

L2

Date : 16.03

Professeurs : Bernard

Nombre de pages : 17

2011-2012



TISSU SANGUIN ET SYSTEME IMMUNITAIRE

Ronéo n° 8:

Intitulé du cours : Immunologie

Chef Ronéo : Margot Le Calvé-Mullet

Binôme: Alexis Fremery & Jade Janicot

Corporation des Carabins

Niçois

UFR Médecine
28, av. de Valombrose
06107 Nice Cedex 2
www.carabinsnicois.com
vproneo@gmail.com

Partenaires



Rôles fonctionnels du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

I. Introduction

Molécules présentatrices d'antigènes et sont fondamentales pour la réponse immunitaire. Elles sont à l'initiation du complexe immunitaire **spécifique**, on n'en a pas besoin dans l'immunité naturelle. Elles vont présenter des molécules du tissu étranger (virus, bactérie, greffon...) pour le rejeter.

→ Quelques définitions :

- **Gène** : région d'un chromosome contenant l'information nécessaire pour permettre la synthèse d'une protéine
- **Allèle** : se dit de 2 caractères situés sur des chromosomes homologues ex : gp sanguin A, B, O
- **Haplotype** : moitié du patrimoine génétique sur une région donnée et hérité de l'un des parents.
Les molécules d'histocompatibilité font partie de cette famille où tous les gènes ne sont pas répartis sur plusieurs chromosomes, mais sur une région limitée d'un seul et même gène. Facile à connaître car grand nombre de molécules codées exactement dans la même région : « transmission en bloc » très utilisé en histocompatibilité et permet de faire un suivi d'un gène au fil des générations.
- **Génotype** : définition d'un individu selon ses gènes. Ex : A/A ou A/O
- **Phénotype** : définition d'un individu selon les produits de ses gènes. ex : A
- **Crossing-over** ou **enjambement** : durant la méiose on assiste à la réduction du nombre de chromosomes qui seront répartis dans les C filles (gamètes) pendant cette étape il existe des échanges de matériels génétiques (recombinaisons) entre 2 chromosomes homologues

L'histocompatibilité est à l'origine du rejet notamment de greffes d'organes.

- **Autogreffe** : tissu d'un individu greffé sur lui-même (peau, moelle, veine). Le rejet est exclu.
- **Allogreffe** : greffe entre individus d'une même espèce.
- **Greffe syngénique** : greffe réalisée entre individus génétiquement identiques (souris de la même souche et jumeaux monozygotes). Cette méthode permet d'éliminer tous les problèmes d'histocompatibilité.
- **Xénogreffe** : greffe réalisée entre individus d'espèces différentes. Permettrait de répondre à l'insuffisance des greffes d'organes.

Les antigènes que l'on rencontre ne peuvent pas être reconnus de façon direct par les LT, ils ont besoin d'être modifiés, d'être transformés; et cette fonction est assurée par les molécules du complexe majeur d'Histocompatibilité (CMH = HLA : Human Leucocyte Antigène).

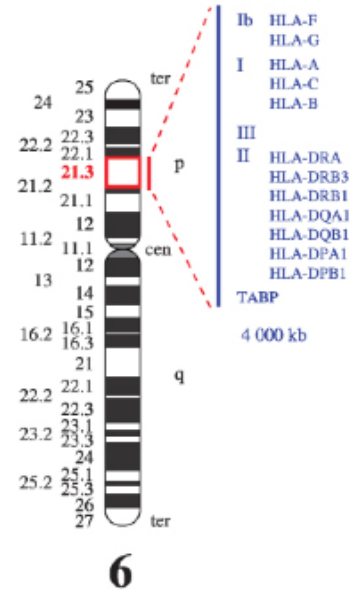
→ La caractéristique majeure du CMH est son **extrême diversité**. Aucuns individus ne sont parfaitement identiques. Il y a une très grande variabilité pour présenter un peptide particulier. En fonction d'un virus donné aucun de nous ne présentera des peptides de la même façon. Ceci expliquant les rejets de greffe !

II. Rôle fonctionnel du CMH

Il y a une petite partie du chromosome 6 où sont codés tous les gènes de ces molécules. Cet ensemble est transmis de génération en génération (utile pour établie les filiations). Chromosome 6 : beaucoup de molécules impliquées dans la réponse immunitaire.

→ Il existe 3 classes de molécules d'histocompatibilité :

- **Classe I** : essentiellement des molécules A, B, C → molécule d'histocompatibilité classiques, se sont les molécules types qui vont présenter les antigènes et qui ont cette fonction bien spécifique de présenter des antigènes différents.
Il y a aussi des non classiques : F, G et d'autres
- **Classe II** : expression cellulaire différente avec des associations moléculaires particulières
- **Classe III** : moins polymorphiques que les classes I et II, elles sont essentiellement représentées par les protéines du système du complément et le TNF. N'ont pas réellement un rôle d'histocompatibilité ni par leur structure ni par leur fonction (Classe III = abus de langage historique)

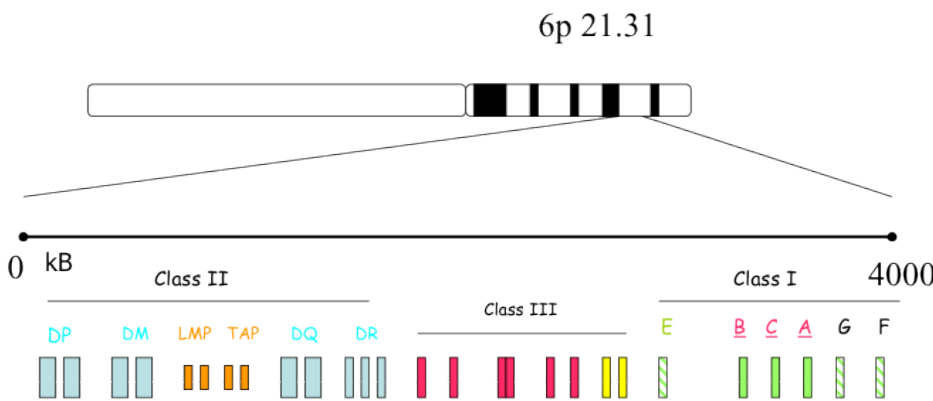


Déséquilibre de liaison : différence qu'il existe entre les fréquences des locus des Antigènes. Il y a des associations préférentielles par rapport à ce que l'on pourrait calculer théoriquement.

Explication : En fonction d'un phénotype, on a observé qu'il y avait une fréquence d'expression plus grande de certains gènes par rapport à d'autre.

Ce déséquilibre de liaison est observé préférentiellement chez les patients qui ont une maladie auto-immune sans savoir pourquoi.

→ Localisation :



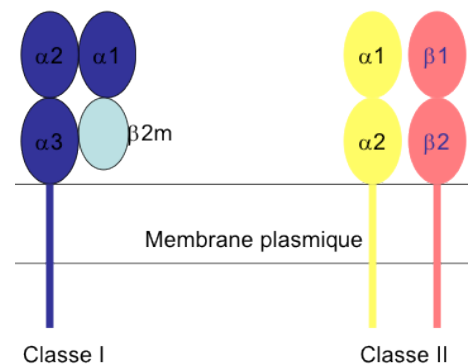
Classe I : 2 chaînes mais la chaîne légère n'est pas codée par des gènes présents sur ce chromosome 6 mais est constante entre les individus et les espèces.

Classe II : 2 chaînes

Ces molécules d'histocompatibilité sont des glycoprotéines comportant 2 chaînes, hétérodimériques (2 chaînes différentes) et codées par des gènes présents sur le bras court du chromosome 6.

→ A quoi ressemblent-elles ?

