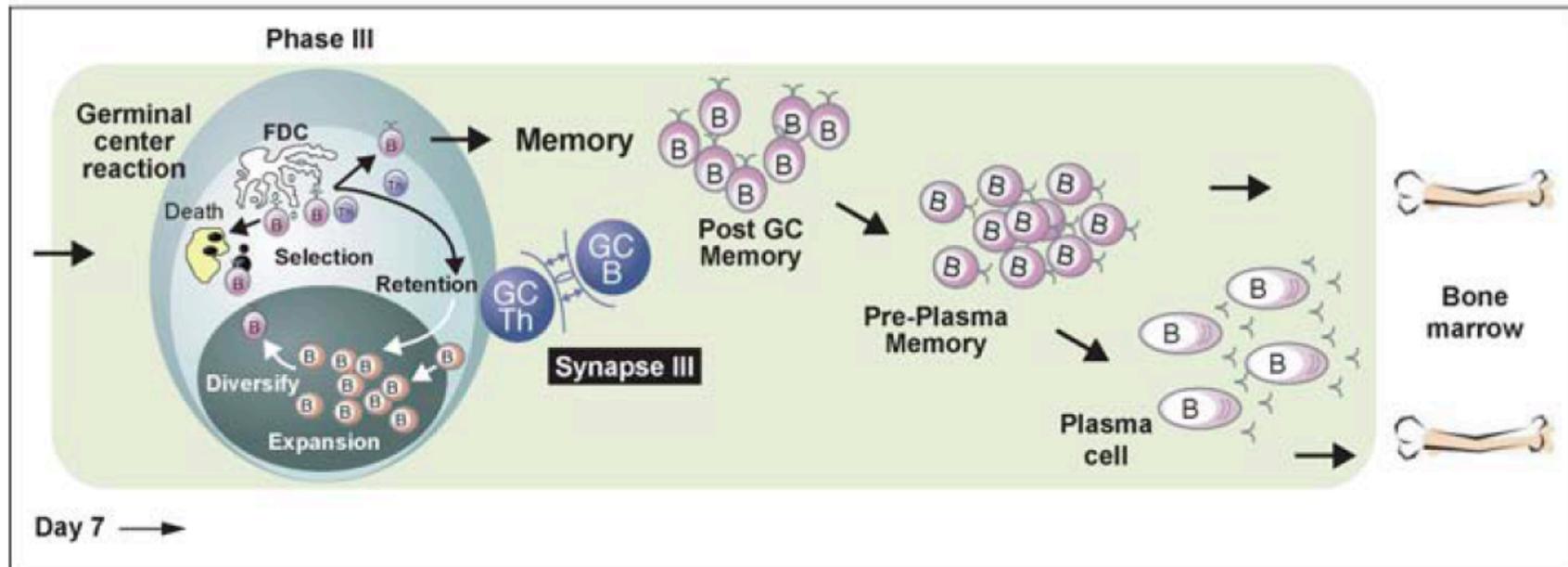
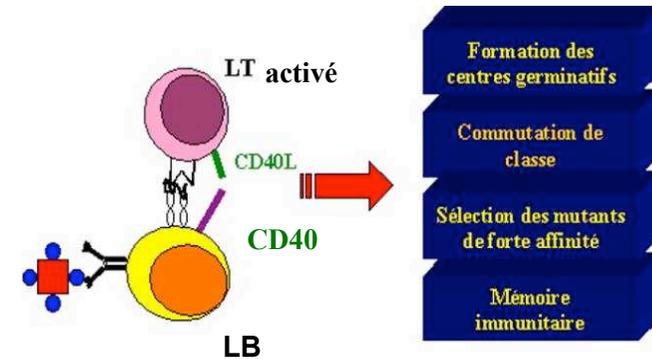
- Antigen cross-linkage of mlg induces signal ①, which leads to increased expression of class II MHC and co-stimulatory B7 on B cell. 2. T_H cell recognizes antigen-class II MHC on B-cell membrane. This plus co-stimulatory signal activates T_H cell.
- Following activation of T_H cell, it begins to express CD40L. 2. Interaction of CD40 and CD40L provides signal ②. 3. B7-CD28 interactions provide costimulation to the T_H cell.
- B cell begins to express receptors for various cytokines. 2. Binding of cytokines released from T_H cell in a directed fashion sends signals that support the progression of the B cell to DNA synthesis.



Centres germinatifs

–Interaction CD40-CD40L déclenche la formation d'un centre germinatif lieu de:

- *maturation d'affinité*
- *commutation de classe*
- *formation de plasmocytes et des cellules mémoire*

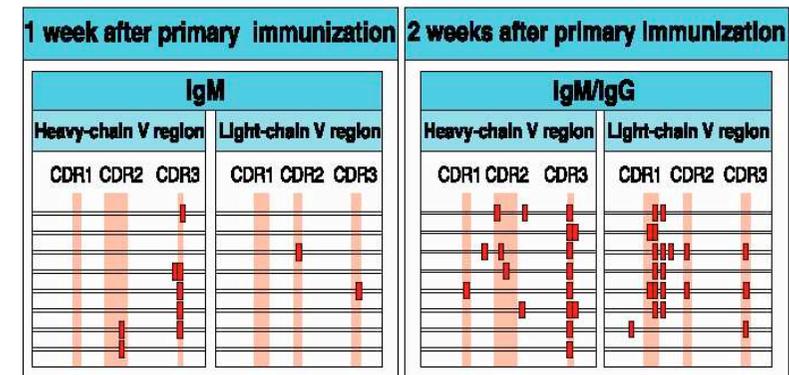


Différenciation des cellules B

Maturation d'affinité

- Affinité des AC augmente de 100 à 1000 fois au cours de la réponse primaire
- Hypermutation somatique:**
 - Exclusivement au niveau des centres germinatifs
 - Mutation intense des régions variables des chaînes lourdes et légères
 - 10-3/paire de base/ division ($\gg 10^{-9}$)
 - Mutations ponctuelles dans région proche des segments V(D)J = CDR1, CDR2
 - V(D)J = 700pb: après 2 divisions presque tous les centroblastes sont mutés
 - Modification éventuelle de:
 - L'Affinité
 - La Spécificité
 - Pas d'altération de la région C (Fonction)
- Requiert la **sélection** des nouveaux clones en présence des FDC (cellules folliculaire dendritiques) présentant à leur surface des complexes Ag-AC

