UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE

FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE

INTERACTION INITIALE DES LYMPHOCYTES T AVEC DES SURFACES CONTROLEES APPLICATION A L'ETUDE DU DECLIN IMMUNITAIRE CHEZ LE SUJET AGE

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 12 novembre 2010

Par Madame Elodie Crétel Durand

née le 28 juillet 1967 à Paris

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ de la MÉDITERRANÉE

SPÉCIALITÉ : IMMUNOLOGIE

Membres du Jury de la Thèse :

Professeur Athanase Benetos	
Professeur Pierre Bongrand	Co-directeur
Docteur Jean Davoust	Rapporteur
Professeur Pierre Galanaud	Rapporteur
Professeur Bruno Lesourd	
Professeur Philippe Naquet	Président
Docteur Anne Pierres	Co-directeur

On s’étonne trop souvent de ce qu’on voit rarement, et pas assez souvent de ce qu’on voit tous les jours.

Au Dr Anne Pierres,

Que je tiens à remercier en premier lieu pour sa patience et son soutien, en tant que directrice de thèse pendant toutes ces années.

Elle m'a appris la démarche logique, progressive de la recherche, dans un esprit d'ingéniosité permanent. Elle m'a également réappris….la règle de 3…..

Elle a su me soutenir dans les moments de doute grâce à ses paroles optimistes et aux dégustations de chocolat… dont elle raffole aussi!

Au Professeur Pierre Bongrand,

Je tiens à vous remercier d'avoir été le promoteur de ce travail de recherche. Vous êtes celui qui nous donne la solution quand tout parait bloqué, par votre grande intelligence et vos connaissances infinies.

Vous formez un binôme hors pair avec Anne et je tiens à vous en remercier.

Vous avez su me faire confiance malgré mes ignorances et je vous en remercie aussi.

A Monsieur le Professeur Pierre Galanaud,

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur dans ce jury de thèse.
Je vous en remercie vivement.

A Monsieur le Dr Jean Davoust,

Je souhaite vous adresser mes sincères remerciements pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse.

A Monsieur le Professeur Bruno Lesourd,

C’est un honneur pour moi d’avoir un des pionniers de l’immunosénescence dans mon jury de thèse.
Soyez remercié de votre présence et de la lecture de ce travail.

A Monsieur le Professeur Benetos,

C’est un honneur pour moi de vous avoir dans mon jury de thèse. Je tiens à vous remercier de l’accueil que vous m’avez fait lors de ma visite à Nancy dans votre service en février dernier. J’ai été impressionnée par votre simplicité et votre charisme. Merci de m’avoir fait découvrir votre approche de la gériatrie, axée sur une prise en charge optimale des patients associée au développement de la recherche.

A Monsieur le Professeur Philippe Naquet,

Vous me faites l'honneur d'être président de ce jury de thèse. Je vous en remercie sincèrement.

Ce travail de thèse et cette thèse n'auraient jamais existé sans le soutien constant et bienveillant du Professeur Marc Heim durant toutes ces années.

Je vous remercie de tout mon cœur.

Vous m'avez permis de passer plusieurs années de sérénité à vos côtés.

Je tiens aussi à remercier vivement le Professeur Patrick Villani qui m'a soutenu également durant ce travail, et me permet l'opportunité de poursuivre ce travail de recherche. Son investissement dans la gériatrie m'a encouragée et je le remercie pour son dynamisme et son soutien au cours de ces dernières années. J'espère poursuivre une collaboration fructueuse à ses côtés.

Je tiens également à remercier le Professeur Sylvie Bonin-Guillaume pour ses conseils judicieux durant ce travail. Elle m'a permis de rencontrer le Docteur Gaetan Gavazzi avec qui un des articles a été écrit. Je la remercie de son « militantisme » permanent pour les personnes âgées.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Gaétan Gavazzi qui m'a permis une collaboration fructueuse durant ce travail ainsi que la possibilité de participer à un congrès sur l'immunosénescence.

Un grand merci à toute l'équipe de l'unité INSERM U600 pour son soutien de tous les instants surtout durant mon année de mobilité, en particulier merci à Marie-Pierre et Théo, Thomas, Pascal, Anne-Marie, Zohar, Pierre-Henri, Jules, Philippe, Valentina, Annie, Christine, Alexia et Laurent….

Merci à Pierre-Henri et Laurent pour leur patience dans les nombreux dépannages informatiques qu'ils m'ont fournis...

Merci à toutes mes amies et amis pour tous les moments que nous avons passés ensemble et tout ceux que nous avons ratés à cause de ce travail……Je compte bien en profiter maintenant, je vous préviens !!!!
A nous les pique-niques sur la plage, les soirées barbecue et les soirées ciné entre filles !!

Merci à toi Olivia pour ton soutien durant toutes ces années et ces bons moments passés ensemble.

Merci à toi Maman de m'avoir encouragée dans cette voie où je ne me serais peut-être pas engagée sans ta présence.
Tu as su me réconforter dans les moments difficiles et supporter ma mauvaise humeur dans les moments de stress (et même en dehors…).

Merci à ma sœurette Cannelle d'avoir été à mes côtés pendant 2 ans, dans les bons et les moins bons moments. Les enfants ont une tata en or.

Merci à Lucas, « mon petit frère », pour tes conseils avisés « d'ancien thésard », merci d'être un oncle de compétition pour tes neveux.

Merci à Papa et Rosine qui malgré votre éloignement et vos soucis avez su me soutenir.

Merci à mes 2 garçons, Hugo et Kenzo. Je n'ai pas été très présente ces derniers mois. Promis je vais me rattraper !! Puisse mon dévouement à ce travail vous inculquer l'envie d'aller jusqu'au bout de vos rêves, même les plus fous !!

Enfin, heureusement que tu as été là, Jean-Marc, toujours présent, à mes côtés.
Merci pour ta cuisine, digne d'un grand chef, pour ta patience…pour m'avoir supportée ou non supportée… (Je sais, je suis une…), et merci pour tout le reste.

A- INTRODUCTION 6

I – ACTIVATION CELLULAIRE T 8

1- STRUCTURE DU RECEPTEUR T 8
2- SELECTION DES LYMPHOCYTES T 10
3- REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE 11
4- LES MOLECULES CO-RECEPTRICES CD4 ET CD8 12
5- LA TRANSDUCTION DU SIGNAL 12
5-1. L'engagement du TCR et l'origine du signal 13
5-2. Initiation du signal 23
5-3. Mise en place du signalosome 26
5-4. Propagation du signal 30
5-5 La théorie des microsclusters et la synapse immunologique 42

II - IMMUNITE DU SUJET AGE OU IMMUNOSENESCENCE 46

1- ANOMALIES BIOLOGIQUES LIEES A L'IMMUNOSENESCENCE 48
1-1. Atteintes des barrières cutanéo-muqueuses 48
1-2. L'activité des cellules souches hématopoïétiques 48
1-3. Cellules de l'immunité innée 48
1-4. Cellules de l'immunité spécifique 50
1-5. Cytokines et vieillissement 57
2- ASPECTS CLINIQUES DE L'IMMUNOSENESCENCE 58
2-1. Immunosénescence et infection 58
2-2. Immunosénéscence et immunopathologie ou impact des maladies chroniques du sujet âgé sur l'immunité 59
2-3. Vieillissement et vaccinations 61
2-4. Immunosénescence et transplantation rénale 63
2-5. Conclusion sur l'immunosénescence 64

B- RESULTATS 66

I- LES TESTS CLASSIQUES DE MESURE DE L'IMMUNITE CELLULAIRE 66

1- MESURE DE LA LIBERATION DU CALCIUM 66
2- PHOSPHORYLATION DE ERK 67
3- ETUDE DE L'EXPRESSION DU CD69 ET DU CD25 67
4- DOSAGE DE L'IL-2 69
5- ETUDE DE LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE 69

II- MISE EN PLACE DE NOTRE TEST 71

III- INTRODUCTION AU PREMIER ARTICLE 73

IV- INTRODUCTION AU DEUXIEME ARTICLE 74

V- INTRODUCTION AU TROISIEME ARTICLE 76

VI- RESULTATS NON PUBLIES SUR LA PARTIE FONDAMENTALE 77

1- ETUDE DES MARQUAGES CELLULAIRES AVEC AC PHOSPHORYLES DE LA CHAINE DE SIGNALISATION APRES ENGAGEMENT DU TCR 77
1-1. Matériels et Méthodes 77
1-2. Résultats 80
2- ETUDE DE LA REVERSIBILITE DU SIGNAL INDUIT PAR L'AC ANTICD3 87
2-1. Matériels et méthodes 87
2-2. Résultats et discussion 88
3-PRINCIPE DU MICROPATTERNING 88
3-1. Matériels et méthodes 88
3-2. Résultats et discussion 90

VII- REVUE SUR L'IMMUNOSENESCENCE 92

VIII- ETUDE DE FAISABILITE DE L'APPLICATION CLINIQUE 93

1- JUSTIFICATION DE NOTRE RECHERCHE 93
2- OBJECTIFS DE NOTRE ETUDE 95
2-1. Objectif principal *95*
2-2. Objectifs secondaires *95*
3- METHODOLOGIE 95
3-1. Type d'étude *95*
3-2. Centres et médecins investigateurs *96*
4- POPULATION D'ETUDE 96
4-1. Population de sujets âgés pathologiques *96*
4-2. Population de sujets âgés sains *97*
5- EVALUATION DES SUJETS 97
5-1. Evaluation clinique *97*
5-2. Evaluation biologique *100*
5-3. Exploration de l'immunité *101*
5-4. Etude de la formation du contact *101*
6- CRITERES D'EVALUATION 103
6-1. Critère de jugement principal *103*
6-2. Critères de jugement secondaires *103*
7- NOMBRE DE SUJETS- DUREE DE L'ETUDE 104
8- RESULTATS 105

IX- INTRODUCTION AU CINQUIEME ARTICLE 106

C- CONCLUSION ET PERSPECTIVES 107

D- BIBLIOGRAPHIE 113

E- ANNEXES 150

Liste des abréviations

Ac : anticorps
ADAP : Adhesion and degranulation –promoting adapter protein
AP-1 (Jun/Fos) : activator protein-1 (Jun/Fos)
Arp2/3 : Actin-Related Proteins 2/3
BSA : Bovine Serum Albumine
BTLA : B- and T-lymphocyte attenuator
C3G : Crk SH2 domain GEF
CARD : capsase recrutment domain
CDRs : complementary determining régions
CFSE : Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : cytomégalovirus
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CRAC : Ca^{2+}-released-activated channels- Ca^{2+}
Csk : Cooh-Terminal Src Kinase
c-SMAC : central supramolecular activation cluster
CTLA4 : Cytotoxic T - Lymphocyte Antigen 4
DAG : diacylglycérol
DHEAS : dehydroepiandrosterone sulfate
Dok-1 : Docking protein 1
DPC : Distal Pole Complex
DREAM : downstream regulatory element antagonist modulator
d-SMAC : distal supramolecular activation cluster
ECM : ExtraCellular Matrix
Erk : extracellular-signal-regulated kinase
FAK : Focal Adhesion Kinase
FCS : fetal calf serum
FITC : Fluorescéine isothiocyanate-5
fMLP : formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FRET : fluorescence resonance energy transfer
Gads : GRB2-related adapter downstream of Shc
GAP : GTPase-activating protein
GEF : Guaninine nucleotide Exchange Factor
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GTP : Guanosine TriPhosphate
HS1 : hematopoietic cell lineage-specific protein 1
HPK1 : hematopoietic progéniteur kinase 1
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
IkB : inhibitor of kappa B
IP3 : inositol-1,4,5-triphosphate
IRM : interference reflection microscopy
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITK : IL2-induced tyrosine kinase
JAB : Jun-activating binding proteins
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
LAT : Linker for Activation of T-cells
Lck : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1 : leucocyte function-associated antigen 1

LPS : Lipopolysaccharide MAGUK : membrane-associated guanylate kinase
MACS : magnetic cell sorting of human leukocytes
MALT1 : mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
MAPK : Mitogen Associated Protein Kinase
MAPKK : Mitogen Associated Protein Kinase kinase
MAPKKK : Mitogen Associated Protein Kinase kinase kinase
MEF2 : myocyte-enhancing factor 2
MGUS : Monoclonal Gammapathy of Undeterminal Signification
MTOC : microtubular organizing center
MyH9 : Myosin Heavy chain 9
Nck : non catalytic tyrosine kinase
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-Cells
NF-kB : Nuclear Factor- Kappa B
NK : Natural Killer
PAG : Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid Microdomains
PBMC : peripheral blood mononuclear cells
PBS : phosphate buffer saline
PD1 : Programmed Death 1
PDK1 : 3-phosphoinositide-dependant kinase 1
PDMS : PolyDiMéthylSiloxane
PEG : polyéthylène glycol
PFA : paraformaldéhyde
PH : pleckstrin homology
PHA : phytohaemagglutinin
PI-3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PI-4,5-P_2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC : protéine kinase C
PKCθ : protéine kinase Cθ
PLCγ1 : Phospholipase C-γ1
PMA : phorbol myristate acetate
p-MHC : complexe peptide– CMH
PS : phosphatidyl serine
p-SMAC : peripheral supramolecular activation cluster
PTK : phosphotyrosine kinase
PWM : pokeweed mitogen
Pyk2 : Proline rich tyrosine kinase 2
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rap1 : Ras-proximity-1
RAPL : regulator of cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissues
Ras : RAt Sarcoma
Ras-GRP : Ras guanyl nucleotide- releasing protein
RE : Réticulum Endoplasmique
RIAM : Rap1-GTP-interacting adapter molecule
RICM : reflection interference contrast microscopy
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
SH2 : Src homology 2
SH3 : Src homology 3
SI : synapse immunologique
SKAP55 : Src Kinase-Associated Phosphoprotein of 55kDa
SLP-76 : SH2- leucocytar phosphoprotein of 76 kDa

SOS : son of sevenless
Src : raccourci pour « sarcome »
STIM : Stromal Interaction Molecule
Syk : Spleen tyrosine kinase
Tac : T activated
TCR : T Cell Récepteur
TLR : Toll-like récepteurs
TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TTB : test de transformation lymphoblastique
VCAM : Vascular Cell Adhesion MoleculeVLA-4 : very late antigen 4
WASp : Wiskott-Aldrich syndrome protein
ZAP-70 : Zeta-associated-protein of 70 kDa

A- INTRODUCTION

Nous sommes exposés à des millions de pathogènes potentiels à travers le contact, l'ingestion et l'inhalation. Notre capacité à éviter les infections dépend de notre système immunitaire adaptatif et durant les premiers jours après l'exposition à un pathogène, de notre système immunitaire inné.

