

# Le lipopolysaccharide bactérien

---

## I.1. Interaction environnement microbien et hôte

### I.1.1. Le microbiote

L'environnement microbien est constitué de bactéries, de virus, de champignons et de parasites qui sont en perpétuelle interaction avec l'organisme *via* l'air, les aliments et l'eau que nous consommons. Ces micro-organismes peuvent être pathogènes et induisent, par conséquent, une réaction de défense immunitaire lorsqu'ils pénètrent dans l'organisme de l'hôte. Ils peuvent être également non pathogènes et entretiennent, dans ce cas, une relation de symbiose ou mutuellement bénéfique avec l'hôte ; ces micro-organismes sont dits commensaux.

Les muqueuses de la peau, des voies respiratoires, de l'appareil uro-génital et du tube digestif sont les structures qui sont en contact direct avec l'environnement microbien exogène ou endogène chez les mammifères.

L'ensemble des micro-organismes qui vivent en symbiose avec l'hôte est appelé microbiote ; sa composition varie en fonction du territoire où il se trouve comme par exemple le microbiote intestinal connu aussi sous le nom de flore intestinale.

Le microbiote intestinal qui tapisse la muqueuse de l'intestin reste le plus étudié et le plus connu, à la fois dans sa composition et dans son rôle. Il est composé de  $10^{12}$  à  $10^{14}$  micro-organismes chez l'adulte, ce qui représente 2-10 fois plus que de cellules de l'organisme hôte. Il se met en place à la naissance, mais la quantité des micro-organismes et la qualité du microbiote évolue tout au long de la vie. La composition exacte a été difficile à caractériser pendant de nombreuses années, car seulement une petite fraction de ses micro-organismes pouvait être cultivée *in vitro*. La mise au point des techniques de séquençage du matériel génétique à haut débit a permis récemment de s'affranchir des contraintes de la culture *in vitro*. On sait désormais que plus de mille espèces bactériennes résident dans l'intestin chez l'homme dont les plus abondantes font partie des Firmicutes et des Bactéroidetes (Qin 2010). La quantité de gènes présents dans le microbiote intestinal est estimé à cent fois supérieur aux gènes du génome humain.

Depuis longtemps, le rôle du microbiote intestinal dans la digestion des aliments et dans l'absorption des lipides complexes et des sucres non digestibles suite à l'hydrolyse de l'amidon et de la cellulose, est bien connu. Plus récemment, différentes études ont montré que le microbiote influence fortement le métabolisme général et peut être incriminé dans le développement de

maladies métaboliques comme l'obésité. Le microbiote participe également à l'intégrité et à l'immunité des muqueuses en empêchant la colonisation de la muqueuse intestinale par des pathogènes par phénomène de compétition, et par production de substances bactéricides pour les agresseurs, mais aussi en participant à l'éducation des cellules du système immunitaire et à la tolérance vis-à-vis des commensaux. Des perturbations du microbiote sont associés non seulement à des maladies intestinales, mais aussi du système immunitaire en dehors de la sphère digestive. Du fait de son importance quantitative et de son influence sur la physiologie et les pathologies de l'hôte, le microbiote intestinal est considéré comme un organe à part entière. Cette notion constitue une des découvertes majeures de ce début du 21<sup>ème</sup> siècle comme exposé dans le supplément vol. 735, n°7610 de la revue Nature publié en 2016 sous le titre *Intestinal microbiota in health and disease*.

A noter que toutes les muqueuses, y compris celles des voies aériennes, longtemps considérées comme stériles (Beck 2012), possèdent un microbiote avec des caractéristiques qui lui sont propres et que l'on soupçonne influencer également le fonctionnement de la muqueuse qu'il tapisse voire de l'organisme entier.

### **I.1.2. Composition et rôle d'une muqueuse**

Le tractus intestinal représente la surface muqueuse la plus importante chez l'homme ; la muqueuse couvre une superficie de 100 m<sup>2</sup> environ et est délimité par une unique couche de cellules épithéliales formant une barrière entre la lumière intestinale dans lequel se trouve le microbiote et le tissu conjonctif de l'hôte. Les cellules épithéliales intestinales sont des cellules hautement différenciées dont la membrane plasmique est constituée de deux domaines fonctionnellement et biochimiquement distincts : le domaine apical qui est situé du côté de la lumière intestinale et le domaine basolatéral constitué par le reste de la membrane de la cellule. Ces deux domaines sont délimités par des structures situées près du pôle apical appelées jonctions serrées. Les cellules épithéliales intestinales sont de quatre types différents : les entérocytes qui sont les cellules les plus nombreuses, polarisées et responsables des fonctions de transport et d'absorption de l'intestin, les cellules caliciformes (ou en gobelet – *goblet* en anglais) qui produisent du mucus recouvrant la surface de la muqueuse, les cellules de Paneth qui libèrent dans la muqueuse digestive de nombreuses molécules anti-microbiennes comme les défensines et sont ainsi impliquées dans la protection de la muqueuse vis-à-vis des pathogènes et les cellules M (pour *Microfold*). Ces cellules M sont spécialisées dans le transport des éléments (antigènes alimentaires et microbiens) de la lumière de la muqueuse vers les cellules immunitaires présentes dans le tissu conjonctif (Corr 2008, Mabbott 2013, Neutra 2001, Ohno 2016). Récemment, il a été aussi montré que le transport des antigènes à partir de la lumière de la muqueuse digestive est, pour une toute petite part, pris en charge par les cellules caliciformes (Lycke 2017).

Les cellules épithéliales intestinales ont pour mission principale d'absorber les nutriments, les électrolytes et l'eau, mais jouent également un rôle crucial dans les défenses immunitaires. La barrière physique assurée par les jonctions serrées qui empêchent le passage paracellulaire des antigènes intraluminaux et des pathogènes du pôle apical au compartiment basolatéral, et par le mucus contribue à défendre l'organisme contre les pathogènes. Le mucus fixe des microorganismes et les élimine lorsqu'il est évacué du fait du péristaltisme digestif. Les cellules épithéliales peuvent même être considérées à part entière comme des cellules de l'immunité (Hornef 2014) puisque certaines produisent elles-mêmes ou transportent des agents antimicrobiens (peptide, anticorps) dans la lumière digestive, et d'autres, en réponse à des microbes, produisent des cytokines qui recrutent et/ou activent les globules blancs.

Les globules blancs sont présents dans la muqueuse digestive avec certains isolés et intercalés entre les cellules épithéliales ou isolés dans le tissu conjonctif ou encore rassemblés et organisés dans des structures lymphoïdes dites secondaires appelées MALT pour *mucosa-associated lymphoid tissues*. Dans l'intestin, les MALT sont en contact direct avec les cellules M au niveau du Follicle-Associated Epithelium (FAE), et sont de deux types : les Plaques de Peyer (PP) et les *Isolated Lymphoid Follicles* (ILF). Ils sont constamment présents et se forment au cours de l'embryogénèse ou immédiatement après la naissance.

La présence permanente de MALT n'est pas vraie pour toutes les muqueuses. Les BALT, ou *bronchus-associated lymphoid tissues*, dans les bronches, ont été initialement décrits comme constitutivement présents et intégrés dans la muqueuse des grandes voies aériennes (Sminia 1989). Il est maintenant un fait connu qu'ils ne sont pas constamment présents chez la plupart des espèces de mammifères, et que leur formation est déclenchée suite à une exposition microbienne ou une inflammation des voies aériennes plutôt qu'à un processus développemental préprogrammé. Ils ne sont pas constamment présents, en particulier chez l'homme et la souris. Dans une étude de recherche systématique de BALT, il a été rapporté que ces derniers ne sont pas automatiquement retrouvés chez l'homme sain (Pabst 1992), d'autres études ont rapporté qu'ils sont présents seulement dans 8-25% des cas (Pabst 1990, Delventhal 1992, Richmond 1993). Le nombre de BALT, leur taille et la complexité de leur architecture augmentent en réponse à des stimulations microbiennes ou inflammatoires (Delventhal 1992). En effet, il a été démontré chez l'homme qu'une exposition pulmonaire à des microorganismes conduit à une augmentation de 20-40 fois plus de BALT dans le poumon que dans les situations non infectieuses.

Même en absence de BALT, la muqueuse bronchique contient des cellules immunitaires dispersées soit dans le tissu conjonctif, soit entre les cellules épithéliales. Concernant les cellules épithéliales des bronches, comme celles de l'intestin, elles sont hautement différenciées et associées les unes aux autres par des jonctions serrées. Dans les bronches, on trouve trois types majeurs de

cellules organisées en un épithélium dit pseudostratifié (Velden 1998) : les cellules basales qui sont considérées comme les cellules souches de l'épithélium, les cellules à fonction sécrétoire qui produisent différentes molécules dans la lumière des bronches et les cellules ciliées dont les cils sont en mouvement perpétuel. Les cellules sécrétoires les plus nombreuses dans l'épithélium bronchique sont les cellules caliciformes qui produisent le mucus. Le mucus, expulsé grâce à l'action des cils, entraîne avec lui un certain nombre d'éléments présents dans la lumière des bronches. Les cellules sécrétoires produisent également divers éléments antimicrobiens. Les cellules épithéliales bronchiques comme celles de l'intestin produisent, en réponse à l'activation des microorganismes, des agents antimicrobiens et des cytokines qui activent les cellules du système immunitaire. Les cellules M n'ont pas été décrites dans la muqueuse des bronches ; par contre elles existent dans plus haut dans les voies aériennes, au niveau de la muqueuse nasale (Mabbott 2013, Rochereau 2016).

## **I.2. Les molécules microbiennes et leurs récepteurs eucaryotes**

### ***I.2.1. Les pathogen-associated molecular patterns et leurs récepteurs***

Les micro-organismes présentent à leur surface des molécules dont certaines appelées PAMP pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns* servent de molécules d'alerte pour les cellules du système immunitaire. Les PAMP sont le plus souvent présentes en grande quantité sur les micro-organismes et facilement accessibles. Ils sont caractérisés par les trois critères suivants (Huet 2004) :

- ils sont spécifiques des pathogènes et n'ont pas d'équivalence chez l'hôte, ce qui permet une discrimination sans ambiguïté entre le soi et le non soi,
- ils sont indispensables à la survie des micro-organismes, ce qui élimine la possibilité d'une mutation aléatoire qui peut rendre le pathogène indétectable,
- ils constituent la signature moléculaire de groupes de micro-organismes. Cela permet ainsi la reconnaissance des envahisseurs par un nombre limité de récepteurs du système immunitaire.

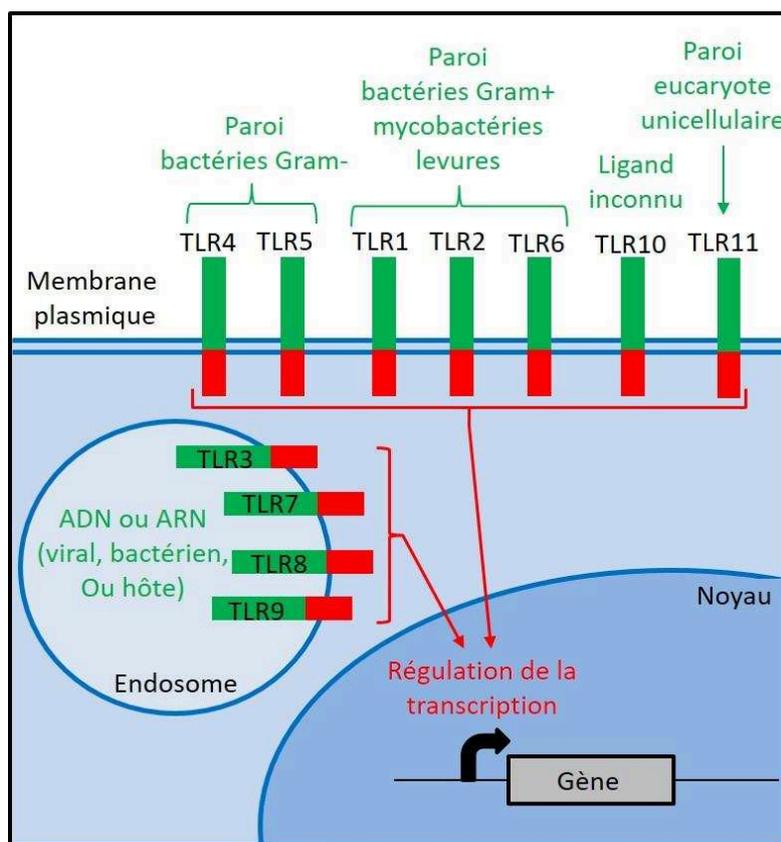
Les LPS des bactéries à Gram négatif, les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif, l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) riche en nucléotides Cytosine Guanine non méthylés (CpG) des bactéries, l'Acide RiboNucléique (ARN) double brin de certains virus sont des PAMP.

Les récepteurs du système immunitaire trouvés à la surface des globules blancs comme des cellules épithéliales qui détectent les PAMP sont appelés PRR pour *Pattern Recognition Receptors*. Les PRR détectent les signaux de danger qu'ils soient des PAMP ou qu'ils proviennent de cellules de l'hôte endommagées ou mortes par apoptose. Ces signaux de danger endogènes sont appelés DAMP pour *Damage Associated Molecular Patterns* (Vidya 2017). Les PRR sont situés dans différents compartiments cellulaires (membrane plasmique, cytosol, endosomes) de manière à détecter les pathogènes extracellulaires ou intracellulaires. Il existe différentes familles de PRR

comme les NLR ou *NOD Like Receptors*, les RLR à activité hélicase ou *RIG Like Receptors* qui sont cytosoliques et les TLR ou *Toll Like Receptors* que l'on peut trouver dans plusieurs compartiments. Les cellules du système immunitaire expriment en même temps plusieurs types de PRR ce qui leur permet de reconnaître efficacement le danger.