Pendant très longtemps on a su qu'elles ressemblaient sûrement à des protéines d'immunoglobulines. Elles ont une structure fondamentale globulaire avec des domaines qui ressemble à des immunoglobulines. On les appelle d'ailleurs la superfamille des immunoglobulines.



Classe I : 3 domaines associés à la β_2m qui n'a pas d'association intra cytoplasmique et donc ne transmet pas de signaux vers l'intérieur de la cellule.

Classe II : 2 domaines d'immunoglobuline toutes les deux ancrées dans la membrane cytoplasmique et donc il y a une petite région cytoplasmique qui permet de transmettre des signaux vers l'intérieur de la cellule.

➔ **Historique :**

Le système majeur d'histocompatibilité découvert par Jean Dausset (Prix Nobel Français en 1980), s'est intéressé à rechercher s'il existait sur les globules blancs un système de groupe sanguin comparable à celui des globules rouges. « Il est tombé sur une mine d'antigènes différents sans s'y attendre ».

Il a testé et pris les globules blancs de ses patients (polytransfusés), de son personnel, etc... et s'est rendu compte par technique d'agglutination, que certains sérums permettaient d'agglutiner certaines cellules et pas d'autres, et certains sérum ne permettaient d'agglutiner aucune cellule. Et il a commencé à faire une nomenclature en organisant toutes ces données.

60% des individus possèdent l'antigène A2 mais associé à beaucoup d'autres antigènes.

Il a très vite eu l'idée de partager et ainsi de faire très vite évoluer la connaissance sur ces nouvelles molécules. Il a très vite travaillé avec des laboratoires qui se sont intéressés à différentes parties du problème : femmes multipares qui ont très souvent des anticorps dirigés contre ces molécules ; chez les poly transfusés même spécificité ; coté technique de la chose très ingérable ➔ miniaturisation des techniques pour les rendre plus facile à comparer. Tous les laboratoires intéressés par le sujet se réunissant pour partager et échanger leurs connaissances sur le sujet chaque année, pour faire avancer les connaissances et définir les fonctions de ces classes moléculaires.

Au cours du temps :

En faisant des analyses familiales, on a su qu'il y avait une transmission au travers des générations. Terme HLA très vite consacré.

- Complexe majeur d'histocompatibilité ➔ pas spécifique à l'Homme.
- Human Leucocyte antigène = CMH Humain ➔ spécifique à l'Homme

Les antigènes HLA sont des glycoprotéines hétérodimériques : (*je ne pense pas que les chiffres soient importants*)

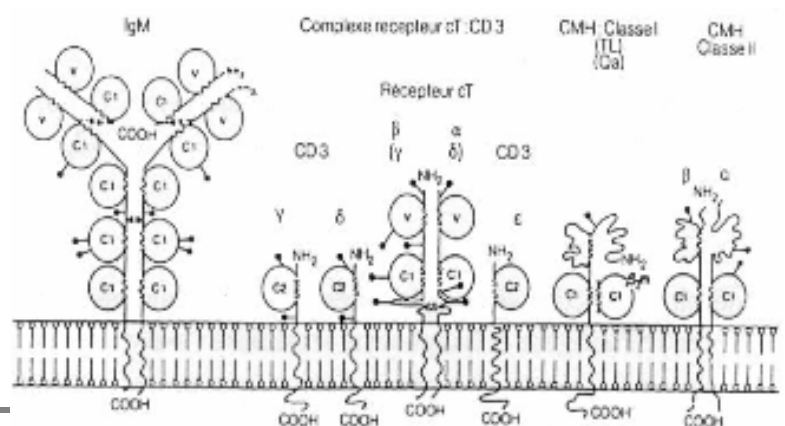
- **Classe I :** une chaîne lourde de 45 kD et une chaîne légère de 12 kD, la β_2 microglobuline
- **Classe II :** une chaîne lourde α 34 kD et une chaîne légère β 29 kD

Densité des gènes dans cette région très très élevée.

Domaine d'immunoglobuline : structure particulière de deux feuillets bêta en forme de tonneau.

➔ **Super famille des immunoglobulines**

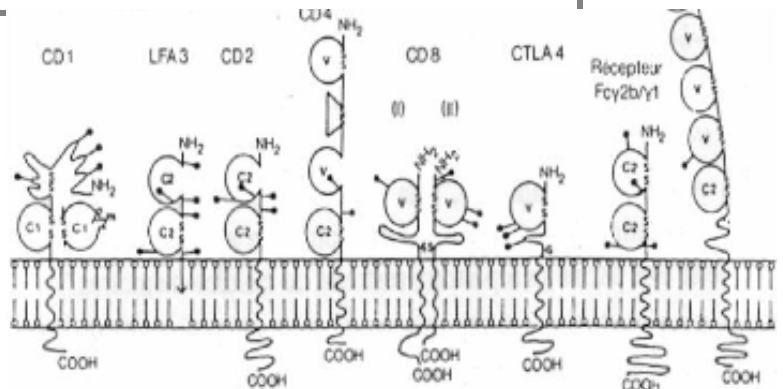
On voit ici à quoi ressemble un anticorps à l'extrême gauche. Toutes ces structures sont la marque de la superfamille des immunoglobulines. Cette structure s'étend à beaucoup d'autres molécules : du système



immunitaire (Récepteur cT, CD3, CD4) mais aussi en dehors du système immunitaire.

L'expression de ces molécules est variable en fonction du type cellulaire, mais les molécules HLA de classe I sont exprimées dans toutes les cellules de l'organisme.

Important : Les cellules dendritiques dans un



environnement cytokiniques favorables peuvent multiplier par 10 leur expression moléculaire, ceci étant nécessaire à la présentation antigénique.

Une cellule dendritique performante est une cellule qui régule parfaitement ses molécules en fonction des besoins de l'organisme.

Les molécules de classe II ne sont pas présentes à l'état basal sur les LT et l'endothélium, elles doivent être activées.

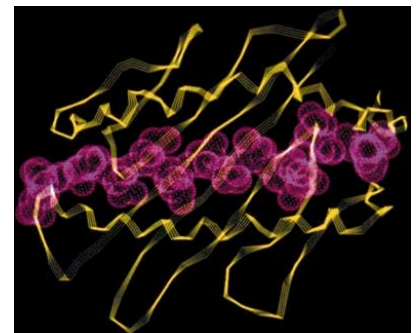
Type cellulaire	Classe I	Classe II
Lymphocyte T	+++	inductible
Lymphocyte B	+++	++
Macrophage	+++	+
Cellules dendritiques	+++x10	+++x10
Granuleux	++	-
Endothelium	++	inductible
Hepatocytes	+	-
neurones	-	-

Même si on a des cellules qui ne sont pas très efficaces, les molécules d'histocompatibilité sont malgré tout présentes (hépatocytes, neurones).

On ne sait pas encore pourquoi le LT va exprimer les molécules de classe II, mis à part un système d'activation pour lui-même et pour une interaction cellulaire.

Déterminant dans la compréhension : fonction en fonction de la structure tridimensionnelle.

Domaine d'immunoglobulines (en jaune en périphérie) avec des feuillets β et des hélices α qui forment une sorte de poche : la poche peptidique faite pour recevoir le peptide (violet au milieu), petit morceau viral ancré dans cette poche.



Les molécules HLA permettent donc de présenter le peptide sous une forme très réduite (8 à 9 AA).

On a ensuite commencé à séquencer ces peptides pour connaître leur constitution en aa et ainsi pouvoir remonter à l'origine de ces peptides et constater pour beaucoup que ça pouvait être des peptides d'origine virale mais aussi des petits peptides du soi, produits de la dégradation cellulaire à l'état normal pour réaliser le renouvellement cellulaire. Cela peut risquer de provoquer une maladie auto-immune. La reconnaissance du soi doit donc être très contrôlée et régulée de façon à ce que ce système ne dérape pas.