L'immunité regroupe les immunités innée et spécifique. L'immunité spécifique permet l'acquisition d'une mémoire immunologique conférant une protection immédiate lors de la seconde rencontre avec un antigène pathogène. Elle regroupe l'immunité humorale et l'immunité cellulaire.

L'immunité humorale fait intervenir la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B alors que les lymphocytes T sont une sous-population de lymphocytes jouant un rôle majeur dans la réponse à médiation cellulaire.

L'activation cellulaire T est initiée par l'interaction du récepteur T, le TCR avec des peptides antigéniques, complexés aux molécules du CMH de classe I et II, et présentés par les CPAs (cellules dendritiques, lymphocytes B, macrophages).

La transduction du signal correspond aux phénomènes biochimiques initiés après cette interaction. Elle comporte une série de cascades de signalisation intra-cellulaires.

L'engagement du TCR par les antigènes déclenche la phosphorylation des tyrosines situées sur les ITAMs présents sur les sous-unités CD3 associées au TCR. Cette phosphorylation est due à des PTKs de la famille Src : Lck et Fyn qui initient la signalisation du TCR, ce qui permet le recrutement de ZAP-70 qui phosphoryle à son tour 2 de ses subtrats, SLP-76 et LAT et amplifie la réponse.

Ces 2 protéines servent de protéines de liaison. Elles n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque mais lorsqu'elles sont phosphorylées, permettent la colocalisation avec d'autres protéines de signalisation. Alors que SLP-76 est située dans le cytosol, l'adaptateur transmembranaire LAT, est lié aux rafts lipidiques. Lorsque LAT est phosphorylée, elle lie directement la PLCγ1, Grb2, Gads permettant la localisation de ces molécules et de leurs protéines associées (incluant PI-3K, SOS, C-Cbl, Vav, SLP-76, et Itk) aux rafts lipidiques de la membrane plasmatique.

Cet évènement est nécessaire pour la phosphorylation et l'activation de la PLCγ1 aussi bien que l'activation de Erk qui sont 2 enzymes clés, chacune d'elle devant être activée pour que l'engagement du TCR aboutisse à l'activation cellulaire T.

La PLCγ1 activée catalyse l'hydrolyse du PI-4,5-P_2 en IP3 et en DAG. Le premier produit induit la libération de calcium intracellulaire alors que le second est un activateur de la protéine kinase C et de Ras-GRP aboutissant à l'activation de Erk, qui phosphoryle et régule de multiples effecteurs en aval.

La phosphorylation des tyrosines aboutit à la réorganisation du cytosquelette ainsi qu'à l'activation de multiples voies, dont les voies Erk, JNK, NF-kB et NFAT conduisant à la transcription de multiples gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la mise en œuvre de fonctions effectrices de la cellule [Lin J et al. 2001, Okkenhaug K et al. 2004, Van Leeuwen JE et al. 1999, Rudd CE et al. 1999, Rudd CE, et al. 2003, Davis MM et al. 2002, Coombs D et al. 2002].

Au cours du vieillissement, le système immunitaire subit de nombreuses altérations.

Le vieillissement immunitaire, regroupé sous le terme « immunosénescence » n'est pas une détérioration immunitaire inévitable et progressive mais plutôt un remodelage où certaines fonctions sont réduites alors que d'autres sont conservées voire augmentées [Burkle et al. 2007].

L'immunité cellulaire T est probablement la plus affectée par le vieillissement. Les altérations de la fonction T sont les plus dramatiques et ont un rôle indirect dans les déficiences immunitaires au niveau humoral comme au niveau cellulaire.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'activation cellulaire T et à la mise au point d'un modèle permettant une évaluation rapide de la capacité d'activation des lymphocytes T dans le but d'appliquer ce modèle à l'étude de l'immunosénescence.

Nous aborderons successivement dans cette introduction les données sur le récepteur T et ses mécanismes d'activation puis une revue des phénomènes d'immunosénescence ainsi que les intrications entre le viellissement immunitaire et la pathologie.

I – Activation cellulaire T

1- Structure du récepteur T

Comme le lymphocyte B, le lymphocyte T est destiné à reconnaître un antigène donné grâce à un récepteur qui induit son activation en réponse à la présentation de l'antigène (figures 1 & 2). Le récepteur T est formé de l'association d'un hétérodimère TCR constitué de 2 chaînes variables αβ ou γδ, liées entre elles par des ponts disulfures et de protéines CD3 non polymorphiques [Rudoph MG et al. 2006].

Chez l'adulte, les lymphocytes T sont en majorité de type αβ mais 10% des lymphocytes T présents dans les épithéliums sont de type γδ.

Les protéines du complexe CD3 (CD3γ, CD3δ, CD3ε et CD3ζ) existent sous forme soit d'hétérodimères CD3εγ, et CD3εδ, soit de l'homo-dimère CD3ζζ.

Les protéines CD3γ, CD3δ, CD3ε ont un domaine extracellulaire immunoglobuline alors que les chaines ζ ont un domaine extra-cellulaire court mais une grande partie intracellulaire [Figure 1]. Le complexe CD3 est responsable de la transmission du signal de reconnaissance antigénique à l'intérieur de la cellule, appelée transduction du signal.

Chaque chaine TCR est composée d'un domaine immunoglobuline variable et d'un domaine constant suivi par un domaine transmembranaire et une courte extrémité cytoplasmique.

Les chaînes TCR sont responsables de la reconnaissance du ligand et ont une spécificité pour l'antigène. Elles n'ont aucune capacité de signalisation intrinsèque. Les TCR lient le pMHC avec une relativement faible affinité par leur CDRs présentes dans leurs domaines variables [Rudolph MG, 2006].

Les chaines TCRγδ sont moins connues que les chaines TCRαβ. Les cellules Tγδ répondent aux infections bactériennes ou parasitaires et reconnaissent en priorité les antigènes contenant des phosphates de mycobactéries par un mécanisme inconnu [Rudolph MG, 2006].

Les interactions entre les chaines CD3 et l'hétérodimère TCR sont médiées par 2 charges positives dans la région transmembranaire du TCRα et 1 charge positive dans le domaine transmembranaire du TCRβ. Les charges négatives des domaines transmembranaires des chaines CD3ζ interagissent avec les charges positives des chaînes αβ.

La chaîne TCRα se lie à l'hétérodimère CD3εδ, ce qui permettrait à CD3εγ d'interagir avec la chaîne TCRβ [Murphy 2008, van der Merwe and Davis, 2003].
Les molécules CD3 (gamma, delta, epsilon et zêta) possèdent des motifs conservés de séquences d'acides aminés, appelés ITAMs. Ils sont composés de 2 motifs YXXL/I séparés de 6 à 9 aa, où Y est la tyrosine, L la leucine, I, l'isoleucine et où X représente n'importe quel aa. La séquence canonique des ITAMs est $YXX[L/I]X_{6\text{-}9}YXX[L/I]$. Les ITAMs fournissent des sites de recrutement pour les SH2 des tyrosines kinases. Le complexe TCR contient 10 ITAMs avec 1 ITAM dans chaque chaîne CD3δ, γ et ε et 3 ITAMs dans chaque chaîne CD3ζ. Il est maintenant clairement défini que la phosphorylation des tyrosines des ITAMs du CD3 est une étape précoce et indispensable pour l'activation des cellules T médiée par le TCR.

Les TCR reconnaissent les peptides présentés par le CMH de classe I ou de classe II.
Les molécules du CMH II présentent les peptides qui proviennent de la protéolyse des antigènes extra-cellulaires dans les compartiments de type endosomal alors que les molécules du CMH de classe I présentent les peptides essentiellement dérivés de la dégradation intracellulaire des protéines du cytosol.

Les TCRs qui reconnaissent ces CMH se retrouvent dans 2 populations cellulaires principales : les lymphocytes T helper pour le CMH de classe II et les lymphocytes T cytotoxiques pour le CMH de classe I.

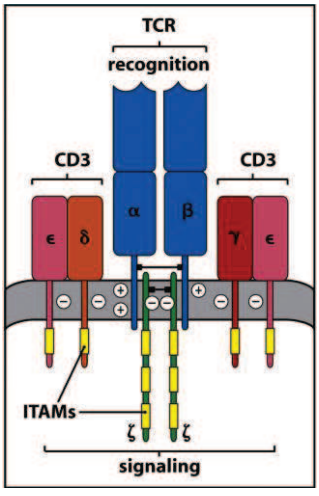


Figure 1 - Le récepteur T associe des protéines de reconnaissance de l'antigène et des protéines invariables de signalisation. D'après Janeway's immunobiology-KM Murphy, chapitre 6.

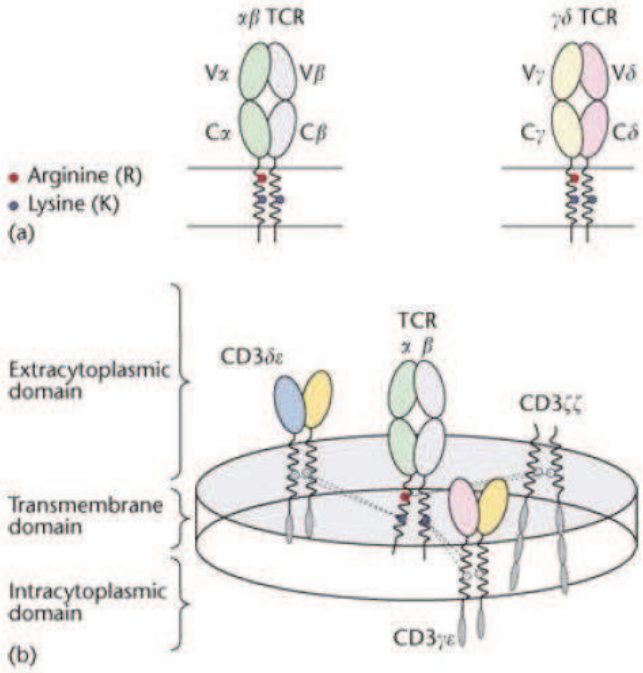


Figure 2 - Structure des différentes chaînes protéiques formant le récepteur des cellules T. Chaque ovale colorié représente un domaine immunoglobuline. En a) un TCRαβ est représenté à gauche, un TCRγδ est représenté à droite. En b), un TCRαβ est représenté entouré des six chaines formant le complexe CD3. Les bâtons grisés des parties intracytoplasmiques représentent les sites de phosphorylation des ITAMs. D'après M. Bonneville et X. Saulquin, Encyclopedia of Life Science, John Wiley & Sons 2005.

2- Sélection des lymphocytes T

La capacité des cellules T à faire la distinction entre les ligands du soi et du non-soi n'est pas une propriété innée des cellules T mais est transmise par des processus de sélection se produisant durant le développement cellulaire T dans le thymus [Jameson SC et al. 1995].

Ces processus modèlent le répertoire des cellules T en régulant la survie des thymocytes en réponse à la reconnaissance des complexes peptides endogènes – CMH.

Le développement des lymphocytes T dans le thymus est caractérisé par une sélection positive au cours de laquelle les lymphocytes T double positifs qui reconnaissent les antigènes peptidiques exogènes en association avec le CMH du cortex thymique et s'y lient avec une affinité suffisante, poursuivent leur maturation. Les cellules ayant survécu vont migrer dans la medulla et sont mises en présence d'autoantigènes complexés avec les molécules du CMH

portées par les cellules épithéliales : les cellules dont le TCR interagit fortement avec les autoantigènes vont subir une apoptose. Ce phénomène permet l'élimination des lymphocytes auto-réactifs et contribue à la tolérance périphérique. C'est la sélection négative.
Au terme de cette sélection intra-thymique, seuls 5% des thymocytes seront exportés vers la périphérie.

3- Réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire comporte 2 phases: une réponse spécifique à un antigène donné et une amplification non spécifique des effets de cette réponse.
L'activation des cellules T naïves spécifiques d'un antigène conduit à leur différenciation et leur prolifération, générant des clones de cellules T effectrices dont la présence témoigne d'une mémoire immunitaire. Cette réponse immune dite primaire est suivie d'une période d'apoptose des lymphocytes T spécifiques avec diminution de leur activité effectrice au fur et à mesure que la quantité d'antigènes diminue. Lorsque l'antigène est rencontré pour la deuxième fois, les cellules T mémoires génèrent une réponse spécifique amplifiée et plus rapide.
L'activation des lymphocytes T fait intervenir leur liaison à un antigène spécifique ainsi que des molécules de co-stimulation.
Les lymphocytes T assurent 2 types de réponses immunitaires : la cytotoxicité grâce aux lymphocytes T cytotoxiques de type CD8 capables de lyser des cellules portant des antigènes spécifiques (après sensibilisation vis-à-vis de ces antigènes), et l'hypersensibilité retardée dépendant des lymphocytes T auxiliaires de type CD4. Ces 2 types de lymphocytes combattent les pathogènes intracellulaires (virus, certaines bactéries et parasites), inaccessibles aux anticorps. Les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent les antigènes viraux associées aux molécules du CMH de classe I. Les lymphocytes T auxiliaires reconnaissent le complexe formé par l'antigène associé à la molécule du CMH de classe II à la surface des cellules présentatrices d'antigène.
On distingue 2 types de lymphocytes T auxiliaires en fonction du profil de cytokines produites. Les lymphocytes TH1 sécrètent du TNF-α et de l'IFN-γ et favorisent la réponse immunitaire de type cellulaire. Les lymphocytes TH2 sécrètent principalement de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10 et de l'IL-13 et coopèrent avec les lymphocytes B pour favoriser la

production d'anticorps. Cette distinction est sans doute moins claire chez l'homme que chez la souris.

