

## 1.1.Introduction

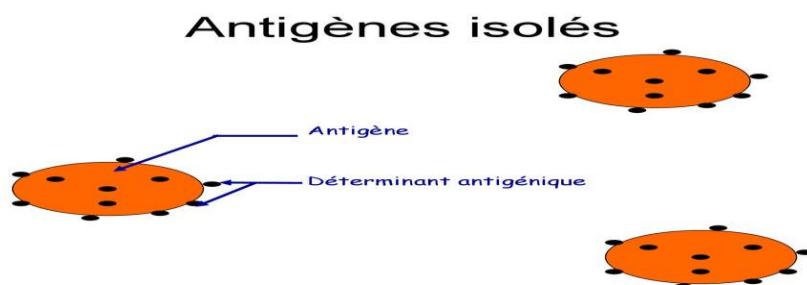
Le système immunitaire de l'homme comprend des centaines de milliards de cellules. On le compare parfois au système nerveux, parce qu'il est doté d'une mémoire et qu'il détecte des changements dans l'environnement et notamment l'intrusion des pathogènes à partir des zones superficielles : de la peau, des poumons, des intestins et des autres muqueuses. Ici pourtant, point de nerf, point d'axone, point de centre mais un immense réseau, un peu semblable aux réseaux de communication informatiques. Dans ses innombrables câblages, tout est affaire de mouvement. Des cellules migrent en tous sens par le sang ou par la lymphe. Elles établissent entre elles des contacts souvent fugaces. Ou encore elles échangent des signaux en sécrétant des molécules qui, en raison de leur demi-vie généralement brève, n'agissent qu'à courte distance. Toutes ces interactions font intervenir des molécules de structures complémentaires. Mais la spécificité du système immunitaire est fondée tout autant sur la complémentarité des structures que sur la dynamique des activations cellulaires : certains mécanismes de défense sont intrinsèquement dépourvus de spécificité, mais ils l'acquièrent en opérant au bon endroit et au bon moment.

## 1.2.Antigène

Les structures moléculaires reconnues par le système immunitaire adaptatif et les récepteurs de l'immunité innée sont conservés au fil de l'évolution, invariants au sein d'un même individu, et peu variables d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce. Ces récepteurs ont été sélectionnés au cours de l'évolution sur la reconnaissance de motifs moléculaires conservés au sein des micro-organismes. Les récepteurs de l'immunité adaptative, c'est-à-dire les récepteurs des lymphocytes B et T, ne sont pas encore déterminés à reconnaître un signal donné lors de leur génération (au début de la différentiation lymphocytaire). La partie dite constante de ces récepteurs est conservée entre les espèces et très similaire entre individus, alors que la partie dite variable est générée aléatoirement, ce qui confère aux lymphocytes, dans leur ensemble, la capacité à reconnaître une infinité de structures moléculaires, appelées antigènes.

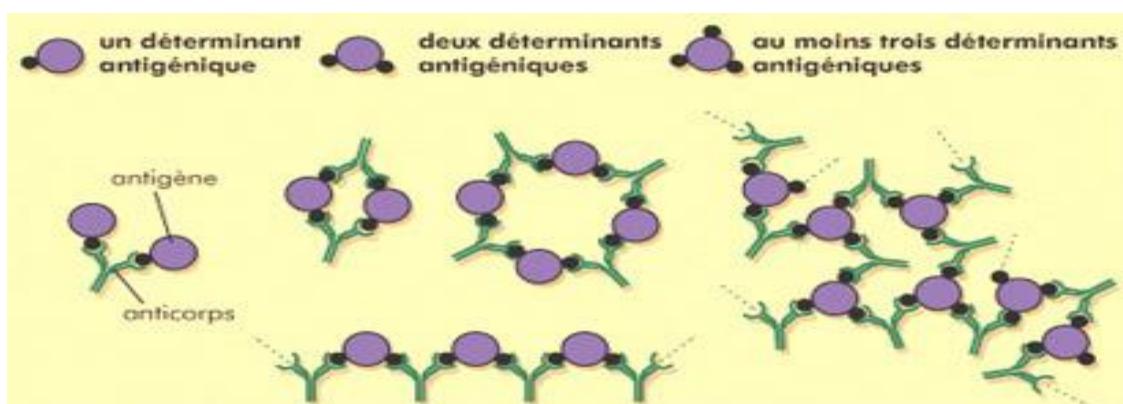
**A. Qu'est-ce qu'un antigène ?** Un antigène est une molécule de toute nature (organique ou non) pouvant être reconnue par un récepteur à l'antigène de l'immunité adaptative. Ces récepteurs sont de deux types : le récepteur à l'antigène des lymphocytes B (BCR, pour B-Cell Receptor) devenant anticorps lorsqu'il est sécrété, et le récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TCR, pour T-Cell Receptor). Nous produisons en réalité plusieurs millions de molécules différentes de chacun de ces deux types. La propriété de liaison