La molécule d'histocompatibilité (jaune en périphérie) ne sera jamais vide, on ne trouve pas à l'état physiologique uniquement la molécule d'histocompatibilité sans le peptide à l'intérieur.

Cours du vendredi 16 mars → *Rappel car il n'y a pas d'appariteur et pas de projection :*

Pour la **classe 1** : la poche peptidique est constituée par un fond (feuillet bêta) et des bords (hélices alpha) avec 2 domaines d'immunoglobulines alpha 1 et alpha 2.

Pour la **classe 2** : 2 chaînes indépendantes HLA (ce n'est pas comme la bêta2microglobuline qui n'a rien avoir avec les molécules HLA) donc 1 chaîne lourde et 1 chaîne légère. Ce sont les 2 domaines distaux qui vont former la poche peptidique.

Ce qui est important c'est le **très grand polymorphisme** de ces molécules : aujourd'hui, on doit être à 4500 molécules HLA de classes 1 et 2 différentes = **la caractéristique majeure !** (*si on doit se souvenir d'une chose, c'est ça*). Il n'y a pas d'autre polymorphisme comme ça dans nos tissus sauf le CMH (y'a les groupes sanguins aussi, mais ça n'a rien à voir).

On a pensé pendant très longtemps qu'on ne pouvait pas fabriquer des Ac monoclonaux dirigés contre les molécules HLA → si je veux toutes les reconnaître : il faut trouver une partie bien constante de cette molécule, qu'on retrouve chez tous les individus → on peut toutes les détecter mais pas de manière spécifique c'est-à-dire qu'on ne peut pas détecter mes molécules HLA de classe 1 ou locus A par ex, et les vôtres.

Enfin, elle retourne sur ses diapos.

Prix Nobel en 83, après il y a eu une diffusion importante des Ac monoclonaux, mais avant on avait des outils assez sommaires pour différencier LB et LT : LT fixe à leur surface les GR de mouton et forme des « rosettes » (numération possible sous le microscope). Plus tard, pour reconnaître les LB, on avait des antisérums qui ne reconnaissaient pas spécifiquement 1 molécule mais toutes les molécules d'immunoglobuline par ex.

Quand on a eu les Ac monoclonaux, on a pu avoir des Ac dirigés contre les protéines spécifiques des LT (CD3, CD2, CD4, CD8), contre les LB et aujourd'hui on a un très grand nombre de molécules de la surface des leucocytes et on peut les individualiser grâce aux Ac monoclonaux. Cela faciliterait la vie des gens qui faisaient de l'histocompatibilité si on avait des outils dirigés contre une spécificité donnée. Cela a été beaucoup plus long que ce que l'on pensait car difficulté majeure : si le polymorphisme est très grand, on aurait beaucoup de molécules différentes et il repose parfois sur 1 seul AA, qui va faire que ce n'est pas la molécule HLA du voisin. En fonction de l'endroit de ce polymorphisme, il peut être tout à fait important fonctionnellement, ou bien s'il est placé dans le domaine par ex pour la classe 1, alpha 3 très distant de la poche peptidique, il y aura moins d'incidence dans les interactions entre cellule présentatrice et un récepteur T. En revanche tout ce qui est situé dans la poche peptidique, aura une influence très importante sur le type de peptide fixé et donc de la capacité de réponse. Donc ces différences très faibles entre ces molécules, on rendu très difficile la production des Ac monoclonaux. Autant c'est facile si on immunise une souris avec par ex une protéine humaine CD3, on est à peu près sûr de sortir très facilement des Ac monoclonaux CD3.

Par contre, il y a des spécificités HLA pour lesquelles on a eu beaucoup de difficultés. Aujourd'hui on se sert des Ac monoclonaux contre les molécules HLA, mais il y a des sous spécificités qu'on ne peut pas déterminer par les Ac monoclonaux.

Avant cet ère, Jean Dausset utilisait le sérum prélevé chez les polytransfusés, ça a donné l'idée que puisqu'on ne trouvait pas ces Ac chez tous les individus, leur apparition était sans doute inductible (Ac non naturels).

Si groupe sanguin A, j'aurai dans mon sérum des anti B. Si groupe O, j'aurai des anti A et anti B. Ce sont des AC naturels, on n'a pas besoin d'être immunisés pour avoir ces IgM. On peut s'immuniser et avoir des IgG (Ac irréguliers)

contre les GR et ça donne des accidents transfusionnels. C'est exactement la même chose avec les molécules HLA, sauf qu'il n'y a pas d'Ac naturels, on n'est jamais immunisé contre les molécules qu'on n'a pas, c'est spontané. J'ai certaines molécules sur mes GB, je n'aurai pas des AC dirigés contre toutes les molécules qui existent chez les autres individus.

En revanche, si on nous transfuse, si on nous fait une greffe d'organe, si on a plusieurs grossesses → on peut s'immuniser fortement contre les molécules HLA.

Attention : elle aime poser cette question parce que ça fait bien comprendre le fonctionnement :

Quelles sont les caractéristiques différentes des groupes sanguins rouges et les groupes sanguins présents sur les leucocytes ? Si on répond déjà que **dans les 2 cas y'a des Ac**, c'est fini pour la question. Il faut bien réfléchir : y'a des Ac naturels et de l'autre côté y'a une nécessité d'immunisation : il faut qu'il y ait la présentation des Ag HLA étranger (ceux des autres) pour qu'il y ait une immunisation. C'est grâce à ça, que ces molécules ont été découvertes, on a utilisé des polytransfusés.

Puis, est venue l'idée au groupe qui venait du Pays-Bas, qu'on pouvait tester des **femmes multipares** : elles développent des Ac anti HLA contre les déterminants qui ne sont pas les leurs (issus du père). Au moment de la délivrance : il va y avoir des cellules de l'enfant qui vont aller dans les tissus de la mère. Plus il y a de grossesses et plus on a de chances de voir apparaître des Ac.

Question : s'il y a plus de pères différents aussi ? Oui, parfois on a des surprises.

On se sert aussi de ces marqueurs qui sont tellement différents dans la population, que quand on veut exclure ou inclure une paternité, on arrive à des taux de probabilités énormes, en utilisant déjà le CMH évidemment.

Ce qu'on n'exclut pas dans le CMH c'est qu'on pourrait exclure à tort un père, si le vrai père était son frère par ex, et qu'ils partagent les mêmes Ag HLA ? A ce moment-là, on retrouve chez l'enfant les mêmes Ag HLA mais ce sera erroné. Il y a des cas où il vaut mieux s'adjoindre d'empreintes génétiques par ex pour compléter le panel d'allèles à lister, et on ne peut pas tenir compte seulement (*elle ne finit pas sa phrase*).

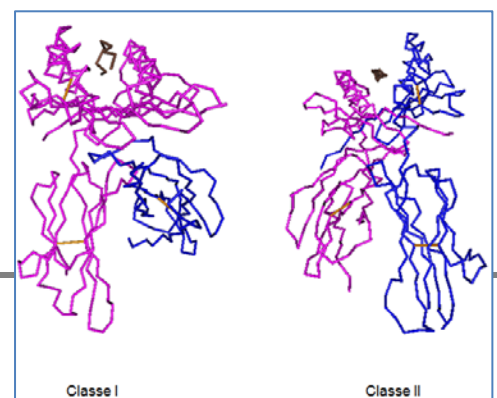
C'est pour vous montrer la puissance de ce système, puisqu'il permet de discriminer les individus précisément. Depuis longtemps on s'est servi de sérums de femmes multipares, dans les centres PMI → parfois on trouvait des spécificités bien ciblées contre cette molécule HLA, ce qui nous permettait d'avoir des réactifs.