### 1.2.2. Exemple des toll-like receptors

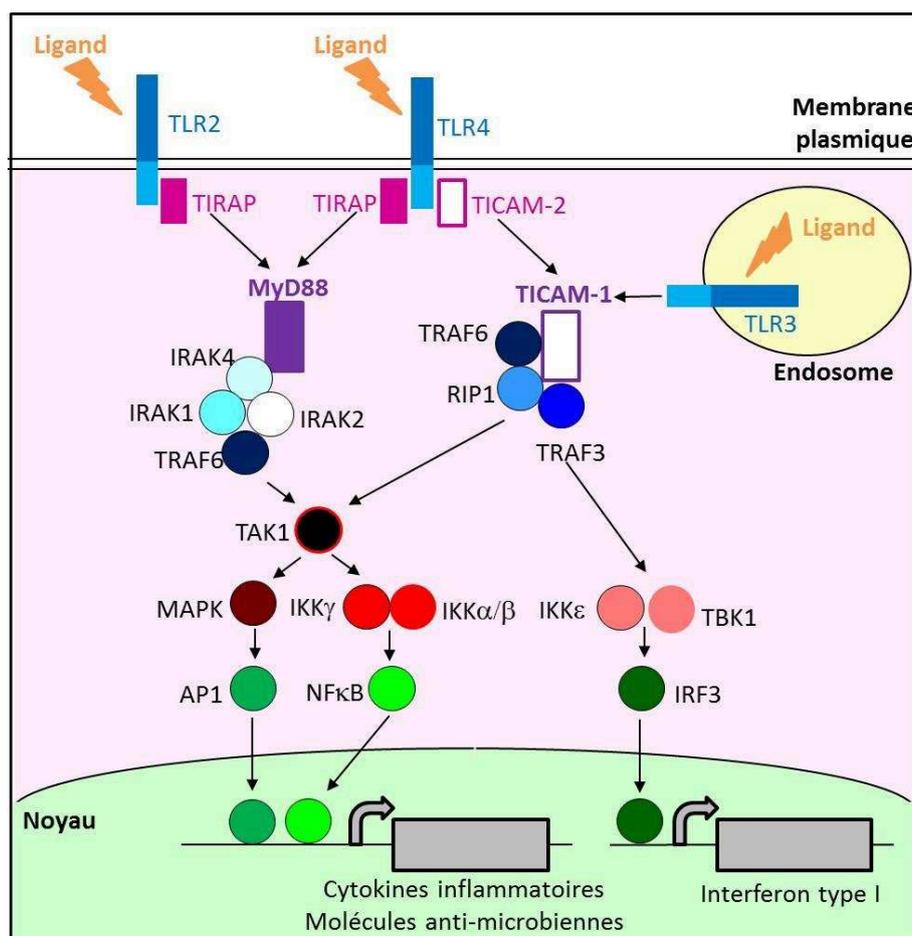
Les TLR ou récepteurs de type Toll ont été les premiers PRR à être identifiés et sont les mieux caractérisés (Medzhitov 1997). Le récepteur Toll (mot signifiant « formidable en Allemand) a été identifié pour la première fois chez *Drosophila melanogaster* comme un récepteur transmembranaire nécessaire à la mise en place de l'axe dorso-ventral au cours du développement embryonnaire (Hashimoto 1988). En 1996, JA HOFFMAN et son équipe ont montré que des mutations du gène codant pour le récepteur Toll engendrent une susceptibilité accrue des drosophiles à des infections fongiques (Lemaitre 1996), suggérant ainsi un rôle de ce récepteur dans le système immunitaire. Cette découverte a été une source de stimulation pour la recherche de récepteurs homologues chez les mammifères et l'étude de leur implication dans la fonction immunitaire. Dès 1997, un homologue mammifère du récepteur Toll est publié par l'équipe de CA Jr JANEWAY (Medzhitov 1997).



**Figure 1 :** Les Toll-Like Receptors avec leurs ligands. Les Toll-Like Receptors sont matérialisés dans la cellule eucaryote par les rectangles rouges et verts ; leurs ligands sont indiqués en lettres vertes.

Différentes protéines structurellement apparentées au récepteur Toll de la drosophile ont été identifiées par la suite chez les mammifères, et ont été désignées collectivement comme les « *Toll-like receptors* ». La plupart des espèces ont entre dix et quinze TLR ; l'homme et la souris en ont 13. On peut les classer en deux groupes selon leur localisation (Figure 1) et le PAMP microbien reconnu : les TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11 forment le groupe des TLR de la membrane plasmique, et reconnaissent des composants microbiens de surface tels que certains composés lipidiques comme les LPS et diverses protéines comme la flagelline qui est un des éléments du filament flagellaire des bactéries filamenteuses. L'autre groupe est composé des TLR 3, 7, 8, et 9 qui sont localisés dans des vésicules intracellulaires telles que les endosomes. Ils reconnaissent principalement les acides nucléiques, ADN et ARN, microbiens. Les ligands des TLR 10, 12 et 13 sont encore inconnus.

Ils sont exprimés par les cellules classiques du système immunitaire que sont les globules blancs mais aussi par les cellules épithéliales et de la peau qui sont en contact avec le milieu extérieur (Takeda 2004). De façon surprenante, ils ont aussi été détectés sur certaines cellules non spécialisées dans la détection de pathogènes, telles que les cellules endothéliales, les cardiomyocytes et les fibroblastes.



**Figure 2 :** La signalisation par les Toll-Like Receptors. Après activation par leur ligand respectif, les Toll-Like Receptors activent des adaptateurs (MyD88, TIRAP, TICAM1, TICAM2) qui, à leur tour, activent des cascades moléculaires conduisant à la régulation de la transcription de différents gènes. Adapté de [https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3524297\\_pjab-85-143-g009&req=4](https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3524297_pjab-85-143-g009&req=4)

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires caractérisées par un domaine extracytoplasmique composé d'une succession de motifs LRR pour *Leucin rich repeats*, d'un unique domaine transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique comprenant environ cent cinquante acides aminés et baptisé TIR pour *Toll/IL-1 Receptor* en raison de sa similitude à celui du récepteur de l'interleukine (IL)-1. Lorsqu'un TLR entre en contact avec son ligand, ce TLR change de conformation au niveau du domaine TIR qui recrute différentes molécules adaptatrices. Ces molécules adaptatrices spécifiques des TLR sont au nombre de quatre : MyD88 (pour *Myeloid Differentiation Primary Response protein 88*), TICAM-1/TRIF et TICAM-2 (pour *TIR domain Containing-Adaptor Molecule*), TIRAP/MAL (TIR domain containing Adaptor Protein). A l'exception de TLR3 qui utilise TICAM-1, les autres TLR utilisent MyD88 comme adaptateur. Les TLR3, 5, 7, 8, 9 et 11 ont un seul adaptateur ; les autres TLR ont MyD88 et TIRAP ou les quatre adaptateurs. Il existe deux voies de signalisation des TLR en fonction de la molécule adaptatrice recrutée (Figure 2) : la voie de signalisation dépendante de MyD88 et la voie de signalisation dépendante TICAM-1 (Takeda 2004). La voie dépendante de MyD88 conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (pour *Nuclear Factor-kappa B*) et AP-1 (pour *Activator Protein-1*) et à l'induction de nombreux gènes codant pour des cytokines et des facteurs anti-microbiens. La voie dépendante de TICAM-1/TRIF connue sous le nom de voie dépendante de TRIF conduit essentiellement à l'activation des facteurs de transcription de type IRF (pour Interferon Regulatory Factor) comme l'IRF-3 qui s'accompagne de la production d'IFN de type I (pour InterFeroN) qui à son tour agit sur les cellules immunitaires (Toshchakov 2002). A noter que certains TLR agissent sous forme de hétérodimère comme TLR2-TLR6. De plus TLR10 est un récepteur inhibiteur de MyD88 et de TICAM-1 (Jiang 2016).

Un cinquième adaptateur appelé SARM (pour Sterile Alpha and heat/ARmadillo Motif) a été découvert récemment ; celui-ci, en s'associant aux adaptateurs activateurs MyD88 et TICAM-1 et en bloquant leur activité, est inhibiteur de TLR4 (Vaure 2014).

### **I.3. Focus sur le lipopolysaccharide**

Le terme « lipopolysaccharide » abrégé en LPS est entré en usage au début du 20<sup>ième</sup> siècle pour désigner un composant de la paroi des bacilles à Gram- en raison de sa composition en lipides et de carbohydrates ou saccharides. Ce composant présente une activité toxique et est responsable de l'apparition d'un état de choc septique se traduisant par de la fièvre, une hypotension, des lésions tissulaires et des défaillances d'organes. Comme son activité toxique est associée aux bactéries et non pas au surnageant de culture comme les exotoxines diphtérique, tétanique et

botulinique, le LPS a été rapidement appelé endotoxine (Erridge 2002, Szalo 2006). Les deux termes continuent de coexister.

### I.3.1. Structure

La structure du LPS est donnée dans la Figure 3.

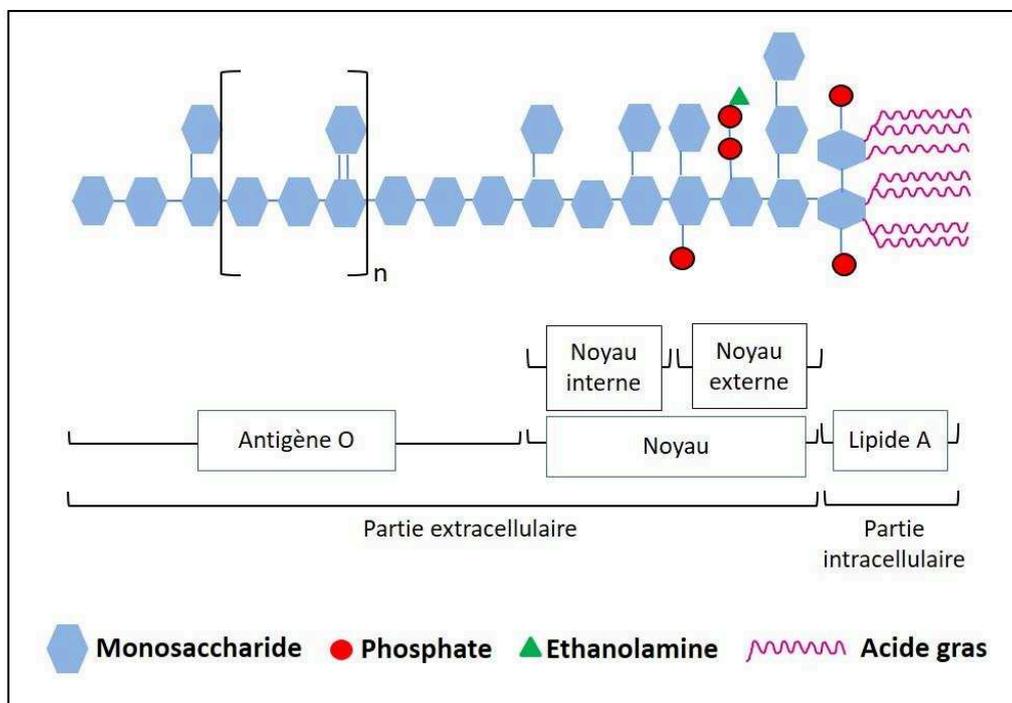


Figure 3 : Structure des LipoPolySaccharides

Le LPS est constitué de trois composants distincts synthétisés séparément :

- un composant hydrophobe localisé à la partie proximale de la molécule appelée « lipide A » qui est relativement conservé. Ce dernier est composé d'un disaccharide de D-glucosamines reliés en  $\beta$ -1,6 et phosphorylé par deux groupes phosphate en position 1' et 4'. Ce disaccharide est acylé par quatre acides gras dont deux fixent eux-mêmes une chaîne d'acide gras. Le lipide A contient six acides gras ayant de dix à seize carbones chacun et constitue le point d'ancrage du LPS dans la bicouche lipidique de la membrane externe de la bactérie. Le lipide A constitue l'essentiel de l'activité toxique chez l'hôte et est un élément vital pour la bactérie,
- un composant hydrophile de nature polysaccharidique situé dans la partie distale en contact avec l'environnement extérieur appelée « antigène O » pour « *Ohne Kapsel* » qui signifie sans capsule en Allemand. L'antigène O résulte de la polymérisation de blocs d'hydrates de carbone nommés « unités O ». Ces dernières sont, elles-mêmes, des oligosaccharides pouvant être constitués de un à huit monosaccharides de même type (homopolymère) ou de types différents (hétéropolymère). Certains hydrates de carbone peuvent présenter des substitutions latérales par des éléments non glucidiques comme des groupements acétyl. L'antigène O peut présenter une forte variabilité structurale due à la composition et aux arrangements des unités O ainsi qu'à leur nombre. Une bactérie donnée ne présente qu'un type d'antigène O à sa surface mais les

antigènes O varient fortement d'une souche à l'autre à l'intérieur d'une même espèce et d'une espèce à l'autre. Certains LPS sont même dépourvus d'antigène O,

- un noyau appelé « *core* » de nature polysaccharidique qui est divisé en deux parties distinctes dont l'une est hydrophobe, désignée comme le noyau interne, et l'autre plutôt hydrophile formant le noyau externe (Nikaido 1987). Le noyau interne est lié de façon covalente au lipide A par l'acide déoxyoctanate ou Kdo et présente une structure généralement conservée. Le noyau externe présente une plus grande variabilité que le noyau interne et est composé d'hexoses ordinaires tels que le Glucose (Glu), le Galactose (Gal) ou la N-Acétyl-D-Galactosamine (GalNAc). Le noyau externe s'associe à l'antigène O lorsqu'il est présent.

### I.3.2. Récepteurs

Les LPS sont reconnus par TLR4 qui est le premier TLR à avoir été identifié chez les mammifères. Il a été identifié simultanément par deux groupes cherchant l'origine de l'hyposensibilité de certaines souches murines (C3H/HeJ et C57BL10/ScCR) à la toxicité du LPS (Poltorak 1998, Qureshi 1999). Le gène défectueux responsable de cette hyposensibilité a été localisé sur le chromosome 4 et identifié comme le gène codant le TLR4. La lignée murine C3H/HeJ présente une mutation ponctuelle où une proline fortement conservée est remplacée par une histidine dans la région du gène qui correspond au domaine TIR de TLR4, ce qui conduit à la synthèse d'un récepteur inactif. L'autre lignée murine, C57BL10/ScCR, présente une mutation non sens bloquant complètement la synthèse protéique de TLR4. Des souris *Knock-Out* (KO) pour TLR4 ont permis de confirmer que TLR4 est un récepteur essentiel dans l'activation de la voie de signalisation induite par le LPS (Hoshino 1999).