de l'antigène aux différents récepteurs lui confère son antigénicité (*Fig.01*). Alors que les BCR reconnaissent toutes formes d'antigènes, à l'état natif, les TCR ne reconnaissent que des antigènes protéiques sous forme peptidique, et lorsqu'ils sont associés aux molécules du Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Seuls les antigènes qui provoquent une réponse immunitaire adaptative sont qualifiés d'immunogènes. Certains antigènes sont caractérisés par des variations polymorphiques intra-espèces, on parle alors d'allo-antigène. Ces allo-antigènes jouent un rôle très important lors des greffes. Les antigènes peuvent également être produits par l'individu lui-même, on parle alors d'auto-antigène.



*Fig.01.* notion d'antigène

**B. Qu'est-ce qu'un épitope ?** Les anticorps, les BCR et les TCR ne reconnaissent pas les antigènes dans leur globalité. Ils reconnaissent une petite région de l'antigène qualifiée de site antigénique, déterminant antigénique ou encore épitope. La région de l'anticorps, du BCR ou du TCR reconnaissant l'épitope est appelée le paratope. Les antigènes portent généralement plusieurs épitopes différents. Le nombre d'épitopes identiques dans un antigène détermine la valence de cet antigène. Si le même épitope est représenté plusieurs fois, l'antigène est dit multivalent. On appelle «épitopes B» les épitopes reconnus par les anticorps ou les BCR, et «épitopes T» les épitopes reconnus par les TCR (*Fig.03*).



*Fig.03.* complexe immun

### 1.3. Antigénicité

L'antigénicité correspond à la capacité de liaison entre l'antigène et son anticorps spécifique. La reconnaissance entre l'antigène et l'anticorps implique une zone particulière de l'antigène appelé l'épitope (ou déterminant antigénique) qui se lie spécifiquement avec une zone particulière de l'anticorps appelé le paratope. Un antigène peut présenter un seul épitope (antigène monovalent) ou plusieurs épitopes (antigène multivalent) qui reconnaîtront chacun différents anticorps. De même, différents antigènes peuvent présenter le même épitope. La liaison entre l'épitope et le paratope est hautement spécifique. La reconnaissance entre ces deux zones repose sur leurs structures moléculaires et sur leurs configurations spatiales.

### 1.4. Immunogénicité

Un antigène est dit immunogène lorsqu'il est capable d'induire une réponse immunitaire dans l'organisme, avec une synthèse d'immunoglobulines spécifiques. Plus un antigène est immunogène, plus la réaction immunitaire sera intense.

L'immunogénicité de l'antigène varie selon : la nature chimique de l'antigène ; la taille de l'antigène (les haptènes sont des molécules antigènes dont la taille est trop faible pour être immunogènes) ; la quantité de l'antigène ; le nombre d'épitopes présents sur l'antigène ; l'origine de l'antigène (xénogéné) : plus l'antigène provient d'une espèce éloignée, plus l'immunogénicité est forte ; la voie d'entrée de l'antigène dans l'organisme et la présence simultanée d'autres antigènes qui favorise l'immunogénicité.

