EXPLORATION DES MALADIES AUTO-IMMUNES

1. Rappels.

DEFINITION



Maladie auto-immune = pathologie caractérisée par une réponse immunologique contre les constituants du Soi, qu'elle soit à prédominance cellulaire ou humorale = diminution ou rupture de la tolérance.

Physiologiquement tout individu est tolérant au soi mais est programmé pour rejeter tout ce qui est étranger *(ex : allogreffe, infection...).*
Nota : une greffe venant d'un jumeau monozygote n'est pas une allogreffe puisqu'il y a partage du même patrimoine génétique.

TOLERANCE CENTRALE

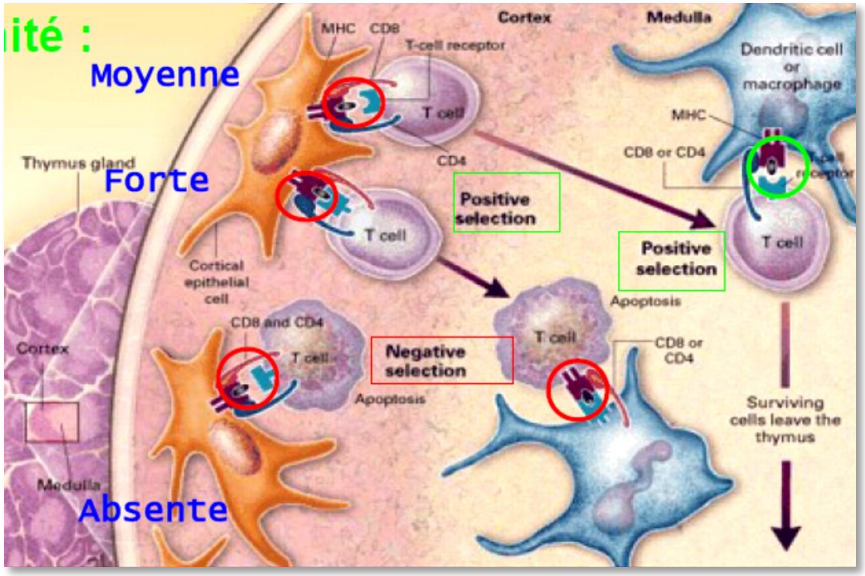
Thymus = lieu de maturation des lymphocytes où ils apprennent à être tolérant envers le soi.
Fonctionnement néo-natal + pdt les 1ères années de la vie puis involution graisseuse.

Sélection des lymphocytes en fonction de l'affinité entre les TCR et les complexes CMH-peptides : Faible/Absente.
Moyenne.
Forte.

1ère **sélection** = **sélection négative** : élimination des lymphocytes possédant une affinité trop faible pour les molécules CMH de classe 1/2.
2ème **sélection** = **sélection positive** : élimination des lymphocytes possédant une affinité trop forte pour les molécules CMH ayant un antigène dans la poche à peptides (donc reconnait trop les peptides du soi).

→ Elimination des lymphocytes incompétents par **apoptose**.
→ Lymphocytes sélectionnés capables de reconnaitre les MHC et les antigènes du soi = apprentissage de la différence soi/non soi et du répertoire des antigènes qu'ils pourront rencontrer durant leur vie en circulation.

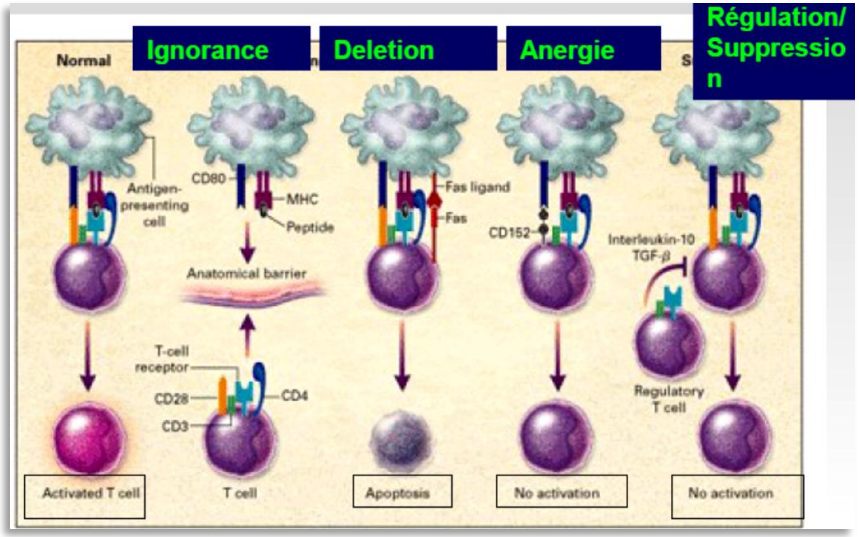
En cas de défaillance (~ 0,1%), passage dans la circulation de cellules T auto-réactives.