Une autre manière de s'immuniser : si **greffe d'organe**, cela conduit à l'application de ce que l'on sait pour le suivi des patients en attente de transplantation rénale car ça pose un énorme problème aujourd'hui, hors ils en ont déjà eu. En général ces patients s'immunisent contre leur 1^{er} greffon, et il devient difficile de les greffer à cause de ces Ac qui sont très dangereux.

Revenons sur nos molécules HLA : le petit peptide Ag n'appartient pas la molécule HLA, mais y loge et il y a des interactions particulières avec certains AA.

Autre manière de les voir, pour la classe 1 :

- En bas à D (bleu) : beta2microglobuline qui sert de soutien
- En haut (rose) : domaines alpha 1 (G) et 2 (D) se partagent la formation de la poche peptidique



- En bas (rose) : domaine alpha 3 (un peu plus étendu)
- En haut suspendu : peptide antigénique

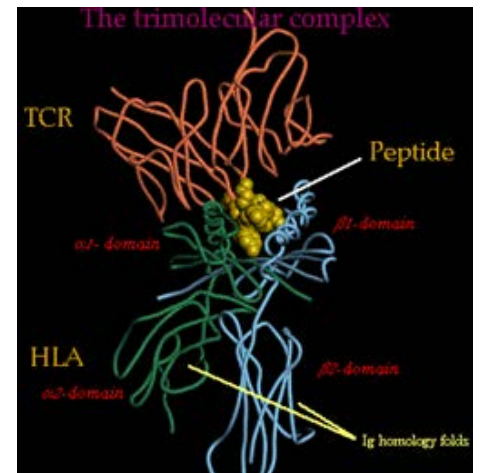
On a pu avoir ces structures à partir des études cristallographiques très poussées. Les molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines sont les plus faciles à cristalliser. On a pu déterminer à quoi elles ressemblent vraiment.

Pour la classe 2, la structure est très proche : la poche est obtenue par la chaîne bleue lourde (D) et rose légère (G) et forment le réceptacle pour le peptide Ag.

Nos molécules HLA exprimées à la surface des cellules ne sont jamais vides : toujours un peptide Ag. Sur cette molécule HLA de classe 2, peptide (jaune au centre), domaine alpha 1 (G), bêta 1 (D) et les 2 autres domaines. Et ici a été cristallisé le récepteur T qui lui va reconnaître le peptide Ag dans le contexte du CMH, à une exception près que l'on verra plus tard.

Nos LT reconnaissent l'Ag qui est complexé à cette molécule de classe 1 ou 2 pendant 24 h puis il est re-internalisé (tout) = turn-over assez rapide, ce qui va dans le sens de la capacité de réponse rapide s'il y a une infection. **La grande caractéristique** : la majorité des molécules du CMH en général porte les Ag du soi (débris cellulaires, petits peptides issus de protéines qu'on a voulu éliminer), quand on est dans un fonctionnement normal : pas d'infection, pas de greffe d'organe. Où on a seulement nos propres tissus. Quand on essaye de produire des protéines du CMH vides, si elles arrivent à la surface cellulaire (ce qui n'est pas évident), elles sont très instables et éliminées rapidement.

Question : Est-ce que lors du turn-over des molécules HLA, est ce que le peptide Ag est aussi réintégré ? Tout est re-internalisé ensemble, puis dirigé vers des voies d'endosomes, détruits pour la plupart et des petits peptides peuvent être re-exprimés à la surface.



III. Les voies d'apprêtement des antigènes

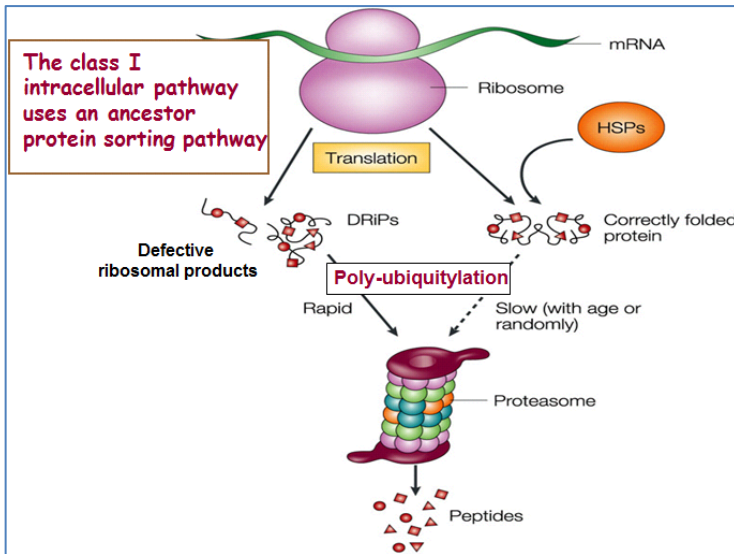
a) Classe 1

→ Comment arrive-t-il dans la poche peptidique ?

Les voies moléculaires qui permettent à la cellule d'exprimer les molécules HLA avec un chargement du peptide correct sont cruciales pour que la réponse immunitaire puisse fonctionner : si je n'ai pas de peptide, pas de réponse immunitaire, et si je n'ai pas de CMH, pas d'expression à la surface.

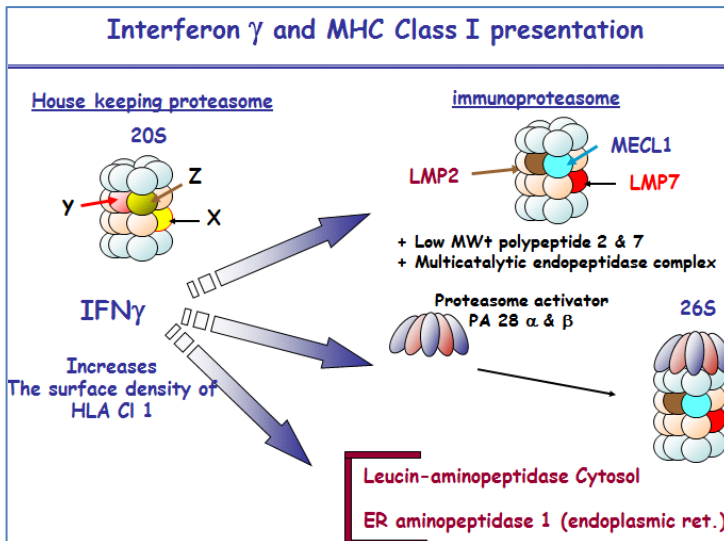
Donc la régulation des voies qui conduisent à l'apprêtement des Ag = la préparation (modification) → déterminant du fonctionnement du SI.

En général, les molécules de classe 1 représentent les Ag qui peuvent être synthétisés à l'intérieur de la cellule (voie endogène) → ex classique : Ag viraux, le virus peut faire répliquer des protéines virales produites à l'intérieur de la cellule, ce sont ces Ag qui vont être récupérés et modifiés pour être à la surface de la cellule.



Je ne vous demande pas de retenir tout ça, mais simplement une chose très importante : en permanence dans nos cellules on a un système moléculaire efficace = **protéasome** qui permet le découpage en petits peptides Ag, de protéines par ex : mal foldée ?, mal faites ou correctement fabriquée mais qu'on veut éliminer, celles ré-internalisées. Si on n'est pas infecté, aucune réponse immune. « Nettoyage de nos cellules ». Ça va servir à charger en permanence des molécules HLA, qui sont fabriquées, si on n'a pas d'autres peptides à présenter.

