

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université Dr MOULAY Tahar SAIDA
Faculté des sciences
Département de biologie



Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et
Valorisation Biologique des Plantes

POLYCOPIE

Cours d'immunologie générale

Elaboré par:

Dr. HOUAMRIA Moufida

Ce fascicule est destiné aux étudiants de biologie **2^{ème} année licence**
Sciences de la nature et de la vie

Année Universitaire **2019-2020**

Contenu de la matière

Cours 1 : Introduction à l'immunologie

1. Mécanisme de défense non spécifique (innée).....	6
1.1. Première ligne de défense.....	6
1.1.1. La peau.....	6
1.1.2. Les muqueuses.....	7
1.2. Deuxième ligne de défense.....	7
1.2.1. Phagocytose.....	7
1.2.2. Protéines antimicrobiennes.....	8
1.2.3. La réaction inflammatoire.....	8
2. Mécanisme de défense spécifique : troisième ligne de défense.....	9
2.1. Généralités.....	9
2.2. Les deux réponses immunitaires.....	10
2.2.1. Réaction immunitaire humorale.....	10
2.2.2. Réaction immunitaire cellulaire.....	10

Cours 2: Organes et Cellules de l'immunité

1. Introduction.....	12
2. Organes lymphoïdes centraux.....	12
2.1. La moelle osseuse.....	12
2.2. La bourse de Fabricius.....	13
2.3. Le thymus.....	14
3. Organes lymphoïdes secondaires.....	17
3.1. Les ganglions lymphatiques.....	17
3.2. La rate.....	18
3.3. Tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.....	19
3.3.1. Les amygdales.....	19
3.3.2. Les plaques de Peyer.....	20
4. La circulation lymphatique.....	21
5. Les cellules de l'immunité.....	22
5.1. Cellules de l'immunité innée.....	23
5.1.1. Les phagocytes.....	23
5.1.2. Le mastocyte.....	24
5.1.3. La cellule NK (Natural Killer).....	24

5.2. Cellules de l'immunité adaptative.....	26
5.2.1. Le lymphocyte B.....	26
5.2.2. Le lymphocyte T.....	26

Cours 3. Antigènes et Anticorps

1. Antigènes.....	28
1.1. Définition.....	28
1.2. Propriétés de l'immunogène.....	28
1.2.1. L'origine.....	28
1.2.2. La taille (poids moléculaire).....	29
1.2.3. Nature et complexité chimique.....	29
1.2.4. Autre facteurs d'immunogénicité.....	29
1.3. Antigènes T-indépendants ou T-dépendants.....	30
1.4. Les épitopes (déterminants antigéniques).....	31
2. Anticorps.....	32
2.1. Définition.....	32
2.2. Structure d'un anticorps.....	32
2.3. Les fonctions d'anticorps.....	34
2.4. Caractéristiques de différentes classes d'immunoglobulines.....	36
2.5. Réaction Ag-Ac.....	37
2.6. Conséquences de la fixation primaire.....	38

Cours 4. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

1. Introduction.....	39
2. Propriétés génétiques du complexe majeur d'histocompatibilité.....	40
3. Molécules de CMH de classe I.....	40
3.1. Structure.....	40
3.2. Distribution cellulaire et fonctions.....	41
4. Molécules de CMH de classe II.....	41
4.1. Structure.....	41
4.2. Distribution cellulaire et fonctions.....	41
5. Chargement des peptides au sein des molécules de CMH.....	42
5.1. Les molécules CMH de classe I (voie endogène).....	42
5.2. Les molécules CMH de classe II (voie exogène).....	43

Cours 5. Le complément

1. Définition.....	44
2. Activation du complément.....	44
2.1. La voie classique.....	44
2.2. La voie alterne.....	44
2.3. Les fonctions des facteurs du complément.....	45
3. Effets biologiques du complément.....	45
3.1. Initiation de la réaction inflammatoire.....	45
3.2. Opsonisation.....	45
3.3. La cytolyse.....	46

Cours 6. La réponse immunitaire acquise (adaptative)

1. Introduction.....	48
2. La réponse adaptative humorale.....	49
3. La réponse adaptative cytotoxique.....	51

Cours 7. Les principaux tests en immunologie

1. Introduction.....	54
2. Classification des réactions Ag-AC utilisés dans les dosages immunologique.....	54
2.1. Tests directs (réactions primaires).....	54
2.1.1. Techniques utilisant un marqueur radioactif : RIA (RadioImmuno Assay).....	54
2.1.2. Les techniques utilisant un traceur enzymatique : ELISA ou EIA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	55
2.1.3 Techniques d'immunofluorescence.....	60
2.1.3.1. L'immunofluorescence directe.....	61
2.1.3.2. L'immunofluorescence indirecte.....	62
2.2. Tests indirects (réactions secondaires).....	63
2.2.1 Méthodes d'agglutination.....	63
2.2.2. Méthodes de précipitation.....	64
2.2.2.1. Précipitation en milieu liquide	65
2.2.2.2. Précipitation en milieu solide.....	66
2.2.2.3. Méthodes associées à l'électrophorèse.....	69

PRÉFACE

CE POLYCOPIÉ EST UN SUPPORT PÉDAGOGIQUE POUR UNE MEILLEURE COMPRÉHENSION DE L'IMMUNOLOGIE GÉNÉRALE. IL PRÉSENTE UN ENSEMBLE DE COURS DESTINÉS AUX ÉTUDIANTS DU TRONC COMMUN DE BIOLOGIE DEUXIÈME ANNÉE LMD. IL RÉPOND À LEURS ATTENTES DANS LA MESURE OÙ IL MET À LEUR DISPOSITION UN RÉCAPITULATIF GLOBAL ET EXPLICITE EN IMMUNOLOGIE, CLAIREMENT ILLUSTRÉ. LE CONTENU DU DOCUMENT EST ÉLABORÉ SELON LE PROGRAMME OFFICIEL DU MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

Cours 1. Introduction à l'immunologie

L'immunité est l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme de :

- Reconnaitre et de tolérer le soi
- Reconnaitre et de rejeter le non soi (substances étrangères, agents infectieux, ses propres constituants altérés...)

Le système immunitaire est l'ensemble de cellules, organes et de molécules, un organisme animal possède deux systèmes de défense :

- Un système non spécifique (naturelle ou innée), c-à-d qui ne différencie pas les agents pathogènes les un des autres.
- Un système spécifique (acquise ou adaptative) : le système immunitaire qui réagit spécifiquement à chaque type d'envahisseur.

1. Mécanisme de défense non spécifique (innée)

La réponse immunitaire innée est induite par un **signal de danger** émis suite à l'interaction spécifique entre des récepteurs du soi appelés **PRR** (pour «*Pattern Recognition Receptors*») ces récepteurs sont exprimés au niveau de différentes cellules de l'organisme et des molécules du non-soi appelées **PAMP** (pour «*Pathogen Associated Molecular Patterns*») présent au niveau des micro-organismes qu'ils soient pathogènes ou non.

1.1. Première ligne de défense

1.1.1. La peau

Une peau intacte est normalement une barrière infranchissable pour les bactéries et les virus elle joue un rôle de :

- **Barrière physique** : les cellules épithéliales sont jointes par des jonctions serrées bloquant ainsi l'entrée des microorganismes grâce à une faible perméabilité et à la desquamation de la peau.
- **Barrière chimique** : des composés chimiques ayant des activités microbicides ou limitant la croissance et la division des microorganismes sont présent à la surface de nombreux épithéliums. Ils regroupent :
 - les sécrétions acide des glandes sébacées (sébum \equiv acides gras) et sudoripares (sueur)

- les enzymes à activité antibactérienne comme les lysozymes (salive, larme,..)
- **Barrière biologique** : les épithéliums présentent une flore bactérienne commensale qui entre en compétition avec les agents pathogènes. De plus certains types de bactéries commensales secrètent des peptides bactéricides afin de limiter la prolifération des bactéries commensales elles même, ou des bactéries pathogènes ex : la flore intestinale.

1.1.2. Les muqueuses

Un épithélium cilié tapisse les voies digestives, respiratoire et uro-génitale et élimine mécaniquement les agents pathogènes. De plus il secrète un liquide visqueux « le mucus » qui retient les microorganismes qui s'y collent et les empêchent de pénétrer dans l'organisme.

1.2. Deuxième ligne de défense

1.2.1. Phagocytose

C'est l'ingestion de particules étrangères par certains types de leucocytes (globules blancs) appelés **phagocytes**. La phagocytose se déroule en plusieurs étapes :

- L'adhérence : correspond à la reconnaissance des récepteurs spécifiques à la surface de la bactérie par des récepteurs de la membrane plasmique des phagocytes.
- Formation des pseudopodes (expansion cytoplasmiques) entourant la bactérie.
- Formation d'une vacuole dans laquelle se trouve la bactérie appelé **le phagosome**.
- Digestion de la bactérie par infusion du phagosome avec des lysosomes, formant ainsi le phagolysosome.
- Exocytose des débris bactériens.

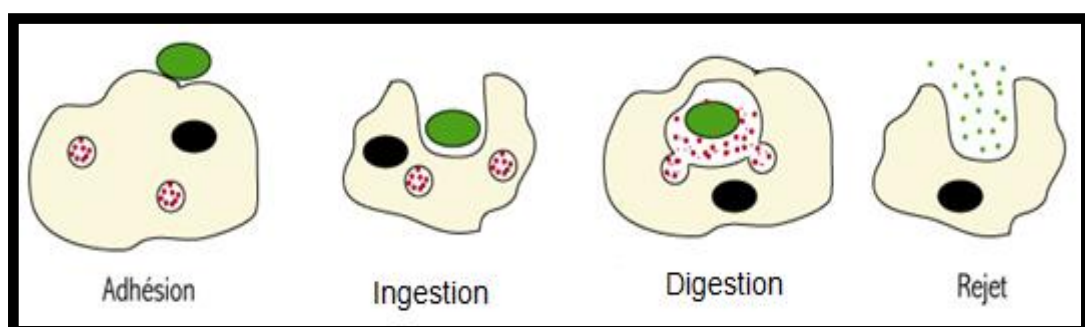


Figure1. Les différentes étapes de la phagocytose

1.2.2. Protéines antimicrobiennes

Divers protéines contribuent à la défense non spécifique en attaquant directement les microorganismes. Parmi ces protéines sont les protéines du **complément**. C'est un ensemble de protéines qui agissent ensemble dans une cascade d'activation qui se termine par la lyse des bactéries. Comme ils peuvent faciliter la phagocytose.

1.2.3. La réaction inflammatoire

La lésion cellulaire causée par une blessure ou la pénétration de microorganisme déclenche une réaction inflammatoire : De petits vaisseaux sanguins entourant la blessure se dilatent (**vasodilatation**). L'apport sanguin vers la région lésée augmente. Celle-ci devient rouge et chaude. De plus, les vaisseaux sanguins sont plus perméables : du liquide s'en échappe : il y a formation d'un œdème.

Le déclenchement et le déroulement de la réaction inflammatoire dépendent de médiateurs chimiques appelés les cytokines (petites protéines produites par la plupart des cellules de l'organisme). Ils activent d'autres cellules comme les mastocytes et les plaquettes et permettent le recrutement des cellules phagocytaires vers les tissus lésés. Ceux-ci phagocytent les agents pathogènes et les débris cellulaires.

- Les cytokines **pro-inflammatoires** : TNF- α , interleukines IL1, IL6, IL12, IL18
- Les substances **vasodilatatrices** : monoxyde d'azote (NO), Histamine, prostaglandine...
- Les cytokines **anti-inflammatoires** : TNF- β , interleukines IL10 jouant un rôle de régulation de la réaction inflammatoire.

Remarque : le pus est formé de cellules mortes et du liquide qui a fui capillaires

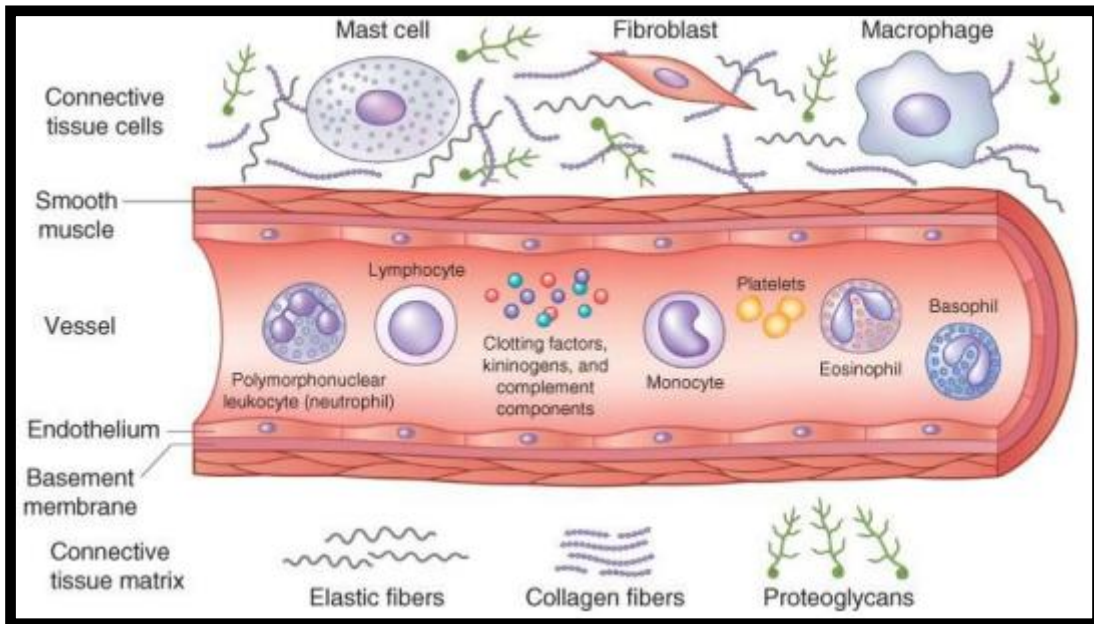


Figure 2. Les cellules impliquées dans la réaction inflammatoire

2. Mécanisme de défense spécifique : troisième ligne de défense

2.1. Généralités

Le système immunitaire spécifique possède quatre grandes caractéristiques :

- **La spécificité** : la capacité du système immunitaire de reconnaître et d'éliminer certains microorganismes ou molécules étrangères. L'antigène est une substance étrangère qui provoque une réaction immunitaire, c-à-d la production de lymphocytes spécialisés et de protéines spécifiques (anticorps). A un antigène donné correspond un anticorps donné : chaque réaction du système immunitaire spécifique prend pour cible un agresseur spécifique et un seul.
- **La diversité** : la capacité du système immunitaire de réagir contre des millions de types d'agresseurs, en reconnaissant chacun d'eux à ses marqueurs antigéniques. Cela est dû au fait que le système immunitaire possède une variété considérable de populations lymphocytaires, dont chacune peut combattre un antigène particulier.
- **La reconnaissance du soi et du non-soi** : la capacité du système immunitaire de faire la distinction entre les molécules de l'organisme (le soi) et les molécules étrangères (le non-soi).
- **La mémoire** : la capacité du système immunitaire de se rappeler les antigènes qu'il a déjà rencontrés et d'y réagir proprement et efficacement lors d'exposition ultérieures. C'est l'immunité acquise.

Il existe deux types de réactions immunitaires :

- celle où l'immunité est acquise via le sérum : l'immunité humorale qui entraîne la production d'anticorps, qui circulent dans le plasma sanguin.
- celle où l'immunité est acquise via les cellules : l'immunité à médiation cellulaire qui repose sur l'action directe des lymphocytes.

Qui agit sur quoi :

AC circulant	Toxines, bactérie libre, virus dans les liquides biologiques
Lymphocytes	-bactérie et virus dans les cellules de l'hôte -mycètes, protozoaires, vers -cellules cancéreuses, greffes

2.2. Les deux réponses immunitaires

2.2.1. Réaction immunitaire humorale

C'est la réaction qui se produit lorsque des lymphocytes B possédant des récepteurs spécifiques sont stimulés par un antigène et se différencient en clone de plasmocytes qui commence à sécréter des anticorps. Ceux-ci sont efficaces contre les agents pathogènes circulant dans le sang et la lymphe. De plus, l'activation sélective des lymphocytes B dote l'organisme de cellule mémoires à durée de vie prolongée qui interviennent dans la réponse immunitaire secondaire.

2.2.2. Réaction immunitaire cellulaire

L'action est orientée vers les cellules de l'organisme qui sont infectées par le virus ou les bactéries et les cellules cancéreuses. L'action est réalisée par les lymphocytes T. On distingue deux familles de lymphocytes T : les lymphocytes T cytotoxique (LTc) qui reconnaissent les cellules infectées grâce à leurs récepteurs qui testent la surface des autres cellules ; Toute cellule infecté présentera des récepteurs en surface différent de ceux du soi et seront détruites et les lymphocytes *T_{Helper}* (LTh) qui interagissent avec les macrophages et produisent des molécules, les cytokines (interleukines) provoquant la prolifération des lymphocyte LTc et B et ainsi une forte réponse immunitaire.

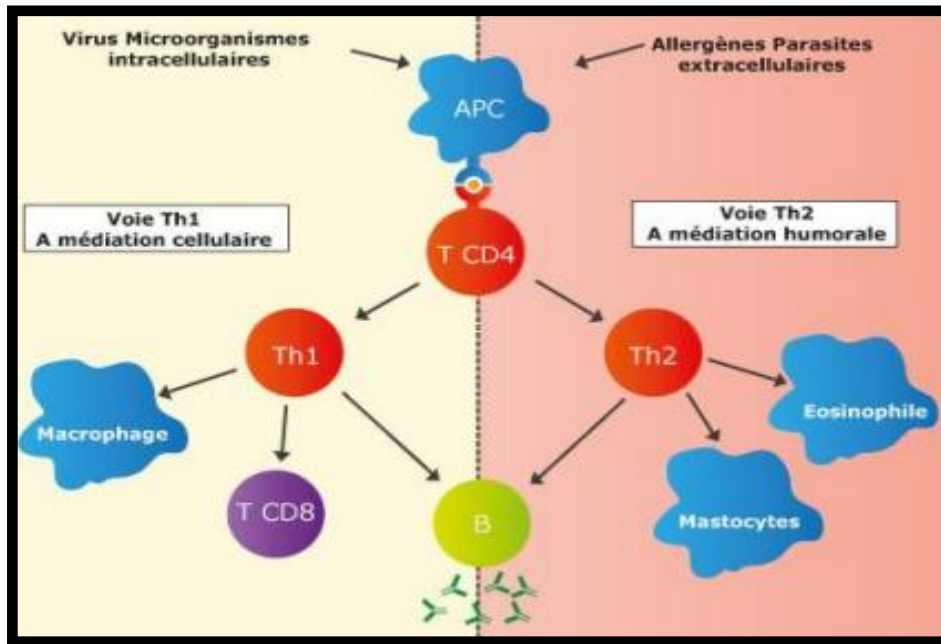


Figure 3. Les réactions immunitaires humorale et cellulaire

Conclusion :

C'est grâce au lymphocyte que le système immunitaire spécifique peut différencier entre le soi et le non soi ; cette reconnaissance est assurée par des récepteurs membranaires (BCR) et (TCR) et il est complété par un mécanisme de mémorisation qui munis l'organisme d'un état protecteur contre la réinfection par le même pathogène.

Cours 2. Organes et Cellules de l'immunité

1. Introduction

On distingue deux catégories d'organes lymphoïdes : les organes lymphoïdes **primaires** ou **centraux** et les organes lymphoïdes **secondaires** ou **périphériques**. Les organes lymphoïdes primaires sont chez les mammifères la **moelle osseuse**, siège de la lymphopoïèse et de la maturation des lymphocytes B, et le **thymus**, siège de la maturation des lymphocytes T. Chez les oiseaux il faut y ajouter un organe particulier, la **bourse de Fabricius**, au sein de laquelle s'accomplit la maturation de la lignée B et dont l'équivalent chez les mammifères serait la moelle osseuse. Les organes lymphoïdes secondaires sont les **ganglions lymphatiques**, la **rate**, les **tissus lymphoïdes associés aux muqueuses**.

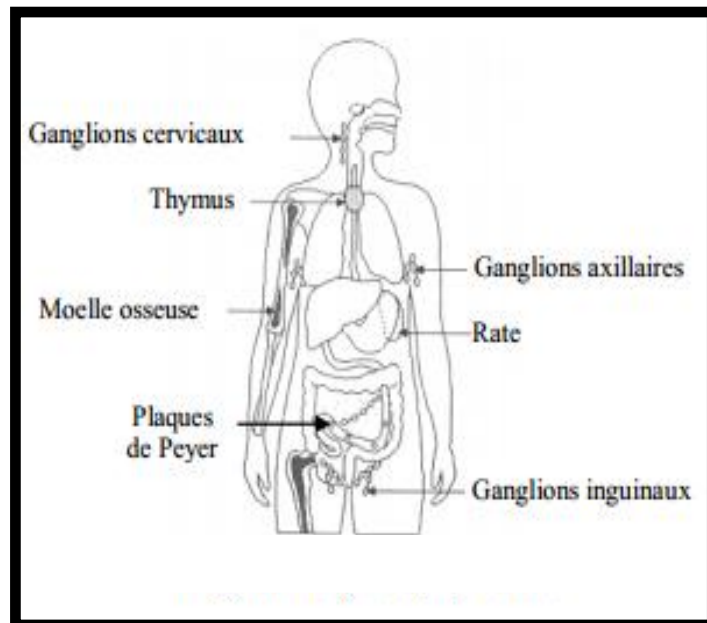


Figure 4. Les organes lymphoïdes

2. Organes lymphoïdes centraux

2.1. La moelle osseuse

La moelle osseuse dérive du mésenchyme. Elle occupe l'espace libre à l'intérieur des os. On y distingue une moelle rouge, active, hématopoïétique, et une moelle jaune, inactive, grasseuse. Elle contient deux sortes de cellules spécifiques, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les cellules du stroma médullaire

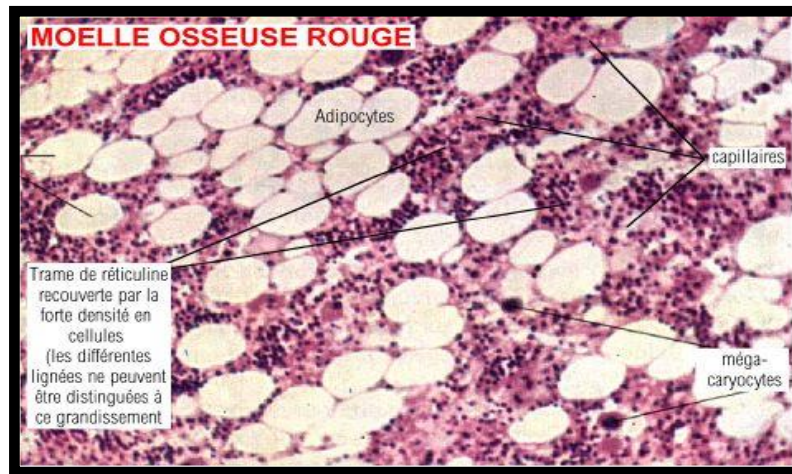


Figure 5. Histologie de la moelle osseuse

Les CSH sont des cellules multipotentes qui ont la capacité de se différencier en chacun des types de cellules sanguines (érythrocytes, leucocytes ou thrombocytes). Alors que les cellules stromales constituent un tissu de soutien permettant la multiplication et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

La moelle osseuse a donc, chez l'homme, trois fonctions :

- elle agit comme organe **hématopoïétique** (*production des cellules sanguines*).
- elle constitue le lieu d'ontogénèse et de maturation des lymphocytes B.
- elle héberge une partie des lymphocytes B activés par l'antigène en périphérie qui se transforme en plasmocytes sécrétant d'anticorps.