4- Les molécules co-réceptrices CD4 et CD8

CD4 et CD8 sont deux molécules de la membrane lymphocytaire impliquées dans la reconnaissance de l'antigène. Elles sont généralement exclusives chez les lymphocytes T naïfs et matures. Les lymphocytes T cytotoxiques expriment le plus souvent CD8. Les lymphocytes T auxiliaires ainsi que les lymphocytes T suppresseurs (T reg) portent CD4. CD4 est une molécule à domaine transmembranaire unique, formée de quatre domaines de type immunoglobuline dans sa partie extracellulaire. La molécule est capable de former des dimères. Elle possède un court domaine intra-cellulaire qui contient une séquence permettant son interaction avec la kinase Lck**.**

CD8 est formée de deux chaines transmembranaires liées par un pont disulfure. L'extrémité distale des chaînes est formée d'un domaine de type immunoglobuline. La chaîne peptidique s'étendant du domaine distal à la membrane est de conformation allongée, du fait d'une glycosylation importante. CD4 et CD8 ont une longueur sensiblement égale à la longueur totale du complexe TCR-pMHC.

Une caractéristique commune de ces deux molécules est de lier le CMH sur un site éloigné du sillon portant le peptide antigénique.

CD4 lie spécifiquement le CMH de classe II, CD8 lie spécifiquement le CMH de classe I. Ces deux molécules sont liées à la kinase Lck dans le cytoplasme lymphocytaire.

L'interaction du TCR avec l'ensemble p-MHC est accompagnée d'une interaction de CD4 ou CD8 avec la partie proximale du CMH. Lors de la reconnaissance de l'antigène par le TCR, cette interaction favorise le confinement de la partie intra-cytoplasmique de CD4 ou de CD8 et de Lck à proximité des chaînes cytoplasmiques de CD3.

5- La transduction du signal

L'engagement du TCR par les agonistes p-MHC initie un signal qui est transmis au noyau par des cascades de phosphorylation et de translocations de protéines aboutissant finalement à l'activation cellulaire T. Les extrémités cytoplasmiques du TCR étant très courtes, il a été démontré depuis plus de 15 ans que la transduction du signal est médiée par les molécules CD3 par la phosphorylation des ITAMs [Smith-Garvin JE 2009].

Contrairement aux progrès dans les connaissances des mécanismes de propagation du signal, le mécanisme par lequel la liaison p-MHC au récepteur T se traduit en un signal d'activation reste obscur [Ma et al. 2008, Smith-Garvin JE 2009].
Les difficultés de compréhension de ce mécanisme sont liées:

- A la complexité de la structure multichaîne TCR/CD3
- A la diversité des peptides présentés par les p-MHC sur les CPAs
- A l'environnement complexe dans lequel l'interaction p-MHC-TCR prend place.

5-1. L'engagement du TCR et l'origine du signal

On sait depuis 15 ans que le CD3 induit la transduction du signal à partir du récepteur engagé via ses ITAMs. La phosphorylation des ITAMs est un élément clé de l'initiation de la transduction. La manière dont le lien du TCR est «traduit» en premier signal reste controversée. Certains modèles suggèrent que l'agrégation du TCR ainsi que des changements conformationnels jouent un rôle dans l'initiation du signal.
Plusieurs modèles ont été décrits pour expliquerle déclenchement de la cascade de signalisation.

5-1-1. Changements de conformation

Au départ, il a été suggéré que des changements conformationnels à l'intérieur du TCR pouvaient jouer un rôle majeur dans la transduction du signal Des changements conformationnels ou dans la flexiblité au niveau du site de liaison du TCR peuvent être nécessaires pour une activation efficace.
Il s'agit des changements conformationnels induits par la reconnaissance de l'antigène dans les extrémités cytoplasmiques du TCR qui peuvent être induits par des mouvements de torsion du TCR par rapport aux chaines CD3 ou par des mouvements de piston créant des déplacements verticaux par rapport à la membrane plasmatique.
Dans le mouvement de piston, le complexe TCR/CD3 est poussé dans la membrane par l'engagement du ligand. Le domaine rigide transmembranaire en forme de baguette de CD3εγ

pourrait alors transmettre un mouvement de piston du complexe TCR perpendiculaire à la membrane plasmatique, d'une manière similaire à ce qui a déjà été rapporté pour le récepteur aspartate [Sun ZJ et al. 2001]. Ce mouvement permet le déplacement des domaines cytoplasmiques de CD3 induisant l'exposition de sites de fixation à des kinases ou à des molécules d'adaptation [Otteman et al. 1999, Aivaizian et al. 2000, Sun et al. 2001, Gil et al. 2002].

Une variante du modèle de piston est le mouvement de torsion du TCR induit par l'engagement du ligand par rapport aux molécules CD3, qui permet également à certains sites de devenir accessibles [Sun et al. 2001, Gil et al. 2002, revue dans Davis, 2002].

D'une manière similaire, une force externe est nécessaire pour le modèle récemment proposé de déformation du récepteur dans lequel le mouvement des cellules T au contact de la CPA, exerce une force d'interaction transitoire pMHC/TCR. Dans ce modèle, la signalisation du TCR est induite par des changements de conformation du complexe TCR/CD3, initiés par une force de traction provenant du cytosquelette et transmise à travers la liaison pMHC/TCR lorsque celle-ci est assez solide pour résister à la rupture [Ma et al. 2008]. Ce modèle est décrit dans le chapitre mécanotransduction [figure 7].

Deux changements conformationnels différents mais non mutuellement exclusifs dans les prolongements intra-cytoplasmiques du CD3 ont été proposés comme mécanismes responsables de la phosphorylation des ITAMS.

Le premier mécanisme est basé sur l'observation qu'en présence d'un lipide acide conçu pour mimer le feuillet interne de la membrane plasmatique, les prolongements intra-cytoplasmiques de CD3ε et d'une façon moindre de la chaîne CD3ζ se plient ou interagissent avec ce lipide de façon à prévenir la phosphorylation. Inversement, dans une solution aqueuse ou en présence d'un lipide «zwitterionique» (amphiphile), les prolongements du CD3 sont plus facilement phosphorylés par Lck [Aivazian D, et al. 2000, Xu C et al. 2008].

Ces découvertes ont conduit à l'hypothèse que dans les cellules T au repos, les prolongements de CD3ε et /ou CD3ζ sont en contact proche avec le repli riche en lipides de la membrane plasmatique, les rendant ainsi inaccessibles à la phosphorylation par Lck, mais après la liaison du TCR, ils sont relâchés de la membrane et phosphorylés.

Cette hypothèse a été testée sur les cellules T et l'interaction entre le domaine cytoplasmique de CD3ε et la membrane plasmatique a récemment été confirmée sur des cellules Jurkat au repos par la technique FRET [Xu C et al. 2008].

Après interaction avec le TCR, un autre changement conformationnel de CD3ε induit l'exposition d'une région riche en proline (proline rich region ou PRR) capable de recruter un domaine SH3 de la protéine d'adaptation tyrosine kinase Nck. Ce phénomène apparait avant la phosphorylation des ITAMs de CD3ε et de CD3ζ [Gil D et al. 2002]. Nck pourrait ainsi recruter et activer des molécules effectrices nécessaires pour la phosphorylation secondaire des ITAMs. Cependant des données récentes chez la souris «Knock-out» pour la région PRR CD3ε n'ont pas réussi à montrer la nécessité de l'interaction CD3ε/Nck pour activer les cellules T périphériques [Mingueneau M et al. 2008, Szymczak AL et al. 2005]. Malgré la découverte originale de la présence, au niveau de CD3, d'une région sans ITAM, critique pour la signalisation du TCR, plusieurs controverses concernant la région PRR persistent [Mingueneau M et al. 2008, Gil D et al., Tailor P et al. 2008, Takeuchi K et al. 2008].

Un autre changement de conformation pourrait être favorisé par des interactions en groupe qui pourraient libérer les extrémités du CD3ζ de la membrane plasmatique et augmenter leur accessibilité à Lck [Seminario MC et al. 2008].

Bien que les changements conformationnels puissent expliquer l'initiation de la cascade intracellulaire des kinases, on ne sait pas comment le peptide antigénique associé au CMH, et les interactions p-MHC/TCR induisent des changements conformationnels dans les régions intracellulaires du complexe CD3.

Des modèles basés sur des changements conformationnels induits par le ligand et/ou sur l'agrégation du TCR ont été proposés [Tableau 1].

Les structures cristallines de plusieurs complexes p-MHC/TCR ont révélé de petits changements conformationnels dans l'hétérodimère du TCR à l'extérieur du domaine de liaison [revue dans Rudolph MG 2006].

Cependant du fait des limitations courantes de la cristallographie et de la spectroscopie en résonance magnétique nucléaire, seules des structures isolées de p-MHC/TCR sans domaines transmembranaires ni composants du CD3 ont pu être élucidées.

Ainsi, des changements conformationnels des composants du complexe TCR/CD3 entre eux ou en relation avec la membrane plasmatique ne peuvent être écartés.

Modèle	Description
Mouvement de piston ***Déplacement***	Une force externe à l'interaction CPA/TCR pousse le complexe TCR/CD3 comme un piston dans une direction perpendiculaire à la membrane, exposant les motifs activateurs sur les régions intracellulaires des chaînes CD3.
Déformation du récepteur ***Changement conformationnel***	La force induite par la cellule T, qui se détache de la CPA, induit la stimulation du TCR en produisant un changement conformationnel lorsque les interactions p-MHC/TCR sont d'une affinité suffisante pour résister à cette force.
Géométrie permissive ***Changement conformationnel***	Des dimères de p-MHC lient des dimères de TCR/CD3 induisant un changement conformationnel comme une rotation avec scission dans la ou les chaînes CD3 qui révèlent des motifs d'activation inaccessibles auparavant.
Ségrégation cinétique	L'initiation du signal se produit du fait de l'exclusion de molécules inhibitrices, de la zone de contact étroit entre la cellule T et la CPA, de ce fait modifiant ainsi le stade enzymatique d'attente vers un stade d'activation.
Diffusion de pièges (« Diffusion trapping ») ***Clustering***	Modèle de ségrégation cinétique étendu dans lequel le coefficient d'affinité et de diffusion de p-MHC/TCR dicte la valence des TCR nécessaires pour emprisonner les complexes dans la zone de contact étroit et de ce fait initier un signal productif.
Pseudo-dimères ***Clustering***	Un agoniste p-MHC/TCR recrute un second TCR par l'interaction avec son CD4 associé, le deuxième TCR se lie alors à un pMHC coagoniste endogène formant un pseudo-dimère stable qui déclenche la signalisation par la proximité d'ITAMs et de Lck associée à CD4 et/ou par un changement conformationnel

Tableau 1- Modèles récents pour la stimulation initiale du TCR - D'après Smith-Garvin JE, T cell activation. Annu Rev Immunol 2009.

5-1-2. La ségrégation cinétique

Dans le modèle de ségrégation cinétique, le contact étroit qui se produit entre la cellule T et la CPA induit l'exclusion de grosses molécules de la zone de contact [Davis JS, 2006]. Les phosphatases inhibitrices avec des domaines extra-cellulaires longs comme CD45 sont exclues du fait de leur taille.

Les complexes TCR qui s'engagent avec les p-MHC à la surface de la CPA restent dans une zone de contact rapproché, loin des phosphatases permettant ainsi d'initier la signalisation. Les complexes TCR qui ne s'engagent pas avec un p-MHC sont libres de diffuser en dehors de la zone de contact. Le raccourcissement des domaines extra-cellulaires de molécules

inhibitrices ou l'allongement des domaines extra-cellulaires de molécules d'adhésion ou accessoires peuvent abroger la signalisation du TCR, suggérant qu'une ségrégation cinétique est un aspect important de l'initiation du signal TCR [revu dans Davis JS, 2006].

Le modèle de diffusion des pièges («diffusion trapping model») associe à la ségrégation cinétique la notion de clustering puisque c'est l'immobilisation ou la prise au piège des p-MHC/TCRs dans des zones de contact étroit qui induit l'initiation du signal TCR [Varma R, et al. 2008].
La valence, ou degré d'agrégation, des p-MHC/TCR nécessaires pour ce piégeage et donc pour la stimulation dépend du coefficient d'affinité et de diffusion de l'interaction p-MHC/TCR.

5-1-3. Modèles basés sur la multimérisation (clustering des TCR)

La multimérisation des récepteurs par des ligands physiologiques peut déclencher l'activation, mais l'oligomère activateur de base est un dimère [Boniface JJ et al. 1998].
L'agrégation du TCR a longtemps été impliquée comme un mécanisme de stimulation du TCR. Dans le modèle d'agrégation classique, le « crosslinking » (lien transversal entre) des complexes TCR/CD3 avec des complexes p-MHC multimériques rend possible le rapprochement et la transphosphorylation entre les prolongements intracytoplasmiques du CD3 et les PTKs associées.
Le fait que des multimères solubles de p-MHC mais non des monomères, puissent déclencher l'activation du TCR est un argument supplémentaire pour la théorie de l'agrégation [Delon et al., 1998].
Cependant de récentes études biochimiques et microscopiques suggèrent que des agrégats de TCR sont présents dans les cellules T non activées [Davis JS, 2006].

Un seul p-MHC est capable d'initier une réponse calcique transitoire à la fois dans des cellules T $CD4^+$ et dans des cellules T $CD8^+$ [Sykulev et al. 1996, Delon J et al. 1998, Irvine DJ et al. 2002]. Cela suggère que l'unité de base est un hétérodimère TCR-corécepteur. En effet, des cellules T exprimant l'antigène CD4 répondent avec un signal calcique transitoire à un seul agoniste p-MHC, alors qu'en bloquant le CD4, il faut au moins 30 ligands p-MHC pour obtenir l'activation du TCR [Irvine DJ et al. 2002].

Le rôle du CD4 dans la réponse cellulaire à un faible nombre d'agonistes peptidiques pourrait s'expliquer par le modèle des pseudo-dimères qui propose qu'un agoniste p-MHC/TCR puisse recruter un deuxième TCR d'une manière dépendante du CD4. Ce second TCR pourrait se lier à un p-MHC endogène co-agoniste, formant un pseudo-dimère stable capable de déclencher la signalisation du fait de la proximité des ITAMs et Lck ou à travers les changements conformationnels de CD3 [Krogggsgaard M et al. 2005] [figure 3]. En effet un simple changement conformationnel de CD4 pourrait avoir un effet de rapprochement des chaines CD3ζ avec Lck, favorisant ainsi la phosphorylation des tyrosines initiant l'activation cellulaire [Irvine DJ et al. 2002].