Il a été montré également que l'activation cellulaire par le LPS nécessite trois autres protéines en plus de TLR4 : la LBP (pour *LPS Binding Protein*), la molécule CD14 (pour Cluster of Differentiation), et la protéine MD2 (pour *Myeloid Differentiation*) (Botos 2011). La LBP est une glycoprotéine synthétisée et sécrétée par le foie, mais aussi par d'autres tissus tels que l'intestin et les cellules épithéliales pulmonaires sous l'action des cytokines comme l'IL-6, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  (pour *Tumor Necrosis Factor*) (Gamble 2009, Kirschning 1997). Elle est présente dans le sérum et augmente fortement en cas d'infection où elle se fixe au LPS pour former le complexe LPS-LBP qui est reconnu par CD14, une protéine ancrée sur le versant externe de la membrane cytoplasmique *via* une queue lipidique de glycosylphosphatidylinositol (GPI). CD14 présente le LPS au couple TLR4/MD2 qui sert de corécepteur pour la partie hydrophobe du LPS (Visintin 2006). L'importance de ces trois molécules, LBP, CD14, et MD2, a été démontré *in vivo*. Ainsi, des doses habituellement létales chez la souris sauvage n'ont aucun effet chez des souris n'exprimant pas la LBP ou le CD14 (Haziot 1995, Moore 2000). Des souris KO pour MD2 présentent une résistance au choc septique induit par le LPS, similaire aux souris KO pour TLR4 (Nagai 2002). A noter que le CD14 peut exister

aussi sous une forme soluble qui peut présenter le LPS au complexe TLR4/MD2 présent sur des cellules non immunitaires ne possédant pas la forme membranaire de CD14.

TLR4 active les quatre adaptateurs que sont MyD88, TICAM-1/TRIF, TICAM-2 et TIRAP/MAL ce qui conduit à la signalisation dépendante de MyD88 et à la signalisation dépendante de TRIF et résulte en la production de cytokines inflammatoires comme des IFN de type 1. TLR4 peut également activer SARM qui s'associe aux adaptateurs activateurs et limite leur activité (Vaure 2014) ; cet effet est probablement un mécanisme de contrôle visant à éviter l'activation excessive des cellules immunitaire et le choc septique.

En plus de l'activation de TLR4, il a été montré que le LPS active également certaines CASPASEs (pour *CysteinyI-aspartate-cleaving protease*) à l'intérieur de la cellule de manière indépendante de TLR4. Le LPS lorsqu'il est présent dans la cellule active la CASPASE-11 murine et ses orthologues humains, les CASPASEs-4 et -5 (Shi 2014). L'effet du LPS passe par une interaction du lipide A avec le domaine CARD (pour *Caspase Activation and Recruitment Domain*) des CASPASEs -4, -5 et -11 conduisant à leur oligomérisation, un prérequis pour leur activation qui conduit à la protéolyse de différents substrats impliqués dans la production de certaines cytokines inflammatoires comme l'IL-1 et dans la mort cellulaire par apoptose (Cai 2014, Lu 2014).

En plus du LPS, d'autres activateurs du TLR4 ont été décrits : le paclitaxel qui est un alcaloïde dérivé de l'écorce de l'if et utilisé en chimiothérapie anticancéreuse chez l'homme, la protéine de fusion du virus syncytial respiratoire, la pneumolysine de *Streptococcus Pneumoniae*. Certains composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, l'acide hyaluronique, et l'héparane sulfate produits au cours d'une réponse inflammatoire, ont été également rapportés comme des ligands endogènes de TLR4 mais ils activent les cellules immunitaires à de fortes concentrations contrairement aux faibles doses requises par le LPS. Enfin, des protéines normalement endogènes comme les protéines de choc thermique ou HSP (pour *Heat Shock Protein*) ont été décrites comme des ligands du TLR4 ; l'expression des HSP augmente dans différents cas de stress cellulaires et pourraient être libérées par les cellules en stress ou suite à une nécrose constituant ainsi un signal de danger (Gallucci 2001). Il a d'ailleurs été montré que HSP60 et HSP70 présente une activité immunostimulatrice et inflammatoire médiée par TLR4 (Asea 2002, Dybdahl 2002, Ohashi 2000, Vabulas 2001, Vabulas 2002).

TLR4 est exprimé par de très nombreux tissus mais n'est pas retrouvé dans la peau ni dans les muscle. L'expression est très forte au niveau des globules blancs en particulier dans la lignée des monocytes où TLR4 est constitutivement exprimé à la surface de ces cellules (Vaure 2014). Dans les autres cellules, comme les cellules épithéliales bronchiques, TLR4 est exprimé à un faible niveau et il est retrouvé constitutivement dans les compartiments intracellulaires ; son expression

peut augmenter avec une localisation en surface suite à l'activation des cellules par des agents infectieux (Greene 2005).

### **I.3.3. Tolérance endotoxinique**

La détection des composants microbiens déclenche une réponse de défense en vue d'empêcher la colonisation et la dissémination des micro-organismes pathogènes. Cependant, même si cette réponse se révèle cruciale dans la lutte contre les infections, elle doit être finement régulée afin d'éviter les complications cliniques pouvant se traduire par des états pathologiques tels que le choc septique (Biswas 2009, Foster 2009). L'un des exemples classiques de ce mécanisme protecteur est la tolérance endotoxinique (Biswas 2009). Il s'agit d'un phénomène dans lequel des cellules ou des organismes exposés à de faibles concentrations de LPS entrent dans un état d'insensibilité transitoire et sont incapables d'y répondre ultérieurement. Ce phénomène a été décrit la première fois en 1946 chez le lapin et a été ensuite observé dans d'autres espèces animales dont l'homme lors d'injections de vaccins (Cavaillon 2006, Foster 2009). Si la tolérance endotoxinique est généralement perçue comme un mécanisme bénéfique, elle peut cependant avoir un effet néfaste comme cela a été observé chez des patients ayant une infection bactérienne systémique (sepsis) où leur système immunitaire rentre dans un état latent de tolérance au LPS. Cet état est associé à de forts risques d'infections secondaires et de mortalité.

Chez la souris, il a été montré que l'injection de doses suboptimales de LPS les protège ultérieurement d'un choc septique normalement induit par l'injection de fortes doses de LPS. Dans le modèle murin, les cellules de la lignée monocyte sont reconnues comme les principales cellules impliquées dans l'induction de la tolérance endotoxinique (Cavaillon 2006). Des études *in vitro* ont confirmé que les monocytes murins et humains produisaient peu de cytokines pro-inflammatoires en réponse à une forte dose de LPS lorsque cette injection était précédée d'une incubation des cellules avec du LPS à faible concentration. La tolérance endotoxinique a également été montrée sur d'autres globules blancs et des cellules non immunitaires comme les cellules endothéliales (Albrecht 2008, Ogawa 2003, Sharabi 2008).

D'un point de vue moléculaire, des défauts dans la signalisation de TLR4 ont été observés au cours de la tolérance endotoxinique. En effet, il a été montré dans des expériences réalisées *in vitro* que les cellules de la lignée monocyte murines ou humaines présentent une diminution de formation du complexe TLR4-MyD88 et un défaut d'activation des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B (Biswas 2007, Fan 2004).

# Chapitre II. L'immunoglobuline A

---

## II.1. Le système immunitaire

Le système immunitaire est un ensemble de tissus, cellules et molécules qui assurent la défense de l'organisme contre les agressions extérieures provenant des microorganismes pathogènes et les agressions intérieures comme les dérèglements cellulaires pouvant conduire par exemple à la formation de tumeurs (Lydyard 2007).

Les tissus comprennent les organes lymphoïdes primaires que sont la moelle osseuse et le thymus où naissent les globules blancs, les organes lymphoïdes secondaires comme la rate, les tonsilles (anciennement appelées amygdales), les ganglions lymphatiques et les MALT, et les épithélia. Les globules blancs sont issus de la division, de la différenciation et de la maturation de progéniteurs hématopoïétiques dits lymphoïdes ou myéloïdes. Les cellules lymphoïdes comprennent les lymphocytes T et B, les cellules Natural Killer (NK) avec tous leurs sous-types de cellules. Les cellules myéloïdes peuvent être majoritairement circulantes comme les PMN, les polymorphonucléaires éosinophiles, les polymorphonucléaires basophiles et les monocytes ou résidentes dans les tissus comme les macrophages, les cellules dendritiques (ou *Dendritic Cells* - DC) et les mastocytes. Le système immunitaire dispose de tout un panel de molécules membranaires ou solubles extracellulaires, parmi lesquelles nous citerons des récepteurs comme les PRR et les TLR, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les cytokines et les médiateurs lipidiques (exemple : PAF) qui recrutent et activent les globules blancs, les molécules toxiques peu spécifiques (exemple : dérivés actifs de l'oxygène) ou spécifiques à activité antimicrobienne, les Ig, les fractions du complément.

Ce système se décompose en un système d'alerte et un système effecteur. Le système d'alerte reconnaît le non soi et le soi altéré et active le système effecteur qui élimine ou neutralise le non soi et le soi altéré. Les PRR participent au système d'alerte alors que les peptides antimicrobiens produits par les cellules de Paneth sont des molécules effectrices. Le système effecteur peut faire appel à des réponses dites humorales, c'est-à-dire liées à des molécules solubles, ou cellulaires quand c'est l'interaction cellule de défense-cellule à éliminer qui contribue à l'élimination de la cellule « dangereuse ».

Le système immunitaire peut aussi être défini comme inné ou adaptatif ; au contraire du système inné qui est présent chez tous les organismes pluricellulaires, le système adaptatif est une évolution des vertébrés. Le système inné comprend notamment les cellules et molécules dites inflammatoires.

Le système inné est présent à la naissance et mobilisable rapidement après la pénétration d'un agent pathogène dans l'organisme. Il constitue la première ligne de défense face aux situations de danger auxquelles est confronté l'organisme. Il ne possède pas de mémoire immunitaire et induit toujours la même réponse quelque soit l'agent pathogène introduit ; il est donc peu spécifique. La réponse inflammatoire locale médiée par les PMN (Mantovani 2011) est un bon exemple de ce qu'est le système inné où, dans les heures qui suivent la pénétration d'une bactérie au niveau d'une muqueuse, il y a recrutement des PMN circulants. Ce recrutement se fait grâce à la production de divers agents chimio-attractants pour les PMN par les cellules présentes dans la muqueuse (cellules immunitaires, épithéliales, autres) et l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales. Les PMN adhèrent à l'endothélium, d'abord de façon légère conduisant à leur roulement ou rolling à la surface de l'endothélium puis par adhérence ferme ou margination avant de ramper et de transmigrer à travers l'endothélium ; les PMN sont alors guidés jusqu'au site infectieux par le gradient d'agents chimio-attractants. Les PMN sont activés localement éliminent les bactéries soit en les phagocytant soit par un mécanisme extracellulaire appelé *Neutrophil Extracellular Trap* (NET). La phagocytose est suivie de la destruction de la bactérie dans des vésicules sous l'effet de dérivés actifs de l'oxygène que le PMN produit en grande quantité et des protéines toxiques déversées dans la vésicule à partir des granules cytoplasmiques où elles sont stockées. Les NET sont un filet d'ADN nucléaire décondensé que le PMN déverse dans le milieu extracellulaire tout en dégranulant. Les bactéries piégées dans le filet d'ADN sont neutralisées et/ou détruites par les protéines hautement toxiques provenant des granules des PMN. Les PMN meurent rapidement au site de leur action et sont eux-mêmes éliminés par les cellules phagocytaires professionnelles que sont les macrophages.

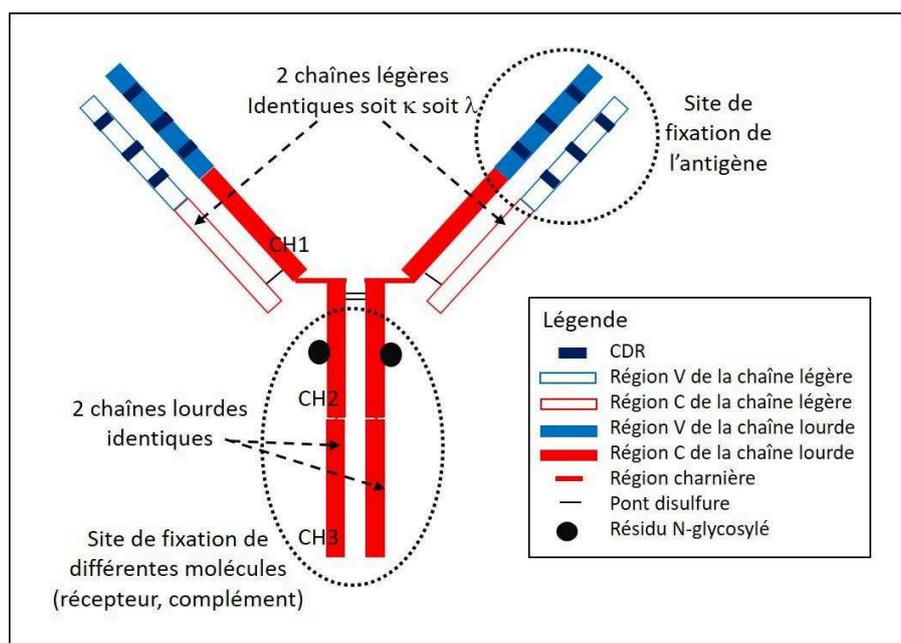
Au contraire du système inné, le système adaptatif est long à se mettre en place car il nécessite un ajustement à l'agent pathogène de façon à ne reconnaître que celui-ci. Cet ajustement passe par des modifications génétiques au niveau des globules blancs permettant de produire *de novo* des molécules effectrices très spécifiques. L'ajustement génétique se fait au cours de divisions cellulaires et s'étale sur plusieurs jours. La réponse adaptative est retardée par rapport à la réponse innée lors du premier contact avec l'agresseur mais elle est gardée en mémoire : lors d'un second ou n<sup>ième</sup> contact avec le même agresseur, elle se met en place rapidement. Le système adaptatif est acquis au cours de la vie et ses molécules effectrices n'ont pas les mêmes spécificités chez tous les individus d'une même espèce. La diversité des molécules effectrices de ce système dépend des rencontres que l'hôte fait avec des agents pathogènes. Les lymphocytes B décrits ci-dessous sont une des cellules majeures du système adaptatif ; ces cellules produisent des Ig dont les gènes sont fortement modifiés au cours de la vie de la cellule.

L'IgA, produit par les cellules de la lignée des lymphocytes B, est une molécule d'alerte lorsqu'elle est sous sa forme membranaire à la surface des lymphocytes B. Dans ce cas, on parle de *B Cell Receptor* (BCR) de type A. L'IgA est également une molécule effectrice du système immunitaire sous sa forme soluble. Par certains aspects de ses fonctions, elle contribue à l'immunité innée des muqueuses et quand elle agit suite à une reconnaissance spécifique d'un agent, elle participe aux mécanismes de l'immunité adaptative.