TOLERANCE PERIPHERIQUE

2ème **barrière** en cas d'échec de la barrière centrale.
Barrière formée entre autre par les **cellules T régulatrices.**
Permet d'éviter que 100% de la population ne déclenche une MAI.

MECANISMES DE LA TOLERANCE PERIPHERIQUE :



Sur le schéma :
Turquoise = TCR reconnaissant le MHC avec le peptide du soi.
Orange = CD28 = molécule co-stimulatrice reconnaissant CD180.
Vert = CD3.
Bleu = CD4, reconnait la partie constante du MHC (comme CD8).

1er schéma à gauche = **mécanisme physiologique** :
Reconnaissance d'une cellule présentatrice d'antigène présentant un antigène du non soi par un lymphocyte T et activation.
Présence de molécules stimulatrices indispensable à l'activation lymphocytaire.

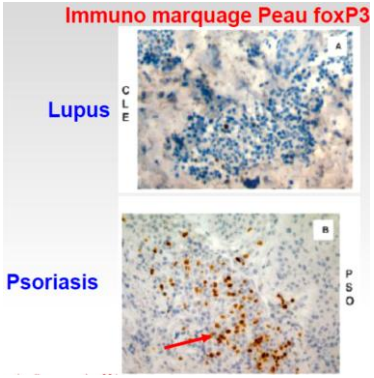
2ème schéma à gauche = **barrières anatomiques** :
- Rétinienne.
- Méningée.
- Hémato-testiculaire…

En cas de défaillance/effraction les lymphocytes T se trouvent en présence d'antigènes qu'ils ne connaissent pas en considèrent comme « non soi ».

3ème schéma au milieu = délétion :
Intervention d'un autre niveau de régulation via le récepteur FAS.
La liaison entre le lymphocyte T et la cellule du soi entraine la liaison entre le récepteur FAS (côté lymphocyte) et FAS-ligand (côté cellule) → signal d'apoptose.

4ème schéma à droite = inhibition :
Intervention des molécules co-stimulatrices qui en fonction de leur ligand peuvent avoir une action inhibitrice.
Ex : CD28 activatrice pour CD80 mais inhibitrice pour CTLA4.

5ème schéma à droite = régulation suppressive :
Intervention des cellules T régulatrices par le biais de cytokines.
Cytokine principale = IL10 puisque vous savez qu'il y a l'équilibre Th1/Th2 -IL2/IL4/IL10 → désactivation, suppression de l'activité.



/ !\ Le mécanisme réactionnel dans l'auto-immunité est le même que celui de l'immunité physiologique, mais dirigé contre les antigènes du soi / !\

CELLULES T REGULATRICES :

• **Etat stable** :
Cellules T régulatrices suppriment les réponses aux Ag du soi.
Peu de Tall Like Réceptors sur les cellules.
Co-stimulation faible.
Interleukines 2 et 6 et cytokines en quantité faible/moyenne.

• **Inflammation/infection** = perte de la capacité suppressive des cellules T régulatrices par :
- Forte augmentation des TLR sur les cellules.
- Importance des signaux de co-stimulation.
- Fort taux d'interleukines 2 et 6.

→ puis retour physiologique à l'état stable.

• **Pathologies auto-immunes** = persistance de cet état d'activation du système immunitaire.
Même s'il a réussi à se débarrasser de l'agent étranger il garde comme cible la cellule anciennement porteuse.
Ex : hépatite virale transformée en hépatite auto-immune qqs années après.
Nota : c'est pour cela qu'on s'était demandé s'il n'y avait pas à l'origine des MAI des infections ayant provoqué cette activation définitive du système immunitaire.
Et en effet il y a souvent un phénomène infectieux à l'origine du déclenchement de la pathologie auto-immune.