2.2. La bourse de Fabricius

Chez les oiseaux les extrémités distales des tubes digestif et génito-urinaire fusionnent en une chambre commune appelée cloaque. L'anatomiste italien FABRICIUS (1537-1619) y a décrit une petite formation qui y est annexée, et porte désormais son nom, la **bourse de FABRICIUS**. La bourse de FABRICIUS est l'organe lymphoïde primaire de maturation des lymphocytes B et c'est l'équivalent de la moelle osseuse chez les mammifères.

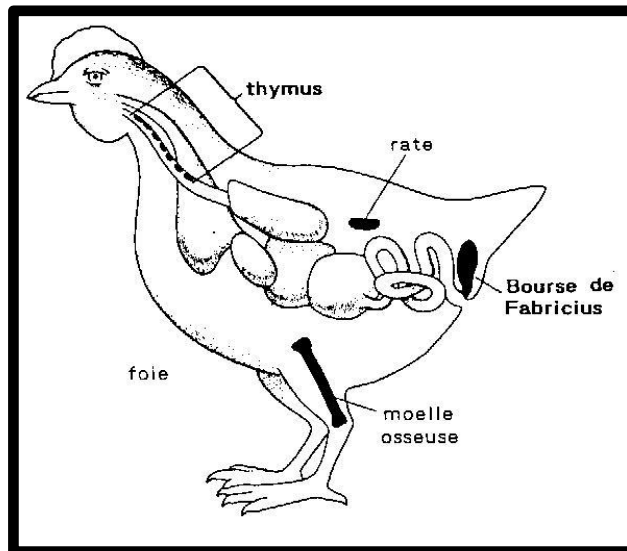


Figure 6. Bourse de Fabricius

2.3. Le thymus

Le thymus est un organe lymphoépithélial volumineux, d'environ une 20^{ème} de grammes chez l'adulte de 30 ans, son poids maximum est atteint chez l'adolescent puis on observe une involution très progressive avec l'âge. Il se situe à proximité de la région cardiaque dans la partie thorax.

a. Anatomie et rôle

Le thymus est un organe bilobé, chaque lobe est divisé en de nombreux lobules. Chaque lobule comprend une partie périphérique, le **cortex** plus sombre, et une partie interne plus claire, la **médullaire**. Il est formé de **cellules épithéliales** (produisant les cytokines impliqués dans la maturation des lymphocytes T) et de **thymocytes**. Le cortex est très riche en thymocytes que la médullaire. Au cours de leur passage dans le thymus, les thymocytes immatures reçoivent de leur environnement un ensemble de signaux qui assurent leur développement et leur différenciation du cortex vers la médullaire. Au terme de cette maturation les thymocytes matures vont partir vers les organes effecteurs. Les autres cellules retrouvées dans le thymus sont toutes originaires de la moelle osseuse: **précurseurs des thymocytes, macrophages et cellules dendritiques**. Il joue un rôle primordial dans la maturation des lymphocytes T.

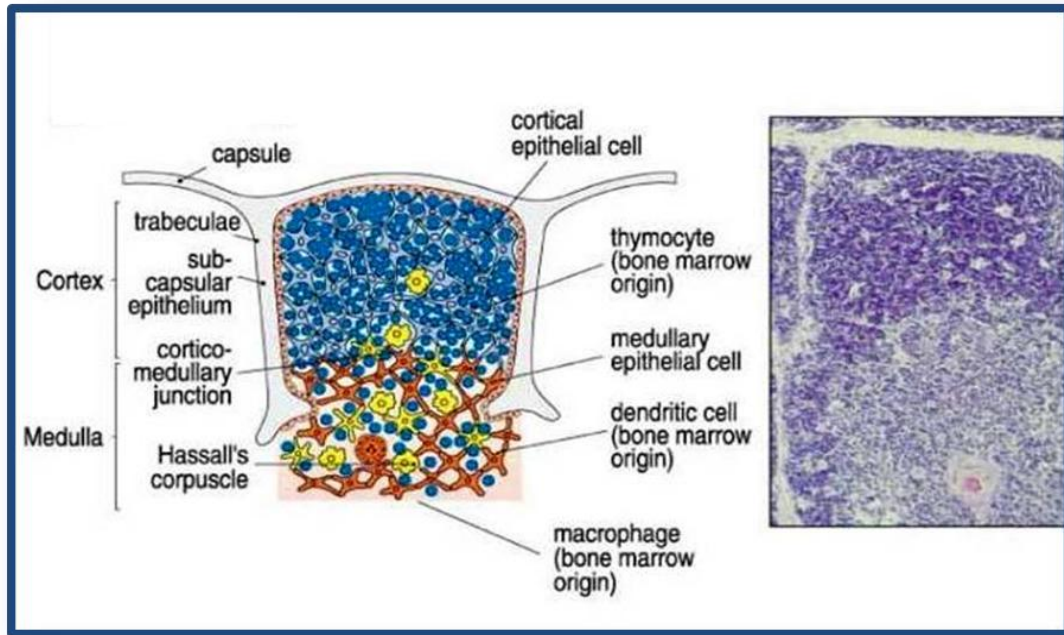


Figure 7. Histologie du thymus

b. La sélection thymique

Les thymocytes en voie de développement aient commencé à exprimer des récepteurs, ils sont soumis à un processus de sélection en 2 étapes:

b.1. Sélection positive

Ne permet la survie que des cellules T dont les TCR reconnaissent les CMH du soi. Cette sélection positive s'effectue dans la région corticale du thymus. Elle implique l'interaction des thymocytes immatures double-positifs ($CD4^+$, $CD8^+$) et les cellules épithéliales corticales.

Le TCR doit reconnaître les molécules du CMH pour survivre

- **Reconnaissance** d'une molécule du **CMHI** : devient **TCD8+**
- **Reconnaissance** d'une molécule du **CMHII** : devient **TCD4+**

Pas de reconnaissance CMH classe I ni II: apoptose et élimination par macrophage du cortex (>95% total)

b.2. Sélection négative

Les LT ne doit pas reconnaître l'antigène du soi. Les LT dont le TCR reconnaît les complexes CMH-Ag présentés par les macrophages ou cellules dendritiques meurent par apoptose.

Au terme de la sélection thymique, seuls 5% environ, des thymocytes seront exportés vers la périphérie. Ces processus créent un répertoire principal autotolérant des lymphocytes T.

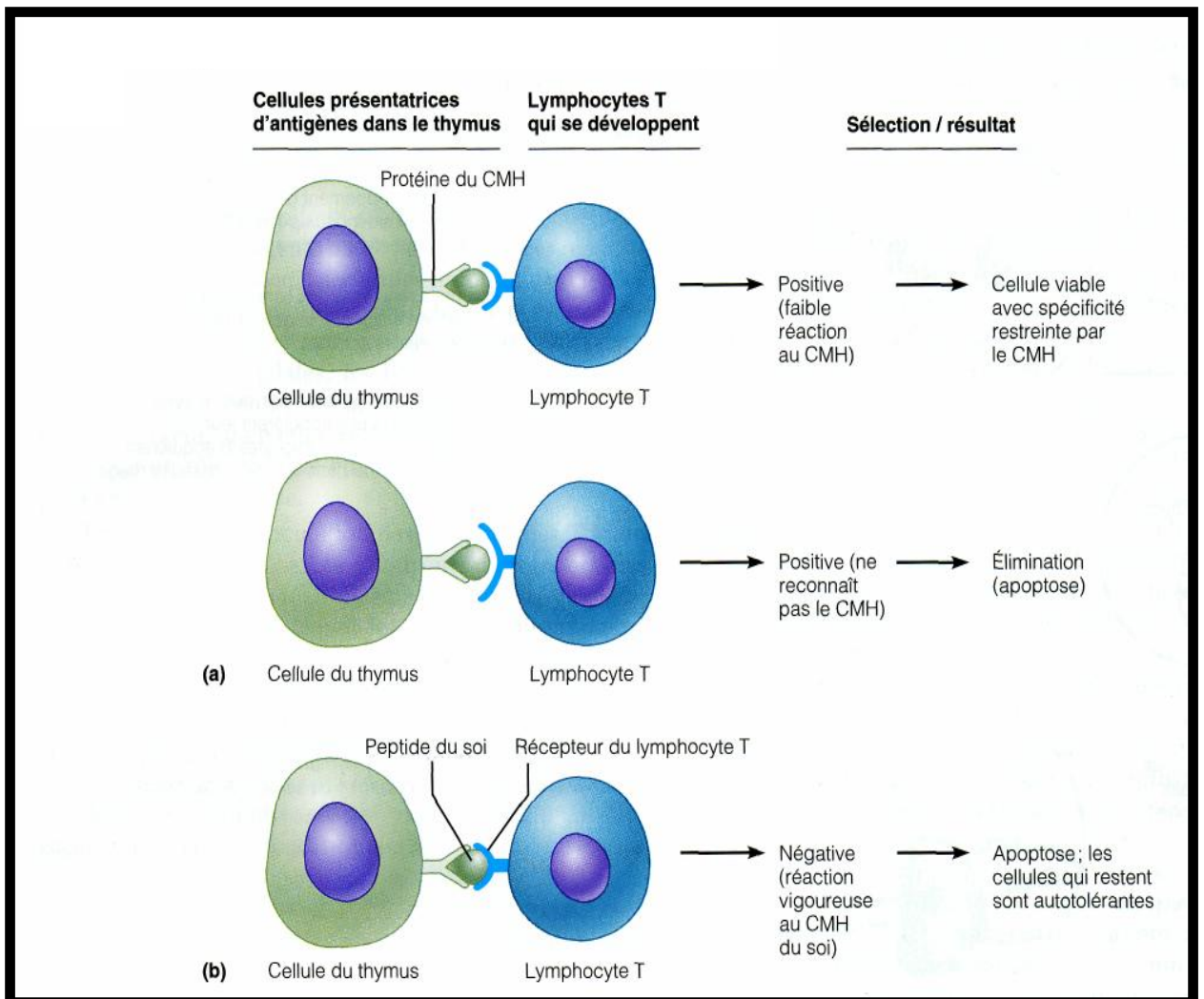


Figure 8. Schéma de la sélection positive et la sélection négative dans le thymus.

3. Organes lymphoïdes secondaires

3.1. Les ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont répartis dans tout l'organisme, le plus souvent groupés en aires ganglionnaires. Ils sont entourés d'une capsule fibreuse conjonctive, percée de vaisseaux lymphatiques afférents qui déversent la lymphe au niveau de sinus, au niveau desquels la lymphe traverse ensuite tout le ganglion pour finalement ressortir par le vaisseau lymphatique efférent au niveau du hile. Les ganglions jouent un rôle principal dans la réponse immunitaire car ils sont le lieu de prolifération et de différenciation des cellules immunitaires, et également car ils jouent le rôle de filtre de la circulation lymphatique (cellules cancéreuses, cellules présentatrice d'antigène).

Les ganglions présentes 3 régions : le cortex, le paracortex, et la médulla (Fig. 9).

- **Le cortex** correspond à la partie la plus externe comportant les follicules lymphoïdes de deux types qui sont tous deux caractérisés par la présence de **lymphocyte B**

Les **follicules lymphoïdes primaires** au niveau desquels on observe une multiplication accrue de ces lymphocytes B.

Les **follicules lymphoïdes secondaires** résultent de la transformation du follicule primaire quelques jours après un stimulus antigénique et comporte alors un centre germinatif au niveau desquels la réaction immunitaire est en train de se produire.

- **Le paracortex** correspond à des nappes lymphoïdes entourant le cortex et caractérisé par la présence de **lymphocyte T**, de **cellules dendritiques** ainsi que de veinules post-capillaires cubiques que l'on appelle **HEV**. C'est dans cette zone que les LT et LB passent du sang dans les ganglions, et c'est là que se produisent les interactions entre les LT et les cellules dendritiques, ainsi qu'entre les LT et les LB.
- **La médulla** est la partie la plus interne des ganglions, correspondant à des cordons médullaires et contenant surtout des macrophages, des plasmocytes et des LB mémoires.

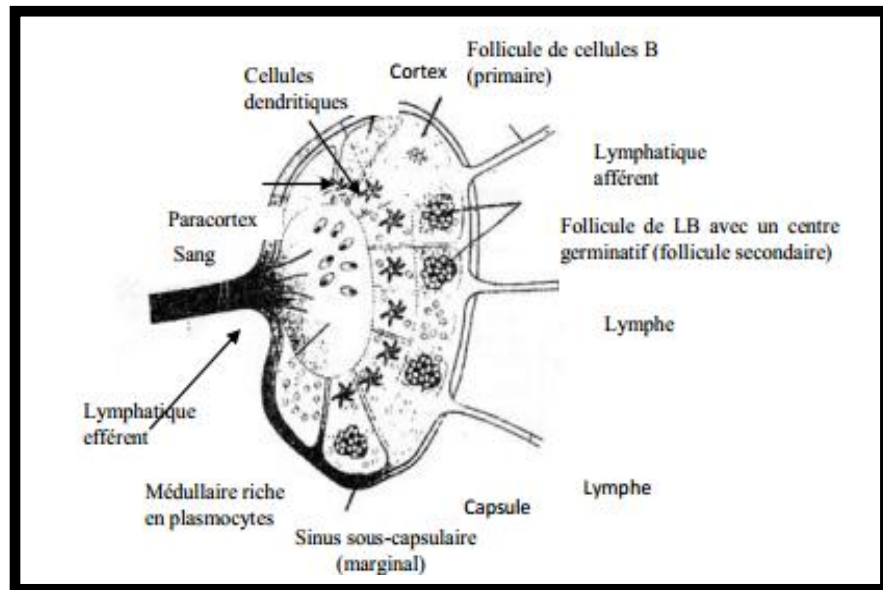


Figure 9. Structure d'un ganglion lymphatique

3.2. La rate

La rate est un organe abdominal intra-péritonéal, situé dans l'hypochondre gauche. Elle n'est **pas branchée sur la circulation lymphatique**, mais sur la circulation sanguine. On y distingue :

- **La pulpe rouge** : est directement localisée sous la capsule, elle est constituée d'un réseau de sinus veineux peuplés de **macrophages** et de globules rouges. C'est le site de **destruction des hématies sénescents**.
- **La pulpe blanche** : entourant les branches de l'artère splénique, formant ainsi un manchon lymphoïde péri-artériolaire, peuplé essentiellement de **LT**.
- **La zone marginale** : sépare la pulpe rouge de la pulpe blanche et contenant des **LB** organisés en follicules primaires.

La fonction de la rate est double : c'est un lieu de rencontre de l'Ag et les **cellules immunocompétentes** et un **filtre** important qui élimine, grâce à ses macrophages, les particules étrangères et les éléments figurés sénescents, principalement les globules rouges.

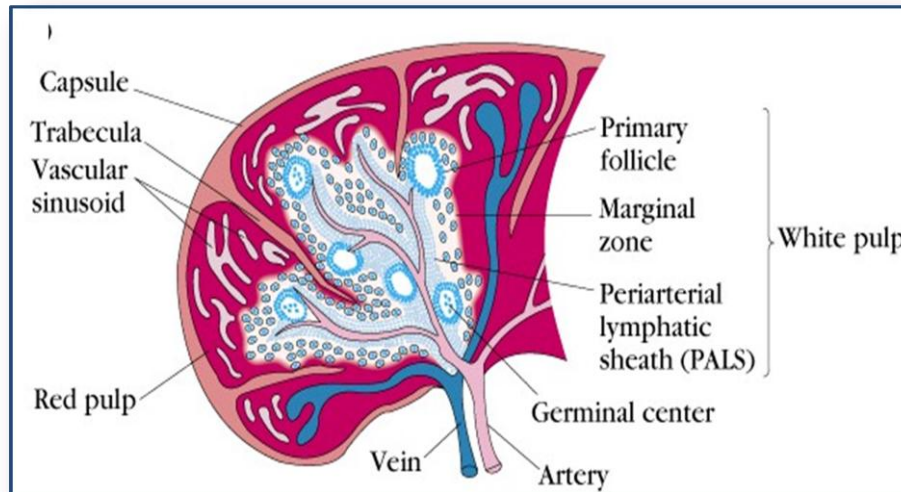


Figure 10. Structure d'un lobule splénique

3.3. Tissus lymphoïdes associés aux muqueuses

Ces tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (en anglo saxon = **MALT** pour "mucosal associated lymphoïd tissues") comprennent ceux du tissu digestif (**GALT** pour "gut-associated lymphoïd tissues"), du tractus respiratoire (**BALT** pour "bronchial-associated lymphoïd tissues"). Ils sont impliqués dans l'absorption, et le transport des antigènes exogènes alimentaires ou respiratoires.

3.3.1. Les amygdales

Les amygdales sont des formations lymphoïdes pairs, en forme d'amande, situés dans la gorge et jouant un rôle important dans les défenses immunitaires par leur localisation. Les amygdales sont constituées de follicules lymphoïdes, comme au niveau des ganglions lymphatiques, des zones caractérisées par la présence de lymphocytes B. Entre ces follicules on observe des nappes diffuses de lymphocytes T.

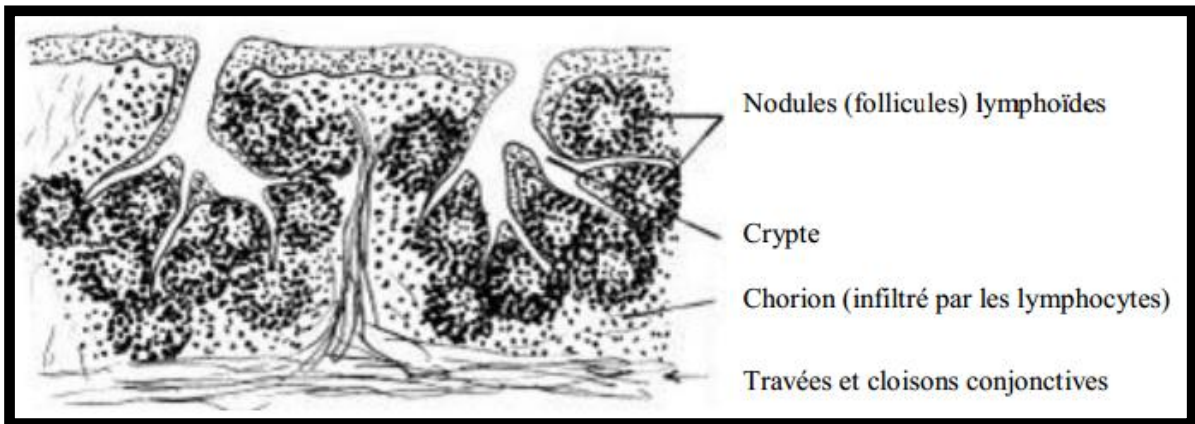


Figure 11. Coupe histologique au niveau de l'amygdale

3.3.2. Les plaques de Peyer

Les plaques de Peyer correspondent à des agrégats de follicules lymphoïdes primaires et secondaires présentes au niveau de la paroi intestinale de l'intestin grêle. Ces follicules sont caractérisés par la présence de lymphocytes B. Les lymphocytes T sont situés de manière plus diffuse à la périphérie des follicules (Fig.12).

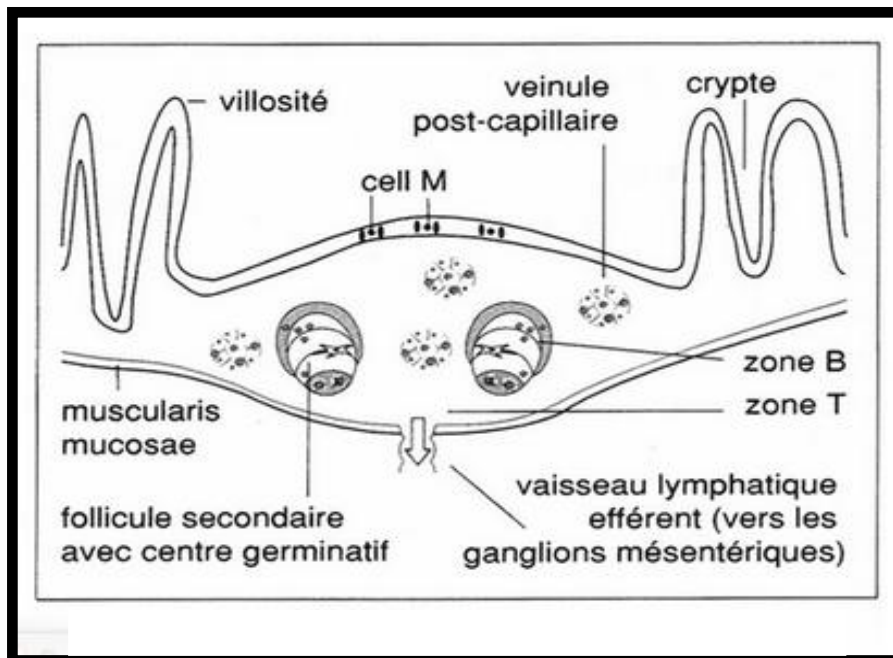


Figure 12. Structure de plaque de Peyer

4. La circulation lymphatique

Constitue un réseau qui circule parallèlement à la circulation sanguine et transporte un liquide appelé la **lymphe** : le liquide qui entoure les cellules des tissus (liquide interstitiel) pénètre dans le réseau lymphatique au niveau de tous petits vaisseaux poreux appelés capillaires lymphatiques. Les capillaires se regroupent en vaisseaux lymphatiques qui drainent tous les tissus et réinjecte la lymphe dans la circulation sanguine, via le canal lymphatique droit et le canal thoracique gauche (Fig.13). Les ganglions sont placés sur ce réseau comme des filtres sur les voies de pénétration de l'antigène alors que la rate l'est sur le réseau sanguin.

Les tissus lymphoïdes annexés aux muqueuses (MALT), ensemble de tissus lymphoïdes des zones sous-muqueuses des systèmes respiratoire, digestif et génito-urinaire sont indépendant du compartiment systémique et couvrent la principale porte d'entrée des agents pathogènes (400 m²).