Figure 224



© 2000 Garland Publishing/Elsevier Science

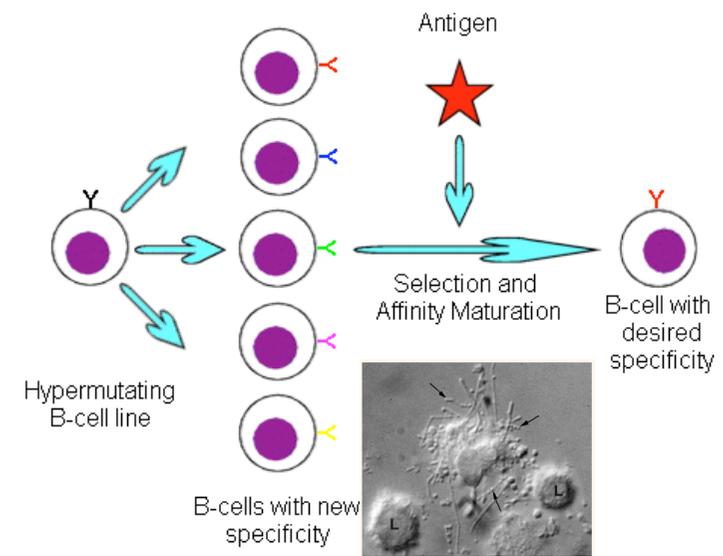
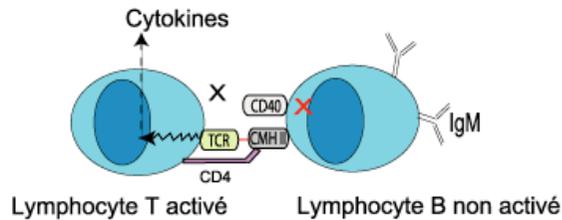
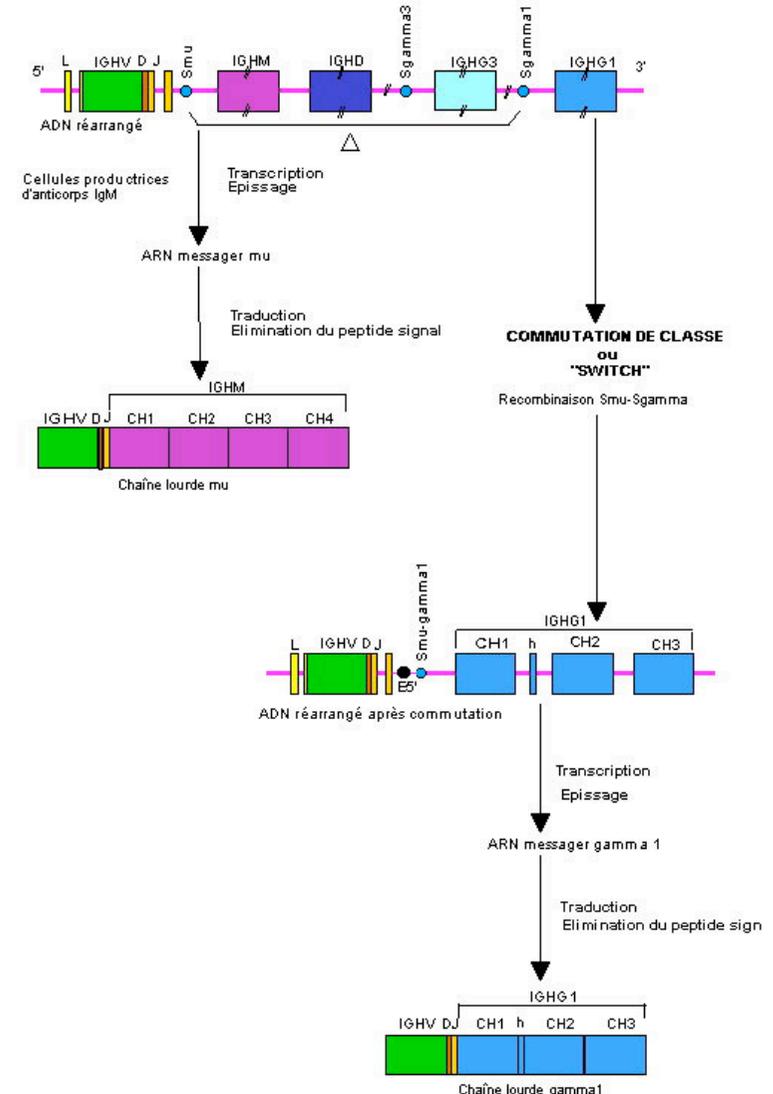


Figure 1 | Morphology of a follicular dendritic

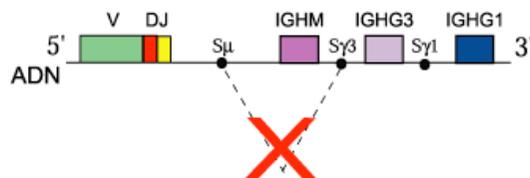
Différenciation des cellules B

Commutation de classe

- Mécanisme: Association du domaine VH réarrangé (VDJ) avec une nouvelle région constante
- Conséquences:
 - Ne change pas la spécificité antigénique
 - Changement de l'isotype de la partie Fc = nouvelles fonctions biologiques
- Initiée suite à l'interaction CD40/CD40L
 - Cf syndrome hyper IgM