La grande différence avec la réponse efficace qu'on attend quand une réponse immune doit se mettre en place, c'est que ce « house keeping protéasome » (ménage), quand on a une stimulation par une cytokine telle que l'interféron gamma produit très rapidement après l'initiation de la réponse immune, c'est une cytokine très puissante qui permet l'augmentation ++ de l'expression des molécules HLA de classe 1 mais aussi de toutes les protéines impliquées dans la préparation des peptides, dans le transport dans le RE, dans l'exportation vers la membrane, Golgi etc... C'est une machinerie dont les capacités sont augmentées par les signaux de la cytokine (interféron gamma). Ce que l'on voit à la fin, c'est une augmentation de l'expression des



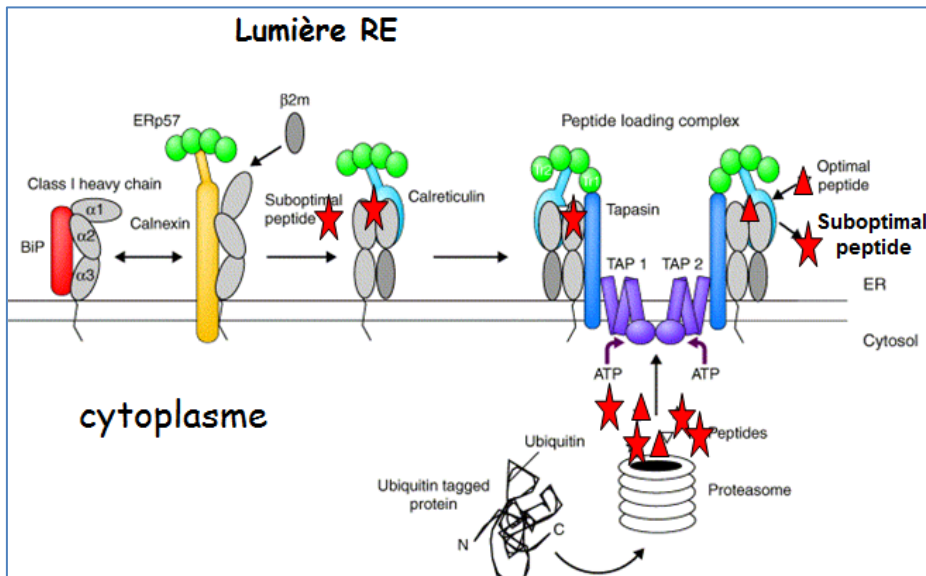
molécules HLA classe 1 à la surface cellulaire. Si les cellules dendritiques sont stimulées par l'environnement → explosion d'expression de ces molécules HLA → présentation efficace de tous les peptides Ag.

Au démarrage de la réponse immunitaire, on a une modification du protéasome et de certaines protéines (hors protéasome) très caractéristiques telles que LMP2 ou 7 (gènes codants sur le bras court du K6, même endroit que HLA) qui interviennent pour former l'immuno-protéasome = complexe multi catalytique très actif pour détruire, modifier des peptides Ag présentés par les molécules HLA de classe 1.

Liste des protéines sensibles à l'interféron gamma :

- De l'immuno-protéasome
- Des enzymes coupant les peptides (ERAP)
- De transport de peptides (TAP)

- LMP-2
- LMP-7
- MECL -1
- Thimet Oligopeptidase
- Erp57 (oxireductase)
- ERAP-1 (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase -1)
- PA28 α
- PA28 β
- TAP-1 (transporter associated with antigen processing -1)
- TAP-2
- Béta 2 Microglobuline
- Tapasine
- Calreticuline
- Calnexine



Dans le RE, on a notre molécule de classe 1 avec sa chaîne lourde dans une forme inactive (domaine alpha 1 et 2 pliés) ne peut pas fixer ni présenter un peptide Ag. Plusieurs protéines chaperonnes interviennent pour modifier ce système : on voit arriver la bêta2microglobuline, alors qu'on a une protéine du RE qui s'appelle protéine 57 qui maintient ouverte l'HLA pour que la **beta2microglobuline** puisse se fixer et donner sa structure réelle. Expérience où on empêche la

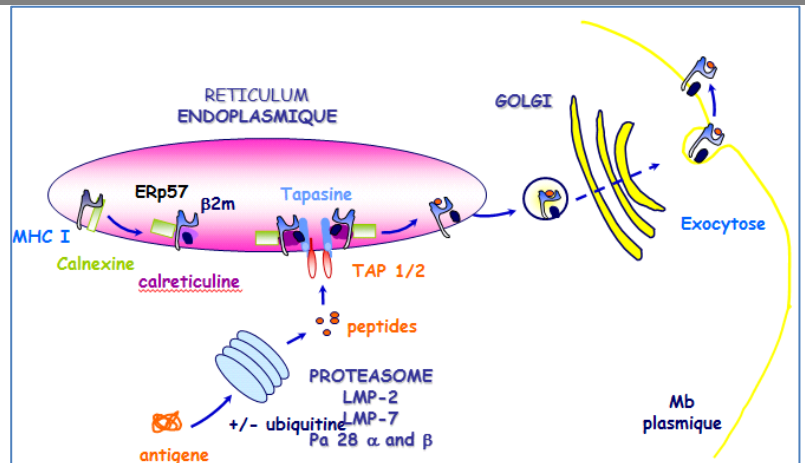
bêta2microglobuline d'être là ou de s'exprimer correctement, on a un déficit d'expression des molécules HLA de classe 1. Donc on a toute une série de molécules (*que je ne vous demande pas de retenir*) : protéine 57, calréticuline, calnexine → qui sont là simplement pour maintenir la molécule HLA de classe 1 dans une bonne conformation de façon à ce qu'on puisse fixer le peptide (rouge). J'ai une protéine qui a subi une transformation car tagguée/modifiée par l'ubiquitine pour passer dans l'immuno-protéasome qui permet l'obtention de petits peptides et on a un système de transport très efficace du cytoplasme au RE (actif, spécifique au peptide Ag). Des équipes à Paris et à Strasbourg ont décrit un déficit en molécule TAP 1 (pour transporteur associé à l'antigène) → déficience de molécules HLA de classe 1 vers la surface cellulaire. Toutes ces étapes montrent bien que tous les éléments sont importants : pas de bêta2microglobuline ou pas de peptide fixé dedans → pas de MHC à la surface.

Ça ne servirait à rien d'augmenter ++ la production des molécules HLA de classe 1, si dans le même temps je n'activais pas la fabrication et le transport de peptides Ag vers le RE pour qu'il puisse être reconnu. Ça ne servirait à rien d'un côté le système, mais que les autres protéines restent au même niveau, dans ce cas on aurait un déséquilibre complet qui ne serait pas efficace. Hors, ce que l'on cherche c'est l'efficacité → exprimer le plus possible de molécules HLA à la surface et des molécules qui portent le peptide Ag.

Une autre molécule importante : **tapasine** sert d'intermédiaire entre TAP et la molécule HLA au moment où elle arrive après maturation, elle se colle à la tapasine → fixation définitive du peptide dans la molécule d'histocompatibilité. Processus complexe, réalisé par une cascade de protéines (pas toutes représentées). Si j'ai un peptide dont le découpage est mal fait, que je peux sélectionner car les TAP interviennent pour faire passer les peptides et les sélectionnent : un peptide qui ne pourrait pas être fixé dans la poche peptidique va être écarté sauf s'il est vraiment très près de la taille critique. S'il faut l'ajuster une fois dans la poche peptidique, c'est encore possible par les enzymes telles qu'**ERAP 1** qui le découpent un peu pour l'ajuster.

Ce qu'il faut retenir : c'est que c'est un système très régulé, multimoléculaire → si accélérateur sur un système, il faut que l'ensemble soit critique pour que l'expression des molécules HLA soit correcte.