## II.2. Les lymphocytes B

### II.2.1. Structure des immunoglobulines

Les Ig sont des glycoprotéines hétérotétramériques constituées de deux chaînes lourdes identiques entre elles et de deux chaînes légères identiques entre elles et ont une forme de Y (Figure 4) (Jefferis 2007). Les chaînes lourdes d'environ 50 kDa chacune et légères d'environ 25 kDa chacune sont constituées de régions dont la séquence en acide aminé est très variable (V) et de régions constantes (C). Dans une Ig, les bras du Y sont constitués par une chaîne légère et une partie d'une chaîne lourde reliées entre elles par un pont disulfure ; l'extrémité des bras du Y réunit les régions V de la chaîne légère et de la chaîne lourde en formant le site spécifique de reconnaissance de l'antigène. Une Ig peut donc reconnaître deux molécules d'antigène en même temps. Le pied du Y associe, *via* des ponts disulfure, l'autre partie des deux chaînes lourdes dont l'extrémité contient ou non une séquence d'association à la membrane plasmique ; la présence de cette séquence conduit à l'expression du BCR alors que son absence donne l'Ig soluble. Le pied de l'Ig soluble est un site de reconnaissance et de liaison de diverses molécules comme les récepteurs aux Ig ou les fractions du complément et porte donc la fonction effectrice des Ig.



**Figure 4 : Structure des Immunoglobulines**

Des ponts disulfure sont aussi présents en intrachaîne et délimitent des domaines : 1 domaine V dans chaque chaîne légère et dans chaque chaîne lourde, 1 domaine C dans chaque chaîne légère et 3 à 4 domaines C ( $C_{H1}$  à  $C_{H4}$ ) dans chaque chaîne lourde. A l'intérieur de chacun des domaines V, on distingue trois zones hypervariables appelées *Complementary Determining Region* (CDR) entourées de zones de « charpente » de plus faible variabilité appelée *Framework* (FR). Certaines Ig possèdent une région dite charnière située entre les domaines  $C_{H1}$  et  $C_{H2}$ , qui confère une certaine flexibilité aux bras du Y (Schroeder 2010).

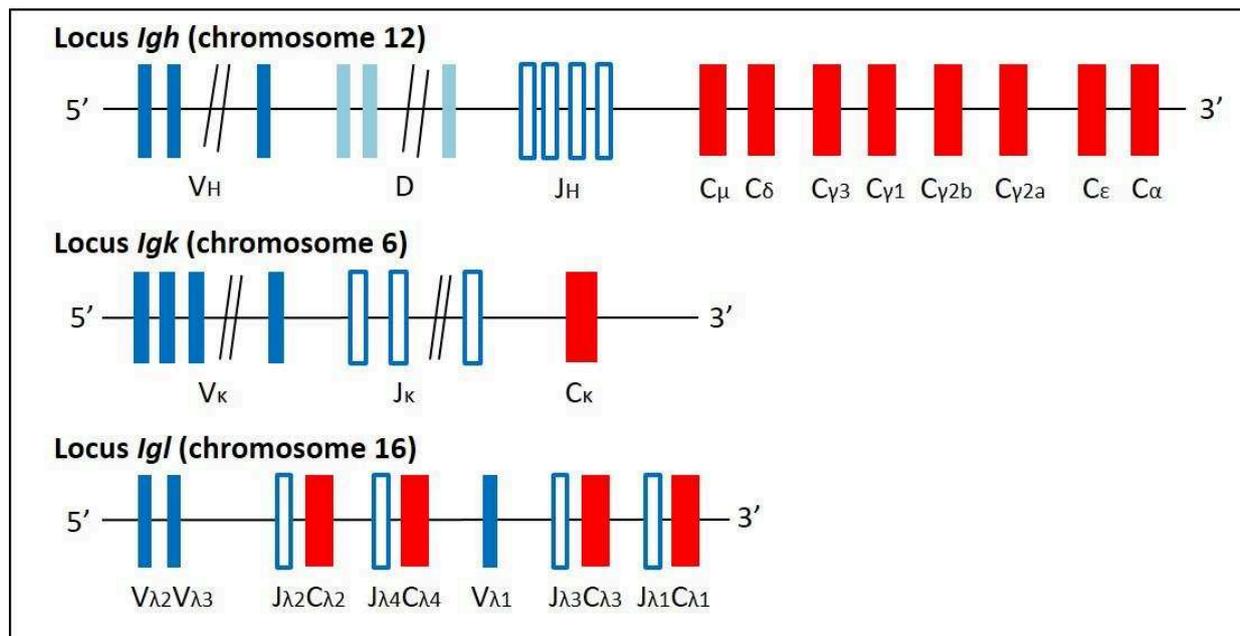
Les Ig existent sous une forme membranaire, le BCR qui est le récepteur aux antigènes pour les cellules B, ou sous une forme soluble et prennent alors le nom d'anticorps. Dans sa forme membranaire, l'Ig est associée à la membrane grâce à un domaine transmembranaire qui se poursuit en intracellulaire par une région très courte ne permettant pas la transmission du signal. La transmission du signal se fait par l'interaction du BCR avec un hétérodimère  $Ig\alpha$ - $Ig\beta$  (ou CD79a-CD79b) où les deux chaînes sont associées entre elles par un pont disulfure.  $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ , dans leur partie intracellulaire contiennent des *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motives* (ITAM) qui transduisent le signal intracellulaire sous forme d'une cascade d'activation de kinases et de facteurs de transcription. Les anticorps sont présents dans les fluides biologiques tels que le plasma, la lymphe, le colostrum et le lait maternel et les liquides produits par les muqueuses digestives, respiratoires et urogénitales.

## II.2.2. Organisation germinale et réorganisation des gènes d'immunoglobulines

Les gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des Ig sont répartis en trois loci appelés et écrits *IGK*, *IGL* et *IGH* chez l'homme et *Igk*, *Igl*, *Igh* chez la souris (Lefranc 1999). Ces loci sont situés sur trois chromosomes différents chez l'homme comme chez la souris.

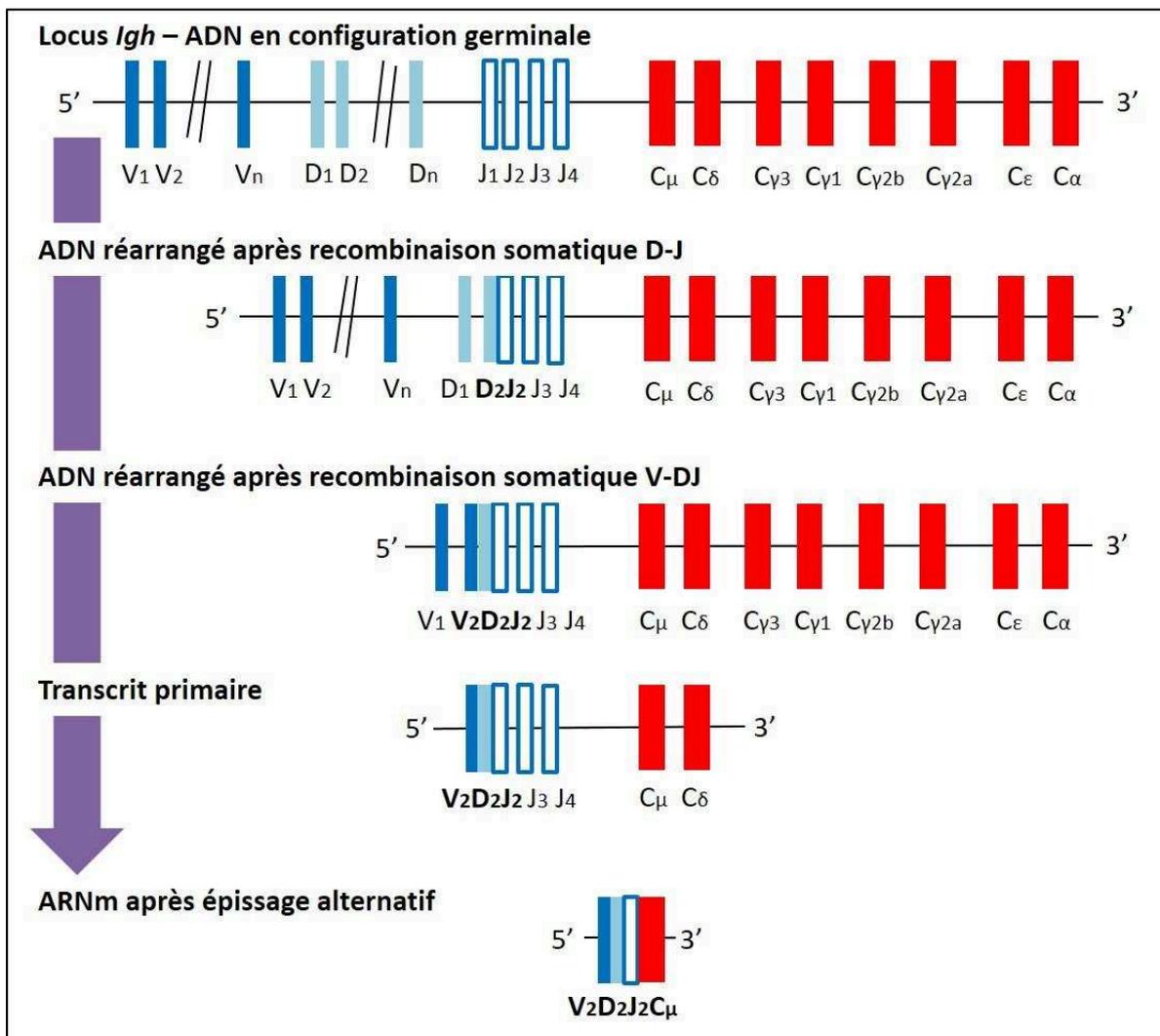
Le locus de la chaîne lourde (*IGH* ou *Igh*, pour *heavy*) est situé sur le chromosome 14 chez l'homme et sur le chromosome 12 chez la souris. Chez l'homme, ce locus comprend 123 segments  $V_H$  pour Variable, 27 segments  $D_H$  pour Diversité, 9 segments  $J_H$  pour Jonction et de 9 segments C pour Constant. Chez la souris, il est constitué de 216 segments  $V_H$ , 21 segments  $D_H$ , 4 segments  $J_H$  suivis par 8 segments C (Figure 5 page 28). Les segments V, D et J sont suivis d'un numéro dans l'ordre où ils sont placés dans le locus (exemple  $V_{H2}$ ) ; les segments C sont suivis d'une lettre grecque (exemple  $C_\alpha$ ).  $C_\alpha$  est dupliqué chez l'homme avec  $C_{\alpha1}$  et  $C_{\alpha2}$  expliquant la différence de nombre de segments C entre ces deux espèces. Tous les segments ne sont pas fonctionnels. Le locus de la chaîne légère kappa (*IGK* ou *Igk*) est situé sur le chromosome 2 chez l'homme, alors qu'il est identifié sur le chromosome 6 chez la souris. Chez l'homme, il comprend 76 segments  $V_k$ , 5 segments  $J_k$  et un seul segment  $C_k$ . Chez la souris, il comporte 161 segments  $V_k$ , 5 segments  $J_k$  suivi d'un seul segment  $C_k$ . Le locus de la chaîne légère lambda (*IGL* ou *Igl*), quant à lui, est localisé sur le chromosome 22 chez l'homme et 16 chez la souris. Chez l'homme, ce locus est constitué de

74 segments  $V_\lambda$  et de 7 à 11 segments  $C_\lambda$ . Chacun des segments  $C_\lambda$  fonctionnels est précédé d'un segment  $J_\lambda$ . Chez la souris, il y a 3  $V_\lambda$ , 4  $J_\lambda$  et 4  $C_\lambda$  qui sont répartis sur le locus comme indiqué dans la Figure 5.



**Figure 5** : Organisation des loci murins *Igh*, *Igk*, *Igl*

Les loci sont non fonctionnels dans leur configuration germinale et doivent subir des réarrangements géniques appelés recombinaisons V(D)J (Figure 6 page 29) qui donnent naissance à un exon. Ces réarrangements qui associent physiquement un segment V, (un segment D) et un segment J, dans un locus nécessitent l'excision d'ADN double brin et la recombinaison des bouts à associer, qui est assurée par les enzymes *Recombination Activating Gene* (RAG)-1 et RAG-2 spécifiques des lymphocytes et par d'autres enzymes d'expression ubiquitaire. Au niveau du locus de la chaîne lourde, les réarrangements VDJ se font en deux étapes : d'abord un segment  $D_H$  s'associe au hasard à un segment  $J_H$  puis l'ensemble  $D_HJ_H$  est joint au hasard à un segment  $V_H$ . L'exon  $V_HD_HJ_H$  ainsi formé s'associe avec le segment  $C_H$  le plus proche, en l'occurrence  $C_\mu$ , et donne un ARNm prêt à être traduit en protéine. L'exon  $V_HD_HJ_H$  code pour la région protéique V de la chaîne lourde tandis que l'exon  $C_\mu$  code pour sa région protéique C. Il en est de même pour les exons VJ et C des chaînes légères qui codent les régions protéiques V et C. Les réarrangements V(D)J aléatoires permettent de créer une multitude de séquence appelée diversité combinatoire. A noter également que la machinerie de recombinaison ne crée pas des jonctions  $V_H-D_H$ ,  $D_H-J_H$  et V-J identiques en séquence ; cette diversité jonctionnelle qui touche principalement les jonctions sur le locus *IGH/Igh* amplifie la diversité combinatoire. Enfin, la combinaison de chaînes lourdes et de chaînes légères différentes démultiplie la diversité du site de reconnaissance de l'antigène dans l'Ig.