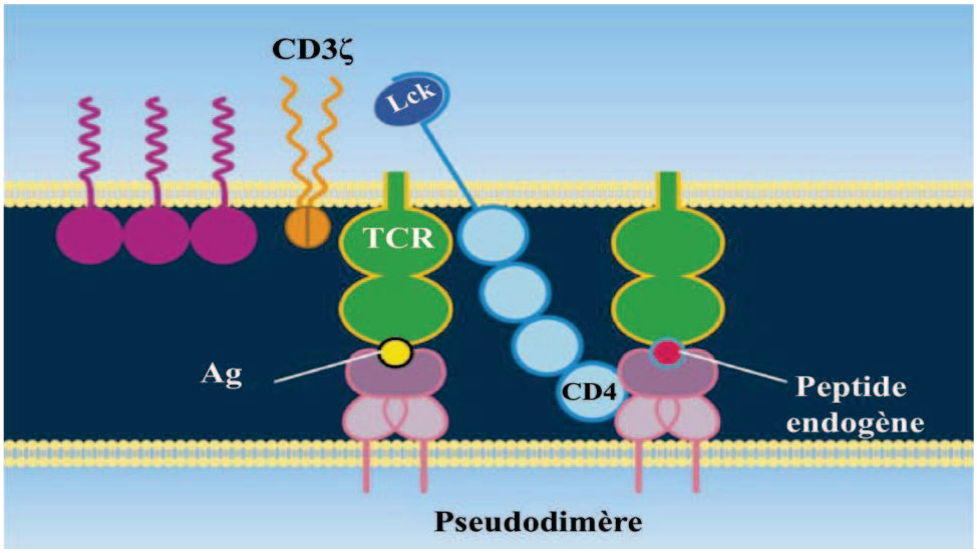


Figure 3 : Théorie des pseudodimères (D'après Irvine DJ et al. Nature 2002)

5-1-4. La mécanotransduction

Les cellules ressentent leur environnement physique grâce à la mécanotransduction.

La mécanotransduction décrit les processus cellulaires qui traduisent les stimuli mécaniques en signaux biochimiques permettant ainsi aux cellules de s'adapter à leur environnement et de moduler leur fonction.

Plusieurs composants biologiques sont décrits comme mécanosenseurs [Jaalouk DE et al. 2009] :

- Des canaux ioniques activés par l'étirement de la membrane plasmatique permettent un influx de calcium et d'autres ions [figure 4-a].
- Au niveau des cellules endothéliales, le glycocalix, une couche moléculaire riche en hydrates de carbone au niveau de la surface cellulaire peut médier la signalisation par la mécanotransduction en réponse à des forces de cisaillement induites par un flux dynamique [Hahn, et al. 2009] [figure 4-b].
- Des récepteurs jonctionnels entre 2 cellules ou entre des adhésions focales et la matrice extracellulaire (ECM), permettent aux cellules de sonder leur environnement [figure 4-c, -d].
- Le déploiement de forces induites par les protéines de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine peut induire une signalisation par un phénomène de mécanotransduction situé à l'extérieur de la cellule [figure 4-e].
- Une tension intracellulaire peut induire des changements conformationnels des éléments du cytosquelette comme les filaments, des protéines de liaison ou des protéines motrices [figure 4-f].
- Le noyau lui-même peut agir comme un mécanosenseur. Des déformations intracellulaires peuvent altérer la conformation de la chromatine et moduler son accès aux facteurs de transcription et à la machinerie transcriptionnelle [figure 4-g].
- La compression de l'espace intercellulaire peut altérer la concentration efficace des molécules de signalisation autocrines et paracrines.

Pratiquement toutes les cellules répondent à une stimulation mécanique induisant des changements fonctionnels adaptatifs. Ces changements induisent des réponses à court terme (comme l'augmentation ou la diminution de la tension cellulaire, l'adhésion, l'étalement ou la migration) aussi bien que des changements dans les effets à long terme (comme dans la synthèse de protéines et leur sécrétion, la réorganisation structurale, la prolifération et la viabilité).

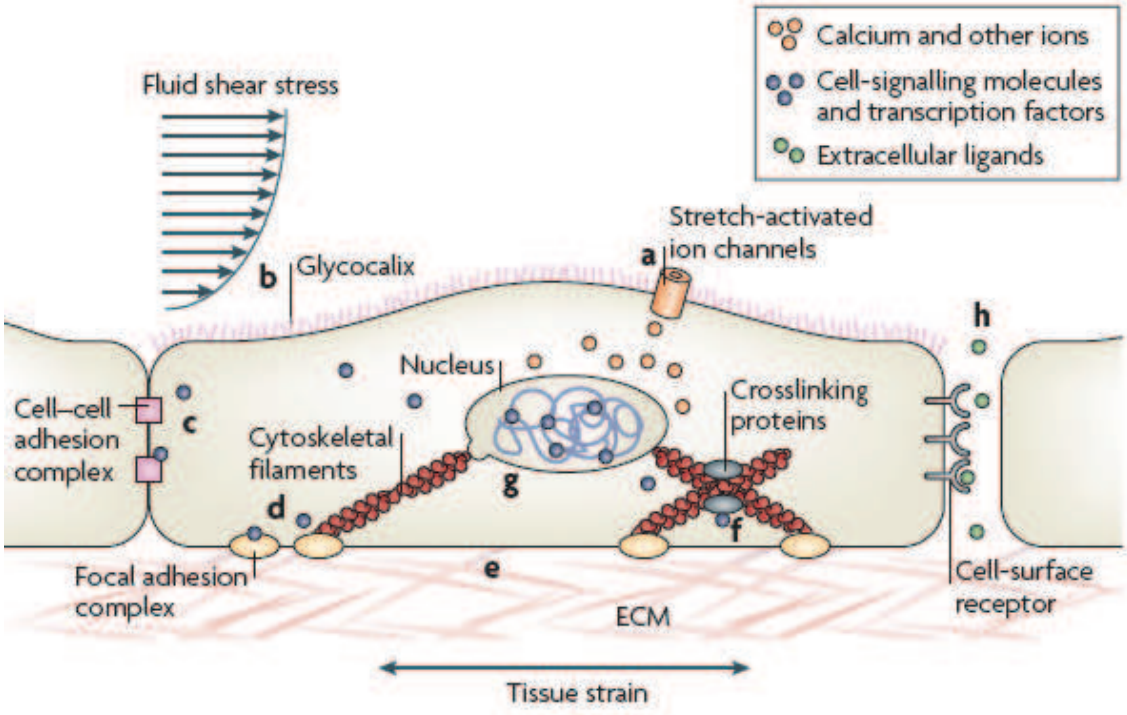


Figure 4 : La mécanotransduction cellulaire - D'après Jaalouk DE et al. Mechanotransduction gone awry- Nature Reviews 2009.

Les intégrines et les cadhérines qui médient les adhésions cellulaires à la matrice extracellulaire et aux cellules voisines, jouent un rôle central dans la mécanotransduction. Les intégrines transmembranaires lient la matrice extracellulaire au cytosquelette en se regroupant en complexes d'attache sous-membranaires spécialisés appelés adhésions focales. Les adhésions focales sont des sites cellulaires majeurs responsables de l'attachement des cellules à la matrice extra-cellulaire et de la signalisation qui suit l'adhésion. Ce sont des complexes multimoléculaires qui rassemblent des récepteurs intégrines transmembranaires qui sont liés au cytosquelette par des protéines d'ancrage cytoplasmiques associées à l'actine comme la taline, la vinculine, la zyxine, la paxilline et la kinase d'adhésion focale (FAK). Les intégrines se lient à un motif RGD (arginine-glycine-aspartate), une séquence présente dans de nombreuses protéines de la matrice extra-cellulaire [Geiger et al. 2009].

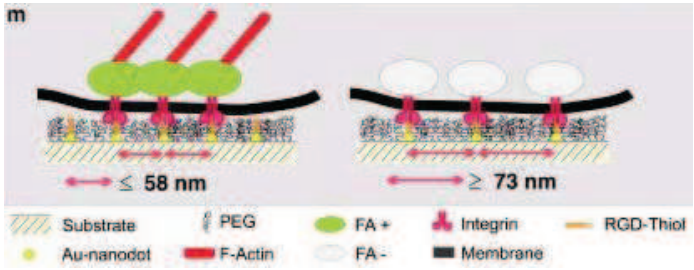


Figure 5 : Schéma de nanopatterning biofonctionnalisé permettant de contrôler le rapprochement des intégrines à la surface cellulaire : des plots en or sont marqués avec des radicaux thiols associés à des motifs peptidiques associant arginine, glycine et aspartate (RGD-Thiol). Les zones entre ces plots sont recouvertes de PEG afin d'empêcher l'adhésion cellulaire. Ainsi l'adhésion cellulaire est entièrement médiée par ces plots d'or recouverts de radicaux thiols RGD. Une distance de séparation entre les plots ≥ 73 nm réduit l'attachement cellulaire, l'étalement et la formation des fibres de stress d'actine du fait d'une restriction du rapprochement des intégrines. Cela est indiqué par l'absence d'adhésion focale (FA-), alors que des distances entre les plots ≤ 58 nm permettent l'adhésion focale (FA+).

L'écart de 73 nm entre 2 sites de liaison de molécules d'intégrines individuelles pourrait être une échelle de longueur universelle au delà de laquelle le rapprochement, l'adhésion et la signalisation médiées par les intégrines ainsi que l'adhésion cellulaire ne peuvent se faire [Arnold M et al. 2004, Geiger et al. 2009]. Cet espace, compris entre 58 et 73 nm, apparaît universel car il est reproductible d'un type de cellule à l'autre [Arnold M et al. 2004, Figure 5].

Un composant particulièrement intéressant de ces adhésions focales est la protéine d'adhésion p130CAS (également dénommée BCAR1). La conformation de cette molécule peut être modifiée par son étirement mécanique permettant l'exposition de sites de phosphorylation Tyr et sa phosphorylation par Src [Sawada et al. 2006].

Un modèle de connexion entre les protéines de la matrice extracellulaire et le noyau est présenté dans la figure 6 extraite de la revue de Wang et al. [Wang et al. 2009].

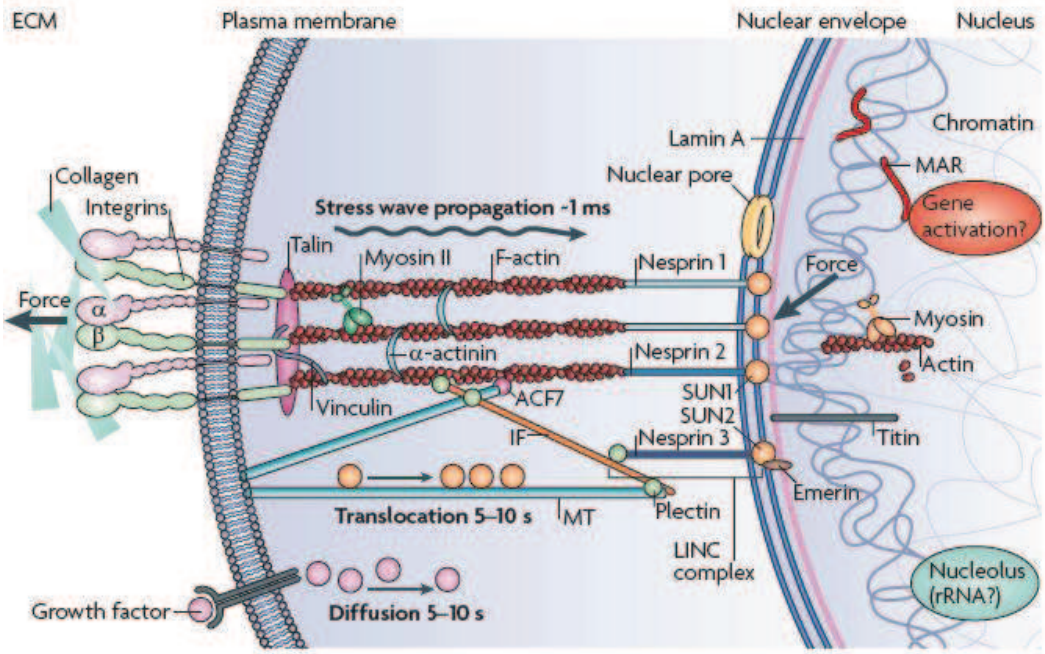


Figure 6 : Connectivité moléculaire de la matrice extracellulaire au noyau. D'après Wang et al. 2009.

Dans le domaine de l'activation cellulaire, Zhengyu Ma et coll. démontrent que l'ancrage à la surface de monomères de p-MHCs agonistes permet de déclencher l'activation du TCR avec un potentiel remarquable [Ma et al. 2008, Figure 7] alors que des p-MHCs monomériques en solution, sont insuffisants pour stimuler le TCR. Dans ce modèle, l'engagement du TCR, nécessite non seulement l'adhésion du lymphocyte T à la surface, mais aussi un cytosquelette d'actine fonctionnel car la contrainte mécanique est transmise par le cytosquelette aux points d'attachement [Ma et al. 2008]. Le signal est initié lorsque le complexe CD3-TCR est déformé par une force de traction associée à la mobilité cellulaire. Cette force de traction induit un changement conformationnel du TCRαβ, qui est ensuite transféré aux domaines intracellulaires du complexe CD3 à travers les interactions entre domaines extra-cellulaires et transmembranaires [Kuhns MS, et al. 2006].

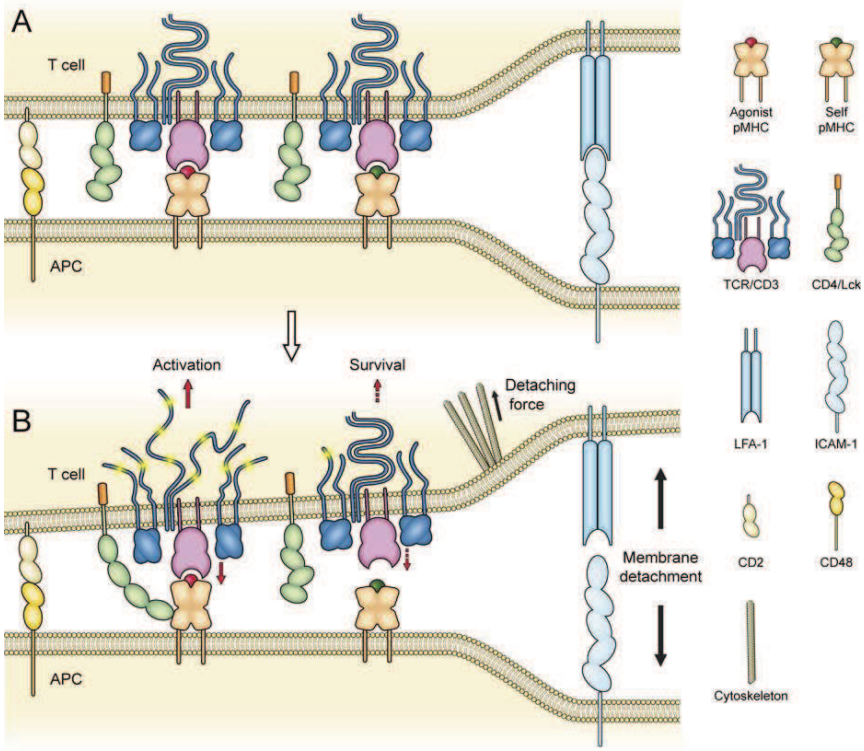


Figure 7- Le modèle de déformation du récepteur pour la stimulation du TCR. D'après Zhengyu Ma Plos Biol 2008.