QUANTIFICATION des cellules T régulatrices tissulaires dans les MAI :
Marqueurs cellulaires = CD25 et foxP3.
Nota : il existe des marqueurs d'identité et des marqueurs d'activation.
Identification immunomarquage avec des Ac anti-marqueur cellulaire.
Ex : Lupus = maladie auto-immune → pas de cellules T régulatrices.
Psoriasis = maladie inflammatoire → présence de cellules T régulatrices.

MECANISMES DES MAI

• Défaillance tolérances centrale ET périphérique = rupture de la tolérance.
• Déclenchement selon la conjonction de plusieurs facteurs dépendants de l'hôte et/ou de l'environnement :

HOTE	ENVIRONNEMENT
• Susceptibilité génétique. *Ex : études sur des jumeaux non monozygotes montrant que seul l'un des 2 développait une MAI.* • Fonctionnement particulier du système immunitaire. • Sensibilité de certains tissus innée ou provoquée.	• Environnement infectieux. *Ex : infection méningée altérant la barrière hémato-méningée avec risque d'induction de MAI en présence de facteurs prédisposants (lymphocytes T auto-réactifs).* • Réactivité croisée des peptides identiques à des Ag du soi. *Ex : peptide de la paroi d'une salmonelle identique à un Ag cutané.* • Effet environnemental sur # tissus les fragilisant / modifiant les Ag du soi *(ex : soleil sur la peau) .*

• **Théorie du danger / de l'étranger** (immunologie fondamentale) → système immunitaire alerté soit par un élément étranger soit *... « vous n'avez pas vu ça ? Je ne peux pas refaire tout le cours là-dessus... »* des portions de molécules qu'on appelle les DAMP.

• **Toll Like Receptor** :
Reconnaissent les virus / bactéries / parasites.
Capables de reconnaitre des molécules du soi *(ex : HSP60, molécule du fibrinogène).*
TLR4 reconnait spécifiquement les molécules du soi → lorsqu'il est **activé** :
- **Activation des lymphocytes B** dont la capacité de présentation des Ag augmente (via des immunoglobulines de surface).
- **Augmentation de la sécrétion d'interféron alpha** permettant la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'Ac.
- **Production de cytokines** activant les lymphocytes T auto-actifs.
- **Diminution de l'activité des lymphocytes T régulateurs.**

→ activation du système immunitaire. Mécanismes des MAI

Conclusion :

• **Immunisation contre un Ag du soi (auto Ag)**

→ Modifications d'un Ag *(ex : agents infectieux, UV..)* ou apparition d'un Ag jusque là sanctuarisé *(ex : cristallin).*

→ Modifications de la réponse immune liées à une anomalie génétique, ou déficit des cellules T régulatrices...

• **Augmentation de la réponse immunitaire / Ag du soi**

→ Réactivité croisée Ag étranger/Soi ou expression aberrante d'une molécule co-stimulatrice.

→ Anomalies génétiques de la costimulation ou de la production des cytokines proinflammatoires (TNF) ou régulant TH1/TH2 (IFN).

2. Modèles expérimentaux animaux.



Les animaux utilisés en laboratoire peuvent :
- Spontanément développer une maladie auto-immune avec une susceptibilité génétique.
- Développer une maladie auto-immune induite par les chercheurs
  → destruction d'un gène (Knock Out).
  → introduction d'un gène pathologique.

DIABETE

Maladie désormais bien connue grâce à l'utilisation de modèles animaux : les **souris NOD** développant spontanément un diabète à 4 semaines.
→ Etude du rôle du système immunitaire dans le déclenchement du diabète.

CONSEQUENCES TISSULAIRES ET ORGANIQUES

• **Fixation d'auto-Ac sur les tissus cibles :**
Cytolyse
Opsonisation-phagocytose
Ex : Ac anti-récepteur de l'acétylcholine dans la myasthénie, Ac anti-TSH dans l'hyperthyroïdie.

• **Actions des Lymphocytes T auto réactifs :**
Cytotoxicité.
Production de cytokines.
Ex : diabète insulinodépendant, thyroïdite...

• **Evolutivité de la réponse auto-immune :**
Auto-Ag nombreux et évolutifs depuis l'initiation du processus jusqu'à l'expression de la maladie = cibles des auto-Ac et des cellules T auto-actives
Cellules effectrices et médiateurs évoluant.
Difficulté à mettre en place une thérapeutique + rôle imprévisible des cytokines pléiotropiques à action # selon le stade de la maladie.