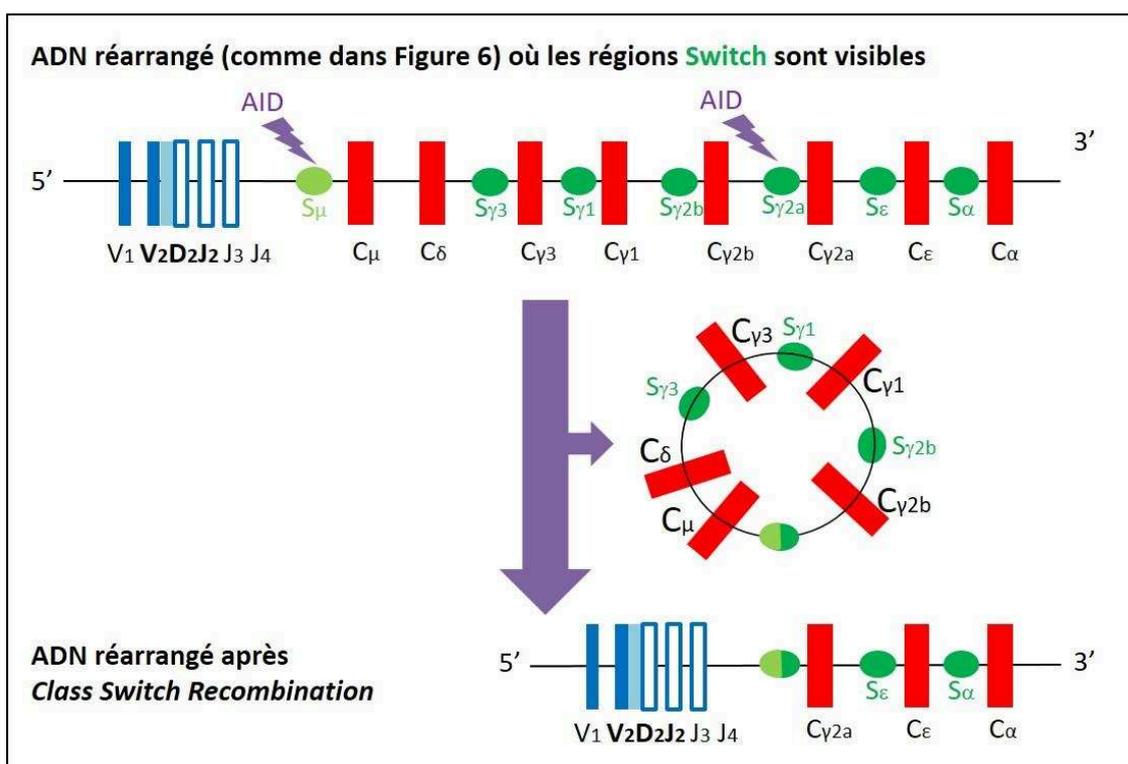
**Figure 6 :** Mécanisme de la recombinaison VDJ au locus *Igh*

Bien que les réarrangements se fassent de façon aléatoire, tous les segments fonctionnels ne sont pas utilisés avec la même fréquence. De plus, dans un lymphocyte B donné, seul un des loci de chaîne légère est utilisé : un même lymphocyte B produit des Ig avec la chaîne légère  $\kappa$  ou avec la chaîne légère  $\lambda$ . Les loci pour les chaînes légères  $\kappa$  ou  $\lambda$  ne sont pas être utilisés de façon identique : chez l'homme environ un tiers des lymphocytes B expriment une chaîne légère  $\lambda$  alors que chez la souris seuls 5% l'expriment.

Les loci réarrangés peuvent subir d'autres modifications au cours de la vie du lymphocytes B : la *somatic hypermutation* (SHM) et la *class switch recombination* (CSR) ou commutation de classe. Ces deux phénomènes font appel à l'activation d'une enzyme lymphocytaire spécifique appelée AID (pour *Activating-Induced cytidine Deaminase*). Lors de la transcription de l'ADN, AID transforme les paires cytidine-guanine qu'elles rencontrent en uracil-guanine par déamination de la cytidine ; il en résulte l'intervention de systèmes de réparation qui excise l'uracil ce qui crée une coupure qui est réparée. Au cours de la SHM, AID cible certaines séquences particulières dans V et la réparation réalisée par des systèmes de réparation non fidèles crée des mutations ponctuelles aléatoires. On

estime que les mutations dans V sont  $10^6$  plus fréquentes que dans le reste du génome. Ainsi, la résultante de la SHM est une augmentation de la variabilité du site de reconnaissance de l'antigène qui se manifestent dans des zones dites hypervariables. Dans les Ig, ces zones hypervariables constituent les zones CDR.

Dans le cas de la CSR, AID cible simultanément deux petites séquences d'ADN dites *Switch* (S) dont l'une est en amont du segment  $C_\mu$  et la seconde en amont d'un autre segment  $C_H$  tel que  $C_{\gamma 2a}$  comme dans l'exemple donné dans la Figure 7. A l'exception de  $C_\delta$ , tous les  $C_H$  sont précédés d'une séquence S. L'action d'AID et les réparations imparfaites utilisant une machinerie moléculaire différente de celle de la SHM conduisent à l'excision de la séquence située entre les deux séquences S et à la recombinaison des séquences portant l'exon  $V_H D_H J_H$  et par exemple l'exon  $C_{\gamma 2a}$  (Figure 6). Le gène ainsi reconstitué donne naissance à une IgG2a et non plus à une IgM. La CSR permet donc de changer la région C d'une Ig et ainsi sa classe pour amener à une nouvelle fonction effectrice. Chez la souris, il existe huit classes et sous-classes d'Ig (IgM, IgD, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgE, IgA) et neuf chez l'homme (IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 et IgA2).



**Figure 7 : Mécanisme de la *Class Switch Recombination***

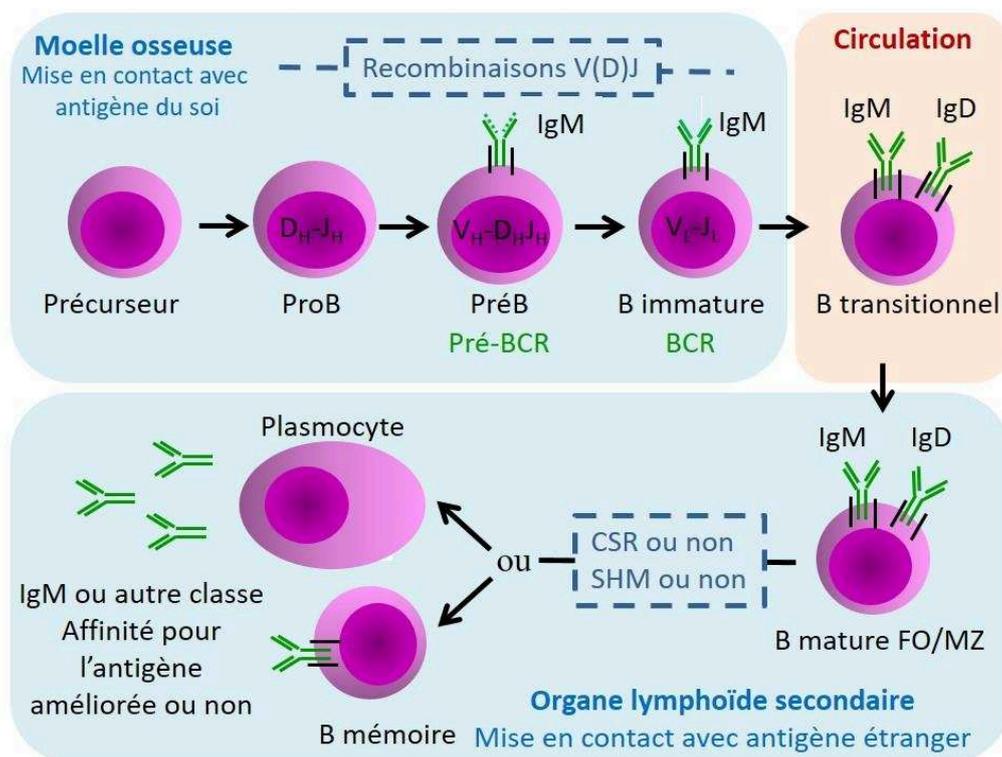
L'IgD chez la souris et chez l'homme ne résulte pas de la mise en œuvre de la CSR contrairement aux autres classes d'Ig mais d'un épissage alternatif de l'ARN codant à la fois l'IgM et l'IgD. A noter aussi que l'IgD est particulier au titre de l'exclusion isotypique qui s'applique à toutes les classes d'Ig sauf à l'IgD ; en effet celui-ci est co-exprimé avec l'IgM par certains types de cellules B.

L'expression des Ig sous forme de BCR ou de protéine soluble est liée à la présence ou à l'absence d'un domaine transmembranaire et d'une région courte intracellulaire qui sont codées par deux exons présents dans les segments C. La sélection de ces deux exons se fait par épissage alternatif.

La diversité combinatoire, la diversité jonctionnelle, les combinaisons de chaînes lourdes et légères, la SHM et la CSR conduisent, à partir de quelques centaines de segments géniques, à la synthèse possible, en théorie, de plusieurs milliards de molécules d'Ig différentes appelé répertoire.

### II.2.3. Développement des lymphocytes B jusqu'au B immature

L'ontogénie de la cellule B se fait en deux étapes majeures successives (Figure 8), dont la première étape indépendante des antigènes du non soi, se déroule dans la moelle osseuse chez l'animal adulte et conduit à la production de cellules B immatures exprimant un BCR capable de reconnaître et d'être activé par un antigène. Elle est divisée en plusieurs sous-étapes : stade pré-pro B, stade pro-B, stade pré-B et le stade B immature. Les recombinaisons V(D)J ont lieu pendant cette étape précoce du développement B.



**Figure 8 :** Les différentes étapes du développement des cellules de la lignée B

Les cellules de l'environnement du lymphocyte B comme les cellules stromales de la moelle osseuse contribuent au développement B en apportant des facteurs qui favorisent la croissance, la différenciation, la maturation et la survie lymphocytaire. Elles participent aussi au contrôle qualité des lymphocytes B.

Les cellules du stade pré-proB constituent les précurseurs les plus immatures des cellules B. Ces cellules n'ont pas encore réarrangé les gènes des Ig, mais commencent déjà à exprimer certains marqueurs spécifiques de la lignée B telles que le B220 chez la souris et CD20 chez l'homme, le CD19 et la protéine Ig $\alpha$ /CD79a, RAG-1 et RAG-2. Les réarrangements des gènes codant les chaînes des Ig ne débutent qu'au stade proB et sur le locus IgH. La jonction entre les segments D et J a lieu au cours de ce stade de manière quasi-simultanée sur les deux allèles. Puis, le réarrangement V<sub>H</sub> avec D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> se fait sur un des deux allèles et s'il est productif, c'est-à-dire qu'il permet la production d'une chaîne lourde  $\mu$ , le second allèle n'est pas utilisé : ce phénomène est appelé exclusion allélique (Alt 1984, Tonegawa 1983). Si le réarrangement sur le premier allèle n'est pas productif, l'autre allèle est utilisé et si là encore cela aboutit à un réarrangement non productif, la cellule est éliminée par apoptose. Seulement un tiers des événements de recombinaison seraient productives (Alt 1987). Le stade suivant est baptisé stade pré-B au cours duquel la cellule associe la chaîne lourde  $\mu$  avec une pseudo chaîne légère (Melchers 1993, Monroe 2007) et produit le corécepteur Ig $\alpha$ -Ig $\beta$  (ou CD79a-CD79b) ce qui conduit à l'expression de surface d'un pré-BCR. Cette expression du pré-BCR est le signal qui provoque l'amorçage des réarrangements de VJ pour la production d'une vraie chaîne légère  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Ces réarrangements se produisent au locus *IGK/Igk* et, s'ils ne sont pas productifs, ils ont lieu au locus *IGL/Igl* (Brauninger 2001). Ce phénomène qui conduit à l'expression exclusive de l'isotype  $\kappa$  ou  $\lambda$  est appelé exclusion isotypique. La production d'une chaîne légère, son association avec la chaîne lourde  $\mu$  et avec le corécepteur Ig $\alpha$ -Ig $\beta$  et l'expression d'un BCR signent le début du stage B immature. A ce stade, la cellule est soumise à un processus de sélection négative ayant pour but d'éliminer les cellules B auto-réactives, c'est-à-dire qui reconnaissent les antigènes du soi. Pour cela, des antigènes du soi portés par les molécules du CMH exprimées par les cellules stromales de la moelle osseuse sont présentés aux cellules B immatures. Les cellules B immatures dont le BCR reconnaît les antigènes du soi sont éliminées par apoptose ; près de la moitié des lymphocytes B immatures sont éliminés par sélection négative (Melchers 1995).

A noter que des clones B auto-réactifs peuvent subir de nouveaux réarrangements géniques, appelés *receptor editing*, suite à la réactivation des enzymes RAG1 et RAG2. Ceux-ci permettent l'expression d'un nouveau BCR à la surface de la cellule qui passe à nouveau le filtre de la sélection négative : si la cellule B immature garde son auto-réactivité, elle est éliminée par apoptose ou elle devient anergique c'est-à-dire que l'expression du BCR est réprimée.

#### **II.2.4. Du B immature au plasmocyte et à la cellule B mémoire**

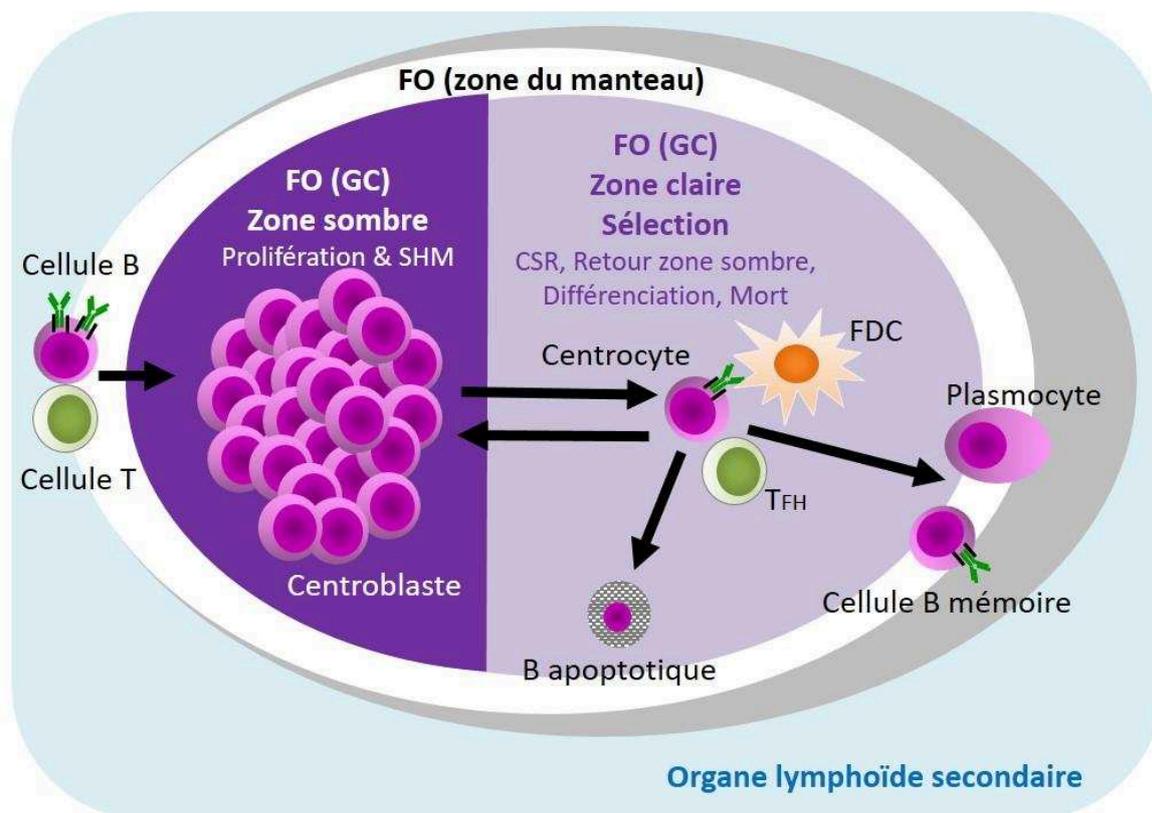
Les cellules B immatures ayant survécu à la sélection négative, c'est-à-dire ne possédant pas de réactivité vis-à-vis du soi, quittent la moelle osseuse et rejoignent la circulation (Figure 8 page 31) ; elles prennent alors le nom de cellule B transitionnelle (1 type chez l'homme mais 2 types chez la souris) avant de démarrer la seconde phase de leur développement qui se passe dans les organes

lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, MALT). Ces organes lymphoïdes contiennent des zones anatomiquement distinctes appelées follicules dans lesquelles s'accumulent les lymphocytes B. Ces follicules peuvent présenter des zones appelées centres germinatifs (GC pour *Germinal Center*) dans lesquels on distingue une zone sombre très dense en cellules B proliférantes et une zone claire moins dense en cellules. Lorsque les GC sont présents, la zone les entourant dans le follicule est appelée zone du manteau. Les cellules B peuvent aussi se retrouver dans une zone qui entoure les follicules et qui s'appelle zone marginale (MZ pour *Marginal Zone*). En fonction de l'endroit où les cellules B se placent, elles prennent différents noms : cellules B folliculaires (ou FO) quand elles sont dans les follicules, centroblastes dans la zone sombre, centrocytes dans la zone claire ou cellules B de la zone marginale (ou MZ).