Absence de commutation de classe



Syndrome Hyper-IgM

Commutation de classe: influence des cytokines

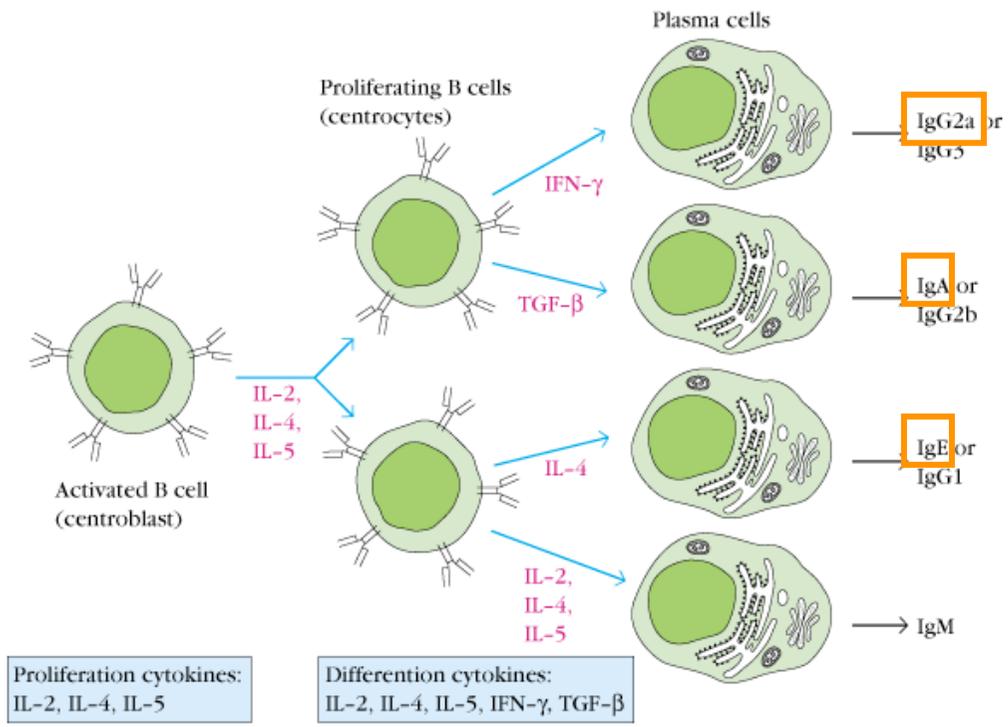
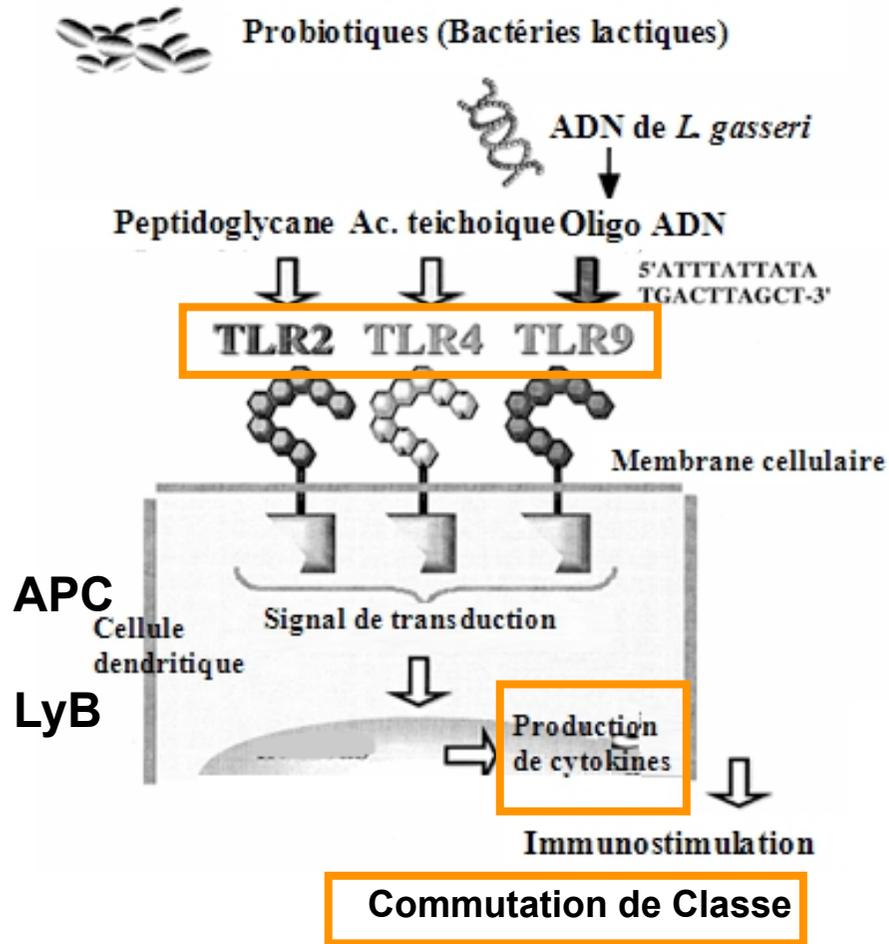


Figure 7.14

Influence of cytokines on antibody isotype switching in mice							
Cytokine	IgM	IgG3	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgA	IgE
IL-4	Inhibits	Inhibits	Induces		Inhibits		Induces
IL-5						Augments production	
IFN- γ	Inhibits	Induces	Inhibits		Induces		Inhibits
TGF- β	Inhibits	Inhibits		Induces		Induces	