Nota : lorsqu'on parle du système immunitaire on parle vraiment de l'immunité spécifique. Mais il existe une première barrière qui est l'immunité innée dans laquelle interviennent les polynucléaires et les monocytes/macrophages. L'intermédiaire entre les 2 sont les cellules présentatrices de l'antigène.

• **Observation n°1** : les souris possèdent **+++ interféron gamma + IL 2 (cytokines de type Th1).**
→ les souris privées de ces molécules ne déclenchent pas de diabète.
→ les souris « normales » aux quelles on administre ces molécules font un diabète.
• **Observation n°2** : en cas de destruction du **gène de la béta-2-microglobuline** chez les souris NOD entrainant un MHC de classe I défectueux, celles-ci ne développent pas de diabète → rôle apparent du MHC. Or ce sont les CD8+ qui atteignent le MHC de classe I.
• **Observation n°3** : présence **+++ de cellules CD8+** dans les pancréas inflammatoires des souris NOD.
• **Observation n°4** : présence de **molécules co-stimulatrices** +++.

Rappel : la béta-2-microglobuline est la chaine légère associée au MHC de classe I.

Identification de l'identité moléculaire similaire entre les molécules du HLA de classe II de la souris des molécules présentes dans le pancréas et des peptides de la pro insuline *(et même avec certains peptides viraux)* → similitude entre ces différents peptides.
Ainsi le système immunitaire commence par reconnaitre ce que porte le HLAdr puis une fois activé il va détruire les cellules produites par le pancréas → **phénomène de reconnaissance du soi et de destruction par les cellules T auto-réactives.**

THERAPIES :
• Espoir d'une thérapeutique ciblée.
• Vaccination = tentative d'empêcher le système immunitaire de détruire le pancréas en l'empêchant de le reconnaitre.
Mais aujourd'hui pas du tout au point.
• Greffe d'ilôts pour aider le sujet à produire de l'insuline + traitement antirejet.
• Certaines études actuelles prélèvent les ilôts restants des sujets malades, les font pousser en culture et les réimplante.
• Greffe de pancréas entier.

SCLEROSE EN PLAQUE

Injection de myéline à des souris → déclenchement d'une maladie identique à la sclérose en plaque par destruction de la myéline.
Mécanisme = reconnaissance de la myéline comme un antigène étranger, donc production de cellules T et d'anticorps contre la myéline.

AUTRES MALADIES

• Polyarthrite rhumatoïde induite par injection de collagène à des rats.

• Souris déclenchant spontanément des lupus à cause de mutations du système FAS/FAS-ligand :
Les cellules T et B auto-réactives ne se détruisent jamais
→ syndrome lympho-prolifératif
→ beaucoup d'anticorps
→ hypergammaglobulinémie
Hyper activation du système immunitaire à cause d'un trouble de l'apoptose du fait de cette mutation.

Rappel : physiologiquement le système FAS/FAS-ligand est là pour arrêter le système immunitaire lorsqu'on n'en a plus besoin.

3. Explorations cliniques.

Pour étudier une pathologie auto-immune il faut étudier :
• La prédisposition génétique (dont le HLA est au cœur).
• Le système immunitaire versant humoral (auto-Ac très facile à étudier).
• Le système immunitaire versant cellulaire (plus complexe, cf. souris).
• L'inflammation provoquée par ces pathologies.

Tous ces tests ne s'effectuent qu'à condition d'avoir une indication clinique.

Nota : auto-anticorps ne signifie pas systématiquement maladie auto-immune.
Il existe des auto-anticorps physiologiques, chez les personnes âgées par exemple.

IDENTIFICATION DES ANTICORPS

Techniques très faciles, de base en immunologie.

• Immunofluorescence indirecte :
- Cellules ou tissus préparés et déposés sur une lame de verre.
- Mise en présence avec le sérum du patient.
- Incubation à l'air ambiant pendant 30min.
- Ajout d'une anti-immunoglobuline humaine couplée à un fluorochrome.

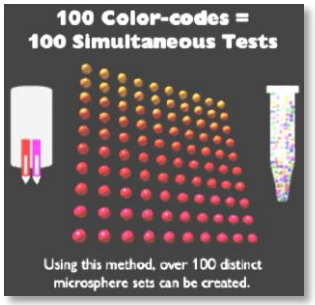
→ si le patient possède l'anticorps recherché celui-ci se sera fixé sur le tissu sur son antigène spécifique → fluorescence.