### 1.5. Utilisation des antigènes

La spécificité de la réaction entre l'antigène et l'anticorps est exploitée dans le domaine de la santé dans trois grands types d'applications :

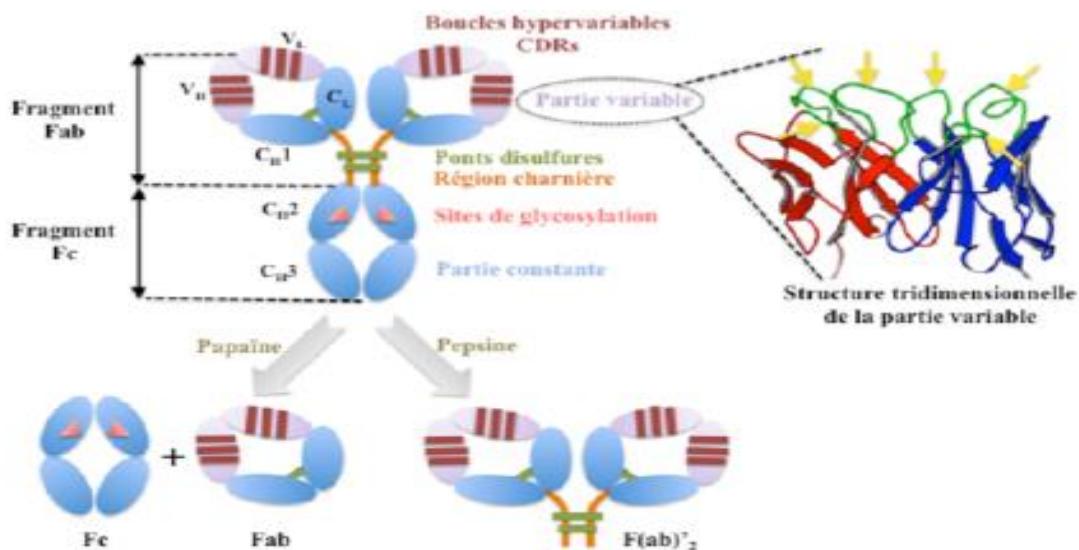
- le développement de méthodes d'analyses de laboratoire ;
- l'élaboration de vaccins ;
- le traitement de certaines pathologies comme les maladies auto-immunes ou le [cancer](#).

De nouvelles méthodes d'analyses utilisent la réaction entre l'antigène et l'anticorps pour mettre en évidence la présence d'anticorps dans l'organisme. Ainsi, il est possible de doser les anticorps synthétisés en réponse à certaines infections virales, bactériennes, parasitaires ou fongiques.

Ces analyses sont appelées des sérologies et permettent de diagnostiquer précisément certaines infections. De même la présence de certaines protéines dans le sang est mise en évidence grâce au principe des réactions antigènes-anticorps.

### 1.6. Anticorps : molécule d'immunoglobuline G (IgG)

La structure de l'Ac est importante pour la réaction immunitaire (*Fig.04*). Les deux principales propriétés des Ac, la spécificité et l'activité biologique. La molécule d'immunoglobuline G a la forme d'un « Y ». Cet « Y » se compose de quatre chaînes peptidiques. La liaison entre les quatre chaînes est telle que l'Ac présente deux moitiés identiques qui comprennent chacune une chaîne longue (lourde) et une chaîne courte (légère). Les quatre chaînes sont unies entre elles par des ponts bisulfures situés entre les unités de cystéine. Le tronc est appelé fragment Fc et les deux branches, fragments Fab. Ces fragments Fab contiennent une partie constante et une partie hypervariable qui est responsable de la liaison à l'Ag. Le fragment Fc peut être séparé du fragment Fab par réaction enzymatique sans que l'activité de fixation des différents fragments en soit perturbée.