© 2000 Garland Publishing/Elsevier Science

MICRO-ORGANISME



Influence du micro-organisme TLR / profil cytokinique

Génération d'IgE lors des infections parasitaires et des allergies

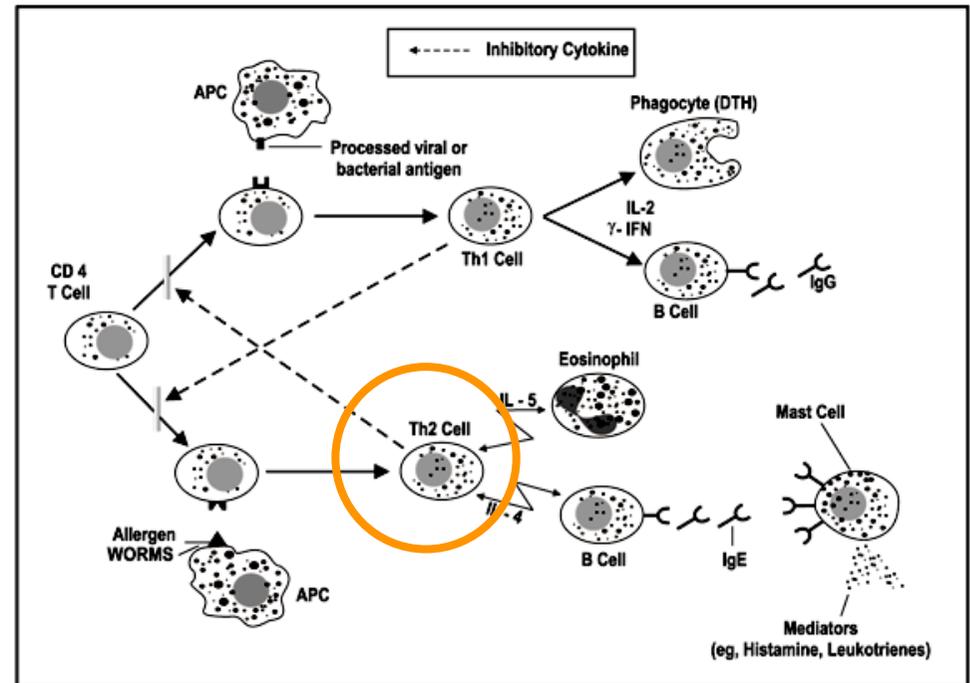
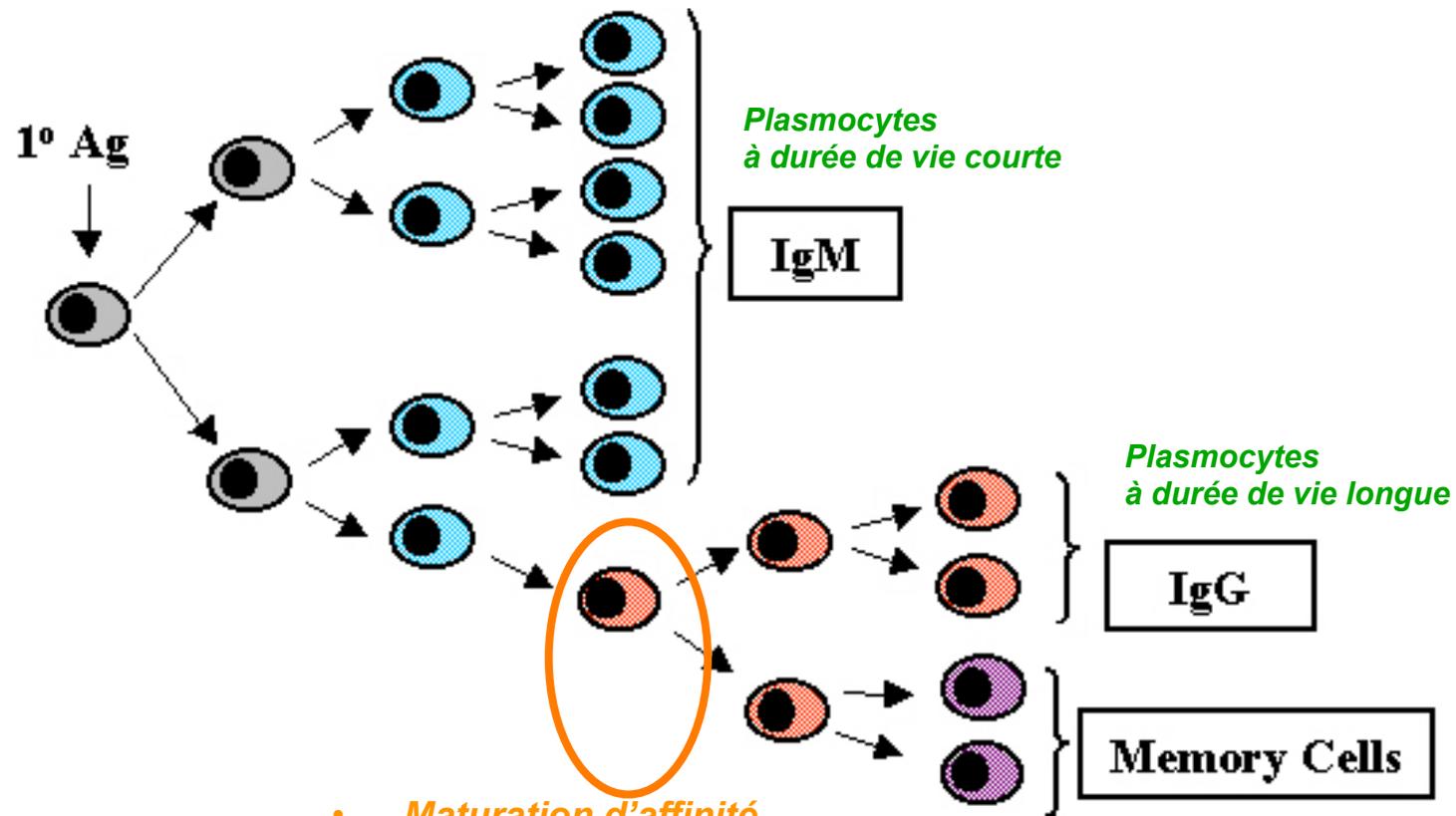


Fig. 1 - The delicate balance between the Th1/Th2 pattern of immune response. In allergic individuals and in helminthic infections there is a Th2-dominated immune reaction with eosinophilia, and hyper-IgE; by binding to mast cells, IgE triggers release of mediators associated with pruritus. When activated, Th2 cytokines inhibit the Th1 arm of the immune system. APC = antigen presenting cell; DTH = delayed type hypersensitivity.

Evolution de la réponse primaire



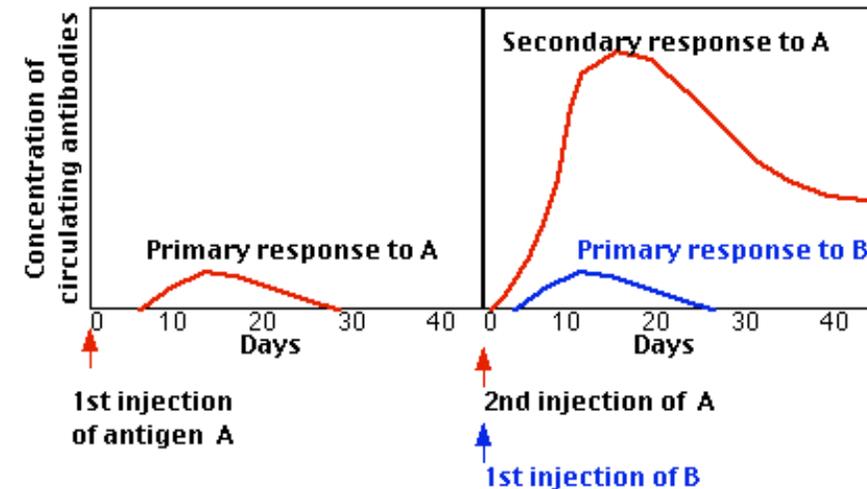
- *Maturation d'affinité*
- *Commutation de classe*
- *Génération de LyB mémoire ou plasmocytes à durée de vie longue*