A- L'Interaction de p-MHC et de TCRs au site de contact membrane-membrane de l'interface cellule T/CPA est facilitée par les molécules d'adhésion. L'interaction entre les agonistes p-MHC et le TCR en soi n'initie pas la signalisation du TCR.

B- Les forces générées à partir du cytosquelette, qui conduit les changements morphologiques de la cellule T et active le mouvement de la cellule T par rapport à la CPA, détachent la membrane plasmatique de la cellule T de la CPA. Une partie de cette force est délivrée au complexe TCR/CD3 via la liaison p-MHC-TCR. La liaison entre les agonistes p-MHC et le TCR est suffisamment puissante pour délivrer une force qui déforme le complexe TCR/CD3 vers une conformation capable d'initier l'activation du signal.

Beaucoup de modèles d'initiation du signal TCR ne sont pas exclusifs les uns des autres et il est probable que l'agrégation du TCR, des changements conformationnels, et l'exclusion de molécules inhibitrices sont nécessaires pour déclencher la stimulation du TCR par étapes ou simultanément.

5-2. Initiation du signal

Avant la stimulation du récepteur T, Lck, associée à CD4/CD8, reste séparée du TCR en étant maintenue dans un état d'inactivité grâce à Csk [Figure 8, étape 1].

Lck est un membre des tyrosine kinases de la famille Src. Csk est une tyrosine kinase qui phosphoryle la tyrosine régulatrice négative Y505 C-terminale de Lck (Y505) afin de la

maintenir dans un état inactif en lui conférant une conformation fermée (le résidu pY505 crée un motif de liaison intramoléculaire pour le domaine SH2) [Boggon et al. 2004, Palacios et al. 2004].

L'interaction de Csk et de PAG permet l'activation de Csk et l'inhibition de Lck. Lck devient activée par le biais de sa déphosphorylation médiée par le CD45, de résidus tyrosine impliqués dans la régulation [Leo et al. 2002, Marinari B et al. 2005]. Lck est également activée par trans-autophosphorylation sur le résidu tyrosine de sa boucle d'activation [Figure 8, étape 2].

Après stimulation du TCR, CD4/CD8 associé à Lck se co-localise avec le TCR aboutissant à la phosphorylation des résidus tyrosine de chaque motif ITAM des chaînes CD3 δ/ε/γ et des chaînes ζ [van Leeuwen et al. 1999, Figure 8, étape 3].

Tous les résidus tyrosine situés dans le motif sont phosphorylés par Lck. Le complexe TCR/CD3 contient 10 ITAMs avec 1 ITAM dans chaque chaîne CD3 δ/ε/γ et 3 ITAMs dans chaque chaîne CD3 ζ.

La phosphorylation des ITAMs par Lck est suivie du recrutement de ZAP-70, un membre de la famille des PTKs Syk. ZAP-70 est exclusivement exprimée dans les cellules T et NK. Les ITAMs doublement phosphorylés, fournissent un site d'amarrage de haute affinité pour les domaines tandems SH2 de ZAP-70 [Figure 9, étape 4]. Une fois recrutée, ZAP-70 est activée par phosphorylation et sera responsable de la phosphorylation de nouvelles molécules en aval. Du fait de la présence de 10 ITAMs sur le complexe TCR, jusqu'à 10 molécules de ZAP-70 peuvent se rassembler sur les récepteurs totalement phosphorylés [Van Oers et al. 1995, Mustelin T et al. J 2003, Chu et al. 1998].

ZAP-70 comporte de multiples sites de phosphorylation (Y292, Y315, Y319, Y492, Y493) ayant à la fois un effet régulateur positif et négatif sur son activité catalytique. La tyrosine 493 est un site de régulation conservé qui se trouve dans la boucle d'activation du domaine kinase. Il a été montré que ce site de régulation positive est nécessaire pour l'activité de la kinase ZAP-70 et qu'il est phosphorylé par Lck [Figure 9, étape 5]. Cette phosphorylation contribue à la conformation active du domaine catalytique [Van Oers, et al. 1995, Chu DH et al. 1998, Williams et al. 1999].

ZAP-70 bénéficie ensuite d'une trans-autophosphorylation au niveau des sites de régulation positifs Y315 et de Y319 qui permet d'achever son activation complète [Figure 9, étape 6].

ZAP-70 activée, accompagnée de Lck, phosphoryle de multiples résidus tyrosine de la protéine LAT [Van Leeuwen et al.1999, Figure 9, étape 7] et des adaptateurs spécifiques des cellules T, comme SLP-76 aboutissant au recrutement et à l'activation d'autres familles de kinases et d'autres enzymes, permettant la génération de seconds messagers et l'activation cellulaire T [Van Oers et al. 1995, Chu DH et al. 1998, Williams et al. 1999].

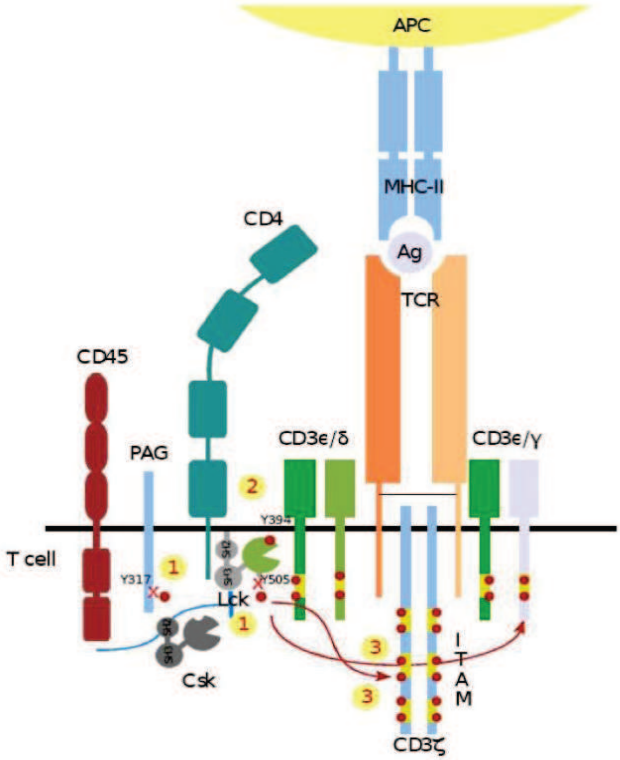


Figure 8 : Phosphorylation des chaines CD3 (d'après réactome, http://www.reactome.org)

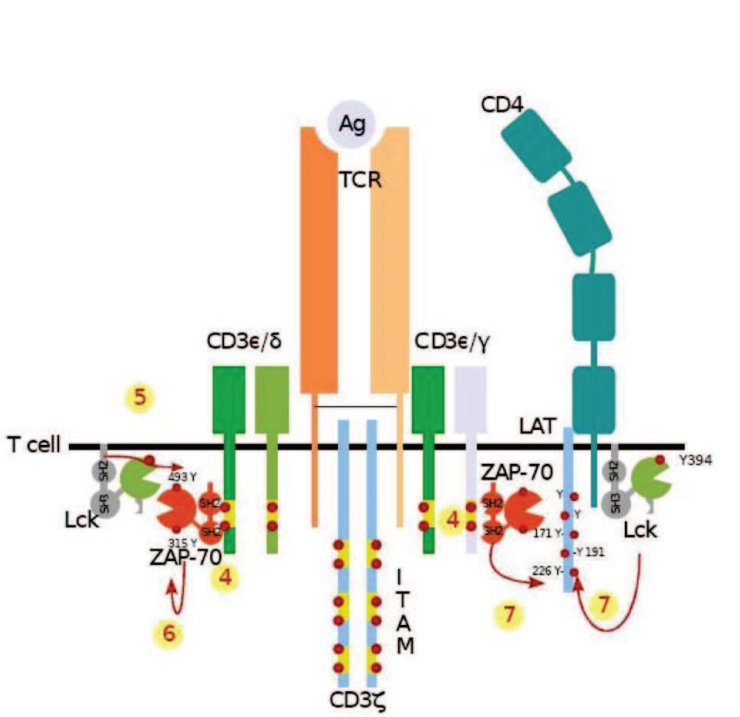


Figure 9 - Interaction de ZAP-70 avec les ITAMs (d'après réactome, http://www.reactome.org)

5-3. Mise en place du signalosome

La dernière décennie a vu la description de l'assemblage et de l'activation d'un complexe de signalisation multimoléculaire fait de protéines d'adaptation. Ce complexe est responsable de la propagation du signal du TCR vers de multiples et diverses voies de signalisation. C'est le complexe de signalisation proximal [Figure 10].

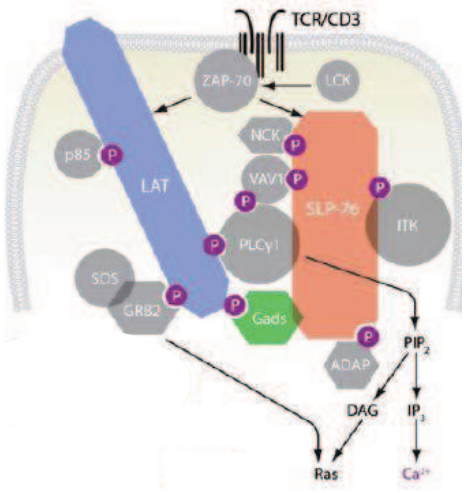


Figure 10 : le complexe de signalisation proximal d'après Smith-Garvin JE et al. Annu Rev. Immunol. 2009.

Parmi les cibles les plus importantes de ZAP-70 se trouvent la protéine d'adaptation transmembranaire LAT et la protéine d'adaptation cytosolique SLP-76 [Zhang et al. 1998, Bubeck et al. 1996].

Ces 2 adaptateurs forment la colonne vertébrale du complexe qui permet l'organisation des molécules effectrices d'une manière spatio-temporelle correcte pour permettre l'activation des voies de signalisation [Koretsky GA et al. 2006, Sommers CL et al. 2004, Zhang W et al. 1999].

LAT contient 9 tyrosines, phosphorylées une fois le TCR engagé, et lie le domaine SH2 C-terminal de PLCγ1, de la sous-unité p85 de PI3K, des protéines d'adaptation aux récepteurs de facteurs de croissance GRB2 et Gads [revue dans l'article de Sommers et al. 2004]. SLP-76 est ensuite recrutée pour phosphoryler LAT par le biais de leur partenaire de lien mutuel, Gads [Liu SK, 1999].

SLP-76 contient 3 domaines :

- un domaine acide N-terminal avec 3 tyrosines phosphorylables interagissant avec les domaines SH2 de Vav1, Nck et ITK
- une région riche en proline (PRR) qui lie constitutivement Gads et PLCγ1
- une région SH2 C-terminale qui peut lier la protéine ADAP, protéine d'adaptation promouvant l'adhésion et la dégranulation et une kinase progéniteur hématopoïétique 1 (HPK1) [revue dans article de Koretzky GA et al. 2006].

Bien que LAT et SLP-76 servent à « nucléér » ce large complexe de signalisation, les molécules effectrices elles-mêmes jouent un rôle dans sa stabilisation. Par exemple, la kinase ITK de la famille Tec est nécessaire au recrutement du GEF Vav1 au site de contact de la CPA, alors que Vav 1 est nécessaire pour la phosphorylation optimale de SLP-76 et le recrutement à LAT ainsi que pour l'activation de ITK [Dombroski D, et al. 2005, Reynolds LF et al. 2002, Reynolds LF et al. 2004].

Ces données et d'autres suggèrent que la formation du complexe est plus compliquée que le modèle linéaire souvent évoqué par simplicité.

Ainsi la PLCγ1 se lie directement à SLP-76, LAT et Vav 1 aussi bien qu'à sa kinase activatrice ITK [QI Q et al. 2007]. Il semblerait que ces interactions collectives soient requises pour stabiliser la PLCγ1 dans une conformation correcte à l'intérieur du complexe pour favoriser son activité optimale [Beach D et al. 2007].

Pour comprendre plus précisément les interactions de ce complexe dans les cellules naïves T, plusieurs laboratoires ont généré des souris exprimant des mutations transgéniques ou knock-out dans des régions spécifiques de liaison de différentes molécules du signalosome [Miletic AV et al. 2006, Sommers CL et al. 2005, Jordan MS et al. 2008].
Ces mutations entraînent toujours des déficits sévères des voies de signalisation en aval notamment des activités défectueuses de Vav1 ou ITK. De façon similaire, la mutation des tyrosines de Vav1 n'entraîne pas de perte de l'interaction avec ses partenaires, mais une dysrégulation de la signalisation dépendante de Vav1 [Miletic AV et al. 2006].

Après l'engagement du TCR, la PLCγ1 se retrouve donc dans le signalosome liée SLP-76, Vav1 et LAT où elle est phosphorylée et activée par ITK, elle-même dépendante de Vav1, Lck, ZAP-70, LAT et SLP-76 [Beach D, et al. 2007, Reynolds LF et al. 2002, Liu KQ et al. 1998, Berg LJ, et al. 2005, Kim MJ et al. 2000, Figure 11, étape 14].

La PLCγ1 phosphorylée se détache ensuite de LAT et de SLP-76 et se transloque à la membrane plasmatique en se liant au PI-4,5-P_2 par son domaine PH [Kim MJ et al. 2000, Figure 11, étape 15]. La PLCγ1 va hydrolyser PI-4,5-P_2 produisant 2 seconds messagers : le DAG et l'IP3 [Kim MJ et al. 2000, Figure 11, étape 16]. Ces seconds messagers sont impliqués dans la mobilisation du calcium, l'activation de la PKCθ, et de NF-kB [Huang et al. 2004, Rudd CE et al 2003, Zhang W et al. 2000, Wange, RL 2000, Liu SK et al. 2001, Qi Q et al. 2007, Yablonski D et al. 2001, Kim MJ et al. 2000].