Nota : il n'y a pas de spécificité d'espèce pour les tissus ! Quand on recherche un anticorps-anti estomac, on peut le prendre d'un rat ou d'un singe pour faire des recherches sur des tissus humains.

• Techniques immuno-enzymatiques *(ex : ELISA) :*
~ même principe que l'immunofluorescence indirecte sauf que cette fois l'anti-immunoglobuline humaine est couplée à une enzyme.
Lorsqu'on met le substrat de l'enzyme celui-ci est coloré/décoloré.

Support de l'antigène: Micropuit dans une plaque de plastique.
Feuille de microcellulose.

• Technique Multiplexe :
Permet d'étudier beaucoup d'auto-anticorps à la fois.



- Microbilles sur lesquelles sont fixés différents antigènes. Chaque bille a une couleur propre.
- Incubation avec le sérum du patient.
- Mise en présence avec des anti-immunglobulines humaines fluorescentes.

Toutes les billes fluorescentes signifient que le patient est porteur d'anticorps contre leur antigène, identifiable grâce à leur couleur respective.

En tout on peut utiliser 100 antigènes différents.

• Technique Protéomique :
Utilisation de **biopuces à auto-antigène**.
Permet de tester un patient pour tous les auto-antigènes présents sur la biopuce !
Se rapproche de l'idée d'immunofluorescence.

- Permet d'identifier différents types cliniques d'une maladie.
Ex : identification de plusieurs antigènes cibles dans la polyarthrite rhumatoïde.
- Permettra peut-être d'ajuster les traitements selon les cibles antigéniques de chaque patient, différentes alors qu'ils ont la même pathologie.

IDENTIFICATION DES CELLULES

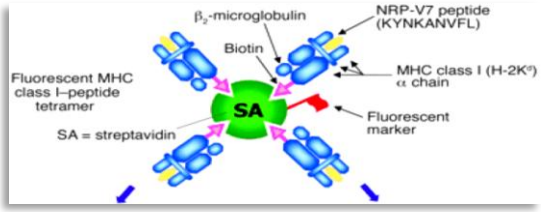
Techniques plus complexes.

Technique des tétramères *(exemple de quantification des cellules CD8+ reconnaissant les antigènes du pancréas chez la souris NOD)* :

• Pour qu'un lymphocyte T **CD8+** reconnaisse un antigène il faut que celui-ci soit présenté par une molécule du CMH de **classe I**.
→ utilisation de molécules de CMH de classe I couplées à l'antigène désiré.

La molécule de CMH doit appartenir au soi.

• De plus s'il n'y a qu'une seule molécule le lymphocyte va avoir du mal à reconnaitre.
Il faut fabriquer des multimères de ces molécules HLA de classe I avec le peptide antigénique dans la poche à peptide.



→ 4 molécules HLA de classe 1 que l'on colle avec de la streptavidine ou de la biotine *(colle permettant de rendre les réactions plus visibles et plus importantes)* et auxquelles on ajoute un marqueur fluorescent.

• Les lymphocytes CD8+ sont identifiés par la technique de phénotypage via un anticorps anti-CD8 et le passage de la cellule devant un laser.
Ainsi les cellules CD8+ qui ont fixé les tétramères fluorescents auront une double fluorescence :
- Une couleur pour le marqueur CD8
- Une couleur pour le tétramère

Cf. modèles animaux : ce type de cellules reconnaissant le HLA est retrouvé dans les souris NOD.

Remarque : en pathologie humaine c'est beaucoup plus dur d'utiliser ce type d'outils notamment du fait qu'il y a une grande diversité d'antigène même si 50% de la population est HLAa2.
Les techniques d'identification des cellules T auto-réactives et des cellules spécifiques à un auto-antigène en pathologie humaine ne sont quasi pas réalisées.

Mais ce sont des techniquement intéressantes car elles permettent de trouver à la fois l'activation du système immunitaire et sa cible.