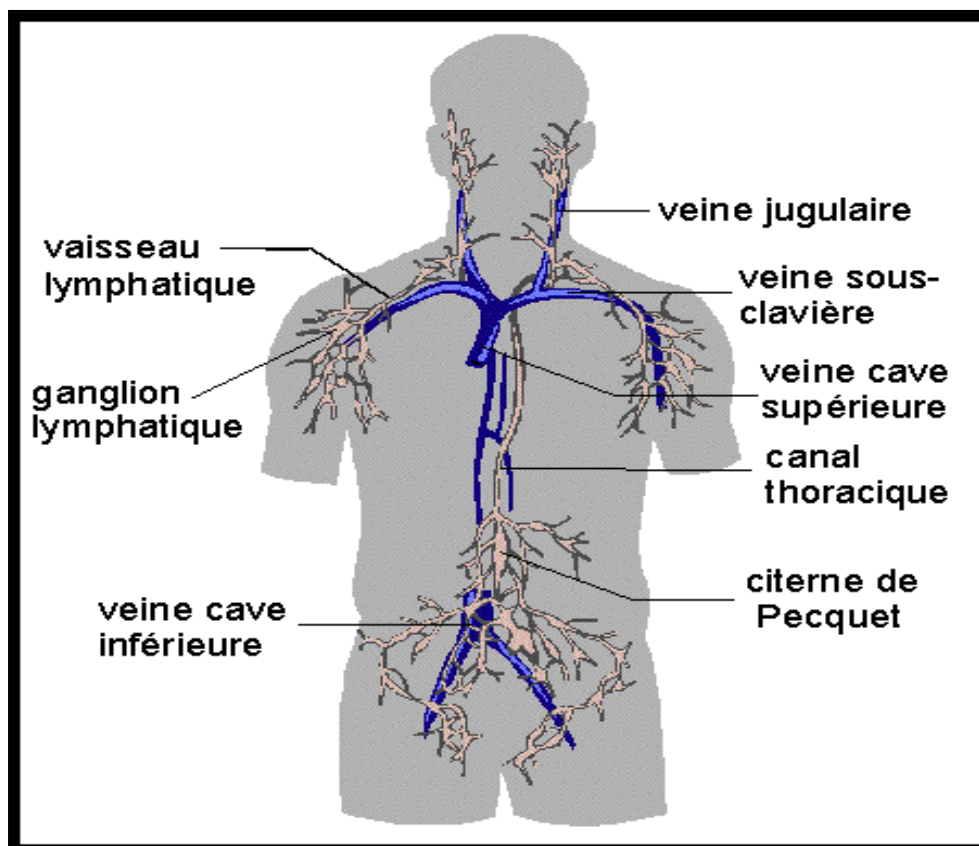


Figure 13. La circulation lymphatique

5. Les cellules de l'immunité

Certaines cellules immunocompétentes ont été reconnues comme telles depuis longtemps: les lymphocytes, les polynucléaires, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules proviennent d'un précurseur commun, la **cellule souche hématopoïétique pluripotente** de la moelle osseuse capable d'auto-renouvellement et de différenciation en **progéniteurs** (Fig.14). Ces cellules souches expriment le marqueur de surface **CD34**. Classiquement, les progéniteurs peuvent être classés en deux familles : (1) ceux qui proviennent d'une cellule souche **myéloïde** et donnent naissance aux polynucléaires, aux monocytes/macrophages, aux cellules dendritiques, aux érythrocytes et aux plaquettes ; (2) ceux qui proviennent d'une cellule souche **lymphoïde** donnant naissance aux lymphocytes T, B et NK (Natural Killer).

On classe habituellement les cellules immunitaires en cellules de **l'immunité innée** et cellules de **l'immunité adaptative**. La différence entre ces deux types cellulaires réside dans la spécificité de leur reconnaissance des antigènes.

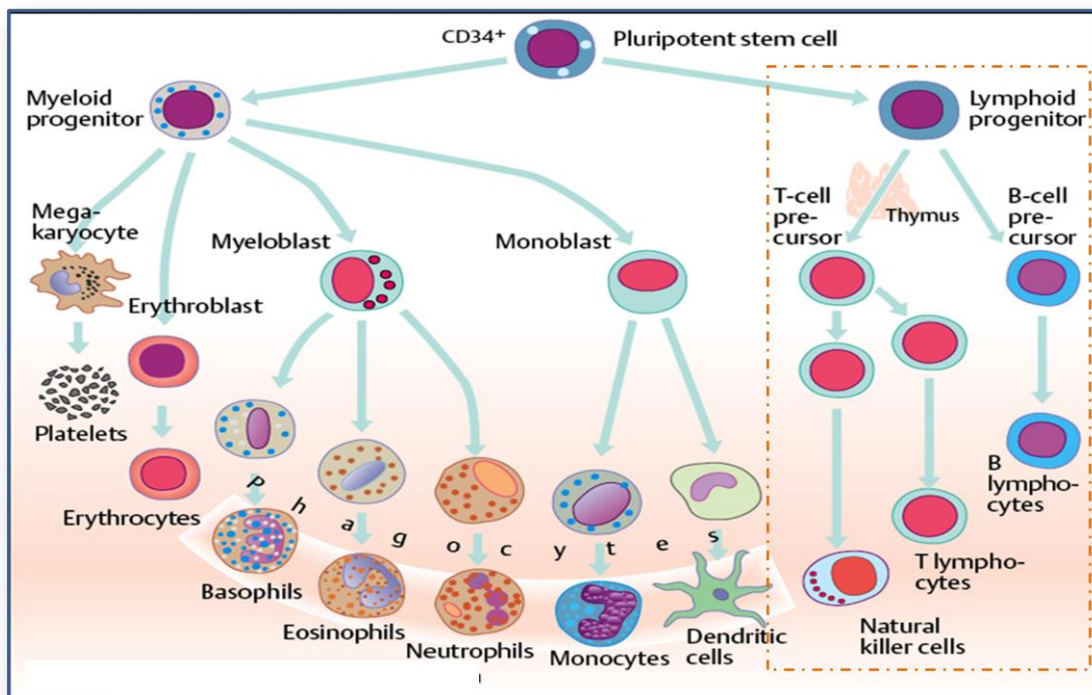


Figure 14. L'hématopoïèse des cellules immunocompétentes

5.1. Cellules de l'immunité innée

On distingue des cellules capables de capter et de détruire les éléments étrangers (implication surtout des phagocytes polynucléés comme les polynucléaires neutrophiles ou granulocytes et des phagocytes mononucléés comme les monocytes/macrophages) et des cellules capables de **capter d'apprêter** et de **présenter l'antigène** (implications surtout des cellules dendritiques mais aussi des monocytes/macrophages).

5.1.1. Les phagocytes

Sont les éboueurs de l'organisme, capable d'endocyter des bactéries et des cellules mortes, parmi eux on compte les macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires.

a) **Le monocyte** : cellule sanguine immature se différencie une fois dans le tissu où elle résidera, et sera ainsi à l'origine des macrophages et des cellules dendritiques.

b) **Le macrophage** : sont des cellules à longue durée de vie, ces macrophages tissulaires ont été désignés au fil du temps selon de nombreux vocables en fonction de l'organe où ils étaient observés : cellules de Küpfer dans le foie, microglie dans le cerveau, cellules mésangiales dans le rein, ostéoclastes dans l'os... Ce sont des cellules **essentiellement phagocytaires** comme elles peuvent aussi exercer des fonctions de **cellules présentatrices d'antigènes**.

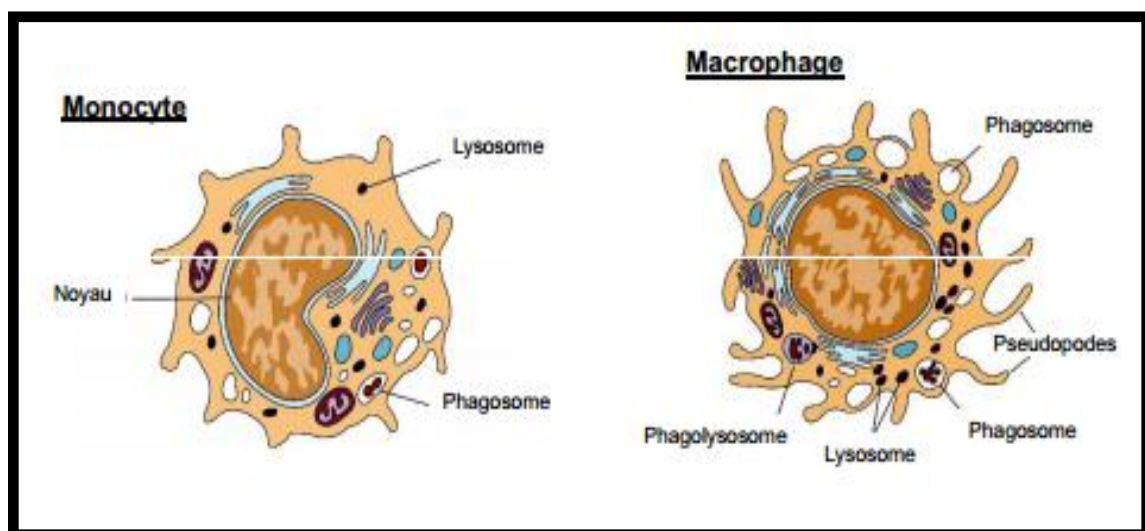


Figure 15. Les phagocytes mononucléés

c) **La cellule dendritique** : cellule immunitaire présentant des expansions cytoplasmiques appelées des **dendrites**, elle a deux origines, soit **myéloïde** (monocyte), soit **lymphoïde**.

La cellule dendritique a différent rôle dans la réponse immunitaire :

Elle joue le rôle de cellule **phagocytaire** et de cellule **présentatrice d'antigène**. Elle a donc un rôle principal dans l'**activation de la réponse immunitaire adaptative**.

Au niveau du thymus elle joue un rôle essentiel dans le **maintient de la tolérance au soi**, dans la **sélection des lymphocytes T**.

d) **les polynucléaires ou granulocytes** : se divisent en trois lignées distinctes : neutrophiles, éosinophiles et basophiles.

- Les **polynucléaires neutrophiles** sont les plus nombreux dans la circulation sanguine. Ils sont reconnaissables par leur noyau unique polylobé. Ce sont essentiellement des cellules phagocytaires qui jouent un rôle majeur dans la défense **antimicrobienne** et dans **l'inflammation**. Contrairement aux autres cellules phagocytaires, les neutrophiles meurent suite à la phagocytose.
- Les **polynucléaires éosinophiles** (ou **acidophile**) ont un noyau unique bilobé. Ils sont retrouvés principalement dans les tissus et leur rôle est capital dans les **défenses antiparasitaires**.
- Les **polynucléaires basophiles** ont un noyau unique bilobé peu visible du fait de la superposition de leurs granulations basophiles. Leur équivalent tissulaire est représenté par les mastocytes qui sont nombreux dans les muqueuses, et ont un rôle physiologique anti infectieux. Les basophiles et les mastocytes ont aussi un rôle important en pathologie dans les **hypersensibilités immédiates**.

5.1.2. Le mastocyte

C'est une variété de leucocytes jouant un rôle primordial dans les allergies. Il est habituellement situé au niveau des tissus conjonctifs, des poumons, des ganglions lymphatiques, de la rate et de la moelle osseuse où il est produit.

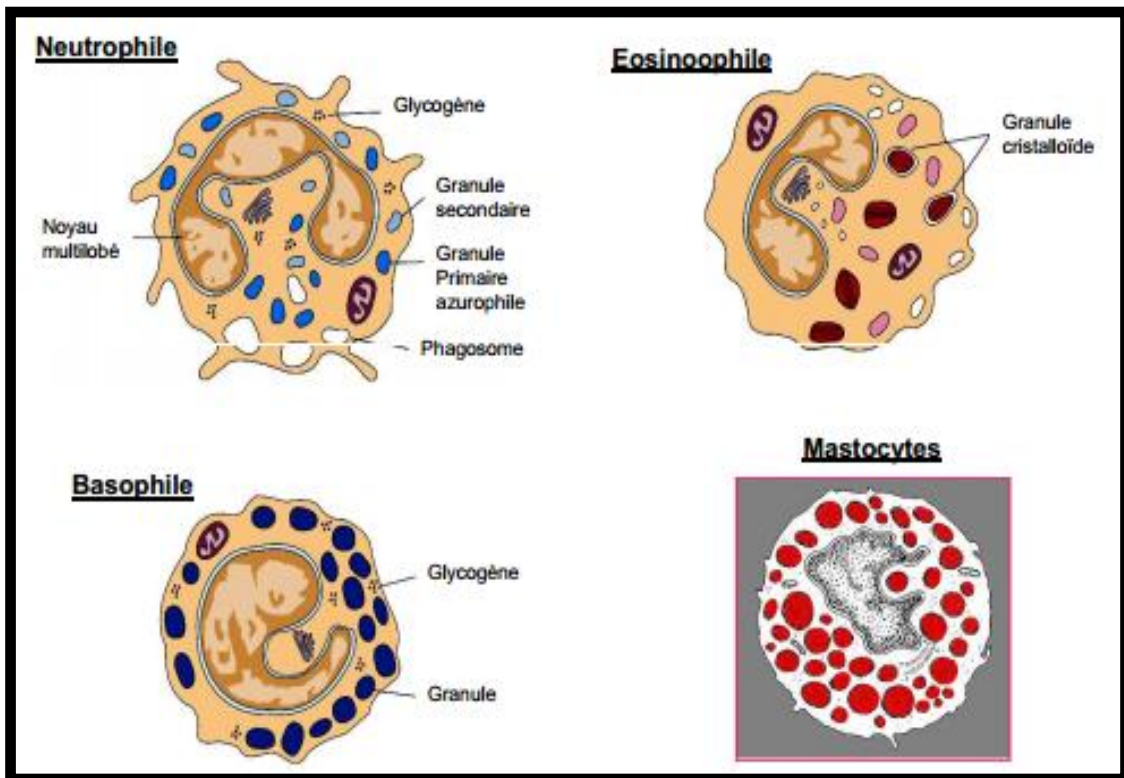


Figure 16. Les granulocytes

5.1.3. La cellule NK (Natural Killer)

La cellule tueuse naturelle ou NK est un troisième type de lymphocyte, qui n'exprime pas de récepteur spécifique de l'antigène et qui est impliquée dans la réponse immunitaire naturelle. Elle est capable de lyser des cellules tumorales ou infectées par un virus.

5.2. Cellules de l'immunité adaptative

Les lymphocytes représentent 20% des globules blancs, se sont les cellules majeures de la réponse immunitaire adaptative. Ils sont caractérisés par la présence d'un récepteur membranaire qui leurs permettent de reconnaître des fragments antigéniques (**BCR** pour les lymphocytes **B** et **TCR** pour les lymphocytes **T**). Ils peuvent survivent plusieurs années (lymphocytes mémoires).

5.2.1. Le lymphocyte B

Le lymphocyte B (5-15% des lymphocytes) est responsable de l'**immunité humorale**, qui vise à produire les anticorps spécifiques de l'agent pathogène. En plus du BCR, le lymphocyte B est caractérisé par un dimère $Ig\alpha-Ig\beta$ qui est associé au BCR (IgM et IgD), des **récepteurs de cytokines**, les récepteurs membranaires **B7** et des classes de différenciation CD19, CD21, CD35, CD45, CD80, CD81 et CD86, etc. Le lymphocyte B aura 2 destinées, en effet il se différenciera :

- Soit en **plasmocytes** qui sécrètent les anticorps solubles qui iront se fixer sur l'antigène (opsonisation), facilitant ainsi la phagocytose. Ces cellules ne présentent pas d'anticorps membranaires.
- Soit en **lymphocyte B mémoire** qui expriment à leur surface les anticorps spécifique d'un antigène, permettant une réponse plus rapide si une seconde infection se présente.

Le lymphocyte B joue également le rôle de cellule présentatrice d'antigène et présente donc ainsi les molécules de classe 2 du CMH, en plus des molécules de classes 1 du CMH.

5.2.2. Le lymphocyte T

Le lymphocyte T est responsable de l'**immunité cellulaire**, qui vise à détruire les cellules pathogènes, (bactéries ou des cellules cancéreuses). Il y a deux types de TCR : TCR1 (formé de chaîne δ et γ) et TCR2 (formé de chaîne α et β). 85-95% des LT ont le TCR2. En plus du TCR, le lymphocyte T est caractérisé par le cluster de différenciation **CD3**, des récepteurs de cytokines et d'autres clusters de différenciation CD4 ou CD8, etc. On distingue plusieurs types de lymphocytes T :

- Les **LT cytotoxique** qui expriment à leurs surfaces les clusters **CD8** qui ont le rôle de tuée les cellules infectées essentiellement par un virus.
- Les **LT helper** (ou **auxiliaires**) qui exprime a leurs surface les clusters **CD4** ont un rôle de régulation de la réponse immunitaire adaptative par **activation** d'autres cellules immunitaires.

Cours 3. Antigènes et Anticorps

1. Antigènes

1.1. Définition

Les substances capables d'induire une réponse immunitaire (RI) spécifique humorale (par formation des anticorps) ou cellulaire (par prolifération des lymphocytes) sont appelées antigènes.

Ex : cellule B + Ag \longrightarrow cellule B effectrice (plasmocyte) + cellule B mémoire.

L'immunogénicité : c'est la capacité à induire une réponse immunitaire spécifique. Une substance qui induit cette réponse est dite immunogène.

L'antigénicité : c'est la capacité à se combiner spécifiquement avec les produits finals des réponses c-a-d : l'Anticorps et TCR.

-Toute les molécules qui possèdent les propriétés d'induire d'immunogénicité aient aussi les propriétés d'antigénicité, mais l'inverse n'est pas vrais.

-Quelques petites molécules (haptène), sont antigéniques mais sont incapable de produire une réponse immunitaire spécifique, c-à-d non immunogène.

Donc 2^{ème} **définition de l'antigénicité** : liaison par complémentarité moléculaire avec les structures effectrices (Ac et TCR).

1.2. Propriétés de l'immunogène

Le pouvoir immunogène de l'Ag dépend de l'origine, sa nature, complexité chimique et le poids moléculaire.

1.2.1. L'origine

Pour provoquer une réponse immunitaire, une molécule doit être reconnue par le système immunitaire comme ne faisant pas partie du soi c-à-d étranger à l'organisme. On fonction de leur origine on distingue

a- Xenoantigènes : se sont des Ag issus d'une espèce entrainant une RI dans un organisme d'une espèce différentes, ex : BSA (albumine sérique bovine) est un Ag expérimental, n'est pas immunogène lorsqu'elle est injecté à une vache, mais fortement immunogène pour un lapin.

b- Alloantigènes : Ag issus d'un individu entraînant une RI chez un autre individu de la même espèce, ex : globule rouge du groupe A transfusé à un individu du groupe B.

c- Autoantigènes : Ag présents dans l'organisme d'un individu reconnu par le système immunitaire de ce même individu, ex : RAA (rhumatisme articulaire aigue) est provoqué par des Ac anti streptocoque qui attaque des déterminants à la surface des muscles cardiaques.

1.2.2. La taille (poids moléculaire)

Il existe une corrélation entre la taille d'une molécule et son immunogénicité. Les meilleurs immunogènes ont un PM environ 100000DA.

1.2.3. Nature et complexité chimique

Les protéines sont les immunogènes les plus puissants, les polysaccharides sont en 2^{ème} position. En revanche les lipides et les acides nucléiques ne sont plus immunogènes, à moins qu'ils ne soient complexés à des protéines ou polysaccharides (se sont donc des haptènes).

Les homopolymères (formé d'1 seul type d'Acide Aminé ou 1 seul ose) tendent à manquer d'immunogénicité, par contre, les copolymères (2 ou plusieurs AA différents) sont plus immunogènes.

L'addition d'AA aromatique, ex : Tyrosine ou Phénylalanine augmente considérablement l'immunogénicité des polymères. Donc l'immunogénicité augmente avec la complexité chimique et structurale. Les homopolymères même de PM élevé sont moins immunogènes que les hétéropolymères de PM plus bas.

1.2.4. Autre facteurs d'immunogénicité

La capacité d'induire une réponse immunitaire dépendra aussi de certaines propriétés du système biologique que rencontre l'Ag : le génotype du receveur, la dose et la voie d'administration de l'Ag, ainsi que l'administration des adjuvants qui augmente la réponse immunitaire.

a. Le génotype du receveur : la capacité de RI varie pour un même Ag d'une espèce à une autre et d'un individu à un autre au sein d'une même espèce, ce ci dépend du receveur (sa constitution physique et génétique, son âge) ex : 2 souches de souris immunisé par un même polypeptide : une souche produisant des taux élevés d'Ac sérique, tandis que l'autre

souche n'en produisant de très faible quantités : lorsque les 2 souches étaient croisées, la génération F1 montrait une réponse intermédiaire vis-à-vis à l'immunogène (la capacité de RI est localisé dans la région du gène du CMH ; donc la présentation de l'Ag aux cellule T joue un rôle essentiel dans la détermination du degré de capacité de RI) .

b. Voie d'administration : L'immunogène provoque une RI s'il est injecté par voie intradermique ou sous cutanée ou intramusculaire ou intra péritonéale. Par contre la voie digestive et intraveineuse n'est pas efficace. Les organes et les cellules stimulés dépendent de la voie par laquelle l'immunogène est administré.

c. La dose : l'administration de faible ou de forte dose d'Ag s'accompagne d'une absence de RI, entre ces deux extrêmes l'immunogénicité augmente avec la dose.

Remarque : une faible dose ne peut pas activer un nombre suffisant de lymphocyte et une très forte dose oblige les lymphocytes à entrer dans un état de non réponse.

d. Les adjuvants : se sont des substances non spécifiques capables d'augmenter l'immunogénicité d'un Ag lorsqu'elles sont ajoutées à ce dernier. Il existe 3 types d'adjuvants :

Adjuvants minéraux : ex : hydroxyde d'alumine ou phosphate de calcium.

Adjuvants huileux : utilisable uniquement en expérimental ; ex : adjuvant incomplet de FREUND (huile minérale).

Adjuvants bactériens : le plus utilisé en expérimentation ; ex : adjuvant complet de FREUND (huile minérale+mycobactéries).

1.3. Antigènes T-indépendants ou T-dépendants

On parle d'antigènes T-indépendants lorsque les lymphocytes B produisent des anticorps sans l'aide de lymphocytes T. C'est le cas pour des antigènes tels que certains polysaccharides ou polymères répétitifs ou des antigènes résistant à la dégradation. Pour les antigènes T-dépendants, les lymphocytes B ont besoin de l'aide des cellules T pour produire des anticorps, et ces immunogènes induisent également une réponse cellulaire. C'est le cas des protéines, dont les peptides épitopiques doivent être isolés et présentés aux lymphocytes T.

1.4. Les épitopes (déterminants antigéniques)

Le déterminant antigénique ou partie de l'Ag qui se lie à l'Ac (paratope : partie d'Ac qui est en contact avec l'épitope), le nombre d'épitopes identiques par molécule d'Ag est appelé **Valence** de l'Ag. Un Ag présente plusieurs épitopes identiques ou différentes est dit Multivalent.

On distingue deux types d'épitopes :

a. Epitope linéaire ou séquentiels : ils sont présentés par l'enchaînement linéaire de monomère adjacents ex : AA, oses..

b. Epitope conformationnels : ils sont formés par un groupe de monomère éloignés dans la séquence mais qui se trouve à proximité suite au repliement spatial de la molécule. La majorité des épitopes conformationnels est retrouvée chez les protéines du fait de sont structure tertiaires.