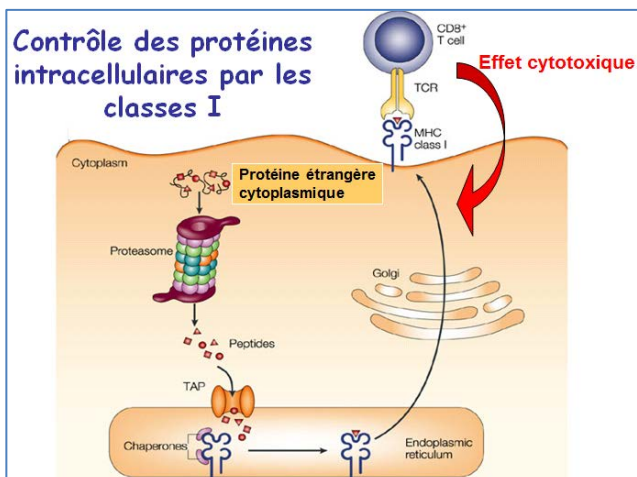
HLA qui a chargé des petits peptides, qui est prête à sortir, et doit passer par des vésicules golgiennes puis par l'appareil de golgi (terminer sa maturation : sucre à fixer) → sortie pour se fixer sur la membrane cellulaire où elle reste 24 h puis chemin inverse : rentrer par des vésicules d'endocytose → découpée par le protéasome voire être ré-exprimée sous forme de débris de protéines cellulaires.



Si on s'intéresse aux possibilités que l'on a de

voir augmenter l'expression des molécules HLA à la surface cellulaire, on sait le faire : cytokine (interféron gamma). Il y a aussi des systèmes qui modifient à la baisse son expression : motifs protéiques développés par des virus ou tumeurs pour faire échapper/court-circuiter ce système d'exportation à la surface et faire qu'une molécule dans une vésicule avant l'appareil de Golgi, puisse être éliminée vers des vésicules d'endocytose car elle a un tag/étiquette qui fait qu'elle va être détournée, de façon préférentielle par rapport aux vésicules la conduisant à la surface. *Diapo 31 pas important.*

pas important.



On a notre protéasome qui découpe des protéines et les fixe sur les molécules MHC de classe 1 dans le RE, on les exporte et le peptide triangulaire (en bas à D). J'ai ma molécule CD8 qui va reconnaître ce peptide dans le contexte du CMH et on donne un signal très puissant à la cellule T qui va essayer de tuer la cellule qui porte ces peptides étrangers par un **effet cytotoxique**.

Théoriquement, au lieu d'avoir une protéine étrangère mais autologue → le traitement n'est pas différent, on aura un peptide issu d'une protéine autologue. Si mon SI marche, il n'y aura pas de signal de mort de la cellule. Il peut se fixer et

est soit éliminé s'il reconnaît trop fortement les protéines du soi, soit « toléré » : LT ne le reconnaît pas comme étranger.

Série de questions :

La cellule qui présentait la molécule, c'est une cellule dendritique ? Oui ou toute cellule présentatrice d'Ag, sachant que la cellule dendritique est la plus efficace pour exprimer la plus grande quantité d'HLA.

Mais c'est une cellule qui ne devrait pas être présente ? Non elle est présente, cf image : protéine étrangère (virale) ne devrait pas être là bien sûr, j'ai ma cellule qui a fabriqué des protéines virales parce qu'il y a une infection, j'ai intérêt à ce que mes LT détruisent les cellules infectées par le virus.

C'est-à-dire que c'est une cellule dendritique de notre corps qui a capté une protéine étrangère ? Voilà, qui a même fabriqué parce que l'ADN ou ARN viral peuvent intégrer le génome de la cellule pour fabriquer des protéines virales, qui vont être modifiées, découpées et présentées par nos propres cellules (notre SI).

HLA présente toujours un peptide Ag ou ça peut être physiologique qu'il présente un peptide ... ?, ça c'est une expérience ce n'est pas physiologique ? Ça c'est tout à fait physiologique, on a la réponse immunitaire

Quand le peptide provient d'une protéine autologue, ça ce n'est pas physiologique ? Si, en permanence on a à la surface de nos cellules présentatrices d'Ag dans nos molécules HLA, nos peptides du soi. Les molécules HLA vides ne s'expriment pas et n'est pas exportées à la surface. Cf diapo 27 « Interferon gamma et MHC Class 1 presentation ». Si on a la grippe, on aura beaucoup plus de peptides viraux présentés que ceux autologues. On est en permanence à grand risque en présentant des peptides autologues où il ne faut pas répondre.

Mais ça c'est une réponse immunitaire pour des virus, pas pour des bactéries ? Classiquement, la voie de présentation par la classe 1 c'est les virus, on va voir pour les bactéries on a la classe 2 qui est très active. Cependant, on a des phénomènes de cross-présentation qui font que les protéines exogènes peuvent aussi être présentées par la classe 1.

Quand c'est un peptide issu d'une protéine autologue, le LT a 2 possibilités ? Soit il tolère, soit on lui donne un signal négatif où il est supprimé = **tolérance périphérique** → dans le cas où il reconnaît de façon assez affine l'ensemble avec un risque auto-immun.

Ça n'entraîne pas forcément une maladie auto-immune ? Tant qu'on maintient bien le système et qu'un LT qui reconnaît trop le soi puisse avoir un signal de délétion → pas de maladie car contrôle périphérique (qui aurait dû être fait dès le thymus).

La présentation des Ag par les HLA se fait au niveau des cellules dendritiques mais aussi toutes les cellules ? Les cellules dendritiques sont qualifiées de professionnelle car elles ont sur une réponse qui doit être très importante, le signal le plus important.

C'est possible que ce soit présent sur une cellule endothéliale ? Oui, il y en a sur toutes les cellules, pour la classe 1 parce que pour la classe 2 c'est inducible. D'ailleurs sur les cellules endothéliales, la présence des molécules HLA peut être dramatique si on a des Ac anti-HLA (on verra ça). Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques dans les tissus très actives, typiquement.

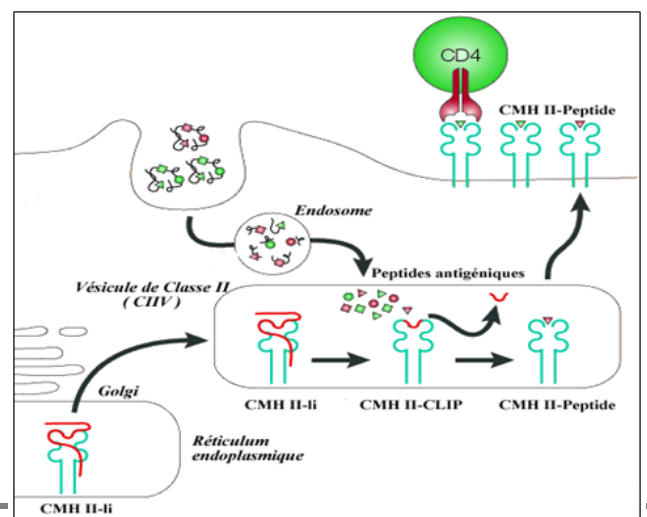
Donc notre interféron gamma produit très tôt, pour augmenter la synthèse des molécules HLA et de toutes celles impliquées dans le processus de l'apprêtement. On peut up réguler l'expression (cytokines) mais les tumeurs et les virus vont diminuer l'expression des molécules HLA de classe 1, donc les cellules T cytotoxiques ne les reconnaîtrons pas et les protéines virales peuvent continuer à s'exprimer.

b) Classe 2

Quant aux molécules HLA de classe II, ce sont des protéines exogènes qui leur seront préférentiellement présentées.

Longueur des peptides :

- **Classe I** : 8 à 10 aa → tout petit pour l'organisme.
- **Classe II** : 9 à 13 → un peu plus long.



La préparation/l'apprêtement des antigènes pour les classes II est un peu plus simple que la classe I → moins d'étapes et surtout moins de protéines chaperonnes qui interviennent.