EFFICACITE

Génération des LyB mémoire

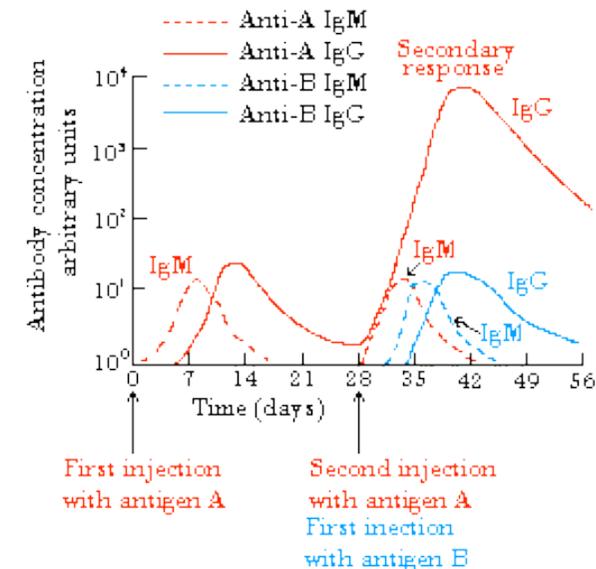
- **LyB mémoire:**

- Générées à partir des centrocytes de haute affinité sélectionnées dans la zone claire des CG
- Capacité à répondre plus vite et plus vigoureusement lors d'un second contact avec le même Ag
- Efficacité de la réponse Mémoire:
 - Fréquence >
 - Seuil d'activation <



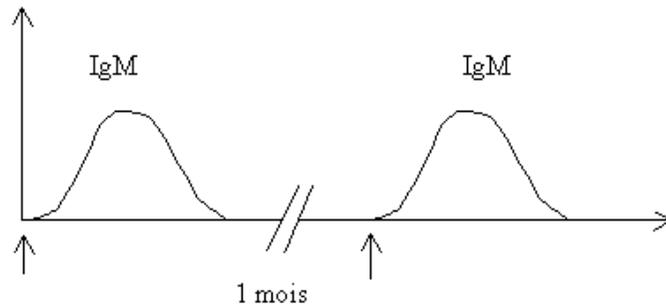
- **Maintien Mémoire et Protection:**

- **Maintien de la population mémoire (via division)**
 - Ré-activation rapide à l'Ag
- **AC plasmatiques recirculants**
 - Activation régulière des B mem ou persistance de plasmocytes sécrétant des AC
 - Rôle persistance Ag sur FDC



Défaut de génération de cellules mémoire

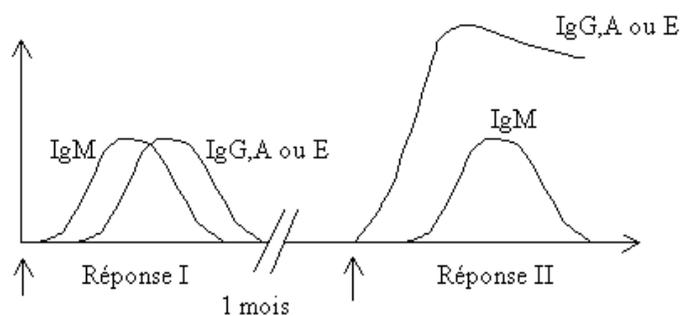
Ag Thymo-indépendants : (ou Activation des LyB en l'absence de CD40L)



Les molécules impliquées dans ce processus sont généralement des polysaccharides à structure très répétitive :

- LPS (lipopolysaccharides bactériens)
- Flagelline (extraite de flagelle de Salmonelle)
- Polysaccharides de pneumocoques
- Ficoll (polymère industriel = polydextrant utilisé pour séparer les lymphocytes sanguins par centrifugation car sa densité > celle des lymphocytes).

Ag Thymo-dépendants



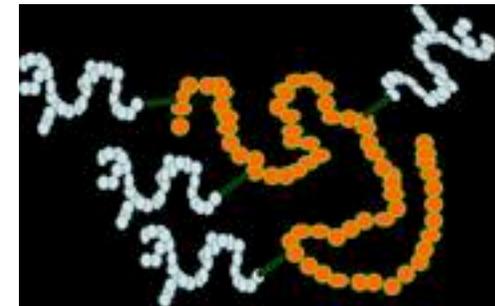
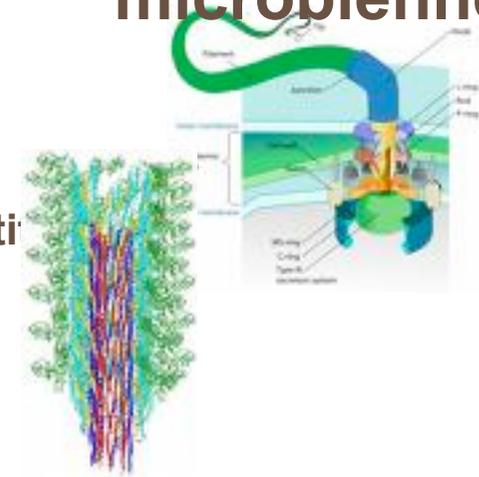
Réponse I \Rightarrow IgM et IgG décalés dans le temps = commutation de classe.

Réponse II \Rightarrow pas de commutation de classe.

Idée de la mémoire immunitaire : lors de la première injection, l'organisme a constitué des clones-mémoires. Cette mémoire est attribuée aux lymphocytes T mais il existe des L.B. mémoires.