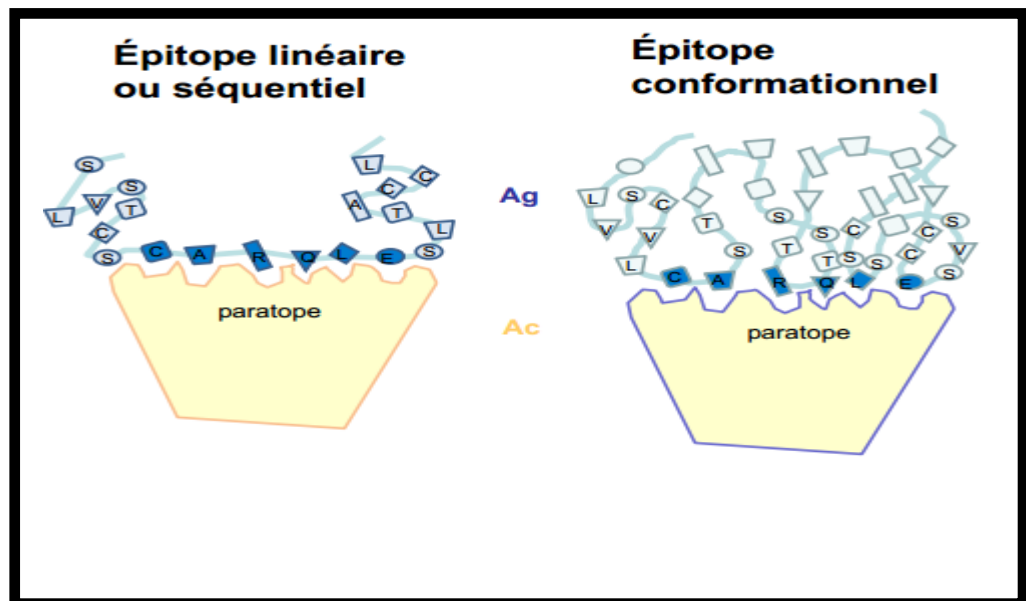


Figure 17. Déterminant antigénique

2. Anticorps

2.1. Définition

Les anticorps sont appelés immunoglobulines (Ig) car on les retrouve après électrophorèse du sérum dans les fractions protéiques α , β , γ globuline. Ce sont des glycoprotéines synthétisées par les lymphocytes B activés ou plasmocytes et qui sont capable de se recombinaées spécifiquement avec l'Ag. On distingue 5 classes d'Ig : IgG, IgA, IgM, IgE et IgD.

2.2. Structure d'un anticorps

La structure des 5 classes d'immunoglobulines repose sur le même modèle de base. Les Ig sont composées de 4 chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures :

* Deux chaînes légères identiques (Light \equiv L) constitué d'environ 220 AA (25KD).

* Deux chaînes lourdes identiques (Heavy \equiv H) constitué d'environ 450 AA (50KD).

Donc une immunoglobuline c'est une molécule de formule H_2L_2

a. Région variable et constante

Chaque chaîne légère et chaque chaîne lourde comportent deux régions, Une région variable (V) c-à-d présentant une grande diversité de séquence en AA entre les Ac, cette région comprend les 110 AA de l'extrémité N-terminale de chaque chaîne et détermine la spécificité de l'Ac, VH pour la chaîne lourde et VL pour la chaîne légère. Une région constante (C) correspond au reste de la séquence du côté C-terminale de chaque polypeptide.

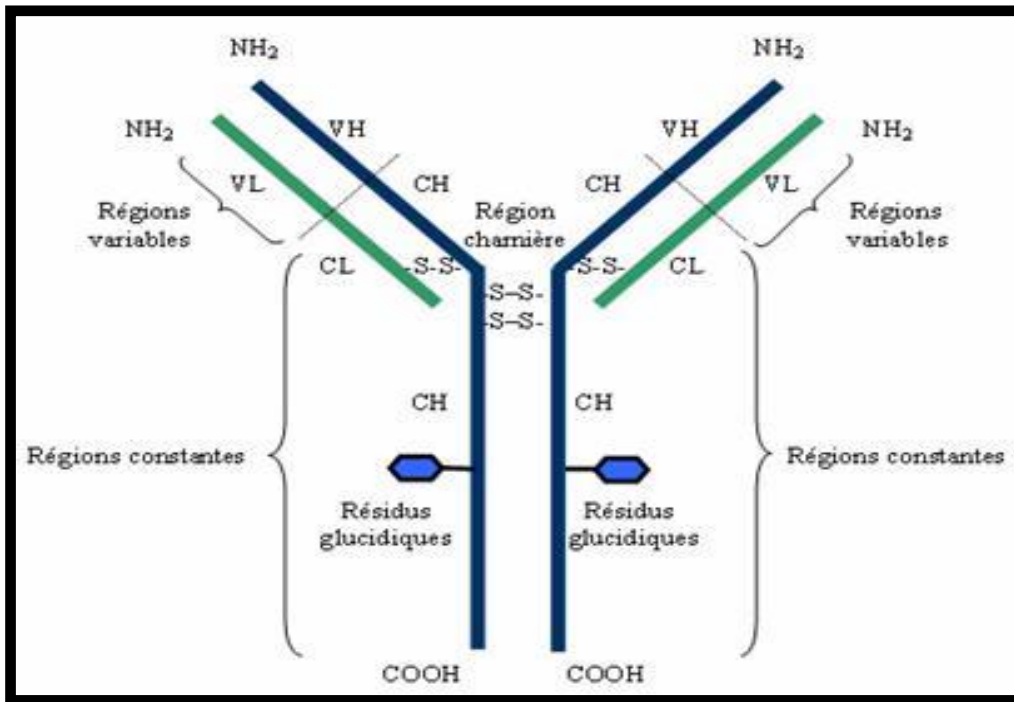


Figure 18. Structure d'un anticorps

Deux types de chaînes légères peuvent participer à la structure d'une Ig : soit la chaîne légère κ , soit la chaîne légère λ (60% de $H_2\kappa_2$ et 40% de $H_2\lambda_2$). Il existe 5 types de chaîne lourde (γ , α , δ , ϵ , μ) appelés isotypes correspond à chaque classe d'Ig :

- γ (gamma) uniquement pour les IgG avec 4 sous classes (γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4).
- α (alpha) uniquement pour les IgA avec 2 sous classes (α_1 , α_2).
- μ (mu) uniquement pour les IgM.
- δ (delta) uniquement pour les IgD.
- ϵ (epsilon) uniquement pour les IgE.

b. Etude de la structure des immunoglobulines par traitement enzymatique :

b.1. La papaïne : découpe l'Ac en trois fragments un fragment Fc : fragment cristallisable, et deux fragments Fab : fragment antigen binding.

Le Fab est composé de la chaîne légère et d'une partie de la chaîne lourde, il représente le support de l'activité anticorps. Le fragment Fc est composé de la partie restante de la chaîne lourde, il est incapable de réagir avec l'Ag mais il renferme l'activité biologique de l'Ac, il peut fixer le complément comme il peut se fixer sur les cellules et les tissus.

b.2. La pepsine : l'action de cette enzyme donne un seul fragment F (ab')₂ et le reste est découpé en petits peptides.

b.3. Réduction chimique : les ponts disulfures intercaténaire (entre les deux chaînes lourdes, et entre les chaînes H et chaîne L) sont rompu par la B-mercaptoéthanol) et on obtient 2 chaînes L et 2 chaîne H.

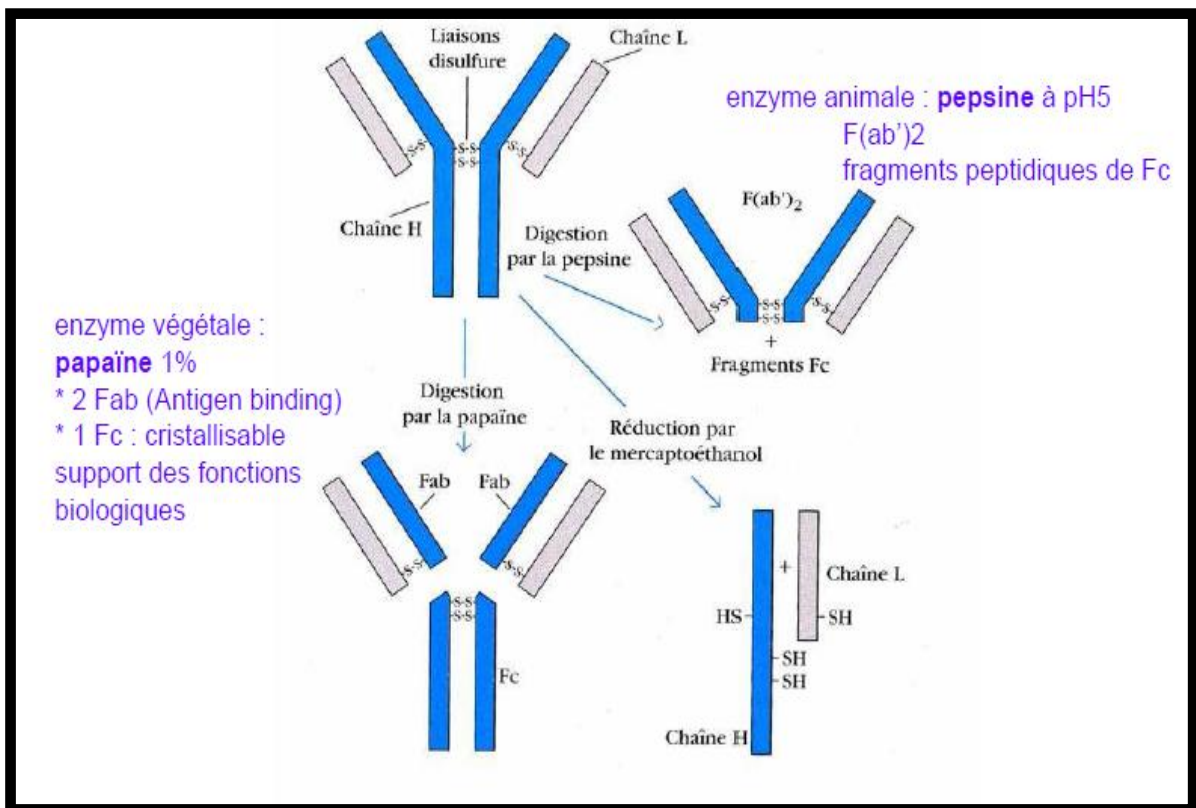


Figure 19. Etude de la structure de l'anticorps par traitement enzymatique

2.3. Les fonctions d'anticorps

Les anticorps sont des molécules bifonctionnelles, leurs 1^{ière} fonction est de se lier à l'Ag par leur fragment Fab, la 2^{ème} fonction est effectrice qui permettent aux anticorps d'éliminer les Ag et de tuer le pathogène :

a. L'opsonisation : c'est l'enrobage (recouvrement) des cellules étrangères (bactérie) par les Ac (opsonine) pour faciliter sa phagocytose.

b. L'activation du complément : seules les IgM et les IgG₁, IgG₂ et IgG₃ sont capable de fixer le C_{1q} et activer la voie classique du complément qui conduit à la lyse des micro-organisme.

c. La neutralisation : la fixation d'un Ag par un IgG ou IgA conduit à la perte d'activité biologique de l'Ag (ex : toxine neutralisé n'agit plus, ainsi les bactéries ou virus neutralisés perdent leur pouvoir infectieux).

d. La cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (CCDA) : peut provoquer la mort des cellules cibles médiées par les cellules NK, lorsque les Ac lié aux cellules cibles s'associe aux récepteurs des cellules NK.

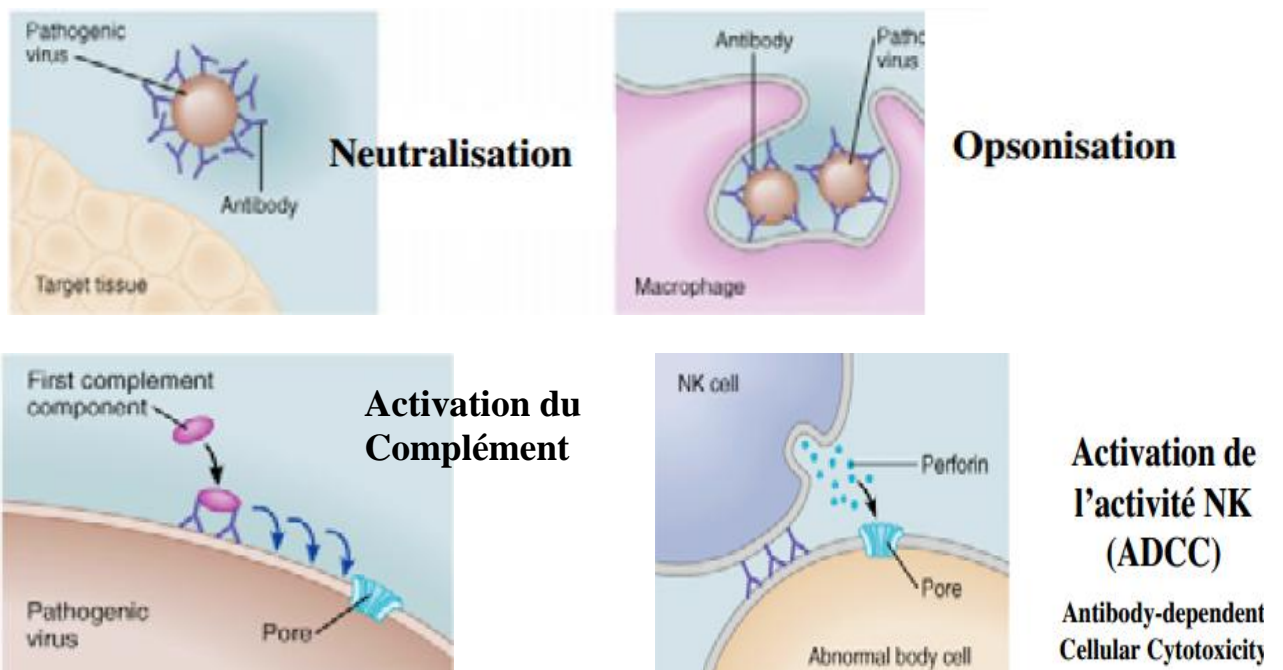


Figure 20. Les fonctions effectrices de l'anticorps pour éliminer l'antigène

2.4. Caractéristiques de différentes classes d'immunoglobulines

IgG : c'est l'isotype sérique majeur (75% des Ig globale) et constitue le principal Ac de la réponse *II^{aire}* à la plupart des Ag. Elle agit comme opsonine pour favoriser la phagocytose, activer le complément et faciliter la cytotoxicité cellulaire grâce à des récepteurs FcR. Seules les IgG sont capables de franchir le placenta, ce transfert permet la protection du fœtus et nouveau née durant les 1^{ier} mois de vie.

IgM : existe sous deux formes :

a-IgM pentamère sérique : c'est la plus lourde des Ig car elle présente 5 pentamères reliés par des ponts disulfures et par une chaîne polypeptidique appelée la chaîne J(Junction). Cette forme particulière d'IgM (10 Fab) lui confère d'un fort pouvoir agglutinant et forte activation du complément.

b-IgM monomère : Ig membranaire se trouve à la surface du lymphocyte B, elle sert de récepteur pour l'Ag.

IgA : dont on connaît deux types :

a- IgA sérique: leurs structures proche à celle des IgG, elle peut se trouvée sous forme mono, di ou trimérique.

b- IgA sécrétoire: c'est l'isotype majeur retrouvé au niveau des muqueuses (ex : resp, digestive, salivaire, larmes...) sous forme de dimère reliées par une pièce de jonction J et une pièce sécrétoire (polypeptide qui protège l'IgA contre les enzymes présentes dans les sécrétions). Le rôle des IgA sécrétoire est la protection des muqueuses en empêchant la fixation des bactéries et des virus aux cellules épithéliales. Il ne fixe pas le complément et ne traverse pas le placenta.

IgD : il a surtout une fonction de récepteur à la surface des LB ou elle est le plus souvent co-exprimé avec l'IgM.

IgE : l'isotype le moins représenté dans le sérum, a une grande importance dans l'immunité antiparasitaire et dans la réaction de l'hypersensibilité puisque il possède un site de fixation aux mastocytes et aux basophiles.

Tableau 1. Caractéristiques de différente classe d'immunoglobuline

Classes	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Pourcentage dans le sérum	70 à 75	15 à 20	10	Moins de 1	Trace
Concentration en g/l	8 à 14	1 à 4	0.6 à 1.8	$30 \cdot 10^{-3}$	$0.3 \cdot 10^{-3}$
Demi-vie (en jours)	21 (IgG ₁) 20 (IgG ₂) 7 (IgG ₃) 21 (IgG ₄)	6	5	3	2,5
PM en kDa	146	60 à 385	970	184	188
Sous classes	Quatre dont les proportions sont : 66% IgG ₁ , 23% IgG ₂ , 7% IgG ₃ , 4% IgG ₄	Deux	-	-	-
Pourcentage en sucre	2 à 3	7 à 11	12	9 à 14	12
Passage transplacentaire	+	-	-	-	-
Activation du complément	++IgG ₁ /+-IgG ₂ /++IgG ₃ /-IgG ₄	-	+++	-	-
Liaison aux récepteurs Fc	+	+			+
Particularités des immunoglobulines animales					
Equines	IgG _(a-b-c) IgT	+	+	-	?
Bovidés	IgG ₁ et IgG ₂	+	+	-	+
Carnivores	IgG _(a-b-c)	+	+	-	+ (chien)

2.5. Réaction Ag-Ac

L'interaction Ag-Ac est une combinaison réversible entre l'Ac (paratope) et le déterminant antigénique (épitope), formant un complexe immun Ag-Ac, cette étape est dite fixation primaire, elle est rapide et ne présente aucun phénomène visible, elle se produit dès que les 2sites sont en contact. La fixation Ag-Ac est maintenue par des forces de faible énergie :

- 1- Liaison ionique : attraction électrostatique entre deux atomes porteurs des charges opposées (ex : $-\text{NH}_3^+ \quad ^-\text{OOC}-$).
- 2- Liaison d'hydrogène : attraction d'un atome d'hydrogène qui est électropositif avec un atome électronégatif (ex : $\text{O}_2 \quad > \text{N}-\text{H}_{\delta+} \quad -\delta\text{O}=\text{C}<$)

- 3- Les forces de Van Der Waals : force instantanée due à une attraction des molécules non chargées.

2.6. Conséquences de la fixation primaire

La manifestation apparente de l'union Ag-Ac dépend de la nature de l'Ag et de l'Ac : il s'agit d'une précipitation si l'Ag est en solution, une agglutination si l'Ag est une particule, ou lyse de l'Ag si le complément intervient.

Cours 4. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

1. Introduction

Le CMH appelé complexe HLA chez l'homme est un ensemble de plusieurs gènes localisés sur le bras court du chromosome 6. Le CMH comprend trois classes de gènes; I, II et III et qui se distinguent par la fonction et l'expression de leurs produits. Les molécules de classe I sont codées par trois locus A, B et C et les molécules de classe II sont codées par trois locus DP, DQ et DR comprenant chacun 2 gènes. Les deux classes I et II de CMH sont impliquées dans la présentation de l'antigène. Les gènes de CMH III sont situés entre ceux de la classe I et II et ils codent pour des protéines à fonction immunitaire (complément C2, C4, B et cytokines inflammatoire TNF α et TNF β).

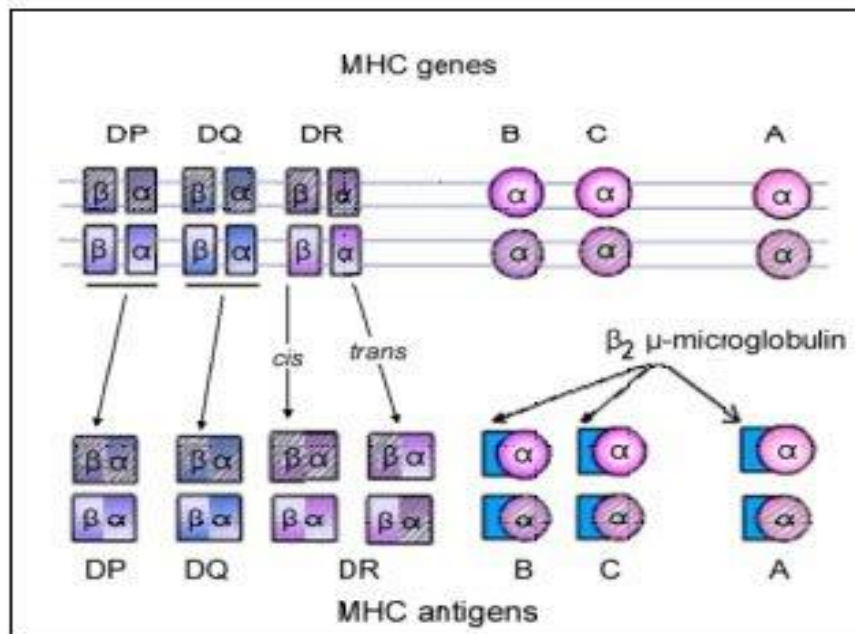
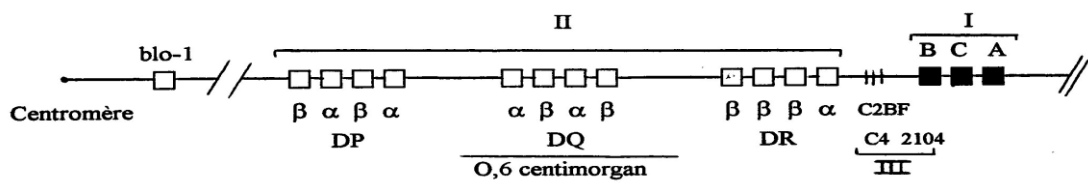


Figure 21 : Localisation chromosomique des gènes du système HLA

2. Propriétés génétiques du complexe majeur d'histocompatibilité

a. **Polygénisme:** plusieurs gènes codant les molécules CMH I et CMH II.

b. **Polymorphisme:** il existe de nombreuses variantes (allèles) de chaque gène pour chaque locus ex : HLA-A 120 allèles, HLA-B 249 allèles, HLA-C 70 allèles, HLA-DP 99, allèles HLA-DQ 55 allèles HLA-DR 259 allèles.

c. **Transmission en haplotype:** ces gènes sont liés, il ségrégent en bloc, on reçoit un groupe de gène de père et un autre de mère ; chaque groupe de gènes s'appelle un haplotype.

d. **Codominance:** pour chaque locus d'origine paternelle et le gène d'origine maternelle sont exprimés dans la même cellule.

3. Molécules de CMH de classe I

3.1. Structure

Ces molécules de classe I sont composées de deux chaînes polypeptidiques α et β_2 -microglobuline, et qui sont associées de manière non covalente :

La chaîne α (ou chaîne lourde de 43 kDa) est codée par les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C et présentent trois domaines : $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ constituent la poche peptidique qui est la cavité dans laquelle l'Ag vient se fixer. La chaîne β_2 microglobuline est une petite protéine de 15 kDa qui n'est pas codée par le CMH (Fig.22).