4. Maladies auto-immunes.

GENERALITES

• 5 à 7% de la population.
• Prédominance féminine +++++++

• Prévalence en 3ème position après les cancers et les maladies cardio-vasculaires.
• Evolutivité non prédictible.
• Souvent des syndromes « chevauchant » à cheval entre 2 pathologies

→ lorsqu'on a une pathologie auto-immune avec un terrain de susceptibilité génétique on risque + d'en avoir une 2ème.
• Diagnostic tardif par rapport au véritable début de la maladie qui commence plusieurs années avant.
• Prise en charge précoce ++++ car certaines pathologies auto-immunes ont un risque de complications majeures voire vital.
Ex : risque vital chez le nouveau né atteint d'un lupus.
Risque de cécité dans la maladie de Horton (vascularite atteignant l'artère temporale).

Mécanismes à connaitre car permettent d'ajuster les traitements/d'en produire de nouveaux.

Par simplification, tentative de classification des MAI selon :
- La cible (organe ? systémique ?)
- La réponse prédominante (humorale ? cellulaire ?)
- Le type de HLA entrainant une + forte susceptibilité (classe I ? II ?)

APPORT DE LA BIOLOGIE

Favoriser les examens quantitatifs à des périodes où il y a beaucoup d'anticorps.

Diagnostic clinique évident :
- Confirmation diagnostique.
- Diagnostic étiologique.
- Pronostic (certains auto-anticorps peuvent être dangereux).

Ex : anticorps spécifiques SSA dans le lupus qui peuvent passer la barrière placentaire chez la femme enceinte et par similitude avec le faisceau de Hiss peuvent entrainer un bloc auriculo-ventriculaire chez le fœtus.

- Suivi de la maladie.
- Surveillance après traitement.

- PAS DE DEPISTAGE à l'échelle de la population car encore une fois **il existe des auto-anticorps physiologiques/non témoins d'une MAI** notamment du à la fatigue du système immunitaire au cours des années, certains médicaments, en réaction à une pathologie infectieuse…
- De même pas de prescription à l'aveugle ! elle doit être orientée par la clinique.
- D'ailleurs il existe de MAI sans auto-anticorps comme la maladie cœliaque (les patients ont souvent un déficit en IgA).
→ il est quasiment impossible d'anticiper une MAI avant les symptômes cliniques, sauf dans une famille présentant une susceptibilité génétique *(ex : famille de diabétiques).*
Et de toute façon il n'y a pas de solution après le dépistage *(ex : on ne va pas mettre les personnes de cette famille sous immunosuppresseurs).*

Diagnostic clinique difficile -> aide au diagnostic.

Nota : les tests d'auto-immunité ne sont pas très chers pour des tests spécifiques.

5. Lupus érythémateux disséminé.

GENERALITES

LED en français - SLE en anglais.

• Prototype des MAI.
Appartient à la famille des « **connectivites** » (au départ on pensait que cela venait du tissu conjonctif).
Touche tous les organes.

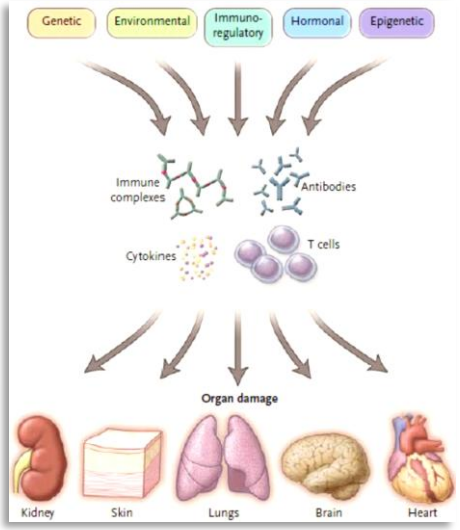
• Prévalence occidentale = 40cas pour 100 000personnes.
Espérance de vie = 80% à 15 ans
- Mortalité avant 35 ans due à des infections ou l'inflammation associée notamment dans le cadre d'infections vasculaires.
- Après 35 ans les sujets meurent d'un IDM ou AVC.

• **Diagnostic** = auto Ac anti nucléaires spécifiques du DNAnatif, des nucléosomes et des Ag solubles dans le noyau.

• **Morbidité** :
Ac anti nucléaire soluble SSA chez femme enceinte entrainant un bloc auriculo-ventriculaire chez le fœtus.
Ac anti C1q (fraction du complément) favorisant le risque néphrotique.
Ac anti phospholipides-beta2GP1 favorisant le risque thrombotique (cf. TSSI).