Ag thymo-indépendants et infections microbienne

- Flagelline bactérienne (protéine)
- Polysaccharides bactériens: structures glucidiques répétitives
 - Immunisation difficile
 - Réponse primaire courte,
 - de faible amplitude,
 - à IgM ,
 - sans cellules mémoire
- Lors d'une nouvelle infection : pas de réponse secondaire et reste une réponse IgM
- Conséquences: Handicape pour la réponse anti-bactérienne
- Application: développement de vaccins conjugués

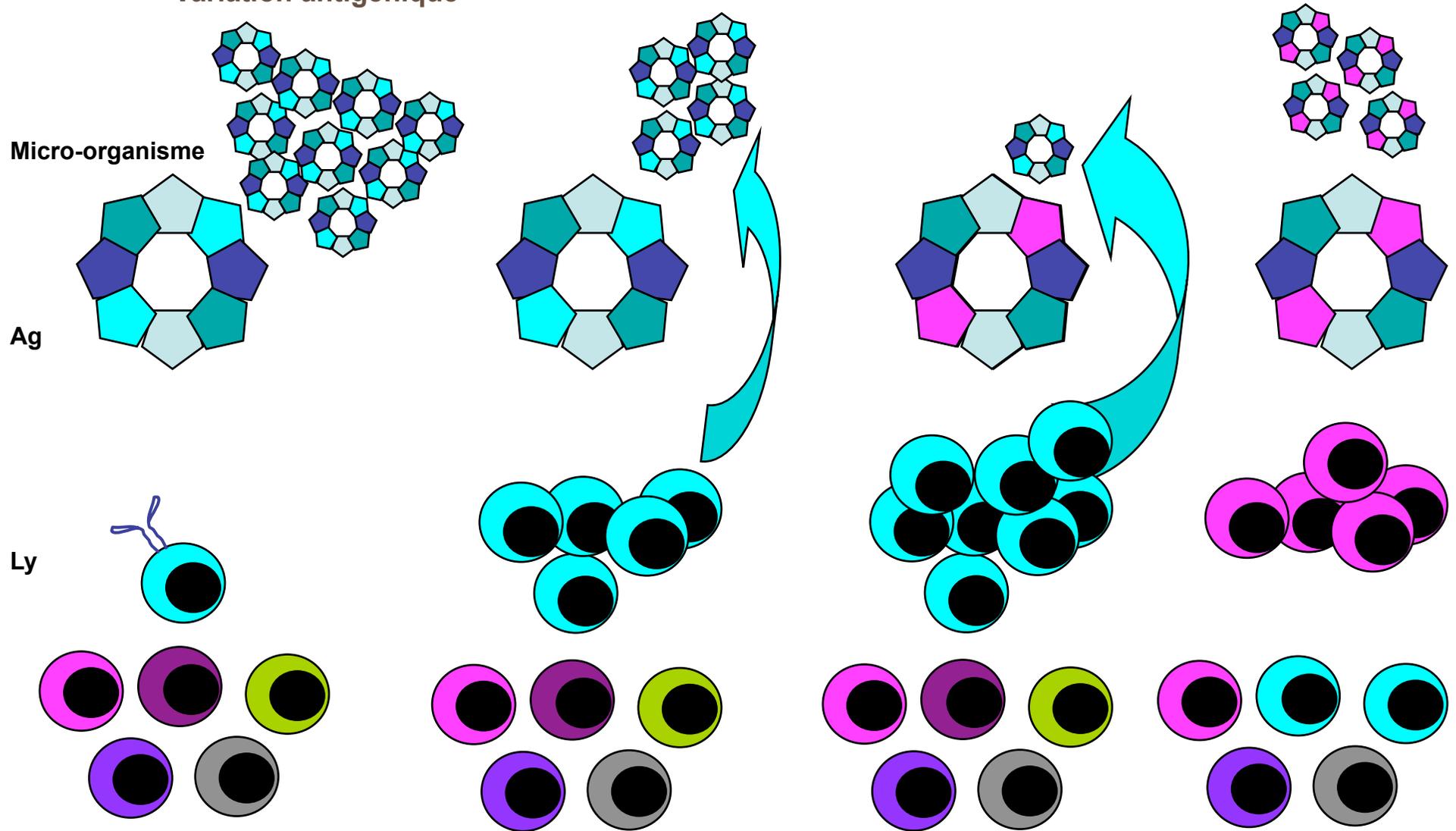


Vaccin Quimi-Hib développé par l'équipe de René Roy et Vicente Verez Bencomo. En blanc, la partie synthétique (le polysaccharide). En rouge, au centre, la protéine du tétanos (source: René Roy)

III. Echappement des micro-organismes à la réponse humorale

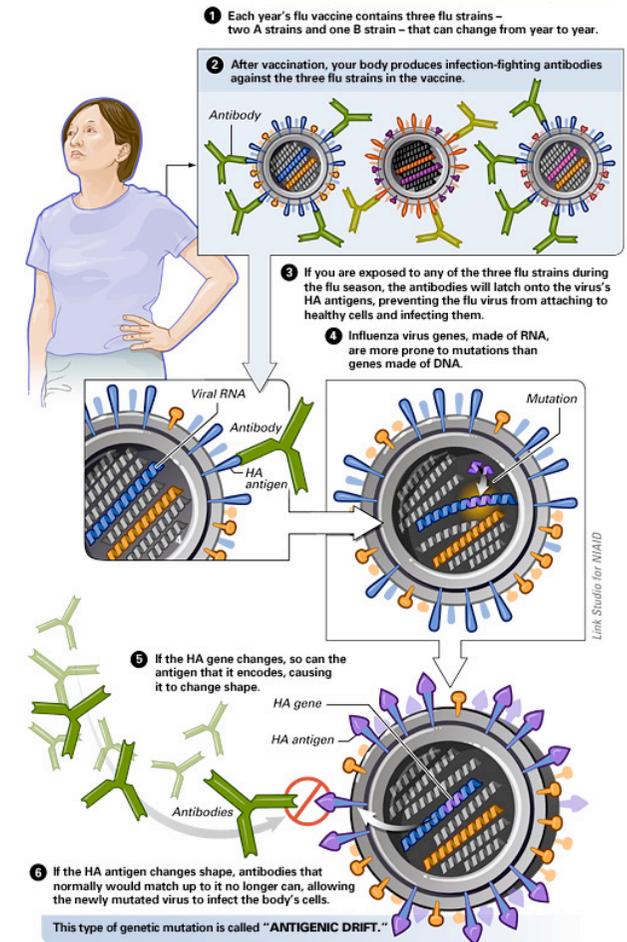
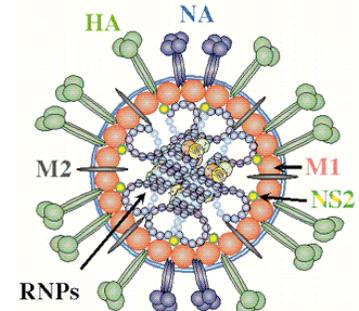
Mécanisme d'échappement des micro-organismes à la réponse anticorps