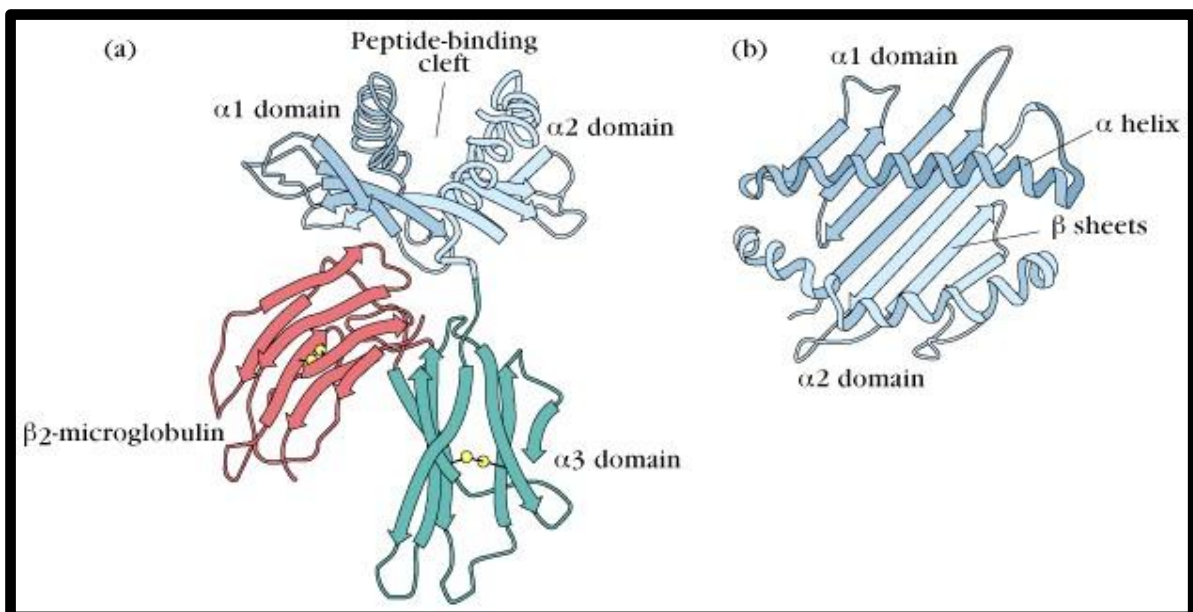


Figure 22. Structure tridimensionnelle du site de fixation d'Ag des molécules de CMH classe I.

3.2. Distribution cellulaire et fonctions

Les molécules de CMHI sont présentes sur toutes les cellules de l'organisme à l'exception de certaines cellules (globule rouge, majorité des neurones,..), elles présentent des **peptides endogènes** synthétisés dans le cytoplasme de la cellule hôte (cellules infectées). Le complexe CMHI-peptide est reconnu par le récepteur TCR des lymphocytes T cytotoxiques (**TCR8**) car c'est la molécule CD8 qui reconnaît le domaine $\alpha 3$ de CMHI.

4. Molécules de CMH de classe II

4.1. Structure

Ces molécules de classe II sont composées de deux chaînes polypeptidiques différentes α et β codées par 2 gènes distincts au sein de CMH II:

La chaîne α est une glycoprotéine de 33 kDa constituée de 2 domaines extracellulaires, $\alpha 1$ et $\alpha 2$. La chaîne β est une glycoprotéine de 28 kDa constituée de 2 domaines extracellulaires, $\beta 1$ et $\beta 2$.

4.2. Distribution cellulaire et fonctions

Les molécules de CMH II sont exprimées par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) ex : monocyte / cellules dendritiques, macrophage et lymphocyte B. elles présentent les peptides exogènes issus de pathogènes captés par phagocytose. Le complexe CMHII-peptides est reconnu par les TCR des lymphocytes T helpers ; car la molécule CD4 lie le domaine $\beta 2$ des CMHII.

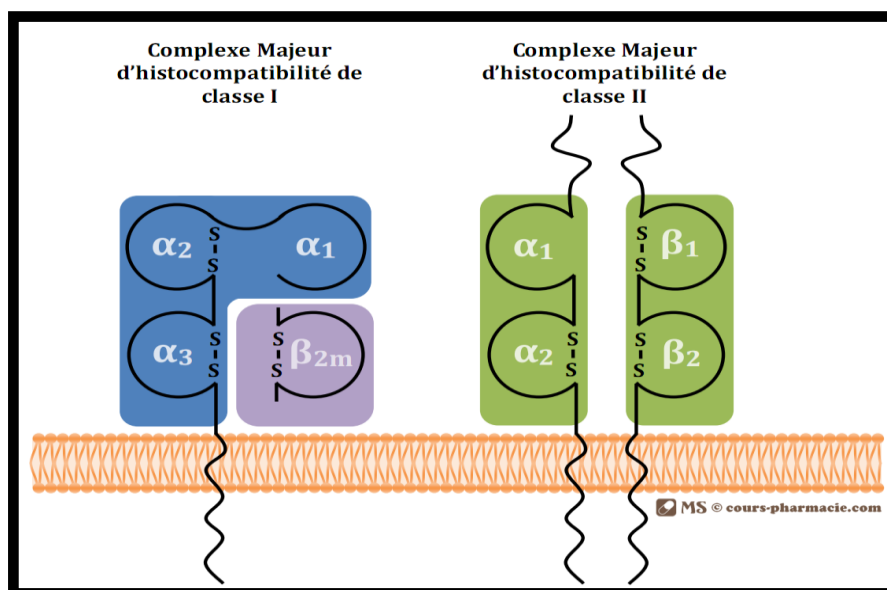


Figure 23. Représentation schématique des molécules CMH de classe I et II.

5. Chargement des peptides au sein des molécules de CMH

5.1. Les molécules CMH de classe I (voie endogène)

Les molécules CMH de classe I présentent des peptides issus de protéines endogènes d'origine cytoplasmique (Fig. 24) :

- Dans le cytosol les protéines anormales sont dégradés en peptides par un gros complexe enzymatique appelé **protéasome**.
- Les peptides antigénique qui en résultent sont transportés vers le RE par les transporteurs de peptides **TAP1** et **TAP2**.
- Au sein du RE les peptides s'assemblent avec la chaîne lourde α de CMH.
- Le trimère chaîne α/β_2 microglobuline/peptides est acheminé en surface via le Golgi.

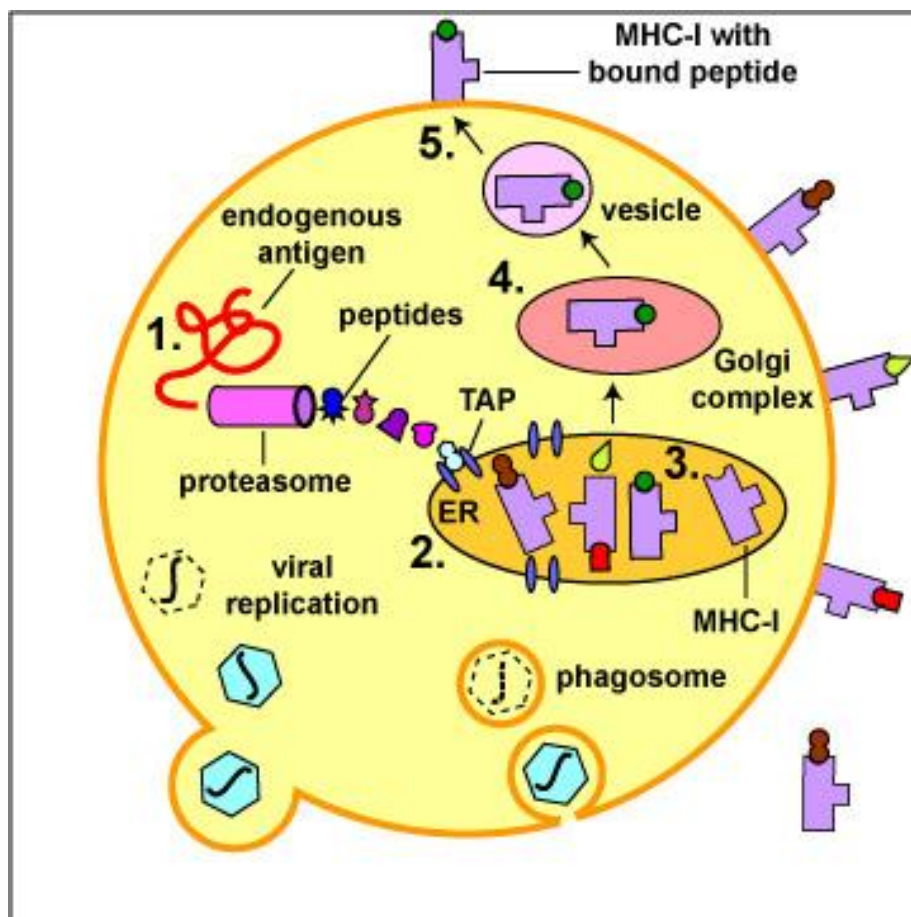


Figure 24. Présentation des peptides endogène par les molécules CMH de classe I

5.2. Les molécules CMH de classe II (voie exogène)

Les molécules CMH de classe II présentent des peptides issus de protéines exogènes d'origine extracellulaire (Fig. 25) :

- Les antigènes exogènes sont internalisés par phagocytose ou par endocytose dans les endosome.
- Les protéines exogènes sont dégradées en peptides dans les CPA par les enzymes lysosomiaux.
- A l'issue de leur synthèse, la molécule de CMHII est associée à une chaîne invariante Li qui occupe la niche de fixation de peptide.
- La chaîne invariante empêche la fixation des peptides endogènes.
- La molécule de CMHII associées à la chaîne invariante est adressée à l'endosome où la chaîne invariante sera dégradée par des enzymes protéolytiques, ce qui permet la fixation du peptide exogène.
- Le complexe CMHII/peptide est ensuite transporté vers la membrane plasmique.

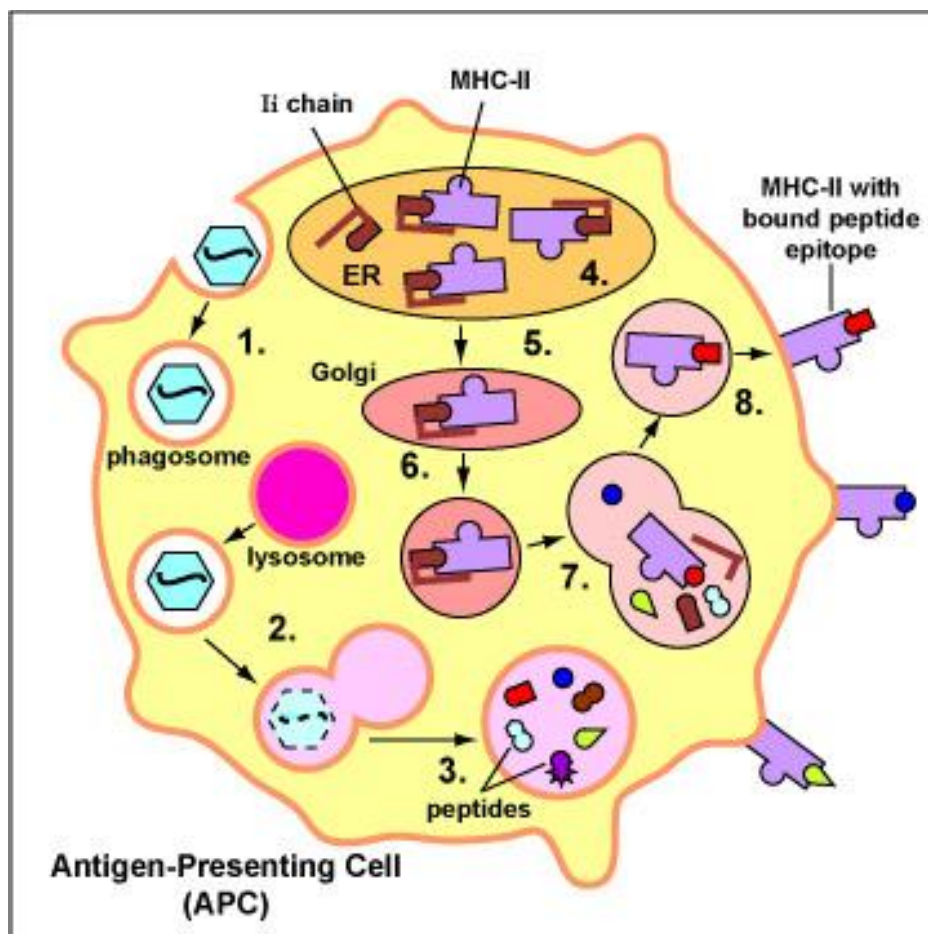


Figure 25. Présentation des peptides exogène par les molécules CMH de classe II

Cours 5. Le complément

1. Définition

C'est un groupe de protéines plasmatiques distinctes réagissant les unes avec les autres en une cascade protéolytique complexe. Il joue un rôle de la lyse des pathogènes et l'activation de la réponse inflammatoire. La plupart des protéines sont produites par les hépatocytes (cellules de foie) et les monocytes.

2. Activation du complément

Il existe deux voies : la voie classique et la voie alterne.

2.1. La voie classique

Elle est initiée par la formation du complexe immun Ag-Ac (IgG ou IgM) à la surface de la cellule cible (ex : bactérie). Au niveau du complexe on distingue un site de fixation du complément au niveau du fragment Fc de l'anticorps. Ainsi la fixation de la première C1 (complément numéro 1).

Le C1 est un complexe macromoléculaire de 3 protéines C1q, C1r et C1s. C1r et C1s sont des proenzymes susceptibles d'être activés. La formation du complexe Ag-Ac rend accessible des sites de fixation pour le composant C1q, ensuite un réarrangement moléculaire de C1s s'effectue c-à-d une autoactivation des sous unités de C1r qui active C1s. Le C1s a une activité estérasique qui amorce le cascade de la voie classique.

Cascade de la voie classique

C1s clive C4 et C2 en deux grands fragments C4b et C2a, qui s'associent pour former la **C3 convertase classique $\overline{C4bC2a}$** à la surface du micro-organisme. Cette enzyme clive le C3 en C3a et C3b, le C3b s'attache aussi à la C3 convertase et l'ensemble **$\overline{C4bC2aC3b}$** forme la **C5 convertase classique** qui clive C5 en C5a et C5b.

2.2. La voie alterne

Cette voie est activée directement par les endotoxines des bactéries gram+/gram- et par un grand nombre de micro-organismes (parasites, virus, levure) sans intervention des anticorps.

La cascade débute par des composants qui s'activent spontanément à la surface des agents infectieux. La protéine C3 possède cette particularité et donne le facteur C3b qui se lie au facteur B. Dans la voie alterne la C3 convertase est formé par le facteur C3b complexés au facteur Bb \longrightarrow C3bBb.

Le Bb est issu du clivage du facteur B par une protéine plasmatique le facteur D. La C3 convertase clive C3 en C3b et C3a, le C3b est le facteur clé qui est formé par la voie classique et la voie alterne.

2.3. Les fonctions des facteurs du complément

Le C3b peut se lier à la C3 convertase (classique ou alterne) afin de former une C5 convertase classique (C4b2a3b) ou alterne (C3bBb3b) produisant à partir du C5 le C5a et le C5b. Le C5b se lie au C6, C7 (la fixation de C7 fait passer le complexe d'un état hydrophile à l'état hydrophobe) qui s'insère dans la membrane du micro-organisme. Le C8 et C9 viennent s'insérer et provoque la formation d'un tunnel lytique qui lyse la membrane cellulaire après polymérisation du C9. Le complexe C5b, C6, C7, C8 et C9 est appelé le **complexe d'attaque membranaire (CAM)**.

3. Effets biologiques du complément

3.1. Initiation de la réaction inflammatoire

Les peptides d'inflammation C3a et C5a appelés **anaphylatoxines** se fixent à des récepteurs membranaires des mastocytes ce qui provoque la libération d'histamine. L'histamine a pour effet : contraction des muscles lisses et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Le C5a est également chimiotactique, il attire les neutrophiles au site de l'attaque microbienne ainsi il provoque l'adhésion des neutrophiles.

3.2. Opsonisation

En facilitant la liaison du microbe au phagocyte, le C3b et C4b agissent comme l'opsonine et jouent un rôle de cible pour la reconnaissance par des récepteurs sur les cellules phagocytaires. Ces récepteurs (CR1 \equiv CD35) et CR3 du complément sont exprimés sur les monocytes, les macrophages et les neutrophiles.

3.3. La cytolyse

Le **complexe d'attaque membranaire CAM** produit des pores dans la membrane de la cellule cible ce qui permet la fuite des composants intracellulaires → C'est la lyse de la cellule.

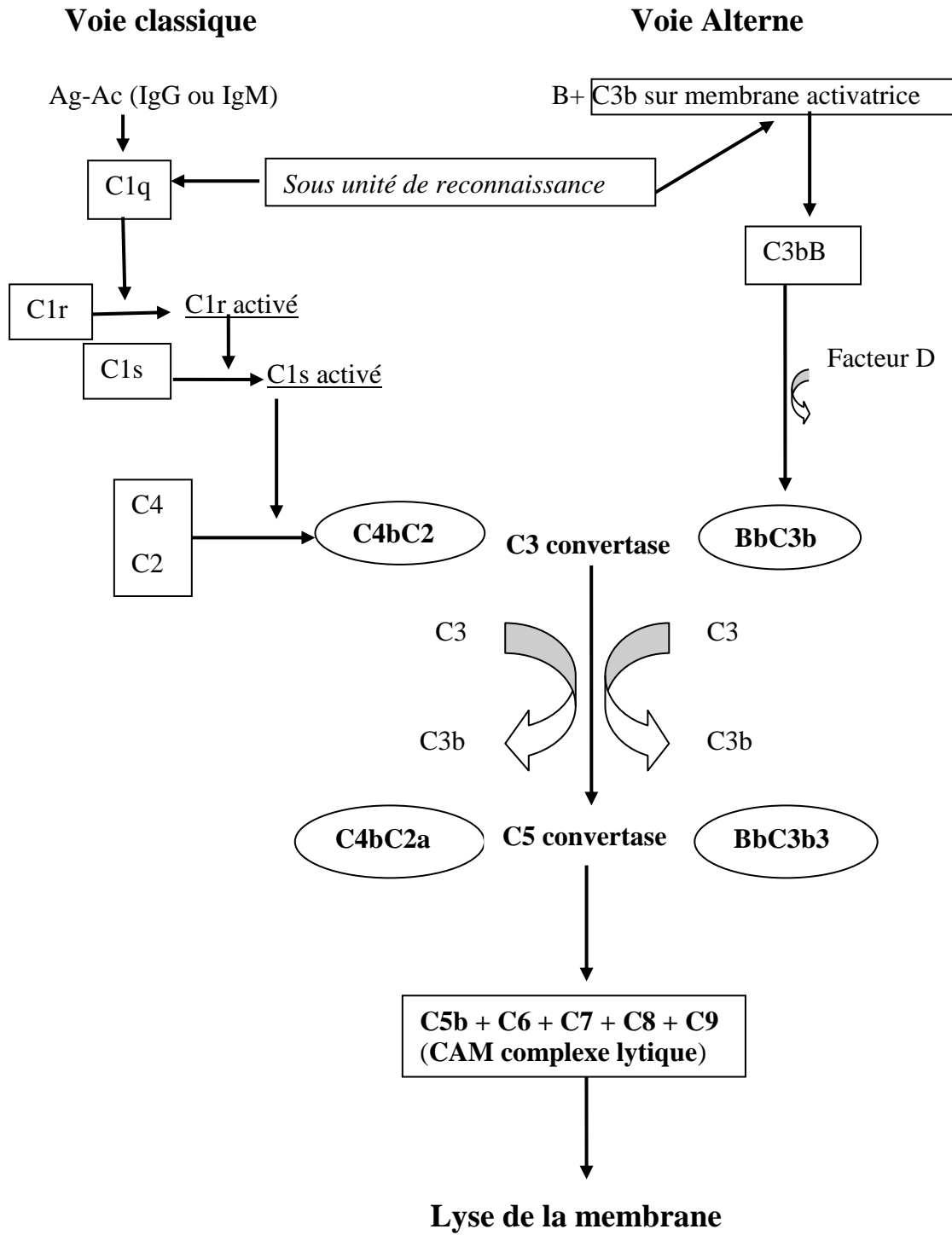


Figure 26. Schéma récapitulatif des voies d'activation du complément.

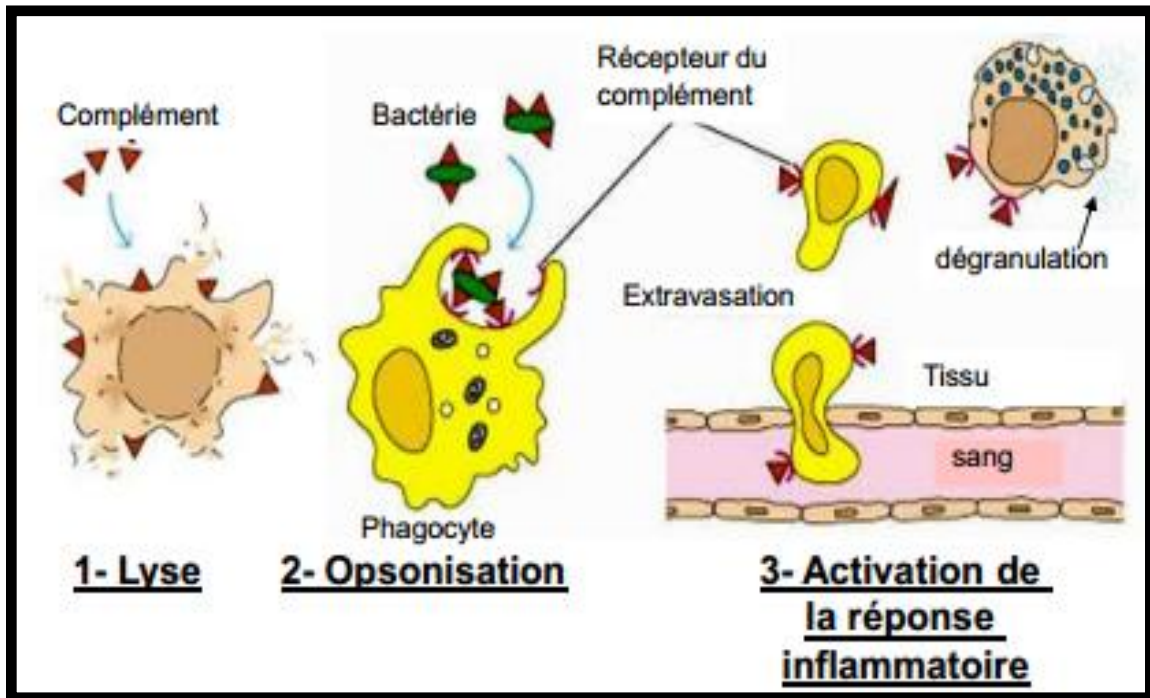


Figure 27. Rôle du complément au cours de la réponse immune

Cours 6. La réponse immunitaire acquise (adaptative)

1. Introduction

Lorsque l'agent pathogène s'échappe des défenses immunitaires naturelles que sont la barrière cutanée ou muqueuse et les mécanismes de phagocytose, l'immunité adaptative entre en action dans les tissus lymphoïdes (la rate et ganglions). Deux situations peuvent se présenter :

- L'antigène peut activer directement les lymphocytes B qui possède les récepteurs spécifiques. Les lymphocytes B activés deviennent alors des plasmocytes et secrèteront des anticorps spécifiques visant la destruction de l'antigène.
- L'antigène peut être aussi présenté au lymphocyte T par les cellules présentatrices de l'Ag qui activeront les lymphocytes T, LT sont de deux catégories :
 - LT cytotoxique (LTCD8+) qui détruit les cellules infectés et les cellules cancéreuses.
 - LT auxiliaires ou helper (LTCD4+), qui joue un rôle clé dans la coordination de l'immunité humorale ou cellulaire et qui stimuleront les LB à produire une plus grande quantité de plasmocytes, d'anticorps et de cellules mémoire.