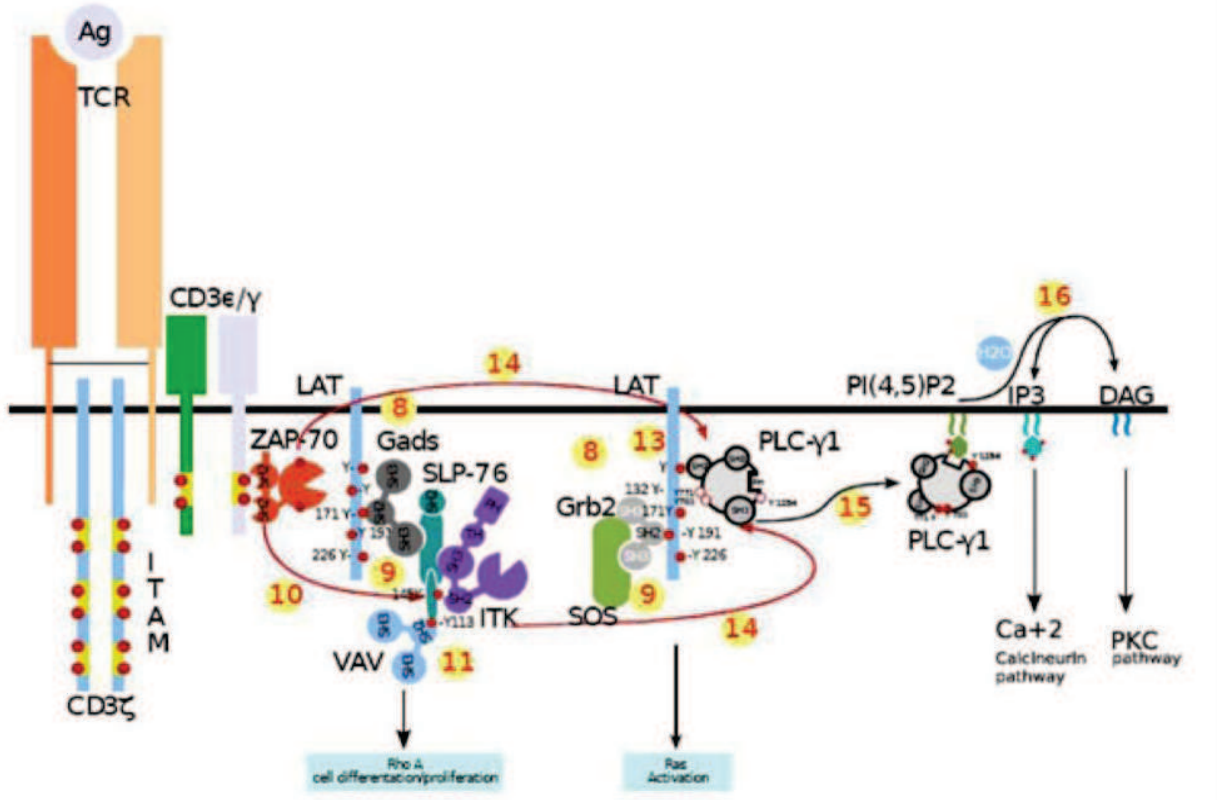


Figure 11- Relargage des seconds messagers (DAG, PKC, Calcium) (d'après réactome, http://www.reactome.org)

Après la liaison du TCR, ITK est recruté à la membrane à travers des interactions du domaine PH avec PIP_3, généré localement par l'activité PI3K induite par Lck [revu dans l'article de Berg LJ et al. 2005, Kim MJ et al. 2000].

Le complexe de signalisation proximal entraîne l'activation de voies dépendantes de la PLCγ1, incluant les réponses par le Ca^{2+} et le DAG, les réarrangements cyto-squelettiques et les voies d'activation des intégrines.

La liaison avec des récepteurs de co-stimulation comme le CD28 augmente ces voies.

La production du DAG entraîne l'activation de 2 voies majeures impliquant Ras et la PKCθ.

5-4. Propagation du signal

Des modifications de l'expression génique sont nécessaires à la cellule T pour obtenir ses pleines compétences prolifératives et produire des cytokines effectrices. Trois facteurs de transcription particuliers ont été identifiés pour jouer un rôle clé dans ces changements : NF-κB, NFAT et AP-1 (Jun/Fos) [Figure 12].

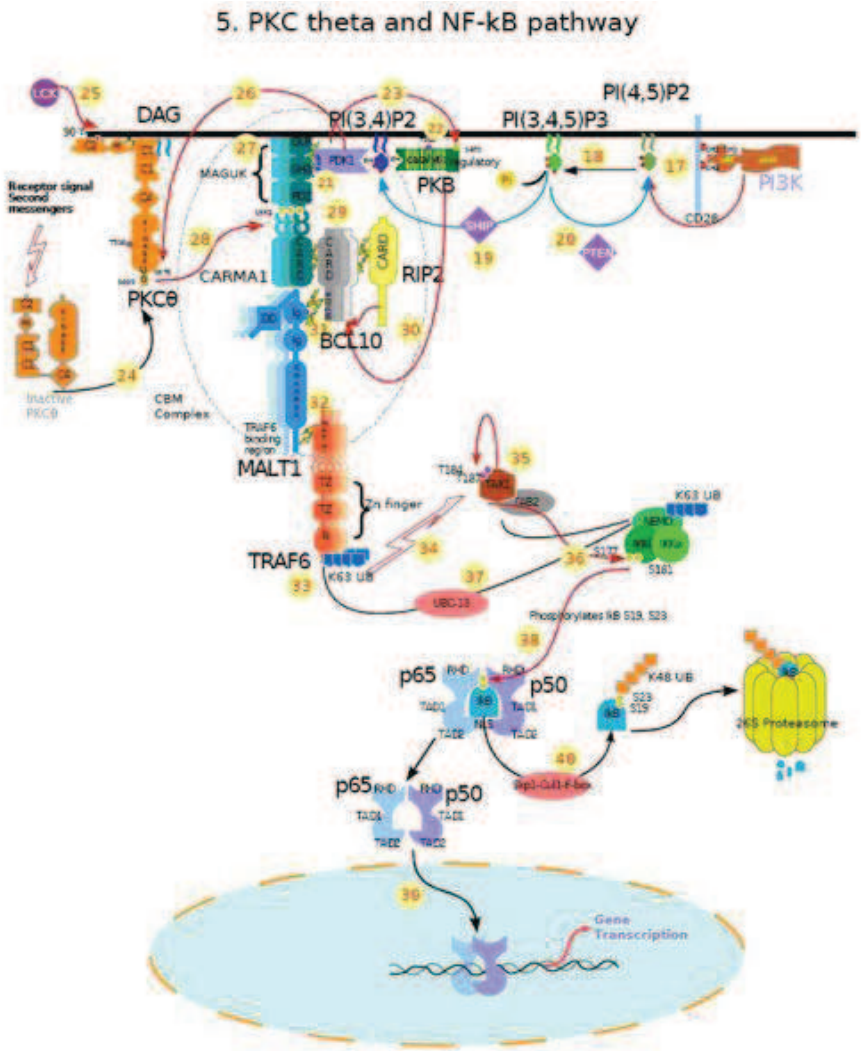


Figure 12 : Propagation du signal (d'après réactome, http://www.reactome.org)

5-4-1. Les voies de signalisation médiées par le DAG

La production de DAG induite par le TCR entraîne l'activation de 2 voies majeures impliquant Ras et la PKCθ.

5-4-1-1. La voie RAS

Ras est une petite protéine G qui fixe le GTP et qui est nécessaire pour l'activation de la serine-threonine kinase Raf-1. Raf-1 est une MAPKKK qui phosphoryle et active les MAPKKs, qui à leur tour phosphorylent et activent les MAPKs Erk1 et Erk2.
L'activité des Erk kinases entraine l'activation d'un facteur de transcription Elk1, qui contribue à l'activation du complexe de transcription AP-1 (Jun/Fos) par la régulation de l'expression de Fos.
Ras est uniquement actif lorsqu'il est lié au GTP, cette activation étant facilitée par les GEFs et supprimée par les protéines GAPs. Deux GEFs de Ras sont présents dans les cellules T, SOS et RasGRP [Figure 13].

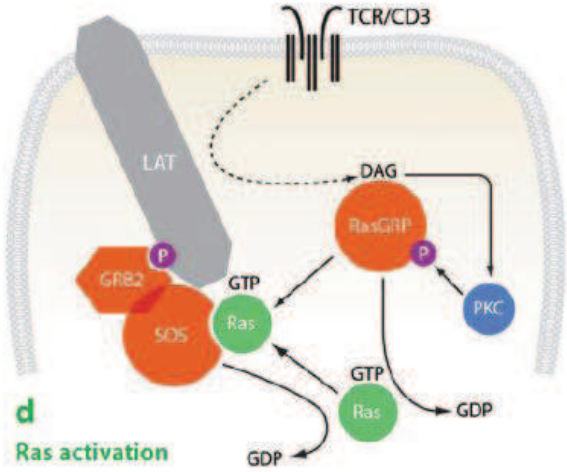


Figure 13 : l'activation de Ras - d'après Smith-Garvin JE et al. Annu Rev. Immunol. 2009

RasGRP apparaît dominant pour l'activation précoce de Ras, puisque que SOS ne peut compenser un déficit en RasGRP [Ebinu JO et al. 2000, Egan SE et al. 1993, Dower NA et al. 2000].
Ras est recrutée à la membrane par un domaine liant le DAG, où il est phosphorylé par la PKCθ [Ebinu JO et al. 1998, Roose JP et al. 2005]. SOS est lié de manière constitutive à la protéine d'adaptation GRB2.

Après stimulation du TCR, le domaine SH2 de GRB2 est recruté et lie les tyrosines phosphorylées sur LAT, apportant de fait SOS au niveau du complexe de signalisation proximal, où il peut faciliter l'activation localisée de Ras [Finco TS et al. 1998].

La significativité de ces 2 modes d'activation de Ras n'était pas claire jusqu'à ce qu'il soit démontré que la production de RasGTP dépendante de RasGRP catalyse l'activité SOS, produisant une boucle de feedback positive et une activation de Ras robuste après engagement du TCR [Roose JP et al. 2007, figure 13].

Ce modèle unifié explique la dominance de RasGRP. En effet RasGRP pourrait être nécessaire pour initier la production de RasGTP, qui après avoir atteint des niveaux seuils catalyserait l'activité SOS et amplifierait d'autant plus le signal.

5-4-1-2. La voie PKCθ

La seconde voie de signalisation majeure régulée par le DAG est médiée par la PKCθ. La PKCθ contient un domaine liant les lipides spécifiques du DAG. Ce domaine est important pour recruter la PKCθ à la membrane plasmatique après l'activation cellulaire T.
Cependant la phosphorylation de la PKCθ par Lck peut être nécessaire pour induire un changement conformationnel permettant la liaison à la PS [Hayashi K et al. 2007]. La PS, en retour, augmente la liaison au DAG, entraînant l'activation de la PKCθ [Melowic HR, 2007].
D'autres molécules de signalisation, incluant Vav1, PI3K, et PDK1, jouent également un rôle dans la localisation de la PKCθ mais les détails de ces contributions ne sont pas complètement définis [Hayashi K et al. 2007].
Une voie importante régulée par la PKCθ est l'activation de NF-κB.
Dans les cellules au repos, le NF-κB se trouve dans le cytosol associé à son inhibiteur (IκB) qui l'empêche de migrer dans le noyau.
Après la stimulation du TCR, un complexe tri-moléculaire se forme entre CARMA1 [la protéine d'échafaudage contenant CARD et MAGUK], la protéine d'adaptation Bcl10, et MALT1 [Hayashi Ket al. 2007, Schulze-Luehrmann J et al. 2006].
L'assemblage de ce complexe CBM (CARMA1/Bcl10/MALT1) est régulé par la PKCθ à travers sa phosphorylation de CARMA1, qui est nécessaire pour son association à Bcl10

[Matsumoto R et al. 2005, Sommer K et al. 2005]. MALT1 se lie à Bcl10 et contribue à la dégradation de la sous-unité régulatrice du complexe IKK (IKKγ), en facilitant sa polyubiquitination [Sun L et al. 2004, Zhou H et al. 2004]. Cette dégradation permet la phosphorylation de IκB par la sous-unité catalytique de IκB kinase (IKK) et ainsi le relargage de NF-κB aboutissant à sa translocation dans le noyau [Schulze-Luehrmann J et al. 2006].
Une protéine associée à CARMA1 et récemment identifiée comme un composant additionnel de ce complexe s'appelle ADAP [Medeiros RB et al. 2007]. ADAP initialement définie comme liant SLP-76, s'associe au domaine MAGUK de CARMA1 après la stimulation cellulaire T. Cette interaction pourrait altérer la conformation de CARMA1 et augmenter son association avec Bcl10 et MALT1 et/ou stabiliser le complexe CBM.

5-4-2. Les voies de signalisation médiées par le Calcium

Les ions Ca^{2+} sont des seconds messagers universels dans les cellules eucaryotes.
L'IP3 généré par l'activité PLCγ1 stimule des récepteurs constituant des canaux perméables au Ca^{2+} (IP3R) situés sur la membrane du RE, permettant la libération du Ca^{2+} stocké dans le cytoplasme [Figure 14].

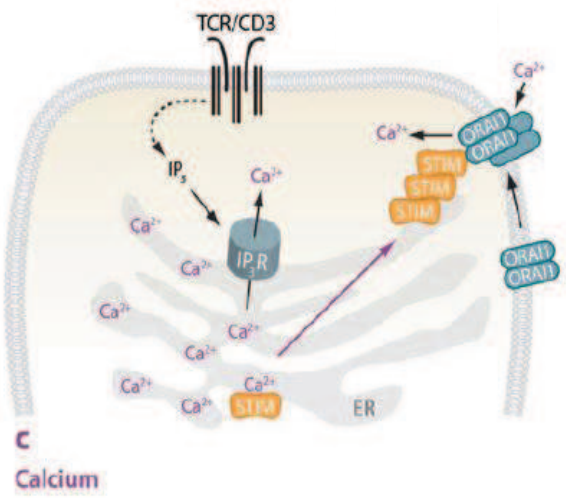


Figure 14: Les voies de signalisation médiées par le Calcium - d'après Smith-Garvin JE et al. Annu Rev. Immunol. 2009.
La déplétion calcique à l'intérieur du RE déclenche un influx soutenu de Ca^{2+} extracellulaire par l'activation des canaux CRAC dans un processus appelé « SOCE » (store-operated Ca^{2+} entry) [Oh-Hora et al. 2008, figure 14].