- Variation antigénique



Mécanismes d'échappement Cas de l'infection grippale

- Influenza : *Orthomyxoviridae*; Virus à ARN; espèces A, B, C
- Influenza A : plusieurs sous-types définis par Ag de surface:
 - H : hémagglutinine (HA) : 15 types
 - N : neuraminidase (NA) : 9 types
 - Ex de sous-types : H3N2, H1N1, H7N7, H5N1 ...
- Le virus de la grippe n'est pas antigéniquement stable :
 - Modifications mineures (**antigenic drift = Dérive antigénique**)
 Les modifications mineures (mutation des protéines NA et HA) surviennent au cours de chaque épidémie. Ces modifications modifient la séquence du génome viral mais ne définit pas un nouveau sous-type viral.
 >> nouveaux variants >> épidémies
 - Modifications majeures (**antigenic shift = Cassure antigénique**)
 Modifications majeures résultent de la recombinaison avec d'autres virus
 L'arrivée d'un nouveau variant provoque le plus souvent une épidémie
 >> nouvelles espèces >> pandémies



Grippe saisonnière et grippe aviaire

Epidémie versus pandémie

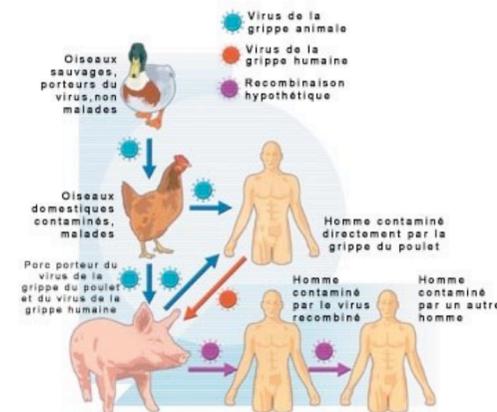
- **Epidémie:**
 - Chaque hiver , infection par A/H1N1, A/H3N2, B (**grippe saisonnière**)
 - Variation chaque année
 - Immunité plus ou moins efficace : protection croisée contre nouveaux variants (**mutants**)

- **Pandémie**
 - Nouvelle souche
 - Issu d'un réservoir animal :oiseaux sauvages = **grippe aviaire**
 - Aucune immunité pré-existence contre les recombinants

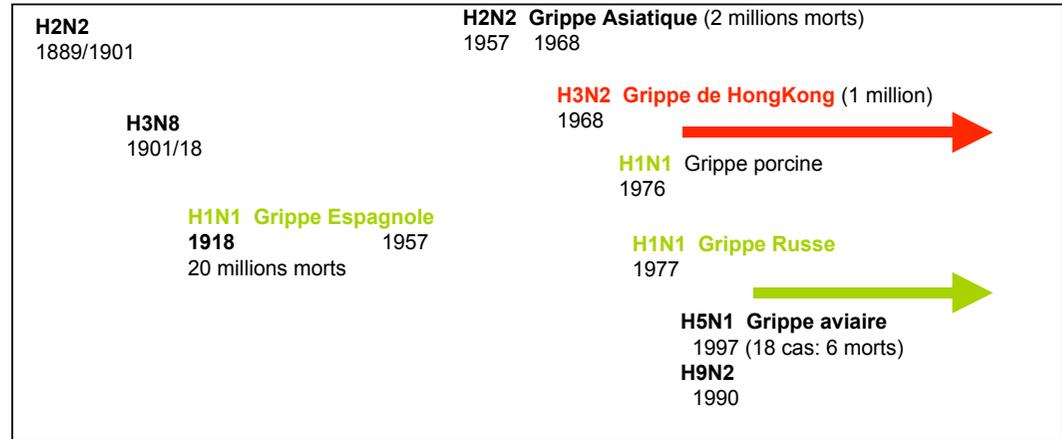
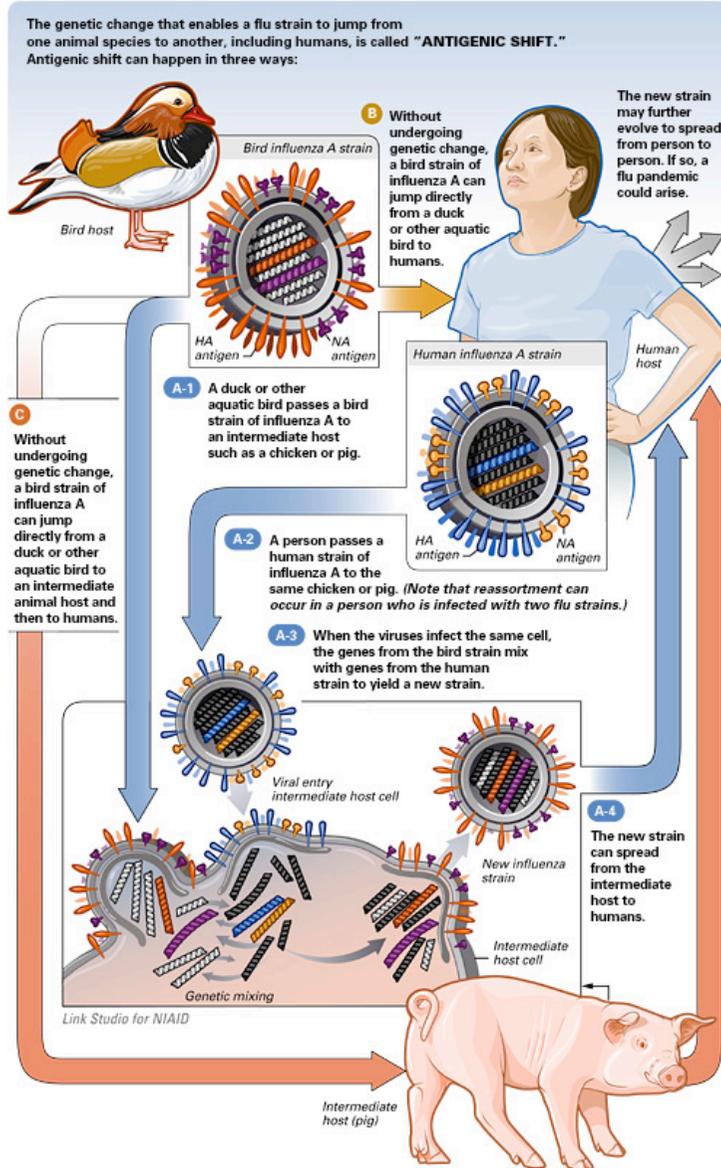
H5N1: Risques de pandémie