Deux types de cellules T auxiliaires sont décrits : les cellules régulatrices de l'immunité de type Th1 et celles de type Th2. Les cellules **Th1** secrètent majoritairement l'**interféron-gamma (IFN- γ)**, du « **Tumour Necrosis Factor – alpha** » (**TNF- α**) et de l'**Interleukine 2 (IL-2)**, qui stimule les LTCD8 et favorise la destruction intracellulaire des micro-organismes. Les cellules **Th2** stimulent les lymphocytes B par le biais surtout de certaines interleukines (**IL-4, IL-5, IL-6**) et favorisent la production d'anticorps.

Les antigènes qui stimulent directement les lymphocytes B sans la participation des lymphocytes T déclenchent des réactions immunitaires humorales et sont appelés **antigènes T indépendants (LB1**: retrouvés au niveau des muqueuses et la pulpe rouge de la rate). Les antigènes qui ont besoin de l'aide des cellules T pour stimuler les lymphocytes B et produire des anticorps sont appelés **antigènes T dépendants (LB2** : retrouvé dans les follicules des organes lymphoïdes secondaire).

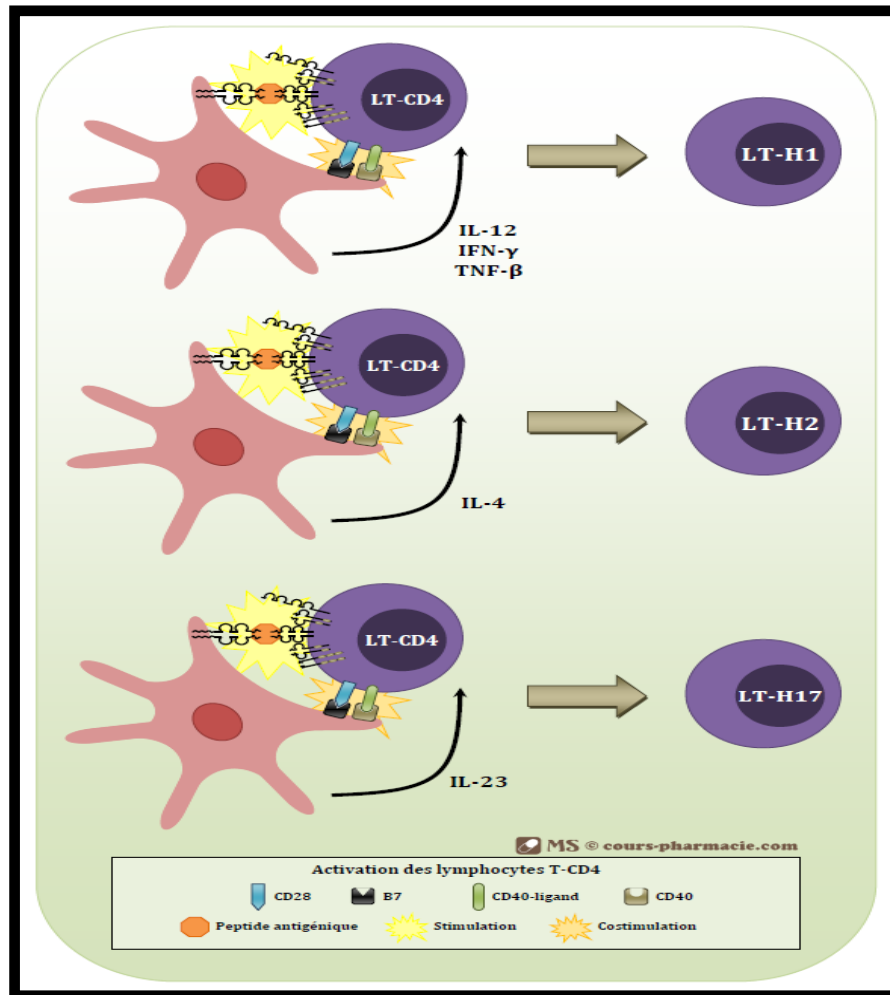


Figure 28. Activation et différenciations des LT-CD4

2. La réponse adaptative humorale

La réponse humorale T-dépendante s'effectue en plusieurs étapes :

- 1/ Reconnaissance de l'Ag par la cellule dendritique et activation du lymphocyte Th.
- 2/ Reconnaissance de l'Ag par le lymphocyte B.
- 3/ Activation du lymphocyte B par coopération du LB avec le LTh activé.
- 4/ Multiplication et différenciation du lymphocyte B.
- 5/ Sécrétion d'anticorps spécifiques de l'Ag.

Activation du lymphocyte B (coopération cellulaire LB et lymphocyte Th activé)

Les cellules T auxiliaires (Th2 activée) active les LB lorsqu'elles reconnaissent le complexe CMHII-peptide à la surface des LB, pour cela les LB après avoir reconnais l'Ag ; il englobe le complexe récepteur-Ag (BCR-Ag) par endocytose et il fragmente l'Ag en peptide pour être présenté par les molécules CMHII de LB.

* Une interaction s'établi entre les LTh2 et cellules B : lorsque LT reçoit un **signal** par son **TCR** et **CD28**, il exprime à sa surface en grande quantité la molécule LCD40 (ligand de CD40) qui peut lier le CD40 exprimé par le LB.

* Le signal transmis au LB par **CD40** est essentiel pour que LB s'active et se différencie
→ **signal 2**.

* Le LTh2 sécrète en outre des cytokines (**II 4**, **II 5** et **II 6**) qui participent à l'activation du LB
→ **signal 3**. Ces cytokines se lient à leurs récepteurs exprimés à la surface de la membrane des LB activés.

* Les LB se **multiplient** activement pour former des clones c'est l'**amplification clonale**, ensuite la majorité des LB se **différencient** en **plasmocytes** qui secrètent alors des Ac dirigées contre l'Ag rencontré et le reste se différencie en **LB mémoires**.

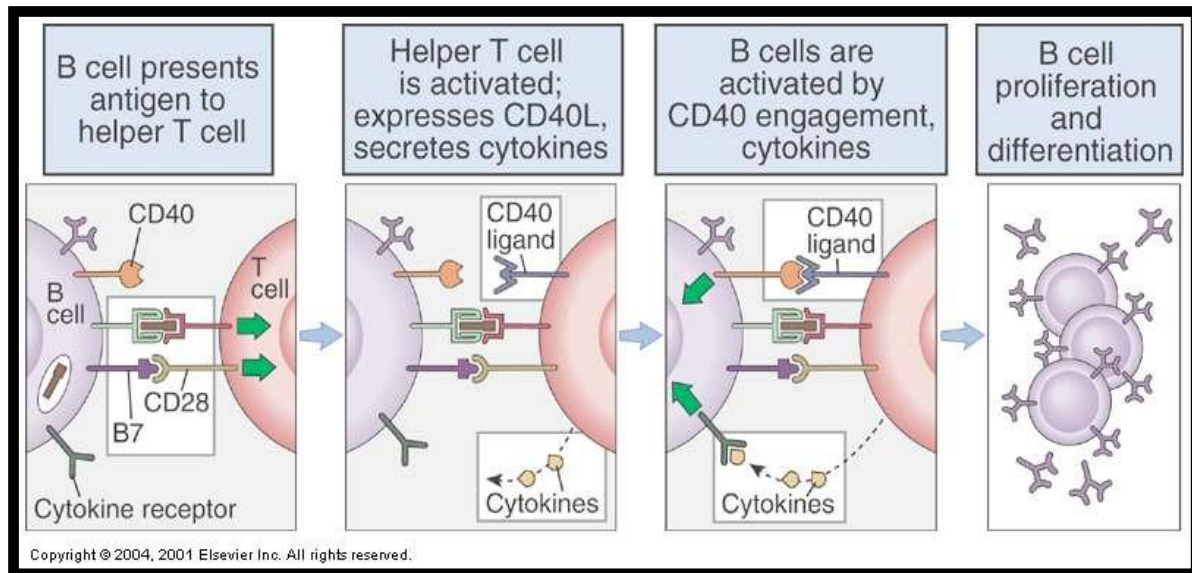


Figure 29. Interaction Lymphocyte T et Lymphocyte B

3. La réponse adaptative cytotoxique

La réponse cytotoxique ou à médiation cellulaire permettant à produire des lymphocytes T cytotoxique (LTc) dirigés contre les cellules de l'organisme infectées par un virus ou un parasite intracellulaire ou des cellules de soi mutées (tumeur). Les cellules T cytotoxique (lymphocyte TCD8) interviennent en détruisant sélectivement les cellules atteintes tout en préservant les cellules saines.

La réponse adaptative cytotoxique comprend plusieurs étapes :

1/ Capture et présentation des Ag par les cellules dendritiques qui expriment de nombreuses molécules d'adhérence **ICAM** (molécule d'adhérence intercellulaire) et **LFA** (antigène associé à une fonction leucocytaire).

2/ une coopération cellulaire a lieu avec un lymphocyte TCD4 naïf (Fig.30) fixation des LT aux cellules présentatrice de l'Ag.

3/ Un 2^{ème} **signal** aura lieu lors de la liaison entre la glycoprotéine **B7** qui s'exprime seulement sur les cellules présentatrices de l'Ag (CPA) et le **CD28** de la cellule TCD4 naïf.

4/ La première rencontre de l'Ag en présence du 2^{ème} signal provoque la **prolifération** de TCD4 et la synthèse de l'interleukine **IL2** qui agit localement en se fixant sur le **récepteur RIL2** à la surface de la membrane de LTCD4. Cette fixation permet la différenciation des **LTCD4 en LTh1** activés et LTh1 mémoire.

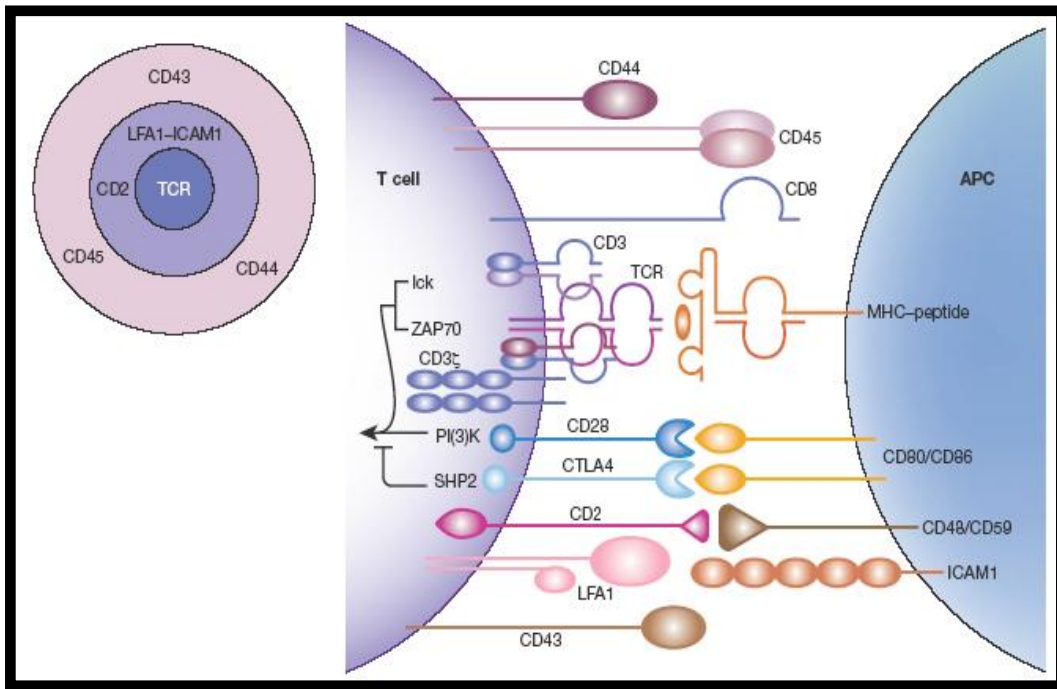


Figure 30. Interaction Lymphocyte T et cellule présentatrice de l'antigène (CPA).

5/ Activation des LTCD8 naïf (Fig. 31) :

Une coopération cellulaire s'établit entre le **LTCD8** qui reconnaît le complexe **CMHI-peptide** de la cellule dendritique d'une part et cette dernière et le lymphocyte **Th1 activé** d'autre part. Le Th1 activé secrète les **IL2** et **INF- γ** qui contribuent à la **prolifération** et à la **différenciation** des LTCD8 en lymphocyte **T cytotoxique effecteurs** et LTC mémoire.

6/ La cytotoxicité exercé par les LTCD8 effectrices :

Les TCD8 contiennent des granules lytiques (lysosome sécrétoire) contenant de nombreuses protéines principalement la **perforine** (il crée des pores dans la membrane entraînant la lyse cellulaire) et la **granzyme B** (enzyme des granules), ces molécules déclenchent la mort de la cellule cible.

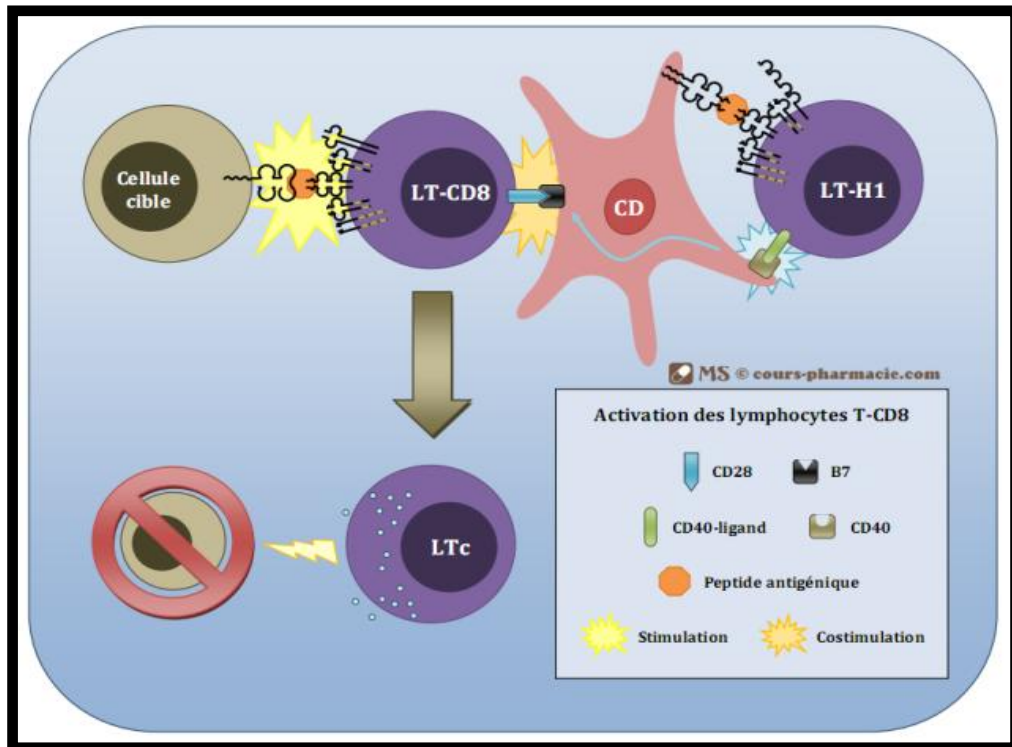


Figure 31. Activation de lymphocyte T CD8

Conclusion

Après la sensibilisation primaire (premier contact) de lymphocyte T et B qui se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires leur fonction effectrice se distribue à travers tout l'organisme par la circulation sanguine, dans le cas idéal cette réponse élimine le pathogène et munis l'organisme d'un état d'immunité protectrice contre la réinfection par le même pathogène grâce à l'existence des populations lymphocytaires (LT et LB mémoire) déjà activés et spécifiques de l'Ag.

Cours 7. Les principaux tests en immunologie

1. Introduction

La spécificité de la liaison Antigène-Anticorps, c-à-d qu'un site de liaison à l'Ac (Fab) est spécifique d'un seul déterminant antigénique repose sur une complémentarité étroite entre le paratope et l'épitope. Cette propriété est utilisée pour détecter *in vitro* des Ac dans les sérums des patients ou des Ag à la surface des cellules des patients.

2. Classification des réactions Ag-AC utilisés dans les dosages immunologiques

1- Réaction primaires : mise en évidence de l'interaction directe entre un Ag et un Ac.

2- Réaction secondaire : mise en évidence des phénomènes physiques qui découlent de la réaction Ag- Ac : précipitation ; agglutination ; réaction dépendant du complément.

2.1. Tests directs (réactions primaires)

Seul la réaction Ag-Ac qui intervient, et quand cette liaison est non visible donc il faut marquer soit l'Ag soit l'Ac avec un marqueur enzymatique ou radioactif ou un fluorochrome et les signaux émis sont :

- **Détectés (méthode qualitative).**
- **Mesurés (méthode quantitative).**

Il existe de nombreuses techniques en fonction de la nature du traceur : radio-isotopique (RIA) ; enzymatique (EIA ou ELISA) ou fluorescent (IF) Et en fonction du procédé : direct, indirect, compétition.

2.1.1 Techniques utilisant un marqueur radioactif : RIA (RadioImmuno Assay)

Les radioéléments : l'iode I^{125} et le tritium H^3

Avantage : technique rapide, très précise et hautement reproductibles

Application : dosage des auto-Ac anti ADN, les hormones et les IgE

Inconvénient : il ya un risque lors d'utilisation d'un matériel radioactif

Principe :

Implique la liaison compétitive d'un Ag* radiomarqué et un Ag non marqué (dont la quantité est inconnu) vis-à-vis un nombre limité et constant de site sur l'Ac. On mesure la quantité de l'Ag* marqué resté fixé et on trace une courbe étalon en ajoutant des

concentrations de l'Ag non marqué croissante à une quantité fixe d'Ag* ; La quantité de l'Ag non marqué détecté est inversement proportionnelle à la radioactivité.

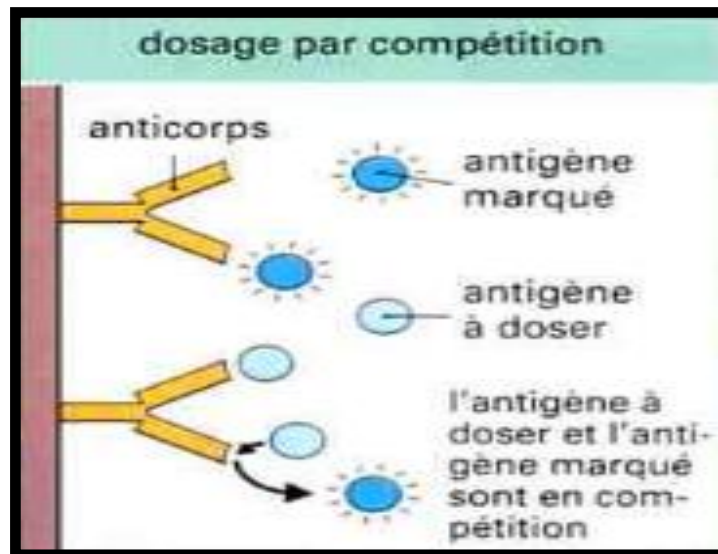


Figure 32. Principe du test RIA

2.1.2. Les techniques enzymatique : ELISA ou EIA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Les enzymes : peroxydase/phosphatase alcaline.

Avantage : pas de risque lié à la radioactivité, la technique la plus utilisée et elle peut remplacer le RIA.

Application : - dosage des protéines à faible concentration ex : haptènes, hormones stéroïdes, médicaments.

- dosage des anticorps pour le diagnostic de maladies infectieuses ex : virus de l'hépatite B, virus du SIDA.

Principe :

Le complexe Ag-Ac est révélé par un réactif (Ag ou Ac) sur lequel une enzyme a été fixée. L'enzyme utilisée va modifier un substrat chromogène. C'est une réaction colorée mesurable en spectrophotométrie. Cette activité enzymatique est proportionnelle à la concentration de la substance à doser. Il existe plusieurs variantes réactionnelles basées sur un concept de base identique (Fig. 33).

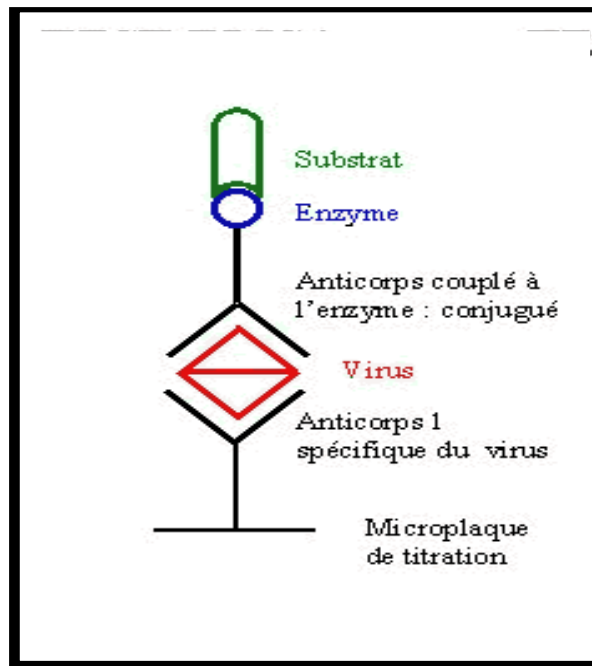


Figure 33. Principe du test ELISA

a. Technique ELISA direct (fig. 34-A)

Il est possible de fixer la totalité de l'antigène présent dans l'échantillon à doser sur la paroi du tube ou de la cupule de réaction, puis de révéler cet Ag par l'Ac marqué.

b. Technique ELISA indirect (fig. 34-B)

Les anticorps recherchés se fixent sur l'antigène qui tapisse des puits; les éventuels anticorps liés résistent au rinçage puis sont la cible d'anticorps anti-anticorps porteurs d'une enzyme qui réagit avec le substrat: le résultat est alors positif.