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules B deviennent matures et sont dites naïves avant d'être mises en contact d'antigènes étrangers. Les cellules B matures naïves interagissent avec différentes cellules et molécules présentes dans les organes lymphoïdes. L'interaction avec ces cellules *via* les molécules qu'elles expriment ou présentent à leur surface ou qu'elles libèrent conditionne la localisation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires et leur activation avec la possibilité de SHM et de CSR. Dans la zone marginale, les lymphocytes B sont au contact de DC, macrophages, PMN qui expriment tous de nombreux PRR ce qui leur permet de capter les DAMP et de les présenter aux lymphocytes B qui les reconnaissent ou non *via* leur BCR (Cerutti 2013). L'interaction DAMP-PRR conduit à l'activation des DC, macrophages, PMN qui produisent des cytokines. Les lymphocytes B s'activent sous l'effet combiné des cytokines, de l'interaction des DAMP avec leurs propres PRR et leur BCR. En s'activant, ils déclenchent ou non une CSR et donnent naissance soit à des lymphocytes B mémoires ou des plasmablastes, étape qui précède le stade de différenciation terminale qui est le stade du plasmocyte. « Plasmocyte » est le terme utilisé pour désigner les cellules de la lignée B qui sécrètent les Ig. Les lymphocytes B mémoire ne sécrètent pas d'Ig mais portent un BCR et ont une durée de vie longue pouvant atteindre plusieurs années. Il a été montré que des cellules B mémoires spécifiques peuvent être détectées dans la circulation et dans la rate chez l'homme près de 50 ans après une vaccination ou une infection (Mamani-Matsuda 2008). Elles possèdent la capacité de proliférer et de se différencier en plasmocytes lors d'une seconde exposition à l'antigène contre lequel elles sont dirigées.

Les cellules B sont des cellules présentatrices de l'antigène qui peuvent capter des molécules qu'elles digèrent sous forme d'éléments de petite taille, en général des peptides d'une vingtaine d'acides aminés, qu'elles exposent à leur surface *via* les CMH de classe II. A proximité des follicules, les cellules B présentant des antigènes sur leur CMH peuvent rencontrer des lymphocytes T<sub>H</sub> (ou Helper) qui reconnaissent l'antigène *via* leur récepteur spécifique appelé TCR (Gatto 2010, Vinuesa 2009). Cette interaction permet celle de CD40L sur le lymphocyte T et de son récepteur CD40 exprimé par le lymphocyte B et conduit à l'activation des deux cellules. Le lymphocyte T

libère des cytokines qui vont renforcer l'effet de l'interaction CD40L-CD40 sur le lymphocyte B. Il est intéressant de noter que le virus d'Epstein-Barr (EBV), qui a un tropisme fort pour les cellules B et les infecte, produit une protéine qui active les cellules B en mimant l'interaction CD40-CD40L. Les deux cellules entrent dans le follicule (Figure 9) où le lymphocyte T prend le nom de  $T_{FH}$  (*Follicular Helper*) et où le lymphocyte B se divise activement en donnant naissance aux centroblastes et au GC. Au cours de leur division, les centroblastes subissent la SHM avant de passer dans la zone claire où ils arrêtent leur prolifération et deviennent des centrocytes. Ceux-ci sont testés pour leur capacité à reconnaître les antigènes étrangers avec une affinité améliorée, mais aussi pour leur absence de reconnaissance des antigènes du soi, qui a pu apparaître suite à la SHM. Ce test passe par une interaction avec les cellules  $T_{FH}$  et avec les DC folliculaires (FDC). L'interaction  $T_{FH}$ -centrocyte passe par les partenaires moléculaires TCR-antigène-CMH (sur la cellule B), CD40L-CD40 et cytokines (libérées par la cellule T) - récepteurs (portées par la cellule B). L'interaction centrocyte - FDC passe par les partenaires moléculaires BCR - antigène - CMH (sur la FDC). Le contrôle qualité qui s'établit ainsi dans la zone claire conduit à l'activation du centrocyte qui peut avoir trois conséquences : l'apoptose de la cellule, le retour dans la zone sombre pour une nouvelle étape de division et de SHM ou la maturation et différenciation en lymphocyte B mémoire ou en plasmablaste puis en plasmocyte. Quelques jours après leur mise en place, les GC disparaissent.



**Figure 9** : Organisation d'un centre germinatif

Les Ig (membranaires ou solubles) issues de cellules passées par le GC sont de forte affinité pour les antigènes alors que ceux produits par les cellules B MZ sont de faible affinité. Tous les

antigènes ne provoquent de réaction du GC ; ceux qui le font sont dit T-dépendants (TD) et les autres T-indépendants (TI).

Les plasmocytes sortent des organes lymphoïdes secondaires. Les plasmocytes peuvent aller se loger dans la moelle osseuse où ils produisent des Ig qui passent dans la circulation ; ils peuvent également se loger dans les muqueuses où ils synthétisent les Ig mucosales dont une grande partie se retrouve dans la lumière des muqueuses. Les plasmocytes représentent le stade terminal de différenciation des cellules B, qui est précédé par un stade intermédiaire appelé plasmablaste.

Les différents stades et types de lymphocytes B décrits ci-dessus ont un phénotype particulier qui peut être mis en évidence par l'étude de l'expression d'un ensemble de marqueurs de membrane généralement réalisée par cytométrie en flux. Par exemple, les B matures naïfs sont caractérisés par la co-expression de l'IgM et de l'IgD. Les marqueurs B220 (et CD20 chez l'homme) et CD19 sont présents sur toutes les cellules de la lignée B à l'exception des plasmocytes. Ceux-ci, au contraire, expriment un marqueur qui leur est propre, CD138 chez la souris et CD38 chez l'homme.

### **II.2.5. Les cellules B atypiques**

Toutes les cellules B décrites plus haut sont définies comme les B2. Chez la souris, il existe également les B1 dont les précurseurs proviennent du foie fœtal. Les cellules B1 matures sont principalement localisées dans la cavité péritonéale et représentent la majorité des cellules B totales de ce compartiment. Elles sont également présentes dans la rate, la cavité pleurale et la moelle osseuse, mais sont à peine détectables dans le sang et les ganglions lymphatiques (Aziz 2015, Montecino-Rodriguez 2006, Roy 2013). Elles se distinguent des cellules B2 par leur phénotype ; comme les B2 elles expriment CD19 et IgM et contrairement au B2 elles ont une faible expression de B220 et expriment CD43. Les B1 existent sous forme de B1a qui expriment CD5 et B1b qui ne l'expriment pas.

La différence de leur origine a été mise en évidence par des expériences de greffe de moelle osseuse sur souris irradiées qui ont montré la non reconstitution de la population des cellules B1 chez ces souris (Montecino-Rodriguez 2006). Un progéniteur a été identifié dans le foie fœtal et son transfert dans des souris receveuses immunodéficientes a permis de reconstituer efficacement les populations cellulaires B1a et B1b (Montecino-Rodriguez 2006). Les progéniteurs de cellules B1 apparaissent d'abord dans le foie fœtal vers le 11<sup>ème</sup> jour de la gestation (d'une durée d'environ 21 jours) ; à ce moment-là aucune cellule progénitrice de B2 n'est observée dans le foie fœtal ni au 15<sup>ème</sup> jour dans la moelle osseuse. Récemment, il a été montré que des cellules B1a peuvent être générées également par la moelle osseuse chez l'adulte. Contrairement aux cellules B2 dont le renouvellement se fait à partir de précurseurs dans la moelle osseuse, les cellules B1 sont dotées de capacité d'auto-renouvellement à partir de cellules B1 matures.

Les cellules B1a sont considérées comme des cellules du système immunitaire inné car elles sécrètent des Ig spontanément et non pas suite à une stimulation antigénique appelée immunisation ; ces Ig sont connus sous le terme « d'anticorps naturels » (Gronwall 2012). Les anticorps naturels forment un bouclier contre les agents infectieux en assurant une protection pendant la période de temps requise pour la formation du centre germinatif et la production d'anticorps parfaitement adaptés. Il a été estimé que 80 à 90% des IgM sériques au repos et 50% des IgA sériques sont dérivés des cellules B1a. Les cellules B1b contribueraient par contre à l'immunité adaptative et serait, avec les cellules B MZ, la source principale d'IgM dirigées contre les polysaccharides et d'autres antigènes TI dans le cadre des réponses immunes adaptatives. Elles peuvent sécréter aussi des IgA.

L'existence des cellules B1 chez l'homme reste débattue. Certaines cellules B produisant des auto-anticorps chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde et exprimant le marqueur CD5 à leur surface ont été considérées comme les homologues des cellules B1 murines (Youinou 2011). Cependant, CD5 a aussi été identifié dans d'autres populations de lymphocytes B comme les cellules B transitionnelles (Freedman 1989, Lee 2009, Sims 2005), ce qui soulève la question de l'utilisation du CD5 chez l'homme pour repérer les éventuelles B1 humaines. Différentes données suggèrent que les cellules B MZ chez l'homme sont fonctionnellement l'équivalent des cellules B1a murines (Roshstein 2015).

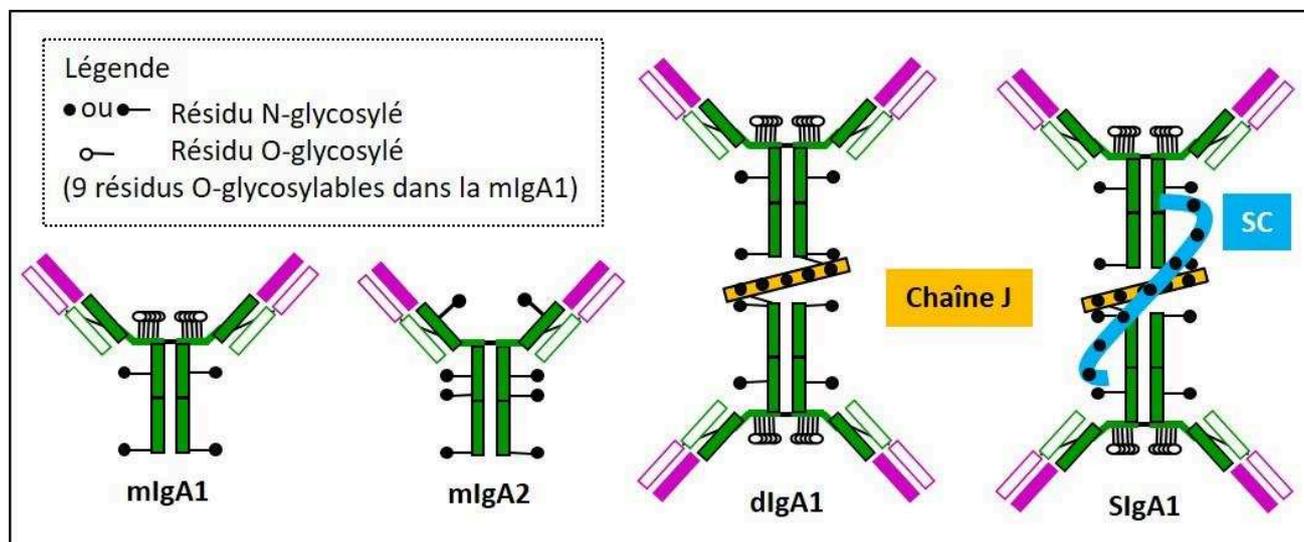
Les cellules B régulatrices ( $B_{REG}$ ) forment une population de cellules B hétérogènes difficilement identifiables par un panel de molécules de surface mais elles sont caractérisées par leur capacité à inhiber le système immunitaire à travers la production de cytokines comme l'IL-10 ou l'expression de molécules de surface comme *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1), appelé aussi CD274, et indépendamment de la production d'Ig. Leur origine fait l'objet de débats ; plusieurs signaux dépendants et indépendants des cellules T pourraient conduire à leur apparition à partir de cellules B1 ou B2. Leur rôle immunosuppresseur a été mis en évidence dans des modèles murins de maladies autoimmunes, d'infections et de cancers (Gorosito Serran 2015).

### **II.3. L'immunoglobuline A**

Elle a été découverte dans le sérum au début des années 1950 (Grabar 1953) puis a été isolée et caractérisée en 1959. A cette période, plusieurs travaux, réalisés notamment chez l'homme, ont permis de montrer qu'elle représente la classe d'Ig prépondérante dans les muqueuses et dans les fluides biologiques (Chodiker 1963, Gugler 1959, Hanson 1959). Elle est la deuxième classe d'Ig la plus abondante dans la circulation après les IgG et les IgM et la classe d'Ig la plus produite dans l'organisme chez l'homme. Sa production dans l'organisme humain est en effet estimée à 66mg/kg

de poids du corps par jour contre 34 mg/kg pour les IgG et 7,9 mg/kg pour les IgM. L'IgA représente également la classe d'Ig la plus hétérogène chez l'homme en raison de ses différentes formes moléculaires.