Dans le RE on a la synthèse de la molécule HLA de classe II. Sur cette molécule, on retrouve la chaîne invariante (rouge, partie haute de la molécule), elle intervient pour fermer complètement la poche peptidique pour éviter de charger n'importe quel peptide. Ce chargement se fait dans un compartiment particulier qui est « le compartiment des molécules de classe II » qui vient après l'appareil de Golgi où le peptide est mûré et glycosylé.

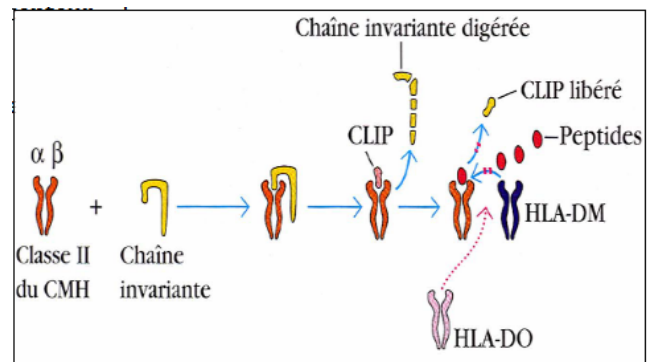
Dans le compartiment des molécules de classe II, sous l'influence d'un gène qui est le HLA-DM (situé sur le chromosome 6 aussi !), la chaîne invariante (= la fermeture) va être découpée en tout petits morceaux afin de permettre aux peptides amenés par des endosomes venant de l'extérieur, de s'intégrer à la molécule. Il ne va persister qu'une toute petite partie de la protéine invariante : CLIP jusqu'au moment où le peptide antigénique sera capable d'être chargé.

Une fois l'ensemble complet = peptide + 2 chaînes du CMH, l'ensemble peut être exprimé à la surface cellulaire et être reconnu par un récepteur T (préférentiellement porté par les LT CD4)

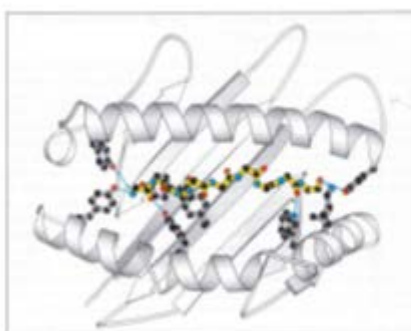
Vision d'un peu plus près du déplacement de la chaîne clip au profit de la molécule HLA.

Le CMH de Classe I

Sur une cellule qui fonctionne bien → molécules de classe I mais aussi de classe II (Lymphocyte B, cellule dendritique).



Molécule de classe I vue de dessus : on voit la poche peptidique formée par les hélices alpha et les feuillets bêta avec une série d'acides aminés fixés.



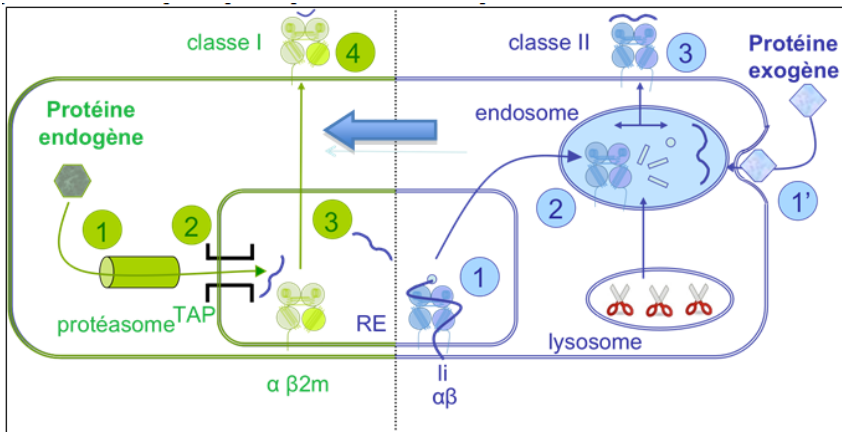
R	G	Y	V	Q	Q
S	I	I	N	E	K
A	P	G	N	P	A
T	Q	R	T	R	A
S	F	P	R	E	I
K	Q	A	V	T	T
S	I	P	S	A	E

On va avoir des résidus qui sont des résidus d'ancrage qui vont permettre l'interaction entre le peptide et la poche peptidique ; ce tableau permet de récapituler les différents AA qui peuvent figurer.

La spécificité de l'aa d'ancrage va déterminer le peptide à ancrer dans la poche peptidique.

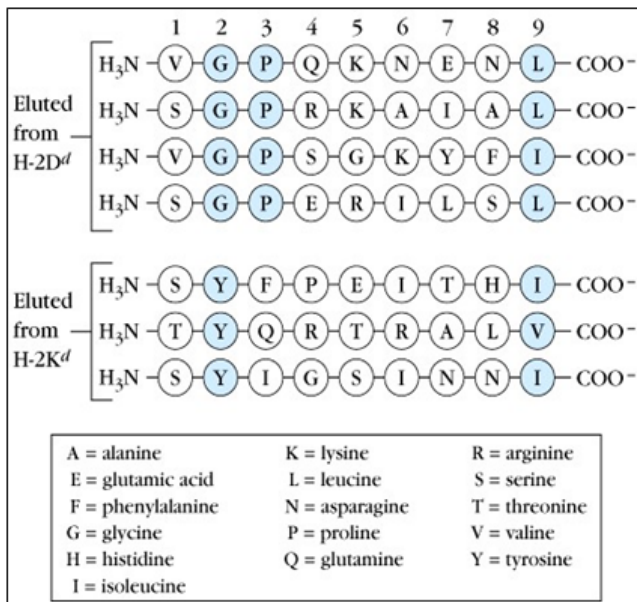
→ Adéquation entre la séquence en aa du peptide et la spécificité de la molécule HLA.

Résumé en parallèle de ce qui se passe pour la classe I et pour la classe II :



Important : Flèche bleue : les protéines exogènes peuvent aussi rejoindre le système des molécules HLA de classe I et être présentées par une molécule HLA de classe I quand on a besoin d'une présentation très active et plus efficace. C'est ce qu'on appelle la Cross présentation.

Dans la classe II liant des peptides de 9 à 13 AA, la longueur est beaucoup plus longue et variable, on note que le point d'ancrage est beaucoup plus loin de l'extrémité du peptide que dans les molécules de classe I.



Expérience chez la souris : système H2 souris = HLA humain

C'est chez l'animal qu'on a pu juger à grande échelle qu'il y avait des peptides vraiment différents qui étaient fixés en fonction du type de molécules d'histocompatibilité.

Après avoir découvert la structure tridimensionnelle très particulière de cette poche qui peut lier un peptide les chercheurs pensaient : « on a trouvé pourquoi il y a des associations HLA particulières », « on va pouvoir résoudre tous les problèmes infectieux... »

Finalement ils se sont rendus compte que des souris infectées exactement par le même virus vont le fixer très différemment par des aa très différents.

Ces expériences sont complexes puisqu'il faut éluer le peptide antigénique entré dans la poche peptidique et ensuite séquencer ce peptide pour en connaître sa composition en acides aminés.

Techniques de détermination des antigènes HLA :

On sait maintenant à quoi servent ces molécules notamment qu'elles sont primordiales dans le déclenchement de la réponse immunitaire. Une fois l'utilisation des techniques d'agglutination décrites ayant permis de démontrer la diversification de ces HLA, on les a miniaturisées.

Techniques sérologiques :

On va utiliser des réactifs qui sont des anticorps reconnaissant des molécules HLA

- Grossesse, transfusion, transplantation

- Absorption sur plaquettes dépourvues en classe II mais très chargées en molécules de classe I. Ceci étant à l'origine d'un risque d'inefficacité de transfusion par élimination immédiate des plaquettes transfusées. Pour les transfusions on peut être amenés à rechercher des donneurs HLA compatible pour limiter les risques de rejets plaquettaires.