**Fig.04.** structure schématique d'une immunoglobuline

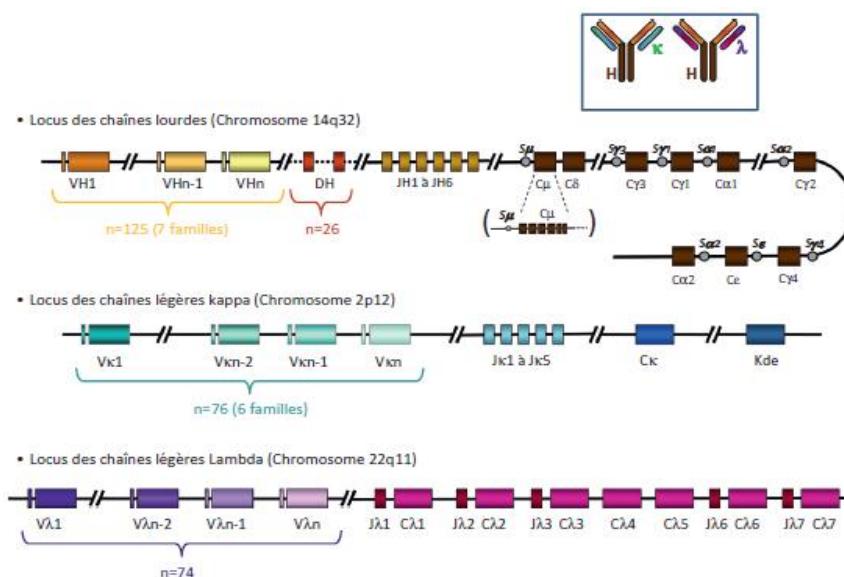
Les Ac ont des propriétés très individuelles et réagissent donc aussi très différemment aux influences du milieu. Ils sont cependant en général très stables. La plupart des Ac supportent des températures allant jusqu'à 56 °C pendant 30 min ou des baisses brèves du pH à 2. En respectant certains principes simples destinés à prévenir une dénaturation et une protéolyse (*dégradation des protéines*), il est possible de les stocker pendant une période prolongée sans grands dommages.

Les conséquences d'une dénaturation peuvent aller d'un dommage léger de la conformation jusqu'à une perte de la solubilité et une agrégation massive irréversible. Il faut éviter un réchauffement massif, un stockage prolongé à plus de 8 °C et des décongélation et congélations fréquentes. Les protéases responsables de la protéolyse des Ac peuvent provenir du sérum lui-même, mais aussi de micro-organismes ayant contaminé le sérum.

Le sérum contient lui-même un certain nombre d'inhibiteurs des protéases et peut normalement être stocké correctement à 4 °C pendant plusieurs mois sans perte notable de l'activité. Pour protéger les AS contre une protéolyse et une avarie bactérienne, on les conserve avec de l'azide de sodium (10 mM) ou du merthiolate (0,005 %), on les stocke par portions à une température inférieure à -20 °C (si possible à -70 °C) ou on les lyophilise. Il faut souvent s'accommoder d'une nette perte de l'activité lors de la lyophilisation. On peut éviter d'avoir aliquoter les AS en les conservant dans un tampon phosphate physiologique contenant 50 % de glycérine ou d'éthylène glycol, qui empêchent la congélation. Les Ac doivent être stockés dans la mesure du possible sous forme concentrée.

### 1.7. Expression des gènes d'immunoglobulines

La formation des chaînes lourdes et des chaînes légères des immunoglobulines résulte de l'association de plusieurs segments de gènes qui sont organisés en loci sur des chromosomes différents (*Fig.05*).



**Fig.05.** Organisation des gènes d'immunoglobulines

L'organisation des familles de gènes codant pour les chaînes légères  $\lambda$  sur le chromosome 22, pour les chaînes légères  $\kappa$  sur le chromosome 2 et pour les chaînes lourdes H sur le chromosome 14. Pour chaque locus, les gènes de variabilité sont notés V, les gènes de jonction J, les gènes des domaines constants C. Sur le chromosome 14, les gènes de diversité sont notés D. Le locus des gènes des chaînes lourdes (IGH) est situé sur le chromosome 14. Il comprend environ 165 segments regroupés en trois familles de gènes : 135 dits de variabilité (VH) dont seulement 45 environ sont fonctionnels, 26 de diversité (DH) et 8 de jonction (JH) dont 6 sont fonctionnels. La partie variable de la chaîne lourde résulte de la recombinaison au hasard entre un des gènes VH, un des gènes DH et un des gènes JH. Neuf gènes codent les régions constantes (CH) des 9 classes et sous-classes d'immunoglobulines.