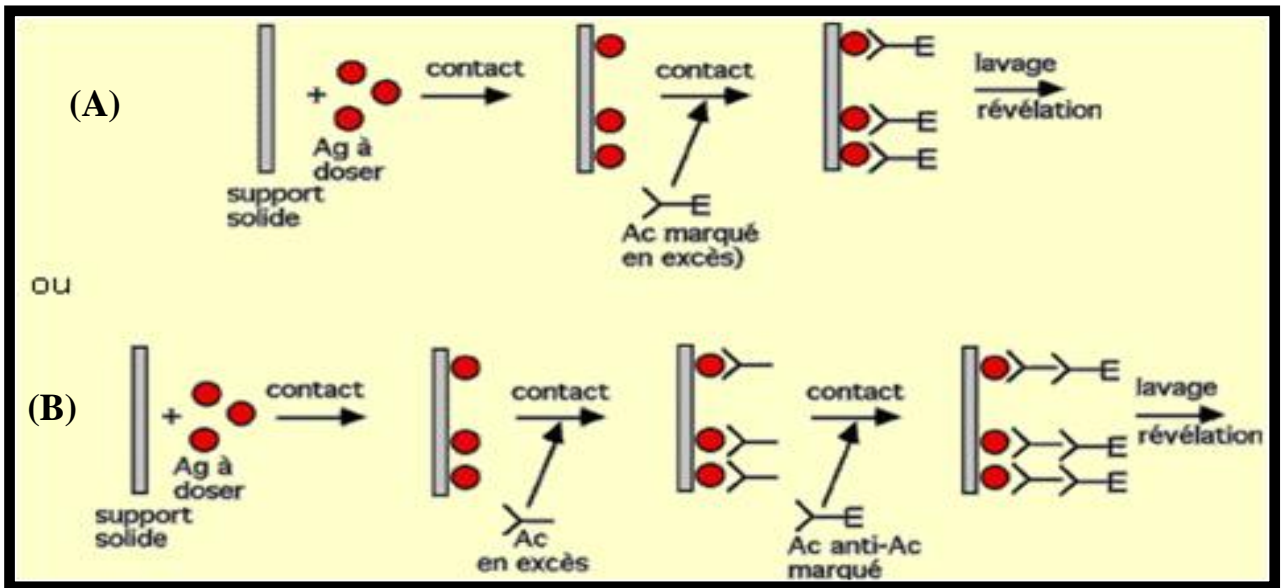


Figure 34. Technique ELISA direct et indirect.

c. Autres variantes

ELISA sandwich

Dosage des antigènes en les faisant réagir avec leurs anticorps préalablement fixés (en excès) sur un support.

- L'antigène doit obligatoirement posséder plusieurs épitopes (au moins bivalent).
- L'antigène est alors révélé par un anticorps marqué par une enzyme.
- L'activité enzymatique est proportionnelle au titre de l'antigène.

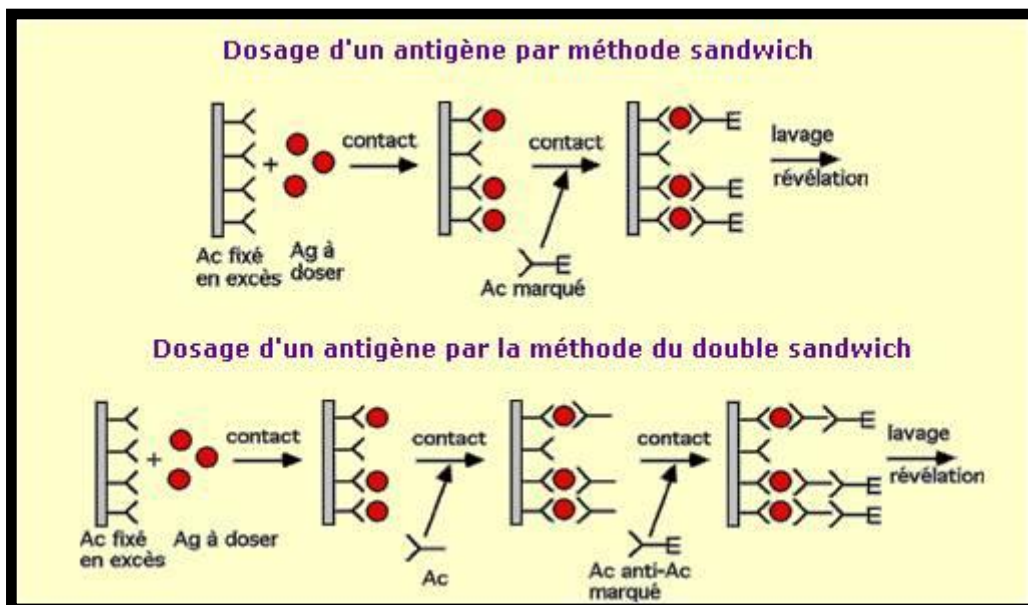


Figure 35. Technique ELISA sandwich

ELISA compétition

Ce test utilise l'inhibition compétitive par un Ac non marqué (il s'agit souvent d'un Ac monoclonal ou d'un mélange d'Ac monoclonaux) de la liaison entre un Ac marqué à un Ag correspondant. L'Ac non marqué (Ac^0) et l'Ac marqué (Ac^*) se fixent à l'Ag dans les proportions de leur mélange. La quantité du complexe Ac^*-Ag diminue au fur et à mesure qu'augmente la quantité d' Ac^0 dans le milieu. Une courbe étalon établie avec des quantités connues et croissantes d' Ac^0 pour une même quantité connue et constante d' Ac^* , permet par simple report de connaître une quantité inconnue d' Ac^0 contenue dans un liquide biologique.

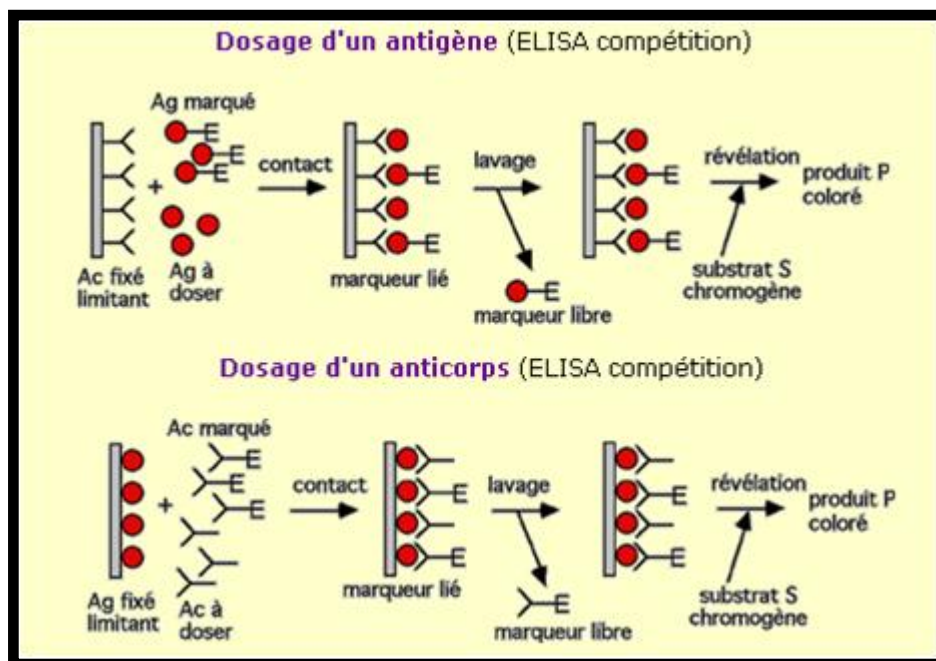


Figure 36. Technique ELISA compétition.

Western Blot (blot = buvard)

L'objectif de cette technique, qui est une variante du test Elisa, est de trouver une protéine dans un mélange complexe.

Rappel: Southern - blot pour l'ADN; Northern - blot pour l'ARN; Western - blot pour les protéines.

Etapes de la technique (Fig. 37):

1- Séparation du mélange de protéines dans un gel de polyacrylamide par électrophorèse ; la migration des protéines est en fonction de leur taille, indépendamment de leur charge

électrique (protéines toutes chargées négativement par le tampon SDS = sodium dodecyl sulfate).

2- Migration en parallèle de protéines de tailles connues (échelle en fonction des tailles moléculaires).

3- Coloration du gel à l'argent ou au Bleu de Coomassie

4- Blot ou " buvardage " : transfert par capillarité des protéines sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon.

5- Surcoating puis lavages de la membrane

6- Ajout du substrat (H_2O_2) et du chromogène, différent de celui utilisé pour le test Elisa (diaminobenzédine) mais on peut aussi utiliser des anticorps marqués avec un isotope, puis un film photo.

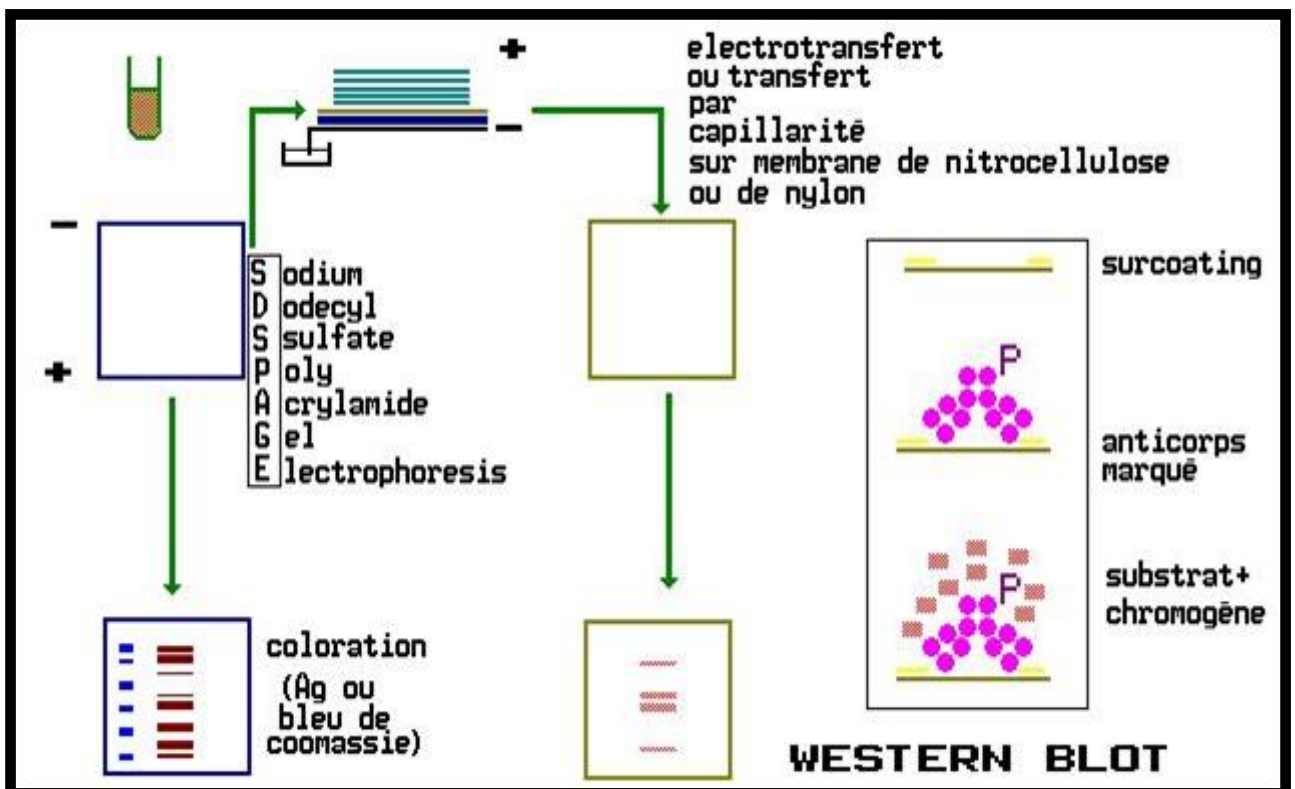


Figure 37. Les étapes de la technique Western Blot

Résultat : On obtient des bandes, ce qui permet de connaître la taille et la nature des protéines.

Remarque : Cette technique est utilisée pour confirmer un premier test HIV positif en ELISA, pour vérifier que les anticorps identifiés sont effectivement spécifiques d'antigènes de ce virus.

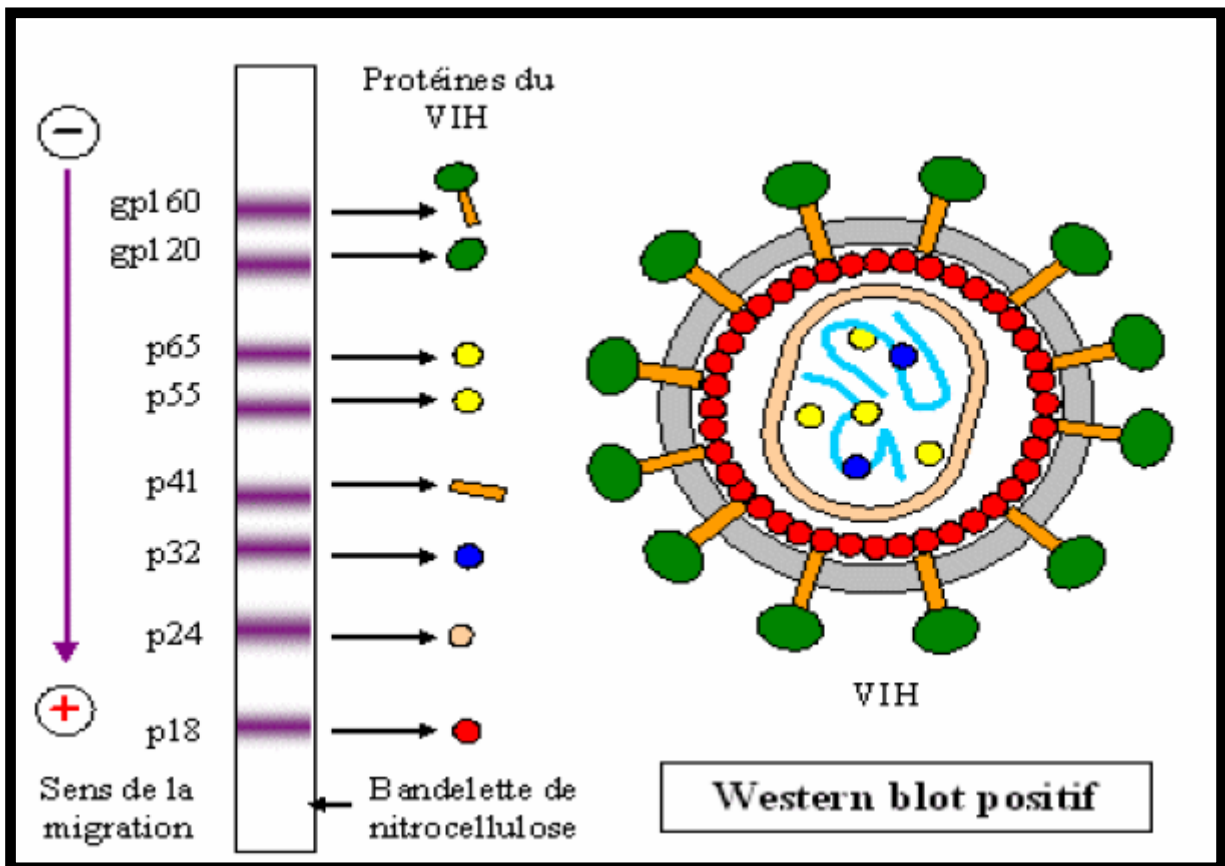


Figure 38. Western blot positif (dosage de VIH)

2.1.3 Techniques d'immunofluorescence

L'immunofluorescence (IF) est une méthode générale permettant d'identifier les antigènes dans les sections de tissus ou sur les cellules, ou d'identifier les anticorps dirigés contre ces antigènes.

Les fluorochromes : sont des substances qui, quand elles sont soumises à un rayon lumineux, deviennent instables (passent à un état excité) et qui, pour revenir à l'état fondamental, émettent une longueur d'onde différente de la longueur d'onde absorbée (émise > absorbée). Les marqueurs les plus utilisés sont :

L'**isothiocyanate de fluorescéine** (donne une fluorescence verte).

L'**isothiocyanate de rhodamine** (donne une fluorescence orangé).

Principe :

Un anticorps est couplé à un fluorochrome (isothiocyanate de fluorescéine ou rhodamine ...) qui est excité par un rayon UV et émet une lumière fluorescente (verte ou rouge ...); observation au microscope à UV.

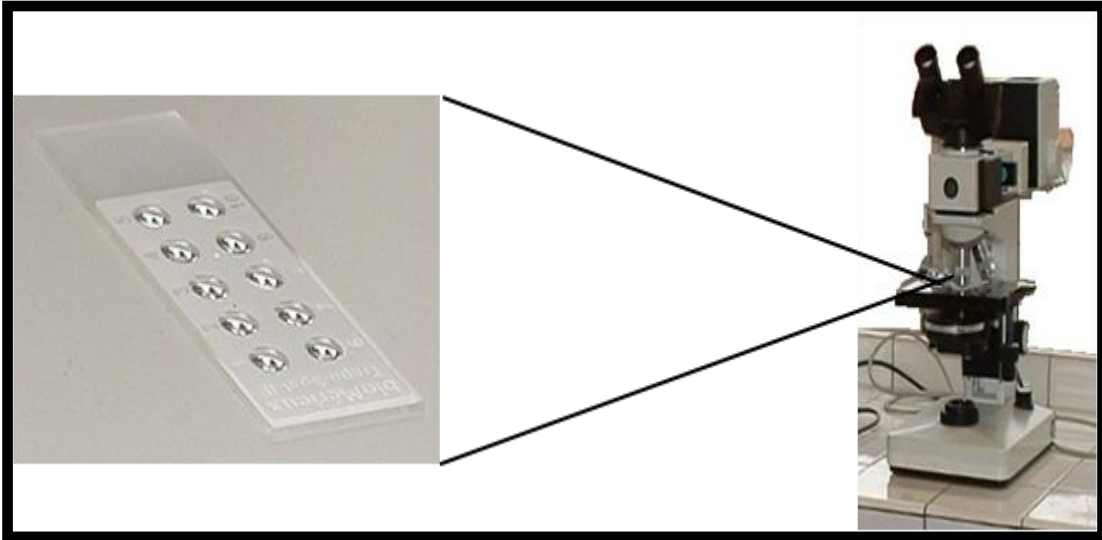


Figure 39. Microscope à fluorescence

En utilisant des sections de tissus (qui contiennent un grand nombre d'antigènes), il est possible d'identifier en une seule fois des anticorps dirigés contre plusieurs antigènes différents. Plusieurs auto-anticorps ont été dénombrés, chacun spécifique d'une protéine ou nucléoprotéine. Lorsqu'un anticorps est dépisté, il est titré et son aspect en fluorescence décrit. Celui-ci peut être soit homogène, homogène à renforcement périphérique, moucheté ou nucléaire.

2.1.3.1. L'immunofluorescence directe

L'anticorps est couplé de façon covalente à une molécule fluorescente, telle que la fluorescéine ou la rhodamine (Ac^*), puis est incubé avec les cellules. L'anticorps se lie à l'antigène spécifique et est visualisé par microscopie sous une lumière ultraviolette. Cette technique peut aussi utilisée pour visualiser ou rechercher par exemple l'actine du cytosquelette dans des cellules ou des tissus;

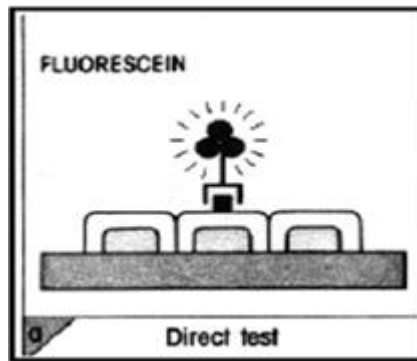


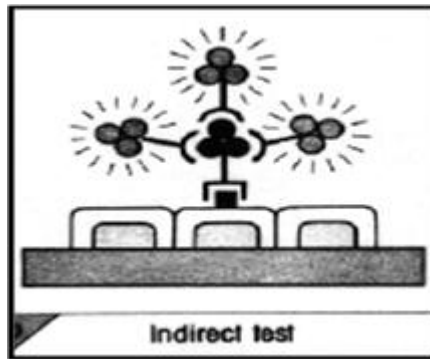
Figure 40. Principe de la technique de L'immunofluorescence directe.

Application

L'IFD est utilisée en anatomie pathologique pour reconnaître les marqueurs tumoraux, mais aussi pour visualiser ou rechercher par exemple: l'actine du cytosquelette dans des cellules ou des tissus; HIV sur les membranes cellulaires de cellules isolées ou de tissus; Les complexes immuns constitués d'anticorps anti-ADN et d'ADN déposés le long des membranes basales cutanées du Lupus Erythémateux Disséminé. Dans ce cas, les anticorps marquée anti-immunoglobulines humaines sont déposés sur des coupes à la congélation d'une biopsie de la peau du malade.

2.1.3.2. L'immunofluorescence indirecte

Dans cette technique, la section ou les cellules sont incubées avec l'anticorps à analyser, qui est visualisé par l'addition d'un second anticorps anti-immunoglobulines fluorescent qui se fixe sur le fragment Fc du 1^{ier} Ac. Cette technique est particulièrement intéressante pour identifier les anticorps dirigés contre des antigènes tissulaires. Exemple : des Ac dirigé contre les ilots de Langerhans sont détectés dans un sérum de patient diabétique en utilisant une section de tissu pancréatique, l'ajout de l'Ac* anti immunoglobulines fait apparaitre les ilots de Langerhans brillant sous le microscope à ultra violet.



. **Figure 41.** Principe de la technique de L'immunofluorescence indirecte.

2.2. Tests indirects (réactions secondaires)

2.2.1 Méthodes d'agglutination

La réaction d'agglutination permet de visualiser la fixation Ag-Ac. Si l'antigène est placé à la surface de grosses particules (bactéries ou parasite par ex), les Ac peuvent provoquer leur agglutination. Il s'agit de la liaison simultanée des molécules d'Ac à deux particules identiques. On distingue :

a. L'agglutination active directe et indirecte

Les épitopes sont possédés par les grosses particules. Les anticorps précipitant sont des anticorps primaires dans la technique directe et dans la technique indirecte il faut des anticorps secondaires anti-Ig pour former le réseau.





b. L'agglutination passive directe et indirecte





Les épitopes sont ici portés par de petites molécules greffées à la surface des grosses particules (biologiques ou inerte). Le couplage des antigènes peut être obtenu par divers procédés : traitement par le chlorure de chrome, la benzidine bisdiazotée et surtout, actuellement, le glutaraldéhyde et les carbodiimides.

Les réactions d'agglutination sont particulièrement utilisées pour le sérodiagnostic des affections microbiennes et le typage des groupes sanguins (hémagglutination). La découverte fondamentale des quatre groupes sanguins du système ABO, revient à Landsteiner en 1901. Il conclut à l'existence de deux antigènes du groupe sanguin «A» et «B»; les hématies d'un sujet donné portent soit l'un (A), soit l'autre (B), soit les deux (AB), soit aucun (O). Ces antigènes sont des glycoprotéines constitués de chaînes

hétérosaccharidiques multiples (L-fucose, N-acétyl galactosamine, D-galactose, N-acétyl glucosamine), branchées sur une sérine ou une tyrosine d'un squelette polypeptidique. Landsteiner conclut également à la présence d'alloanticorps anti-A et anti-B chez les sujets qui n'ont pas l'antigène correspondant :

Tableau 2. Les antigènes érythrocytaires et leurs agglutinines.