La sous-unité formant les pores des canaux est une molécule à 4 domaines transmembranaires appelée Orai 1 [Zhang SL et al. 2006, Feske S et al. 2006, Vig M, Science 2006].
Le détecteur de déplétion calcique des canaux de RE et l'activateur des canaux CRAC est la molécule STIM siégeant au niveau du RE [Roos J et al. 2005 , Liou J et al. 2005].

Deux protéines, STIM 1 et STIM 2, sont présentes chez les mammifères, et STIM1 joue un rôle prépondérant pour la phase initiale robuste de l'entrée du Ca2+ stocké (SOCE), alors que STIM2 joue un rôle prépondérant pour maintenir les niveaux de base du Ca2+ et maintenir la phase tardive de ce processus (SOCE) [Oh-Hora M et al. 2008 Brandman O et al. 2007].
Les canaux CRAC sont le principal mode d'entrée du Ca^{2+} dans les cellules T.

L'augmentation des niveaux de Ca^{2+} induite par l'activation du TCR entraîne l'activation de facteurs de transcription dépendants du Ca^{2+} et de la calmoduline, incluant MEF2 et DREAM. Cette augmentation des niveaux de Ca^{2+} entraine également l'activation de protéines de signalisation comme la calcineurine phosphatase et la kinase calcium-calmoduline dépendante (CaMK), qui à leur tour activent plusieurs programmes de transcription [Savignac M, Pfugers Arch 2007]. La calcineurine activée, déphosphoryle les membres de la famille NFAT, aboutissant à leur translocation dans le noyau.

Dans le noyau, les isoformes de NFAT peuvent former des complexes avec d'autres facteurs de transcription, entrainant des niveaux différents d'expression de gènes, et des devenirs fonctionnels dépendants du contexte du signal TCR.

L'interaction NFAT/AP-1, intègre les signaux Ca2+ et Ras, entraînant l'expression de gènes importants pour l'activation cellulaire comme l'expression d'IL-2. Inversement, en l'absence d'activation d'AP-1, l'activité NFAT induit un schéma d'expression de gènes conduisant à une anergie cellulaire T et l'absence caractéristique de production d'IL-2 [Macian F et al. 2002].

5-4-3. La signalisation du TCR aux intégrines

Les intégrines sont les principaux récepteurs cellulaires responsables de la médiation des adhésions cellules/cellules ou cellules/matrice et qui permettent la migration leucocytaire et indirectement l'activation des cellules de l'immunité. Les intégrines sont composées d'hétérodimères de chaînes α et β de type glycoprotéines transmembranaires de type I avec des extrémités cytoplasmiques courtes. On a décrit 18 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes, qui s'associent en paires pour former au moins 24 récepteurs $\alpha\beta$ différents.

Les intégrines communes exprimées sur les leucocytes incluent LFA-1 ou $\alpha_L\beta_2$, Mac-1 ($\alpha M\beta 2$) et VLA-4 ou $\alpha 4\beta 1$.
Les intégrines clés des cellules T comprennent LFA-1 et VLA-4, qui lient leurs ligands respectifs ICAM et VCAM.
Les intégrines émettent de manière bidirectionnelle des signaux à travers la membrane plasmatique dans des voies mentionnées comme la signalisation de l'extérieur vers l'intérieur (« outside-in signaling ») et la signalisation de l'intérieur vers l'extérieur (« inside-out signaling »). Chacune de ces voies est médiée par des changements conformationnels de la structure de l'intégrine. De tels changements permettent une liaison de haute affinité avec les molécules d'adhésion (« counteradhésion molecules ») sur l'endothélium vasculaire ou la matrice extracellulaire et aboutissent à l'association des extrémités cytoplasmiques des intégrines avec des molécules de signalisation intracellulaire.

Une des fonctions majeures des intégrines est de permettre le lien entre le cytosquelette de la cellule et la matrice extra-cellulaire.

5-4-3-1. Voie de signalisation de l'extérieur vers l'intérieur (outside-in signalisation)

Les étapes de signalisation se produisant à la suite du regroupement des intégrines induit par les ligands, correspondent à la signalisation de l'extérieur vers l'intérieur (« outside-in signalisation ») et sont présentées dans la figure 15.
Les réponses fonctionnelles des cellules T résultant de la signalisation de l'extérieur vers l'intérieur incluent l'activation de la prolifération, la sécrétion d'IL-2 et la stabilisation des contacts entre la cellule T et la CPA [Abram CL et al. 2009].

L'activation des kinases de la famille Src est une étape clé dans la voie « outside-in » et entraine la phosphorylation d'une variété de molécules incluant les adaptateurs contenant des ITAMs qui, lorsqu'ils sont phosphorylés, permettent le recrutement et l'activation des kinases Syk et Zap-70. Ces kinases, en retour, phosphorylent une variété de molécules, incluant SLP-76 et Vav1. Cette voie de signalisation est analogue aux autres voies de signalisation décrites en aval des immunorécepteurs [Abram CL et al. 2009, Figure 15].

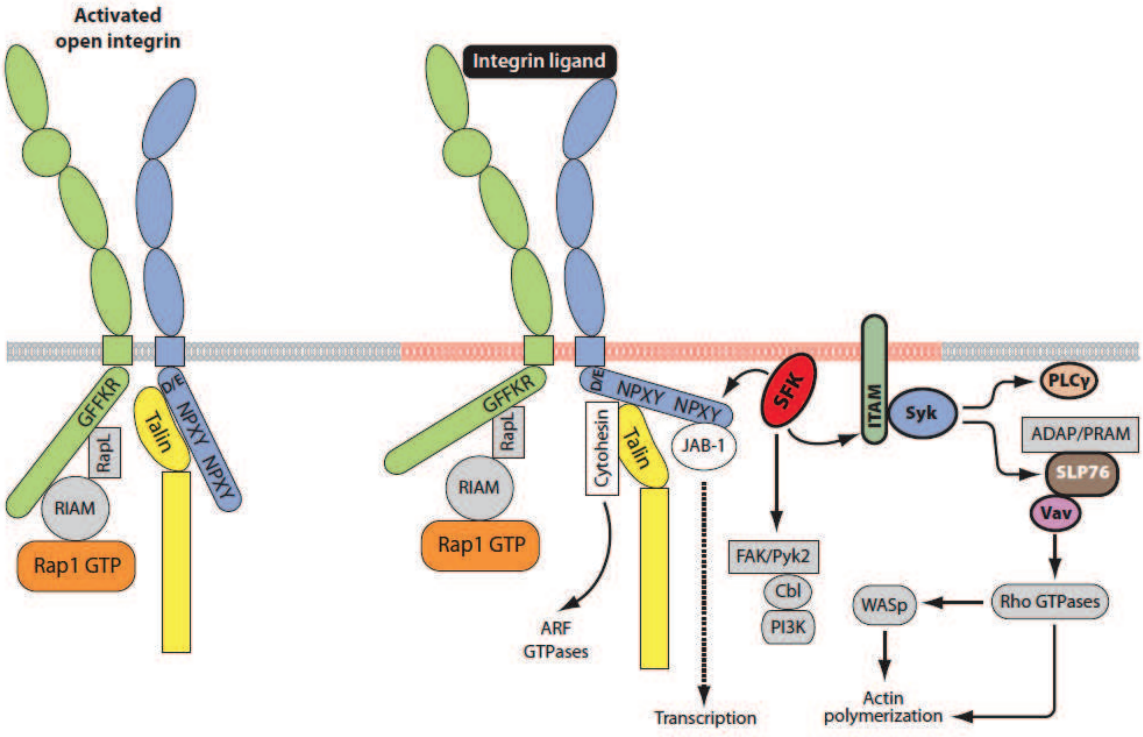


Figure 15 : signalisation de l'extérieur vers l'intérieur (outside-in signaling)- D'après Abram CL Annu Rev Immunol 2009. Cette figure détaille les évènements de signalisation qui se produisent après liaison au ligand.

Vav1 active ensuite des RhoGTPases aboutissant à la réorganisation du cytosquelette. Les kinases de la famille Src peuvent également activer les kinases FAK et Pyk2 aboutissant à la phosphorylation de Cbl et au recrutement et à l'activation de PI3K. L'association d'autres molécules comme JAB ou la cytohesine avec l'extrémité cytoplasmique des intégrines active d'autres voies de signalisation en aval.

5-4-3-2. Signalisation de l'intérieur vers l'extérieur (inside-out signalisation)

L'activation des intégrines dépendante d'évènements initiés par le TCR, est un processus désigné « inside-out signaling » (ou « signalisation de l'intérieur vers l'extérieur ») [Menasche G et al. 2007, figure 16].

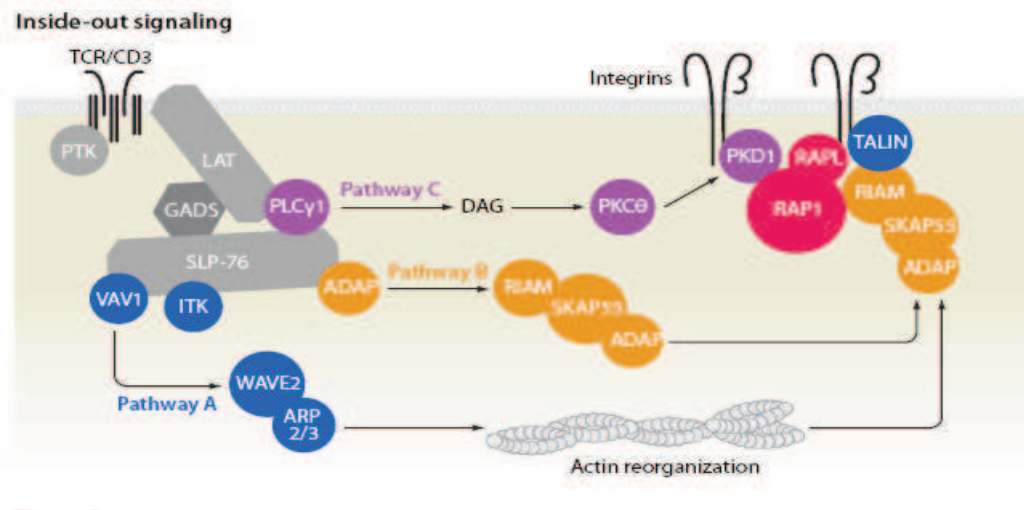


Figure 16 : Un modèle d'activation des intégrines. D'après Menasche G, Immunol Rev 2007.
Après l'engagement du TCR, le signalosome nucléé LAT/SLP-76 s'assemble. Ce complexe permet l'activation de 3 voies nécessaires à l'activation de l'intérieur vers l'extérieur des intégrines:

- Vav1 et Itk contribuent à la réorganisation de l'actine nécessaire pour la mobilité des intégrines (voie A).
- La mobilisation du complexe ADAP/SKAPP55/RIAM est nécessaire pour la localisation à la membrane plasmatique de Rap1 activée (voie B). Le complexe actif Rap1/RIAM induit l'association de la taline avec les extrémités β des intégrines, entraînant peut-être une altération de l'affinité des intégrines.
- Enfin, la génération de DAG médiée par la PLCγ1 aboutit à l'activation de PKD1 et son association avec Rap1 (voie C). Cette interaction est nécessaire pour l'activation de Rap1 et contribue au recrutement de Rap1. Rap1 à son tour recrute RAPL, et la liaison secondaire de RAPL aux sous-unités αL entraine le rapprochement des intégrines et les changements de leur affinités.

Les signaux initiés dans cette voie par l'engagement des immunorécepteurs, aboutissant au changement conformationnel et au rapprochement des intégrines, permettent d'augmenter l'affinité et l'avidité des intégrines pour leur ligand [Smith-Garvin et al. 2009].

Un régulateur central de la signalisation de l'intérieur vers l'extérieur est la GTPase Rap1. Rap1 augmente l'activation cellulaire T en favorisant l'adhésion induite par LFA-1 à ICAM-1. Cette conclusion fait suite à des études utilisant la surexpression de formes dominantes-négatives et constitutivement actives de Rap1 [Katagiri K, et al. 2000, Sebzda E, et al. 2002] ainsi que par l'analyse de souris déficientes en Rap1A, chez qui l'adhésion de LFA-1 à

ICAM-1 induite par le TCR est fortement réduite [Duchniewicz M, et al. 2006]. De nombreuses molécules de signalisation proximales qui entrent dans la composition du signalosome, incluant LAT, SLP-76 et PLCγ1, sont nécessaires pour l'activation des intégrines et de Rap1 [Menasche G et al. 2007, Figure 16].
Cependant il existe des molécules effectrices en aval qui ont un rôle plus sélectif dans l'activation des intégrines, comme la protéine ADAP. Les cellules T de souris déficientes en ADAP sont défectueuses dans le regroupement de molécules LFA-1 induit par le TCR et dans l'adhésion à ICAM [Peterson EJ et al. 2001].

L'association de ADAP et SLP-76 est également nécessaire pour l'activation des intégrines de même que l'association de ADAP avec SKAP55 [Kliche S et al. 2006, Wang H et al. 2004].
Le complexe ADAP/SKAP55 est important pour la localisation correcte de Rap1 [Kliche S et al. 2006].

Une troisième protéine d'adaptation, RIAM, également liée de manière constitutive à SKAP55, s'associe avec Rap1 activée après la liaison du TCR, entraînant un mouvement de Rap1 vers la membrane [Menasche G et al. 2007]. On ne connaît pas le mécanisme de localisation de RIAM à la membrane plasmatique après la stimulation du TCR mais ce recrutement pourrait être induit par l'interaction de $PI(3,4)P_2$ avec le domaine PH de RIAM [Lafuente EM et al. 2004].
Une cible importante de la PKCθ pour l'activation de Rap1 est la kinase PKD1. Après la stimulation par le TCR, Rap1 s'associe avec le domaine PH de PKD1 [Medeiros RB et al. 2003], cette interaction étant nécessaire au recrutement de Rap1 à la membrane et à son activation. Comme PKD1 recrute également de manière inductible C3G à la membrane de façon dépendante du TCR, il semblerait que cet évènement contribue à la dépendance de l'activation de Rap1 pour PKD1 [Medeiros RB et al. 2003].