### II.3.1. Structure



**Figure 10** : Les différentes structures des Immunoglobulines A

Chez la souris, il n'existe qu'un type d'IgA alors que chez l'homme il existe deux sous-classes, IgA1 et IgA2. Sur le plan de sa structure de base, l'IgA de la souris ressemble plutôt à l'IgA2 humaine. La principale différence structurale entre l'IgA1 et l'IgA2 humaines est la présence ou l'absence d'une séquence de 18 acides aminés au niveau de la région charnière (Berthoux 2015). Cette séquence est présente dans les molécules d'IgA1 (Figure 10) auxquelles elle confère une plus grande flexibilité, mais absente dans IgA2. Elle est constituée uniquement de résidus proline, serine et de thréonine. Son absence dans les molécules d'IgA2 les rend plus résistantes à l'action de certaines protéases bactériennes clivant les liaisons spécifiques proline-sérine ou proline-thréonine (Papista 2011, Woof 2011). A noter que les bactéries produisant ces protéases colonisent fréquemment la surface des muqueuses et sont responsables de la plupart des infections du tractus génital et de la cavité orale. L'IgA2 existe sous la forme de deux variants allotypiques nommés IgA2m(1) et IgA2m(2). Ces variants diffèrent essentiellement par le mode d'association des chaînes lourdes et légères. Dans l'IgA2m(2), l'interaction entre les chaînes lourdes et légères est stabilisée par des associations non covalentes et non pas par les classiques ponts disulfure comme c'est le cas pour l'IgA2m(1), l'IgA1 et les autres classes d'Ig (Woof 2006). Une troisième forme de l'IgA2, l'IgA2(n), représentant probablement un troisième allotype, a été décrite en 1994 (Chintalacharuvu 1994). L'IgA1 et l'IgA2 portent des N-glycosylations au niveau de la chaîne lourde, mais seule l'IgA1 est O-glycosylée dans sa région charnière. L'IgA de souris est N-glycosylée ; elle a été considérée pendant longtemps comme non glycosylée au niveau de sa courte région charnière mais

récemment il a été montré qu'il existe plusieurs allotypes dont certains présentent quelques résidus glycosylables dans la région charnière. Les glycosylations représentent 6-10% de la masse moléculaire des IgA (Papista 2011).

La O-glycosylation est un évènement qui touche majoritairement les protéines intracellulaires où les motifs O-glycosylés peuvent servir de signalisation. Seulement quelques rares protéines libérées dans le milieu extracellulaire sont O-glycosylées ; parmi les Ig, seules les IgA1 et IgD sont O-glycosylées et dans la circulation, en plus de l'IgA1, on trouve certains facteurs de coagulation et une protéine du système du complément. La O-glycosylation consiste à ajouter un sucre sur l'oxygène des résidus sérine, thréonine, tyrosine, ou hydrolysine alors que la N-glycosylation permet l'ajout d'un sucre sur l'azote de l'asparagine (Arnold 2007, Freeze 2006, Spiro 2002). Dans l'IgA1, la O-glycosylation se fait au niveau de la région charnière qui présente une succession de dix-huit acides aminés qui sont des prolines, des sérines et des thréonines. Les neuf sérines et thréonine de la région charnière des IgA1 sont en théorie O-glycosylables mais seules trois à six le sont réellement avec des chaînes de sucre constituées maximum de trois sucres : GalNAc, Gal et acide sialique. Le premier sucre à être fixé sur les sérines ou les thréonines est le GalNAc grâce à l'action d'une transférase spécifique, puis un Gal est fixé au GalNAc sous l'effet de la Beta3 Galactose-Transférase 8 (Beta3Gal-T8, appelée aussi C1GALT1) aidée par la chaperone C1GALT1C1 (Ju 2002, Ju 2008). Enfin, un acide sialique peut être ajouté sur le GalNAc ou sur le Gal ou sur les deux.

Les IgA existent sous différentes formes (Figure 10 page 37) : monomériques (m) ou polymériques (p). Les polymères sont essentiellement des dimères d'IgA (dIgA) associés à la chaîne J (pour *Joining*). Les pIgA peuvent ou non former un complexe avec une protéine appelée pièce sécrétoire ou *Secretory Component* (SC) et dans ce cas l'IgA prend le nom d'IgA sécrétoire ou SIgA. Comme les autres classes d'Ig, la mIgA est un hétérotétramère composé de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les chaînes lourdes ont trois CH et dans la forme soluble de l'Ig et possèdent en C-terminal une séquence de dix-huit acides aminés appelée *tailpiece*. La mIgA a une taille d'environ 160 kDa et une forme de T plus que de Y.

La chaîne J a été découverte par MS HALPERN et ME KOSHLAND dans l'IgA isolée à partir du colostrum humain et de lapin en 1970 (Halpern 1970). Elle a été détectée ultérieurement chez la souris, le bovin, la poule, le xénope et même chez les invertébrés (Johansen 2000). Ces derniers ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif et n'ont pas d'Ig mais possèdent un système inné en particulier au niveau des muqueuses. Chez les mammifères, la chaîne J est un polypeptidique de 15 kDa contenant huit cystéines parfaitement conservées dont six sont impliqués dans la formation de ponts disulfure intracaténaires et 2 dans celle de ponts disulfure avec la *tailpiece* les chaînes lourdes des IgA et des IgM (Max 1985). La chaîne J ne s'associe pas aux

autres classes d'Ig qui ne possèdent pas de *tailpiece*. Certaines études anciennes avaient suggéré que la dIgA contient deux chaînes J ; cependant il est actuellement admis que la dIgA n'a qu'une molécule de chaîne J. L'expression de la chaîne J a été détectée également dans les plasmocytes à IgD, IgG ou IgE mais sa fonction dans ces cellules n'est pas connue ; dans ces cellules, la chaîne J serait principalement dégradée dans le compartiment intracellulaire (Brandzaeg 1999). La chaîne J régule la fonction et la formation des dIgA, sans pour autant être indispensable à leur structure. Des plgA, incluant des dIgA, dépourvues de chaîne J ont été détectées dans des cas de myélome chez des patients. Par ailleurs, dans un modèle murin KO pour la chaîne J, quelques dIgA sont retrouvés dans le plasma et le ratio mIgA / dIgA est fortement augmenté (Hendrickson 1995). Ces souris présentent aussi une diminution d'un facteur quatre des taux d'IgM circulantes et des plgM de taille variable qui est probablement la conséquence d'une dérégulation du processus de polymérisation en absence de la chaîne J (Erlandson 1998).

Le SC est une glycoprotéine de 80 KDa qui est la partie extracellulaire du récepteur aux plg (plgR). Ce récepteur est exprimé par les cellules épithéliales dans les muqueuses ; initialement son expression est au niveau basolatéral où il reconnaît les plgA associés ou non à des antigènes. Le complexe plgA - plgR est endocyté et transporté au travers de la cellule épithéliale jusqu'au pôle apical par un mécanisme appelé transcytose. Un clivage protéolytique de plgR prend place au pôle apical ce qui libère, dans la lumière de la muqueuse, SC qui reste associé à plgA donnant une SIgA. SC protège l'IgA contre la dégradation par les protéases dans les sécrétions. La chaîne J augmente l'affinité de plgA pour plgR et SC. L'interaction de plgR avec plgA se fait par des interactions covalentes avec l'extrémité C-terminale de la chaîne J et les domaines C<sub>H2</sub> de l'IgA, mais aussi par des liaisons non covalentes avec les domaines C<sub>H3</sub> de l'IgA (Kaetzel, 2005).

Les IgA1 et les IgA2 sont produites par les plasmocytes situés dans la moelle osseuse comme ceux dans les muqueuses. Le ratio IgA1 : IgA2 est globalement de 3 : 2 dans les muqueuses mais cette proportion varie d'une muqueuse à l'autre ; l'IgA1 est prédominante dans le plasma avec un ratio IgA1 : IgA2 de 10 : 1 (Papista 2011, Woof 2006). L'IgA murin est également produit par les cellules B1. La mIgA est prédominante dans le plasma alors que la plgA est majoritaire dans les muqueuses. La SIgA est spécifique des liquides biologiques sécrétés dans la lumière des muqueuses.

### **II.3.2. Activation de récepteurs et du complément**

Comme les autres Ig, l'IgA est une molécule bifonctionnelle capable de fixer spécifiquement un antigène grâce à ses régions V et d'activer différentes molécules (récepteurs et complément) par sa région C.

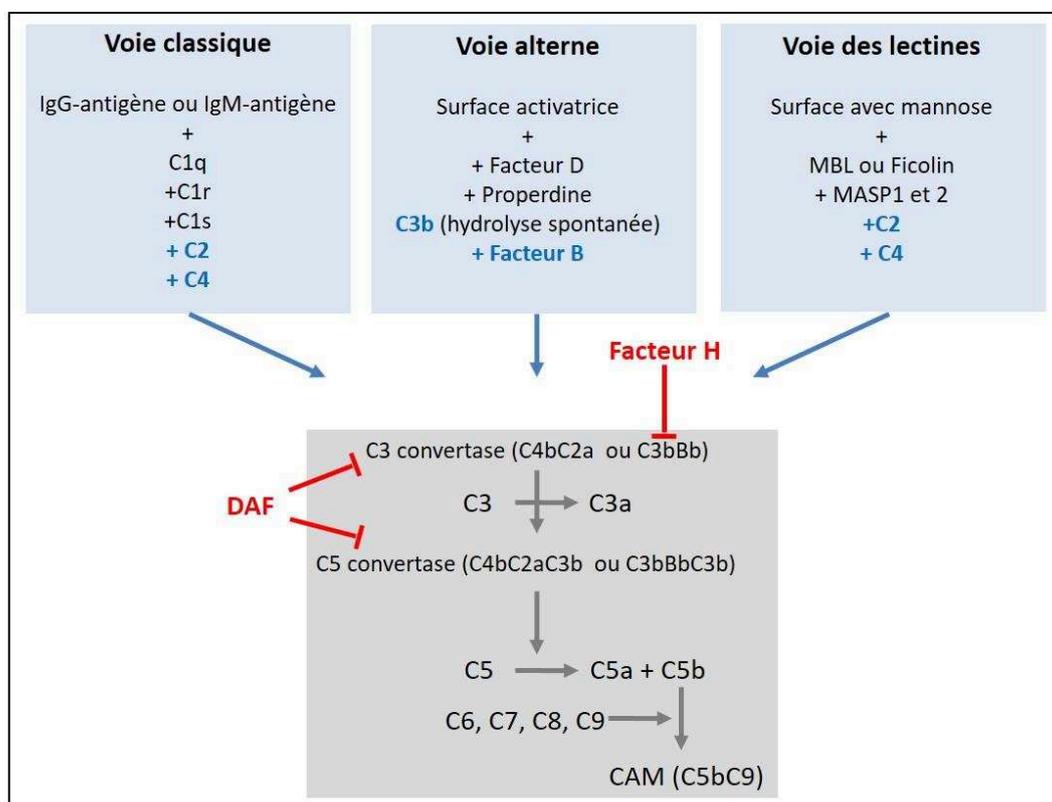
Actuellement, sept types de récepteur de la région C (appelée Fc) des IgA sont connus (Mkaddem 2014, Papista 2011) :

- plgR présenté plus haut,
- le récepteur Dectin-1 et son corécepteur Siglec-5, exprimé par les cellules M et permettant la rétro-transcytose des IgA (Rochereau 2013),
- le récepteur Fc $\alpha$ RI, appelé aussi CD89,
- le récepteur à la transferrine (TfR), connu aussi comme CD71, et exprimé de façon ubiquitaire à l'exception des érythrocytes, reconnaît les plgA (Moura 2001),
- le récepteur Fc $\alpha$ / $\mu$ R, correspondant à CD351, présent essentiellement sur quelques cellules du système immunitaire dont certains lymphocytes B, reconnaît avec une forte affinité les IgM et moins fortement les IgA,
- le récepteur Fc Receptor Like (FcRL)4, présent à la surface des cellules B mémoire dans les muqueuses, lie les IgA et inhibe l'activation du BCR,
- le récepteur *DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin* (DC-SIGN), connu comme CD209, présent à la surface de macrophages et de DC lie les SIgA,
- et le récepteur des ASialoGlycoProtéines (ASGPR) qui est exprimé par le foie et intervient dans la clairance hépatique de différentes molécules circulantes dont les IgA.

CD89 est une glycoprotéine transmembranaire identifiée pour la première fois comme récepteur de la région C de l'IgA humaine en 1996 (Morton, 1996). Elle est composée d'une partie extracellulaire, d'une région transmembranaire et d'une région intra-cytoplasmique de petite taille. Cette dernière ne possède pas de motifs de signalisation mais est associée à un polypeptide homodimérique de transduction du signal appelé chaîne FcR $\gamma$  qui porte un ITAM (Woof 2006). CD89 reconnaît l'IgA dans la région comprise entre C<sub>H2</sub> et C<sub>H3</sub>. Il a été montré que CD89 fixe la mIgA avec une faible avidité et est inhibé par cette fixation alors qu'il fixe avec une forte avidité et est activé par la plgA (Papista 2011, Wines 2006). Cette dualité fonctionnelle du récepteur CD89 serait dépendante du niveau de phosphorylation de la chaîne FcR $\gamma$  associée. CD89 existe chez l'homme, les primates, les chevaux, les bovins et le rat, mais pas chez la souris (Maruoka 2004, Morton 2005). Il est exprimé de manière constitutive à la surface des cellules de la lignée myéloïde incluant les monocytes, les macrophages, les PMN neutrophiles et les PMN éosinophiles. Lorsqu'il est activé sur ces cellules, il peut induire la phagocytose, la dégranulation et la production de dérivés actifs de l'oxygène ou de diverses cytokines (Wines, 2006). CD89 est aussi exprimé par certaines DC où il permet à la capture de complexes associant l'IgA et son antigène en vue de la digestion de l'antigène et sa présentation aux lymphocytes T pour leur éducation. CD89 existe sous forme soluble et résulte du clivage de la forme membranaire.