- H5N1 peut infecter l'homme (cas humains en Asie) = Zoonose
- mais pas adapté (faible réplication virale)
- pas de transmission d'homme à homme (ou limitée)

- Risque élevé de pandémie en cas de « **shift** » = « **cassure antigénique** »
 - Réassortiment chez un animal:
 - Porc si élevage conjoint du porc et du canard
 - Volailles
 - Passage chez l'homme en cas de contact étroit avec les animaux
 - Réassortiment chez l'homme:
 - H5N1 peut passer directement chez l'homme



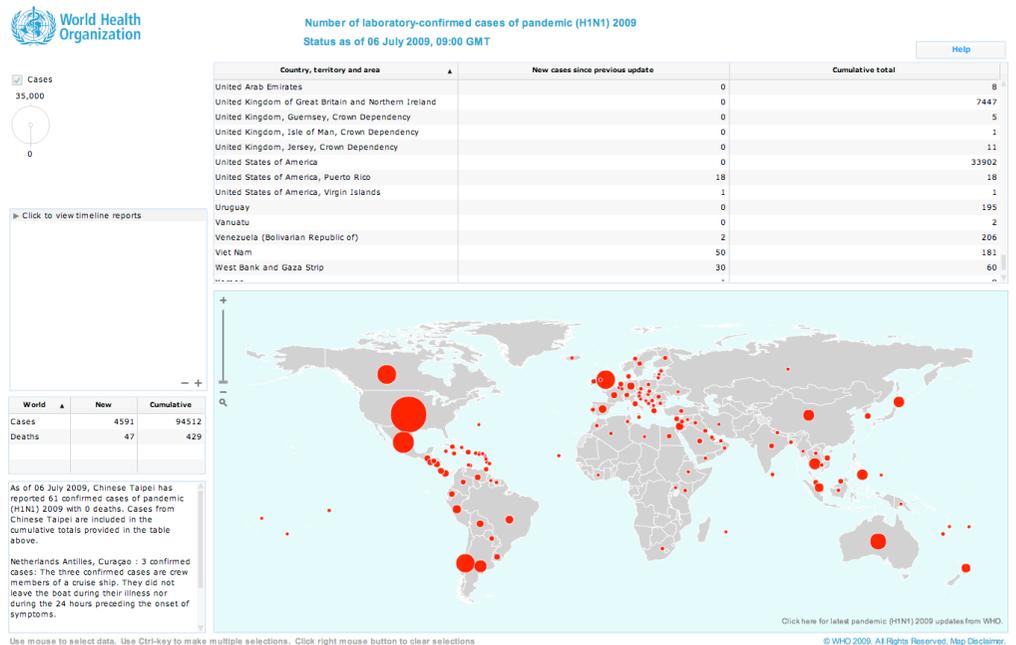
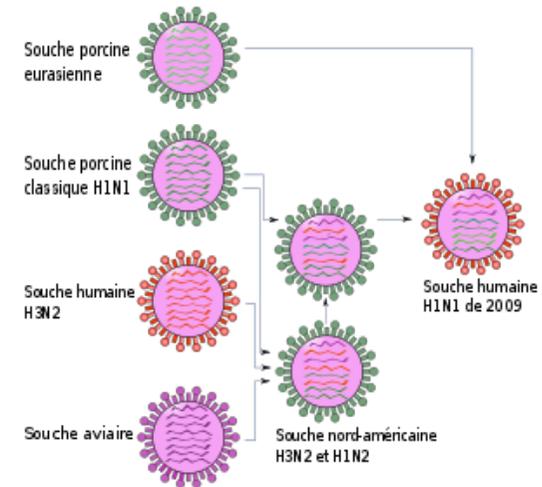
Cas de pandémie de grippe aviaire



Epidémies annuelles françaises: **virus A ou B ou A puis B:**
 1995/96: **H1N1: 47%, H3N2: 47%, B: 6%**
 1996/97: **H3N2: 85%, B: 15%**
 1998/99: **H3N2: 50%, B: 50%**
 1999/00: **H3N2: 99%, B: 1%**
 2000/01: **H1N1: 90%, B: 10%**

Nouvelle Grippe H1N1

- La nouvelle grippe A/H1N1 dite grippe « porcine » ou A(H1N1)2009 est une infection humaine par un virus grippal (H1N1) qui infecte habituellement les porcs.
- Virus différent de la souche H1N1 responsable de la grippe saisonnière
- Aucun vaccin disponible
- Les vaccins existants contre la grippe saisonnière ne confèrent pas de protection.
- Délai de 6 mois minimum



- **Développement RIH:**
 - RIH contre Ag protéique (thymo-dépendant) requiert T helper: **Coopération cellulaire**
 - Nécessite co-stimulation via CD40L
 - Induit CG, mutation somatique, commutation classe et B mémoire
 - CG: 90% meurent par sélection sur FDC , centrocytes sélectionnés donnent mem + Plasmoblastes
 - Différences quantitatives et qualitatives entre RIH I et RIH II
- **Action des AC:**
 - Agglutination (IgM)
 - Neutralisation Ag (IgG, vaccin, IgA)
 - Augmente phagocytose (IgG+M; opsonisation)
 - Activation du complément (IgG+M)
 - Renforce RIC : ADCC
- **RI antivirale, antibactérienne et anti-parasitaire**

Mécanismes de défense (schématisique)

	Phagocytose	Immunité humorale		Immunité cellulaire
	Polynucléaires et macrophages	Complément	Anticorps	Lymphocytes T
Bactéries				
- entérobactérie	+++	++	+++	-
- mycobactérie	-			+++
Champignons				
- <i>Candida/Aspergillus</i>	+++	-	-	++
- <i>Cryptococcus</i>	++	-	-	++
Parasites				
Protozoaires	+	+	+	+++
Virus			++	+++