Techniques cellulaires

- Basée sur la réponse proliférative allogénique : mise en présence de cellules du donneur et du receveur pour observer si une cellule prolifère en réponse au stimulus. Beaucoup moins utilisé maintenant car manque de temps, utile seulement pour la recherche mais il s'agit d'une technique très sensible.

Techniques de biochimie :

- électrophorèse en 2D : point très important dans la détermination des différences entre les molécules d'HLA. Elles ont permis de valider le fait qu'on avait bien des molécules HLA différentes les unes des autres (on est passé d'une 20aine de molécules à une 100aine)

Techniques de biologie moléculaire

Aujourd'hui dans un laboratoire de routine, on continue les techniques sérologiques et les techniques de biologie moléculaire ; c'est ce qui permet de répondre le plus efficacement et le plus rapidement à toutes les demandes de typage.

Pour faire un typage HLA (réalisé tous les jours dans les labos) :

Il faut d'abord extraire les cellules mononuclées en déposant le sang sur un liquide ayant une densité donnée, on centrifuge pendant 20 min : les GR tombent au fond avec les polynucléaires et on retrouve quelques plaquettes dans le liquide dans la phase supérieure. Un disque fait interface entre les deux phases : c'est là que se situent les cellules mononuclées.



On fait une technique de lymphotoxicité :

On met ces cellules mononuclées en présence d'anticorps pour telle ou telle spécificité dans des petites plaques (plaques de Terasaki) en ajoutant du complément de lapin. S'il y a formation d'un complexe antigène-anticorps, le système du complément va être activé et va conduire à la lyse cellulaire. Cette lyse va nous permettre de colorer différemment les cellules vivantes (vertes) et les cellules mortes (rouges) grâce à des colorants.

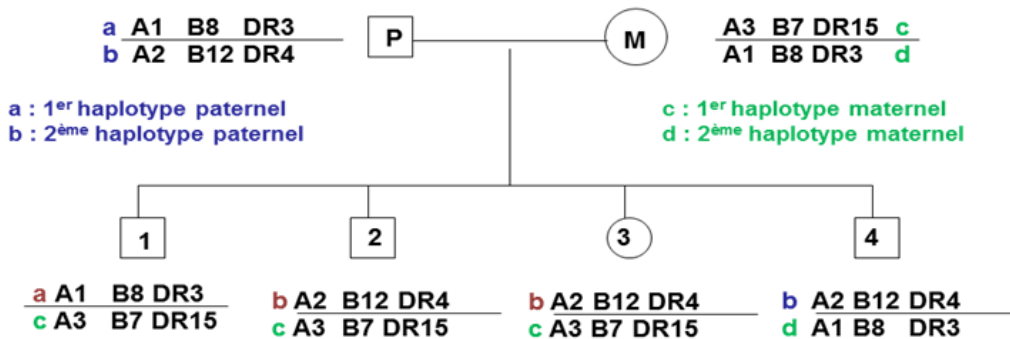
Ensuite on lit sous microscope pour évaluer dans chaque puit, le nombre de cellules vivantes et de cellules mortes (un petit peu long : 4h).

Ce typage par lymphotoxicité a lieu et, est nécessaire à chaque fois qu'une greffe d'organe doit être réalisée.

La façon de travailler en laboratoire a beaucoup changé à partir du moment où les méthodes de biologie moléculaire ont vraiment évolué : Technique de PCR + kits de travail standardisés = travail beaucoup plus rapide.

Pour connaître nos HLA, on amplifie spécifiquement une partie de chaque Locus pour déterminer le typage des HLA.

Revenons à la transmission en bloc : utile lors de la recherche de donneur de cellules souches intrafamiliale.



Ici on a figuré le typage du père (on retrouve ici le déséquilibre de liaison A1 B8 DR3 qui a une plus grande fréquence) et celui de la mère. Si on s'arrête là, sans connaître leur descendance, on n'a pas le droit d'associer les différents antigènes entre eux, car on ne sait pas comment ce sont associés les différents antigènes car lorsqu'on fait le typage du père par exemple on

Ex dans cette famille :

- 1 et 4 : deux haplotypes HLA différents
- 2 et 3 : identiques HLA pour les 2 haplotypes parentaux
- 1 et 2 : haplo-identiques HLA

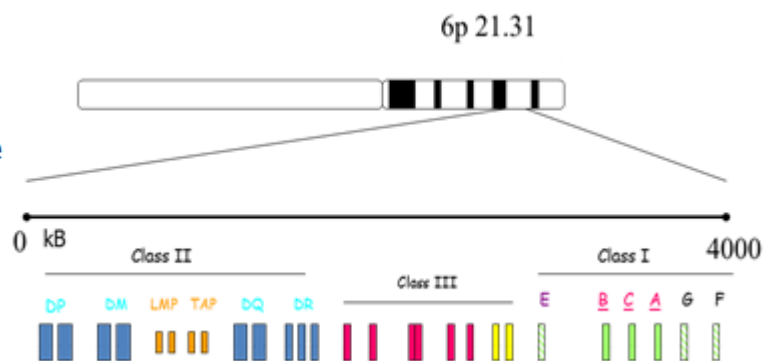
Si un individu a n frères et sœurs, la probabilité qu'il ait au moins l'un d'entre eux HLA identique est de $p=1-0,75^n$.

retrouve : A1-A2-B8-B12-DR3-DR4 sans connaître les associations. Pour avoir le droit de faire les haplotypes de la famille, il faut avoir le typage de plusieurs enfants comme c'est le cas ici. Progressivement on arrive à replacer les haplotypes.

En admettant que l'enfant « 1 » soit le patient malade, on remarque qu'aucun des autres enfants n'a reçu l'haplotype « a » du père.

On dit que le 2 et le 3 sont haplo-identiques.

Rappel A, B, DR... sont des locus. Dans la classe I, le polymorphisme est porté seulement par une seule chaîne. Alors que dans les molécules de classe II, les deux chaînes sont polymorphiques ce qui augmente l'inconstance.



Question sympa à l'examen: on nous donne les haplotypes parentaux. Quels sont les haplotypes des enfants ?!

Ici il s'agissait d'une famille idéale sans crossing-over.

NB : Le crossing-over se place beaucoup plus souvent avec la molécule DP (compréhensible en regardant l'image ci-dessus) ce qui peut engendrer une anomalie au niveau du typage.

Les techniques sérologiques sont aujourd'hui majoritairement basées sur les anticorps monoclonaux ; on en possède contre la plupart des spécificités larges ce qui signifie qu'on ne sera pas dans la précision qu'on a avec la biologie moléculaire.

QuestionS culturelleS pour Gabriel =) :

Gab : « Différence entre anticorps polyclonaux et monoclonaux ? »

Ghislaine : « Monoclonal = non naturel sauf dans une maladie du type dysglobulonémie monoclonale. Il ne va reconnaître qu'une spécificité. Lorsqu'on en produit, on peut en produire une quantité industrielle, ils sortiront toujours de la même manière, ils sont complètement standardisés.

Polyclonal = il va reconnaître tous les épitopes sur une molécule. Une fois le sérum épuisé d'anticorps polyclonaux, l'immunisation est à refaire »

Gab : « Dans une technique type western blot, en utilisant des anticorps monoclonaux, on va donc avoir une réponse plus précise ? »

Ghislaine : « On peut utiliser les deux pour un western blot, bien sur la réponse sera plus précise avec des monoclonaux, parfois on peut être un peu déçus car des anticorps marchent moins bien que d'autres. Aujourd'hui on arrive à détecter la forme phosphorylée d'une protéine avec un Ac monoclonal, très utile dans un western blot pour voir si cette protéine est bien activée par phosphorylation. »