• **Traitement** :
On espère une immunothérapie.
Beaucoup de recherches actuelles portent sur des anticorps anti-cytokines ou anti-cellules de l'immunité.

PHYSIOPATHOLOGIE



Facteurs dus à l'hôte :
- Susceptibilité génétique.
- Jumeaux monozygotes = 25% de risque pour l'un si l'autre a un lupus.
- Jumeaux dizygotes = 2%.

→ **concordance génétique.**
- Gènes susceptibles d'avoir une influence sur quasiment tous les chromosomes.

- Système immunitaire particulier.

Ex : aplotype HLA A1 B8 DR3 spécifique des MAI.

- Facteurs hormonaux (susceptibilité féminine).
- # facteurs épigénétiques actuellement objet de recherches.

Facteurs liés à l'environnement :
- Radiations - UV.
- Certains médicaments.
- Certains virus *(ex : anti-EBV chez 5% de la population lupique).*

REPONSE IMMUNE

- Même schéma que le fonctionnement normal, mais mal dirigé.

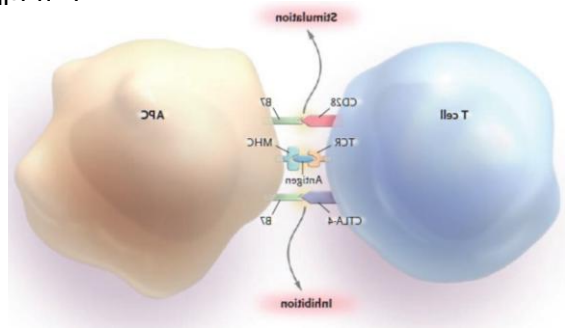
Reconnaissance de l'antigène par la cellule dendritique → activation du TCR → activation des LB via la co-stimulation CD40/CD40-ligand (utilisation en thérapeutique mais peu efficace).

- Auto-antigènes reconnus induits par l'apoptose induite libérant tout un tas de molécules susceptibles d'être reconnues par le SI *(ex : apoptose des kératinocytes après irradiation UV).*

- **Rôle des cytokines** :

TNF alpha
IL 10
IFN alpha
Utilisation comme cibles thérapeutiques pour traiter les symptômes.

Ce ne sont pas réellement les anticorps qui produisent les symptômes car il faudrait qu'ils rentrent dans les cellules or in vivo ils restent à la surface.
Ils se déposent sur la membrane basale glomérulaire.
Certains se fixent sur des protéines à cause de réactions croisées.

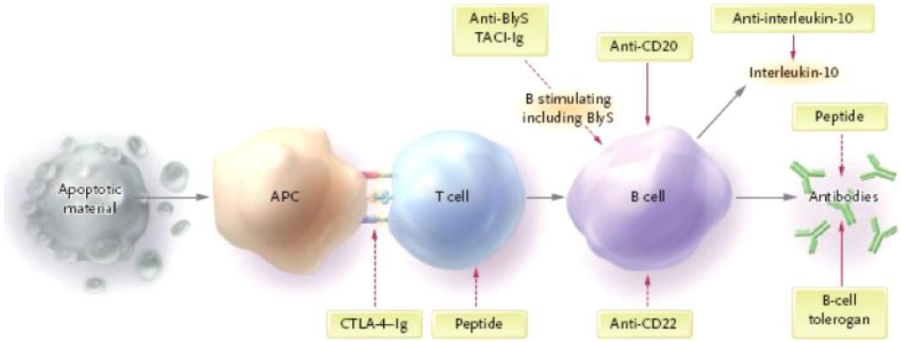


Donc ils entrainent des destructions
sur certains organes mais ils n'entrainent pas à proprement dit la maladie.

La seule MAI due directement à des auto-anticorps est la myasthénie (blocage de la jonction neuromusculaire par fixation au niveau des récepteurs de l'acétylcholine).

CIBLES THERAPEUTIQUES

En dehors de l'immunosuppression thymique de type corticothérapie on essaie



de faire une immunothérapie + spécifique et on essaie d'intervenir à tous les niveaux.
Malheureusement à ce jour il n'y a pas de traitement miracle.

DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE EN PRATIQUE

1. **Recherche d'auto-anticorps en immunofluorescence directe.**

Les procédures sont standardisées mais l'interprétation reste subjective puisqu'humaine.
Cible antigénique = DNAnatif visualisée.
2. Technique ELISA.