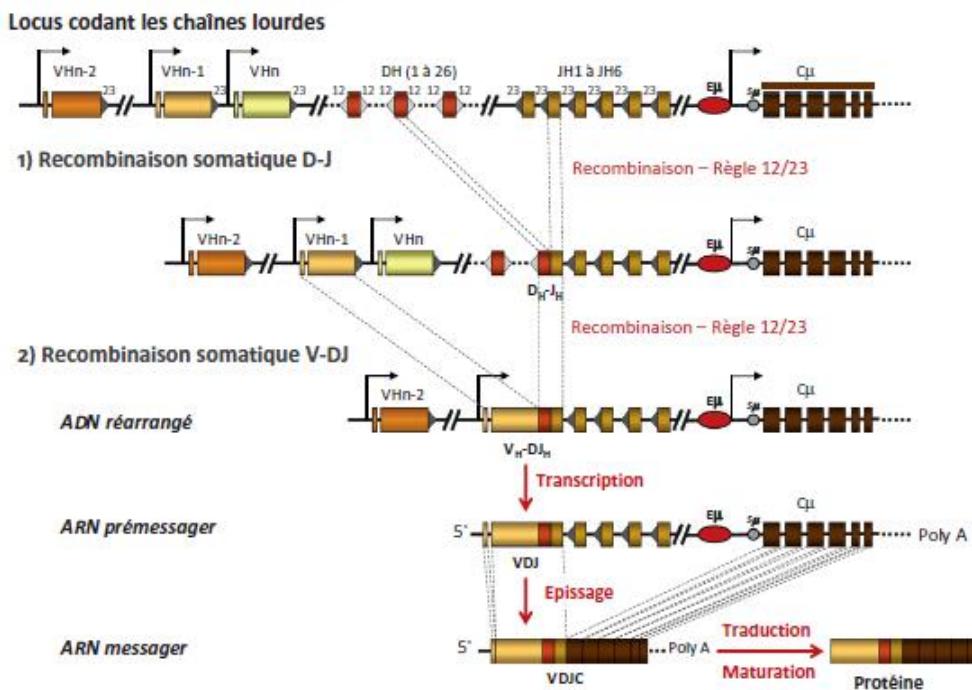
Dans l'ordre, sur le chromosome 14, on trouve les gènes des domaines constants des régions  $C\mu$ ,  $C\delta$ ,  $C\gamma 3$ ,  $C\gamma 1$ ,  $C\epsilon 2$ ,  $C\alpha 1$ ,  $C\gamma 2$ ,  $C\gamma 4$ ,  $C\epsilon 1$ ,  $C\alpha 2$ . Le gène  $C\epsilon 2$  est un pseudogène. Il y a deux loci pour les gènes des chaînes légères. Les gènes codant les chaînes légères  $\kappa$  sont situés sur le chromosome 2. Le locus IGK humain, en configuration germinale, comporte 76 segments  $V\kappa$  dont 31 à 35 fonctionnels, ainsi que 5 segments  $J\kappa$ . Les segments  $V\kappa$  et  $J\kappa$  codent la partie variable de la chaîne légère. Un seul segment  $C\kappa$  code pour la partie constante.

La recombinaison se fait au hasard entre un gène  $V\kappa$  et un gène  $J\kappa$ . Les gènes des chaînes légères  $\lambda$  sont situés sur le chromosome 22. Le locus IGL humain, en configuration germinale, comporte 74 segments  $V\lambda$  dont environ 30 fonctionnels, ainsi que 4 segments  $J\lambda$ . Il existe au moins 6 gènes  $C\lambda$  différents, chacun étant précédé d'un seul gène J qui lui est propre. Là encore, la recombinaison se fait au hasard entre l'un des gènes  $V\lambda$  et un gène  $J\lambda$ .

### 1.8. Génération de la diversité des immunoglobulines

Deux mécanismes différents assurent la diversité du BCR, respectivement la diversité combinatoire et la diversité jonctionnelle. Les étapes du réarrangement des gènes codant pour un domaine variable de chaîne lourde (VH) (*Fig.06*). Il se fait en trois étapes :

- Choix d'un gène DH et d'un gène JH ;
- Choix d'un gène VH ;
- Génération d'un ARN pré-messager (pré-ARNm) à partir de la séquence VDJ-domaine constant ainsi constituée sur le chromosome 14 réarrangé. La synthèse protéique d'une chaîne lourde  $\mu$  se fera après épissage de ce pré-ARNm.



**Fig.06.** Génération de la diversité des immunoglobulines.

### 1.9.Régulation de la différentiation lymphocytaire B

Le rôle des cytokines et des récepteurs de cytokine, les premières étapes du développement sont strictement dépendantes du micro-environnement particulier apporté par les cellules stromales de la moelle osseuse. Ces cellules stromales régulent la croissance, la maturation et la survie des précurseurs par l'intermédiaire de facteurs solubles (IL7, *Stem Cell Factor* ou SCF, SDF-1) et de contacts directs avec les cellules en développement.