Le système du complément est constitué par un ensemble de protéines synthétisées majoritairement par le foie et qui existent dans le plasma sous la forme soluble et de récepteurs membranaires exprimés à la surface de nombreux types cellulaires (Maillard 2015). Ce système peut directement détruire des agents pathogènes mais également en les recouvrant c'est-à-dire en

les opsonisant, peut faciliter leur reconnaissance puis leur destruction par des cellules immunitaires, le recrutement et l'activation des cellules immunitaires et l'élimination des complexes immuns circulants. Les protéines solubles du complément sont constitutivement présentes mais inactives dans la circulation où elles représentent environ 5% des protéines plasmatiques. L'activation des protéines du complément peut se faire par trois voies majeures qui sont dans l'ordre de découverte: la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Figure 11) (Maillard 2015). La voie classique est activée par des complexes immuns associant Ig et antigène qui reconnaissent le composé soluble C1q qui clive les composés C2 et C4 permettant la formation de la C3 convertase C4b-C2a. La voie alterne est activée directement par interaction de certains micro-organismes avec le composé soluble C3b (produit par hydrolyse spontanée du C3) et les cofacteurs properdine, facteur B et facteur D ; il en résulte le clivage du facteur B et la formation d'une C3 convertase sous la forme C3b-Bb. La voie des lectines est activée par interaction de certains sucres comme les résidus mannose présents à la surface de bactéries par la protéine soluble *Mannan Binding Lectin* (MBL) ce qui, comme la voie classique, conduit au clivage des composés C2 et C4 et la formation de la C3 convertase C4b-C2a. La C3 convertase sous la forme C4b-C2a ou C3b-Bb, clive elle-même le composé C3 et il s'en suit une cascade d'activation moléculaire commune aux trois voies qui aboutit à la production de protéines solubles régulatrices de la réponse immunitaire comme C5a via l'activation de récepteurs membranaires et à la formation d'un complexe dit d'attaque membranaire (ou *Membrane Attack Complex* - MAC). Le MAC se loge dans la bicouche lipidique de l'enveloppe bactérienne ou dans la membrane plasmique de cellules eucaryotes et se conduit en canal ; la perturbation de l'équilibre osmotique provoque la cytolyse (Cybulsky 2000, Qiu 2014).

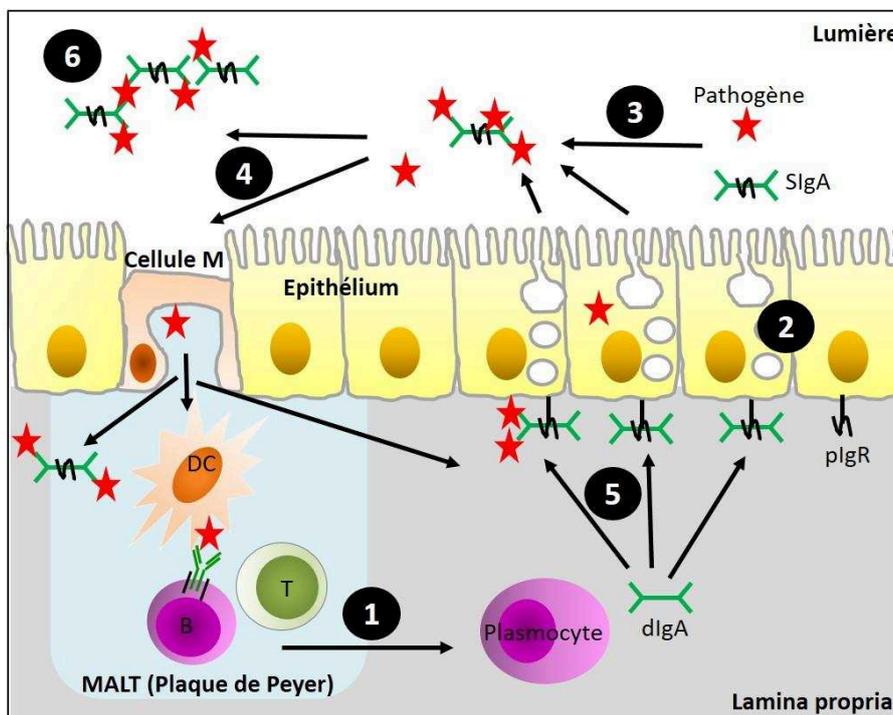


**Figure 11 :** Le système du complément

Contrairement aux IgG, les IgA sont incapables d'activer le complément par la voie classique. Il a cependant été montré que les pIgA pouvaient activer la voie alterne et la voie des lectines (Hiemstra 1987, Pascal 2012, Roos 2001).

### II.3.3. Fonctions de l'immunoglobuline A

Dans les muqueuses, l'IgA participe à la défense de l'organisme contre les agents infectieux en contribuant au mécanisme défini comme l'exclusion immunitaire. L'exclusion immunitaire empêche la colonisation et l'invasion par les microorganismes pathogènes. Ce phénomène est essentiellement dû aux SIgA dans la lumière des muqueuses. Les SIgA possèdent différents sites de liaisons permettant de bloquer les déterminants d'adhérence des microorganismes aux cellules épithéliales et de les agglutiner, facilitant ainsi leur élimination dans le mucus qui est évacué par le péristaltisme digestif ou les battements ciliaires dans les voies aériennes (Hajishengallis 1992, Reinholdt 1987, Williams 1972). Les glycanes du SC et des IgA, plus que la reconnaissance antigénique par les régions V, sont les principaux éléments permettant l'exclusion immunitaire (Edebo 1995, Phalipon 2002). Ce mécanisme conduit aussi à l'élimination de toxines produites par les microorganismes dans la lumière des muqueuses ou d'allergènes alimentaires, c'est-à-dire d'antigènes provenant du bol alimentaire et pouvant être à l'origine d'allergie.



**Figure 12** : Régulation de l'Immunoglobuline A dans la muqueuse digestive. 1-Différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et migration dans la lamina propria. 2- Passage des dIgA par transcytose dans la lumière de la muqueuse. 3- Neutralisation d'antigènes dans la lumière. 4- Passage des antigènes ou des SIgA-antigènes via les cellules M dans la sous-muqueuse. 5- Neutralisation d'antigènes dans la sous-muqueuse puis transcytose, ou neutralisation en intracellulaire lors de la transcytose. 6- Élimination des complexes SIgA-antigènes dans les fécès.

En plus du rôle dans l'exclusion immunitaire, il a aussi été décrit que les pIgA au cours de leur transcytose peuvent neutraliser, à l'intérieur des cellules épithéliales, des virus et des éléments bactériens pro-inflammatoires comme le LPS (Fernandez 2003, Mazanec 1992, Mazanec 1993). De plus, la transcytose d'IgA associée à un antigène peut contribuer à l'élimination de molécules inflammatoires ou toxiques qui ont atteint la sous-muqueuse (Kaetzel 2005). Dans les tissus, les complexes immuns contenant des pIgA et des antigènes sont chimi-attractants pour les PMN (van der Steen 2009) et peuvent activer les cellules immunitaires qui expriment CD89 et conduire ainsi à la destruction de microorganismes ou de cellules tumorales (Aleyd 2014, Pascal 2012). Via leur rétrotransport par les cellules M de la lumière des muqueuses à la sous-muqueuse, les SIgA associées à un antigène peuvent contribuer à éduquer et à réactiver le système immunitaire adaptatif (Mantis 2002, Weltzin 1989).

Les IgA contribuent à la mise en place et à l'homéostasie du microbiote : en effet, chez la souris, plusieurs études ont montré que la déficience en IgA ou en SIgA due à un déficit d'expression de pIgR conduit à une modification de la qualité du microbiote (Kaetzel 2014). Il est également démontré que l'allaitement et en particulier les IgA contenus dans le lait maternel contribuent à la mise en place du microbiote (Levi Mortera 2016, Rogier 2014). L'effet de l'allaitement est durable et a un impact sur le microbiote chez les souris adultes (Rogier 2014).

Les IgA peuvent également avoir un effet immunomodulateur. Ainsi, les IgA circulantes qui sont majoritairement monomériques sont considérées comme des éléments anti-inflammatoires plus que comme des molécules de défense contre les pathogènes. Cet effet régulateur de la réponse inflammatoire est certainement à attribuer à l'effet inhibiteur des mIgA sur CD89 porté notamment par les PMN neutrophiles qui sont, chez l'homme, la population de globules blancs la plus importante en quantité dans le sang. Cette population nécessite d'être constitutivement inhibée pour éviter l'activation des PMN et la production et la libération dans la circulation de produits hautement toxiques. L'effet immunomodulateur de l'IgA peut aussi résulter au niveau mucosal de l'interaction de l'IgA avec le récepteur inhibiteur du BCR, le FcRL4, à la surface des cellules B mémoire, et de la reconnaissance de SIgA amenées par les cellules M au contact des DC portant DC-SIGN. Les DC activées par ce biais induisent une expansion de lymphocytes T<sub>REG</sub> pouvant favoriser l'immunosuppression (Mkaddem 2014).

Récemment un rôle inattendu des pIgA a été démontré sur l'érythropoïèse (Coulon 2011). Cet effet résulte d'une interaction des pIgA sur CD71 à la surface des érythroblastes qui conduit à une plus grande sensibilité de ces cellules à l'érythropoïétine (EPO) et à leur prolifération.

### II.3.4. Maladies liées à l'immunoglobuline A

L'IgA est incriminée dans quelques pathologies :

- le déficit sélectif en IgA qui est le déficit immunitaire primitif le plus fréquent en Europe et en Amérique du Nord avec une prévalence de 1/600. Elle est généralement asymptomatique mais peut, chez certains sujets, conduire à des infections récidivantes des voies aériennes, intestinales, uro-génitales et à des allergies.
- le myélome multiple à IgA qui résulte de l'accumulation principalement dans la moelle osseuse de plasmocytes tumoraux monoclonaux qui produisent une IgA. L'incidence du myélome multiple (à IgA ou à IgG) est de 5 nouveaux cas / 100 000 habitants et par an et touche l'adulte âgé.
- la dermatose bulleuse à IgA (ou dermatose à IgA linéaire) est une maladie auto-immune sous-épidermique rare (1 cas/10<sup>6</sup> personnes) causée par des auto-anticorps IgA produits contre un antigène de la membrane basale dermo-épidermique. Elle se manifeste essentiellement chez les enfants. Cliniquement, elle est caractérisée par des vésicules ou bulles tendues, qui, à l'examen histopathologique, démontrent des ampoules sous-épidermiques avec un infiltrat de neutrophiles,
- le purpura rhumatoïde (ou purpura d'Henoch-Schönlein ou vascularite à IgA) est une vascularite systémique affectant les petits vaisseaux où des complexes immuns à IgA se déposent. Des neutrophiles sont retrouvés dans les lésions cutanées. L'origine de la maladie est inconnue. Elle est caractérisée cliniquement par un purpura, c'est-à-dire des tâches rouges liées à un épanchement de sang dans la peau, associé à une arthralgie et à des douleurs abdominales et/ou à une atteinte rénale. Elle est diagnostiquée chez 1 enfant/5500 et est plus rare chez les adultes (1 cas/10<sup>6</sup>).
- la N-IgA est une cause majeure de maladie rénale. Elle fera l'objet du chapitre suivant.

### II.3.5. Régulation de la production de l'immunoglobuline A dans la muqueuse intestinale

Dans la muqueuse intestinale, la CSR et la production des IgA est initiée dans les MALT au niveau des PP (Plaques de Peyer) et des ILF (*Isolated Lymphoid Follicle*) selon des mécanismes dépendants ou indépendants des cellules T (Sutherland 2012) (Figure 12 page 42). Les plasmocytes sortent des MALT et se logent dans la *lamina propria* où ils produisent des IgA de très hautes affinités provenant de cellules ayant subi la SHM ou peu affins appelés anticorps naturels. Différentes études se sont intéressées au rôle des cellules B1 dans la production des IgA de la muqueuse digestive et ont suggéré qu'elles y participent (Meyer-Bahlburg 2015).

Des études dans différents modèles murins ont montré que de nombreuses cellules et facteurs sont impliqués dans la production des IgA à commencer par le microbiote intestinal (Lycke 2017). Ainsi, les souris élevées en condition dite *germ-free* ont une déficience dans la production d'IgA par rapport aux souris présentant une flore intestinale normale ; les taux d'IgA augmentent suite à l'introduction d'un microbiote. La colonisation de la muqueuse digestive par une unique souche

bactérienne conduit aussi à l'augmentation de la production des IgA et le taux d'IgA varie avec la souche introduite. L'absence quasi-complète des cellules sécrétrices d'IgA chez les nouveaux-nés avant la colonisation de leur intestin par la flore commensale montre également que le microbiote influence la production de l'IgA (Benveniste 1971). Les cellules épithéliales qui transportent les antigènes depuis la lumière du tube digestif, particulièrement les cellules M, et les DC sont essentielles à la mise en place de la réponse IgA dans la muqueuse digestive (Lycke 2017). La déficience en facteurs nécessaires à la différenciation des cellules M se traduit par un déficit de production d'IgA mucosale.

Outre le transport des antigènes, les cellules épithéliales, dont les PRR sont activés par des DAMP, produisent des cytokines et des facteurs qui peuvent influencer la production des IgA. Ainsi, l'expression d'un TLR4 constitutivement activé au niveau des cellules épithéliales de l'intestin se traduit par une augmentation de la production par l'épithélium de facteurs favorisant la production d'IgA, par un recrutement des cellules B et une augmentation des niveaux d'IgA dans les fécès (Shang 2008). Ces facteurs peuvent provenir aussi des cellules immunitaires qui se trouvent à proximité ou dans les MALT comme les TH, les TFH, les DC, les FDC mais aussi les PMN et les macrophages.

Parmi les facteurs incriminés dans la production des IgA, certains agissent directement sur la CSR et d'autres sur la survie des cellules B ou des plasmocytes ou sur les deux phénomènes. Le facteur majeur pour la mise en place de la CSR est le *Transforming Growth Factor* (TGF) $\beta$  qui active directement le lymphocyte B, ce qui conduit à la CSR vers la classe IgA (Lycke 2017). Chez la souris, l'absence de récepteurs de TGF- $\beta$  sur les cellules B entraîne une diminution drastique de la CSR vers la classe IgA, la présence seulement de quelques plasmocytes positifs pour les IgA dans la *lamina propria* de l'intestin et l'incapacité de répondre à des immunisations orales (Cazac 2000). De nombreux signaux dont les plus connus sont l'activation de CD40, l'acide rétinoïque qui dérive de la vitamine A, le *Nitric Oxide* (NO) et l'IL-21 agissent en synergie avec le TGF- $\beta$  sur le lymphocyte B pour favoriser la CSR ; leur action se fait à différents niveaux comme par exemple l'IL-21 qui augmente la synthèse de l'enzyme AID (Lycke 2017). L'IL-21 est produit majoritairement par les cellules T<sub>H17</sub> qui libèrent aussi la cytokine IL-17. La déficience en IL-17 limite fortement la production d'IgA dans la muqueuse digestive mais cette cytokine n'agit pas sur la CSR. Les cytokines *TNF Super Family member* (TNSF)13 / APRIL et TNFSF13B / BAFF qui se fixent au même récepteur *TNF Receptor SF* (TNFRSF)13 / TACI présent sur les lymphocytes B active directement la CSR vers la classe IgA tout en favorisant la survie des cellules B ; APRIL et BAFF sont aussi des facteurs importants de survie des plasmocytes (Lycke 2017).