*N-acétyl*galctosamine  / *L-Fucose*  / *D-Galactose*  / *N-acétyl*glucosamine 

<i>Génotypes possible</i>	<i>Phénotype</i>	<i>Antigènes érythrocytaires</i>	<i>Unités saccharidiques élémentaires correspondantes</i>	<i>Agglutinines (classe de l'allo-Ac)</i>
<i>AA ou AO</i>	<i>A</i>	<i>A</i>		<i>Anti-B (IgM)</i>
<i>BB ou BO</i>	<i>B</i>	<i>B</i>		<i>Anti-A (IgM)</i>
<i>AB</i>	<i>AB</i>	<i>A et B</i>		<i>Aucun</i>
<i>OO</i>	<i>O</i>	<i>Aucun</i>		<i>Anti-A et Anti-B (IgM/IgG)</i>

2.2.2. Méthodes de précipitation

Lorsque des quantités suffisantes d'Ac se sont liées à des Ag solubles, on peut voir apparaître un précipité formé d'agrégats de molécules d'Ag réunies par l'Ac. Lorsqu'on ajoute différentes quantités d'antigène à une quantité fixe d'anticorps (ou l'inverse), un complexe se forme suite à la liaison des deux réactifs. En culottant les complexes formés et en mesurant les quantités d'anticorps ou d'antigène restant dans les surnageant, on définit trois zones :

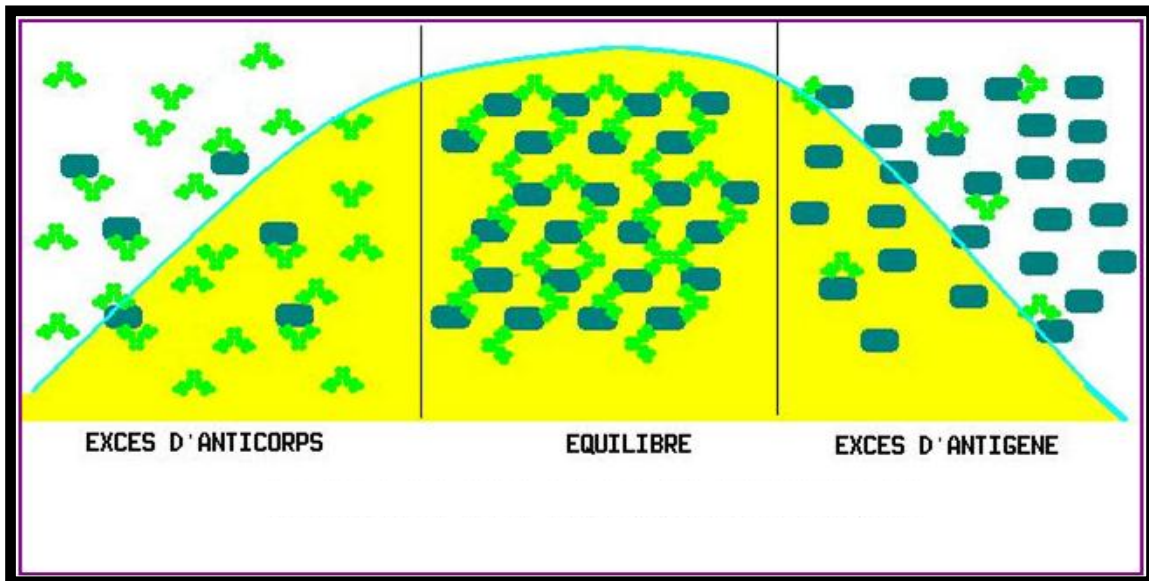


Figure 42. Courbe de précipitation

La quantité de précipité dépend des quantités d'anticorps et d'antigène :

- Au départ, il ne se passe rien (effet zone) : pas de ponts entre les Ag par **excès d'Ac**;
- Puis apparaît un trouble, un précipité : **zone d'équilibre** entre Ag et Ac formant un réseau moléculaire (Fig. 42).
- Enfin, ce trouble disparaît : dissociation du réseau par **excès d'Ag**.

Ainsi, en présence d'excès d'une des deux molécules, on accroît la proportion de complexes plus petits et donc moins précipitables.

2.2.2.1. Précipitation en milieu liquide

a. Le ring-test ou test de l'anneau

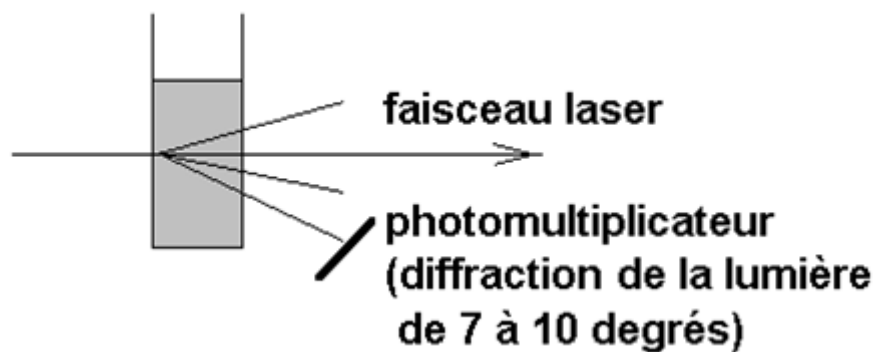
Les deux phases (phase inférieure contenant l'anticorps et phase supérieure contenant l'antigène) ne sont pas mélangées. L'antigène descend lentement au contact de l'anticorps pour former un complexe Ac-Ag à la zone d'équilibre de la courbe de précipitation. La position de l'anneau indique la présence de l'Ag ou de l'Ac que l'on recherche (Fig.43). Cet ancien test, surtout qualitatif, est un peu quantitatif par la position de l'anneau : plus il y a d'antigène, plus l'anneau est bas.



Figure 43. Test de l'anneau

b. Techniques de néphélométrie

Un rayon laser traverse le tube contenant d'éventuelles particules du précipité. La diffraction de la lumière par les particules (nephelos = nuage) est mesurée à la sortie. Plus il y a de précipité Ac-Ag, plus il y aura de signal sur le photomultiplicateur (appareil qui mesure la diffraction). La mesure, rapide et automatisée, permet un dosage quantitatif.



2.2.2.2. Précipitation en milieu solide

Le gel d'agarose (3% à 10%) utilisé retient les précipités dans ses mailles.

a. Technique d'Ouchterlony ou de double immunodiffusion

L'agarose est coulé sur une plaque de verre de quelques millimètres d'épaisseur. On y découpe deux puits à l'emporte-pièce : dans l'un des puits est placé un anticorps et dans l'autre puits est versé un antigène. Un précipité apparaît dans la zone d'équilibre. Ce test est qualitatif et semi-quantitatif : l'arc se déplace selon les concentrations relatives pour se situer le plus près du puits où la concentration est la plus faible. Quand la réaction est terminée (24 à 48 h), on peut laver l'agarose dans du sérum physiologique sans altérer le complexe immun retenu par le maillage de l'agarose, puis colorer les protéines du complexe immun pour révéler la bande de précipité.

Lors de l'utilisation d'une série de puits disposés en couronne au tour d'un puits central, la lecture peut révéler :

- ***Une identité totale*** : lorsque les deux lignes de précipitation se rejoignent et fusionnent pour ne former qu'une seule ligne continue, donc les deux puits contiennent des antigènes identiques qui diffusent à la même vitesse et possèdent le même poids moléculaire.

- ***Une non identité*** : les deux préparations antigéniques sont différentes (leurs déterminants sont différents). Chaque système de précipitation évolue pour son propre compte et les deux lignes de précipitation se croisent.

- ***Une identité partielle*** : dans ce cas, les deux puits contiennent des antigènes qui présentent des déterminants antigéniques identiques, mais qui diffèrent par quelques déterminants particuliers que possède un des deux antigènes ce qui entraîne la formation de l'éperon.

b. Technique de Mancini

On utilise un gel d'agarose qui contient déjà un anticorps :

Des puits sont percés dans lesquels on met l'antigène (Fig. 44). L'antigène diffuse dans le gel déplaçant la zone d'équilibre; après 48 heures les rayons des anneaux de précipitation, qui se sont progressivement éloignés du puits, sont mesurés car proportionnels à la quantité d'antigène.

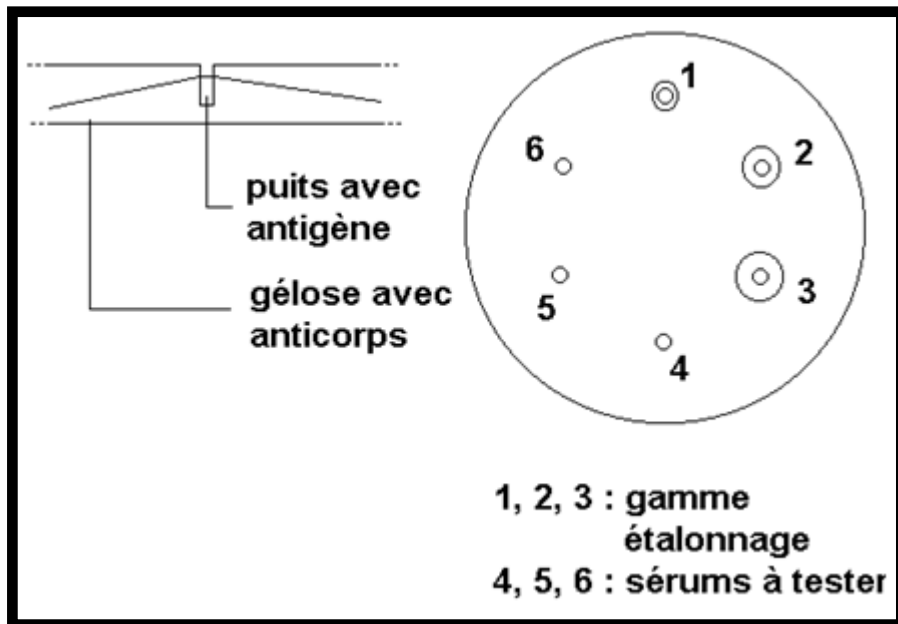


Figure 44. Schéma de la technique de Mancini

On peut réaliser ainsi une courbe d'étalonnage et obtenir un résultat quantitatif (Fig. 45).

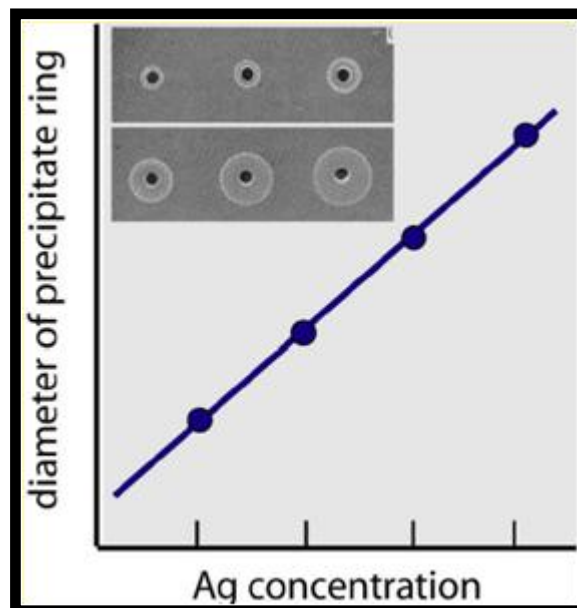


Figure 45. La courbe d'étalonnage

2.2.2.3. Méthodes associées à l'électrophorèse

a. Immunoélectrophorèse de Grabar et Williams

Les étapes sont les suivantes (Fig.46) :

Une lame de microscope est recouverte d'agarose et percée de deux puits. On sépare des protéines grâce à un courant électrique (ex : électrophorèse de sérum humain). On découpe ensuite une gouttière au milieu de la lame, dans laquelle on verse de l'anti-sérum polyclonal animal "anti-sérum humain" reconnaissant pratiquement toutes les protéines du sérum humain. Après diffusion, on obtient différents arcs de précipitation qui peuvent être colorés et comparés.

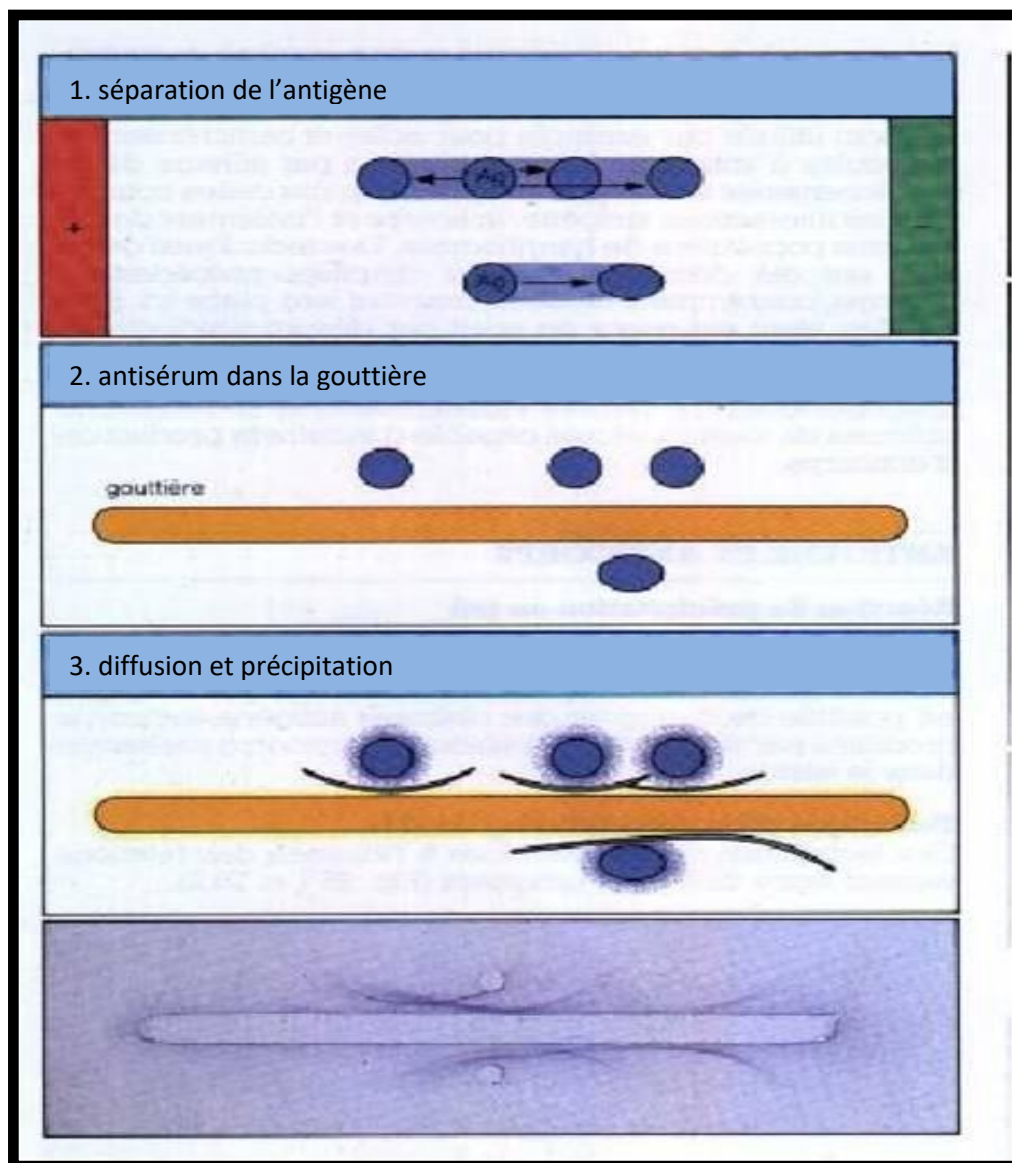


Figure 46. Schéma de la méthode d'immunoélectrophorèse de Grabar et Williams

Remarques

- La même chose peut être faite avec un seul anticorps.
- Cette technique est surtout appliquée dans l'analyse des liquides biologiques : LCR, urine, sérum, plasma... etc.

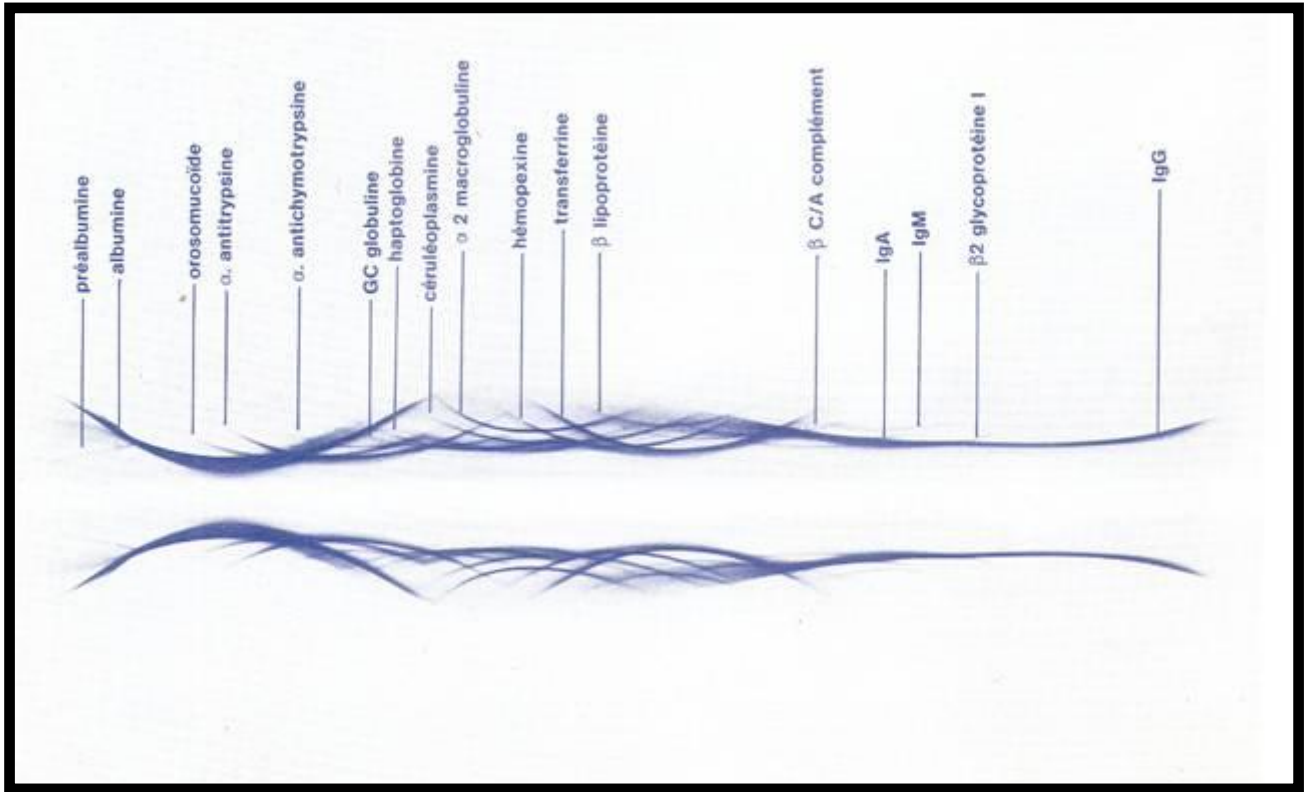


Figure 47. Photo de l'analyse d'un liquide biologique par l'immunoélectrophorèse

b. Immunofixation

L'immunofixation est une technique qui permet l'identification des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines monoclonales dans le sérum ou dans l'urine.

Première étape:

Électrophorèse, cette technique impose de faire migrer le sérum à tester plusieurs fois (autant de fois qu'il y aura d'anticorps utilisés dans la deuxième étape). La première piste de migration, après fixation de l'ensemble des protéines, sera l'électrophorèse témoin du patient.

Deuxième étape:

Les anticorps ne sont plus ajoutés dans une rigole, comme précédemment, mais ils sont déposés individuellement sur chacune des 5 autres pistes de migration. La présence de

l'analyte (ex : immunoglobuline monoclonale) se traduit par l'observation d'une bande étroite après coloration des complexes précipités.

L'immunofixation tend à supplanter l'immunoélectrophorèse en raison de sa rapidité d'exécution (moins de 2 heures), et surtout en raison de sa plus grande facilité de lecture.

Dans la figure (48) ci-dessous, l'examen par immunofixation révèle la présence d'une immunoglobuline monoclonale G de type kappa migrant conjointement aux protéines de la zone des gammaglobulines.

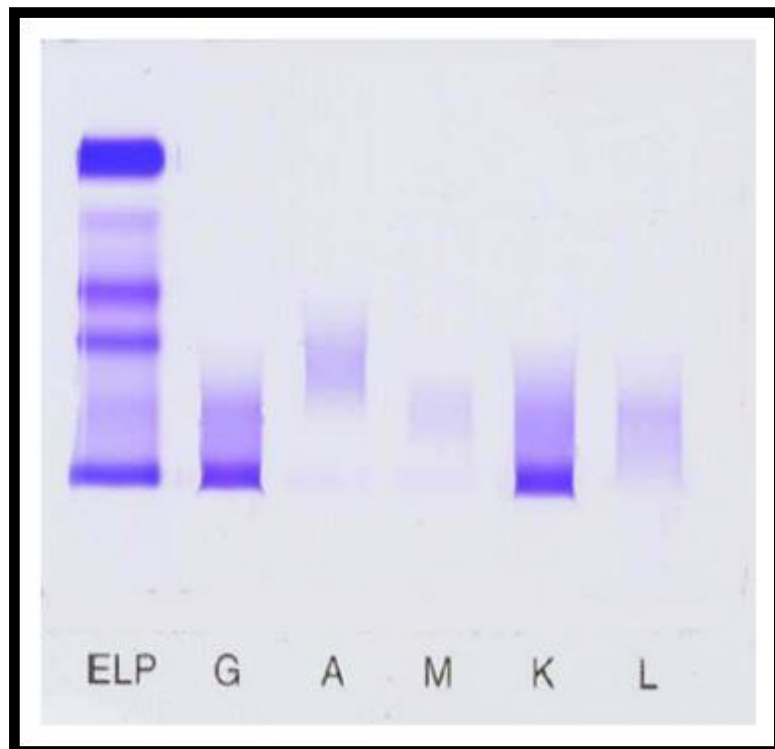


Figure 48. Identification des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines par L'immunofixation

Références bibliographiques

- 1- Immunologie, le cours de Janis Kuby, 7ème édition, Auteur : J.A Owen, Jenni Punt, S-A Stranford, (2014), Editeur DUNOD, ISBN 13, 9782100705436
- 2- Atlas d'immunologie, Auteur, Frédéric Gros, (2018), ISBN 13, Editeur DUNOD 9782100767052.
- 3- Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique 4 ème édition collection campus référence, Auteur : A.K. Abas, A.H. Lichtman, (2013), , ISBN 13, Editeur ELSEVIER-MASSON, 9782294724886
- 4- Mémento sciences, Immunologie humaine, 1er cycle psem-pcep, Auteur : Jen-luc Aymeric, Gérard Lefranc,(2009), Editeur DE BOECK, ISBN 13, 9782804119102
- 5- Janeway C. A., Murphy K., Travers P. et Walport M. Immunobiologie (2009) 3ème édition.
- 6- Martin S., Delves P., Burton D., and Roitt I.(2008). Fondements de l'immunologie. Edition de boeck.
- 7- Adiko A.C., Babdor J., Gutierrez-Martinez E., Guermonprez P. And Saveanu L. (2015). Intracellular transport routes for MHC I and their relevance for antigen cross - presentation. Front. Immunol., 6 /<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00335>