Le rôle des facteurs de transcription au cours de la différentiation lymphocytaire, des facteurs de transcription, en se fixant sur différentes séquences promotrices et activatrices de gènes cibles, sont impliqués dans la quiescence, la survie et la mort des progéniteurs B, ainsi que dans l'induction de l'engagement des cellules dans une lignée spécifique. Un certain nombre de ces facteurs de transcription apparaissent ainsi fondamentaux : Ikaros, E2A, EBF, Pax5 et LF1.

### 2. Anticorps monoclonaux

La première utilisation des anticorps pour la thérapie remonte à 1890, lorsqu'Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato découvrirent que l'état d'immunité conféré par l'injection d'une faible dose de toxine diphtérique pouvait être communiqué à des individus naïfs par transfert de sérum. C'est ainsi que naissait la sérothérapie, qui fut une véritable révolution thérapeutique et médicale, encore utilisée aujourd'hui pour neutraliser des toxines suite à des infections bactériennes ou à des envenimations. L'activité neutralisante des antisérum fut rapidement

attribuée aux anticorps (un terme initialement utilisé par Paul Ehrlich en 1891), gamma globulines du sérum, dont la structure fut élucidée partiellement en 1950 par Rodney Porter. Parallèlement, en 1948, Astrid Fagraeus montra que des cellules B spécialisées, les plasmocytes, étaient responsables de la biosynthèse des anticorps *in vivo*. C'est dans ce contexte, qu'en 1975, César Milstein et Georges Köhler réussirent à développer une technique permettant de produire des anticorps *in vitro*, à partir de cellules hybrides résultant de la fusion entre des lymphocytes B murins et un myélome de la même espèce (*Fig.07*).

Chaque clone cellulaire hybride, une fois isolé, produit le même anticorps qui est donc qualifié de monoclonal. Grâce à cet ensemble d'avancées techniques, Köhler et Milstein ont donc réussi à fusionner des splénocytes provenant de souris immunisées avec un myélome murin déficient pour une enzyme nécessaire à la biosynthèse des nucléotides par la voie de sauvetage (opposée à la voie de novo), l'HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase). Cette déficience enzymatique permet de sélectionner facilement les cellules hybrides (ou hybridomes) grâce à un agent de sélection ajouté au milieu de culture, l'aminoptérine. Celle-ci bloque la seule voie de biosynthèse des nucléotides qu'il reste aux cellules myéloïdées non fusionnées (la voie de novo), permettant d'une part, d'induire la mort de ces cellules, et d'autre part, de sélectionner par complémentation génique les hybridomes issus de la fusion cellulaire. Le milieu de culture sélectif contient également de l'hypoxanthine qui assure la synthèse des bases puriques le temps que la complémentation se mette en place, et de la thymidine qui permet de compenser l'effet antagoniste indésirable de l'aminoptérine sur la thymidylate synthase.

Le milieu sélectif est communément appelé milieu « HAT » pour Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine. Les lymphocytes B non fusionnés vont, quant à eux, disparaître au bout de quelques jours puisqu'ils sont incapables de se multiplier *in vitro*. Les hybridomes ainsi sélectionnés ont donc : (1) la capacité de se multiplier indéfiniment, (2) la capacité de sécréter des anticorps. L'obtention de clones uniques sécrétant des anticorps monoclonaux spécifiques pour la cible nécessite des étapes supplémentaires de dilutions limites pour atteindre un stade clonal, et de criblage pour vérifier la liaison spécifique à l'antigène.



**Fig. 07.** Production des anticorps monoclonaux d'après Köhler et Milstein.

Depuis 1975, la découverte de Köhler et Milstein a largement été utilisée pour générer des anticorps monoclonaux utilisés en recherche, pour le diagnostic médical et pour la thérapie de diverses pathologies. En 1986, le premier anticorps monoclonal thérapeutique murin est accepté par la FDA (Food and Drug Administration). Cet anticorps, le muromonab (Orthoclone OKT3™), est dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T et s'est révélé efficace pour limiter les réactions inflammatoires à l'origine des rejets lors des transplantations d'organes.