Rap1 activée peut également s'associer à l'effecteur RAPL. Cette interaction coïncide avec la localisation de RAPL à la membrane et est nécessaire pour sa liaison avec la sous-unité αL de LFA-1 [Katagiri K et al. 2003].

En plus de réguler l'activation de Rap1, les signaux du TCR régulent également les regroupements des intégrines au cytosquelette. La taline est une protéine de liaison du cytosquelette importante pour l'activation des intégrines. L'activité de Rap1 augmente l'association de la taline avec les sous-unités β des intégrines à travers son association avec RIAM [Han J et al. 2006]. Il semble que la formation du complexe taline/RIAM/Rap1 puisse permettre à la taline de se lier aux intégrines, ce qui peut induire une augmentation de son affinité pour le ligand. La taline n'est pas la seule protéine liant l'actine impliquée dans l'activation des intégrines. La vinculine, WAVE2 et le complexe Arp2/3 jouent également des rôles dans ce processus [Nolz JC et al. 2006].

5-4-4. L'actine et les réponses du cytosquelette (voie Rac)

Quand une cellule T rencontre un antigène associé à une CPA, les signaux du TCR initient un programme de réarrangements cyto-squelettiques de l'actine à l'origine de la polarisation de la cellule T [Burkhardt JK et al. 2008]. La réorganisation de l'actine est essentielle pour la fonction cellulaire T si bien que les inhibiteurs de la polymérisation de l'actine empêchent l'interaction cellule T/CPA et abolissent les signaux proximaux du TCR [Holsinger et al. 1998]. La conjugaison TCR/CPA favorise des changements morphologiques qui induisent une accumulation d'actine filamenteuse (F-actine) à l'interface de stimulation.

Ces changements sont liés à l'augmentation de la fluidité de la membrane plasmatique et à une diminution de la mobilité de la cellule. L'arrêt de la motilité est associé à une phosphorylation Ca^{2+}-dépendante et à la désactivation de la protéine MyH9. Cependant la voie de signalisation liant le TCR à cet évènement n'est pas précisément définie [Jacobelli J et al. 2004].

La fluidité membranaire est augmentée par la déphosphorylation transitoire, dépendante du TCR et de Vav1, des protéines ERM (ezrine, radixine, et myosine) entraînant la perte de leur capacité à lier la membrane plasmatique au cytosquelette d'actine [Faure S et al. 2004].

La signalisation par le Ca^{2+} et l'activation des intégrines après l'engagement du TCR entraînent des modifications additionnelles des protéines associées à l'actine qui peuvent jouer un rôle en altérant la rigidité de la membrane plasmatique [Burkhardt JK et al. 2008].

L'accumulation de F-actine à l'interface cellule T/CPA est le résultat d'une activation localisée, induite par le TCR, de multiples voies de régulation et de polymérisation de

l'actine, la plus étudiée impliquant le complexe des protéines 2/3 liées à l'actine (Arp 2/3) mais d'autres voies indépendantes contribuent aussi à ce processus [Gomez TS et al. 2007].
L'activation de Arp 2/3 nécessite une interaction avec des facteurs promoteurs de nucléation incluant les protéines WASp, WAVE2 et HS1.
WASp est recrutée au site d'activation du TCR à travers son interaction avec la protéine d'adaptation Nck associée à SLP-76. WASp est activée via une stimulation dépendante de la GTPase Cdc42 appartenant à la famille Rho [Zeng R et al. 2003]. L'activation médiée par Vav-1 d'une seconde GTPase de la famille Rho, Rac1, entraîne l'activation de WAVE2 [Burkhardt JK et al. 2008].
Il est probable que d'autres GEFs que Rac1 et Cdc42 interviennent dans les changements de l'actine induits par le TCR [Miletic AV et al. 2006].
L'activation de la cellule T en réponse à une CPA entraîne également la polarisation de la cellule T, si bien que le MTOC se dirige vers le site de contact cellule T/CPA [Kupfer A et al. 1987]. Bien que la polarisation du MTOC ait longtemps été observée comme le signe d'une liaison effective cellule T-CPA, les mécanismes de signalisation responsables de ce mouvement restent mal compris.
Le mouvement du MTOC apparaît essentiel pour la formation de la synapse immunologique (SI) [Yokosuka T et al. 2005, Varma R et al. 2006b, Campi G et al. 2005].

De manière opposée au MTOC et à la SI, une autre structure ordonnée se forme, connue comme le complexe du pôle distal (DPC). Bien que son rôle ne soit pas très clair, le DPC pourrait favoriser la séquestration des régulateurs négatifs afin de les maintenir à l'écart du complexe d'activation du TCR [Burkhardt JK et al. 2008].
De plus, le DPC peut contribuer à la polarisation de molécules de signalisation clés qui pourraient être requises pour différencier activités de mémoire ou effectrice dans les cellules récemment divisées [Chang JT et al. 2007]. La formation de ce complexe est dépendante de la F-actine et de la re-phosphorylation des protéines ERM qui migrent au pôle distal liant les molécules de signalisation au cytosquelette [Allenspach EJ et al. 2001].

Les cascades de signalisation du TCR et les voies de la réorganisation de l'actine sont interconnectées et difficiles à étudier séparément car beaucoup de molécules impliquées ont de multiples fonctions adaptatrices et enzymatiques. Les signaux WASp, WAVE2 et Vav-1

sont également impliqués dans des rôles indépendants des réponses de l'actine [Reynolds LF, et al. 2005, Nolz JC et al. 2007, Zhang W et al. 1999]. De plus l'altération des molécules régulatrices de l'actine entraîne des défauts de signalisation du complexe TCR [Billadeau DD et al. 2007].
D'autres études semblent nécessaires pour comprendre les mécanismes d'interdépendance entre les dynamiques du cytosquelette et l'activation cellulaire T.

5-4-5. La co-stimulation

L'activation optimale des lymphocytes T nécessite au moins 2 signaux. Un premier est délivré par le complexe TCR/CD3 après la reconnaissance de l'antigène. Des signaux additionnels de co-stimulation sont délivrés par l'engagement de récepteurs de co-stimulation comme le CD28 [Smith-Garvin et al. 2009].
Les voies de co-stimulation les mieux caractérisées sont médiées par un ensemble de molécules de co-stimulation appartenant à la superfamille de CD28, incluant les récepteurs CD28, CTLA4, ICOS, PD1 et BTLA. Ces protéines délivrent des seconds signaux à la fois négatifs et positifs aux cellules T en interagissant avec la famille des ligands B7 exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes. [Acuto O Nat Rev Immunol 2003 , Slavik et al 1999, Alegre et al 2001, Fife BT et al. Immunol Rev 2008].

Dans les cellules T naïves, la co-stimulation CD28 améliore l'entrée dans le cycle cellulaire, stimule potentiellement l'expression de l'IL-2 et de son récepteur, et stimule l'activation d'un programme anti-apoptotique. CD28 s'engage avec un ou tous les membres de la famille des récepteurs B7, B7.1 et B7.2. Après la liaison au ligand, les tyrosines et les motifs riches en proline présents à l'extrémité cytoplasmique du CD28 sont phosphorylés par Lck ou Fyn.
Le CD28 recrute et induit une phosphorylation et une activation d'un ensemble plus restreint de composants de signalisation intracellulaires comme les protéines PI3K, Vav-1, Tec et les kinases ITK, AKT et l'adaptateur Dok-1 [Michel F, Sci STKE 2002].

5-5 La théorie des microsclusters et la synapse immunologique

Il y a quelques années, plusieurs travaux ont montré qu'une jonction spécialisée entre le lymphocyte T et la CPA constituait une étape importante de l'activation lymphocytaire T [Monks et al. 1998, Revy et al. 2001 - figure 17].

Les études d'imagerie en microscopie confocale ont montré une remarquable organisation moléculaire au sein de la SI [Monks et al. 1998, Grakaoui et al. 1999, Bromley et al. 2001, Cemerski et al. 2006]. Sa formation se fait en quelques dizaines de minutes et aboutit à la SI dite « mature ».

La SI est composée de 3 régions concentriques basées sur leur composition moléculaire :

- la c-SMAC riche en TCR, en molécules CD4 ou CD8 et en molécules de co-stimulation (CD28).
- la p-SMAC entourant la c-SMAC, riche en intégrines comme LFA-1 [Monks et al. 1998, Grakaoui A et al. 1998].
- Une troisième région appelée d-SMAC est riche en volumineuses molécules comme CD43 ou CD45.

Avec la formation de la synapse, le TCR initialement à l'extérieur est transporté au centre dans la c-SMAC tandis que LFA1 initialement au centre est transporté à l'extérieur pour former la p-SMAC, aboutissant à la formation de la synapse « mature » [Grakaoui et al. 1999].

Dans les premières études, la formation de la SI semblait être une étape clé dans l'activation lymphocytaire T et on pensait que la c-SMAC était le lieu de l'engagement des récepteurs et de prolongement du signal [Monks et al. 1998, Revy et al. 2001, Marko et al. 2007].

Mais des résultats récents suggèrent que les événements d'activation sont déclenchés avant la formation de la synapse par la formation de « microclusters » de TCR qui vont se concentrer ultérieurement dans la c-SMAC où ils subiront une endocytose [Purtic et al 2005, Saito et al. 2006, Varma et al. 2006, Seminario et al. 2008].

En effet l'observation d'activation cellulaire par des CPA fixées [Allen PM et al. 1984], et de la lenteur de la formation d'une SI alors que des signaux dépendants du TCR peuvent être rapidement initiés par des petites surfaces de contact [Lee KH et al. 2002], conduisent à écarter la théorie de la SI comme un pré-requis pour l'activation de la cellule T. De plus

certaines sous-populations de lymphocytes T peuvent être activées en l'absence de c-SMAC [Balamuth F et al. 2001]. Dans les études de Lee et al, utilisant des techniques d'immunofluorescence, la phosphorylation des tyrosines induite par le TCR culmine en périphérie de la synapse et est absente de la c-SMAC qui se développe en une demi-heure [Lee KH et al. 2002]. De plus, Lee et al. ont démontré que des cellules T mutantes n'arrivant pas à former des synapses bien séparées sont «hyper répondeuses» à une stimulation antigénique [Lee KH et al. 2003].

D'autres études ont montré que le signal d'activation précédait la formation de la c-SMAC et la c-SMAC serait principalement le lieu de dégradation du TCR [Lee KH et al. 2002].
Dans une nouvelle approche impliquant des bicouches lipidiques patternées, Mossman et al. ont démontré que des barrières mécaniques au mouvement des microclusters de TCR, favorisaient l'activation cellulaire T [Mossman et al. 2005].
Plus récemment il a été proposé que la SI soit à la fois le lieu d'augmentation du signal TCR et son lieu de dégradation, et l'équilibre entre ces 2 processus serait déterminé par la qualité de l'antigène de telle façon que la c-SMAC puisse servir à amplifier des signaux agonistes faibles [Cemerski S et al. 2006, Figure 18].
Enfin une nouvelle sous-région de la c-SMAC riche en molécules CD28 et en PKCθ mais relativement dépourvue en TCR, a été décrite, soulignant l'importance potentielle de la c-SMAC pour la transduction du signal des molécules de co-stimulation [Yokosuka T et al. 2005].

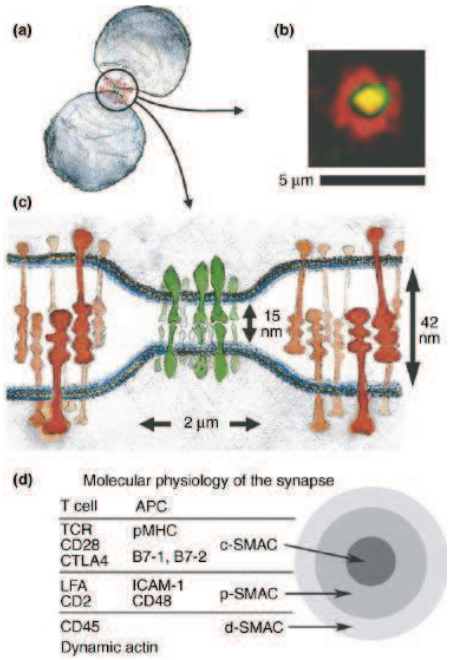


Figure 17 : Organisation de la synapse immunologique – d'après JT Groves Curr opin Immunol 2006

(a) Jonction schématique entre une cellule T et une CPA
(b) Image fluorescente d'une SI entre une cellule T et une membrane de support servant de substitut de CPA. ICAM-1 est coloré en rouge, et occupe la p-SMAC, alors que le TCR (en vert) et le MHC (jaune) se co-localisent dans la c-SMAC.
(c) Coupe schématique verticale de la SI, illustrant les espaces intermembranaires dans les régions de la c-SMAC et de la p-SMAC
(d) Plan schématique de la physiologie moléculaire de la synapse, résumant la localisation des protéines clés.

Ainsi, il est maintenant bien accepté que l'initiation des signaux TCR prend naissance dans des microclusters périphériques qui se forment avant la SI [Seminario MC et al. 2008, Dustin ML 2008, Saito et al. 2006]. La liaison p-MHC/TCR entraine la formation de microclusters intracellulaires qui contiennent le complexe TCR et ses molécules de signalisation associées dont ZAP-70, GRB2, LAT et SLP-76. [Bunnel SC et al. 2002]. Ces microclusters de signalisation sont recrutés en 2 sec. Ils initient et peuvent soutenir les signaux Ca^{2+} en transmettant les signaux nécessaires à l'activation cellulaire T par l'assemblage des complexes de signalisation [Yokosuka T et al. 2005]. Ces clusters persistent une courte durée après quoi ils convergent vers la c-SMAC [Yokosuka T et al. 2005, Varma R et al. 2006]. La formation et la translocation de ces clusters sont dépendantes de la dynamique de la F-actine, et de nouveaux clusters continuent à se former même après que la synapse mature a été établie [Yokosuka T et al. 2005, Varma R et al. 2006b, Campi G et al. 2005].

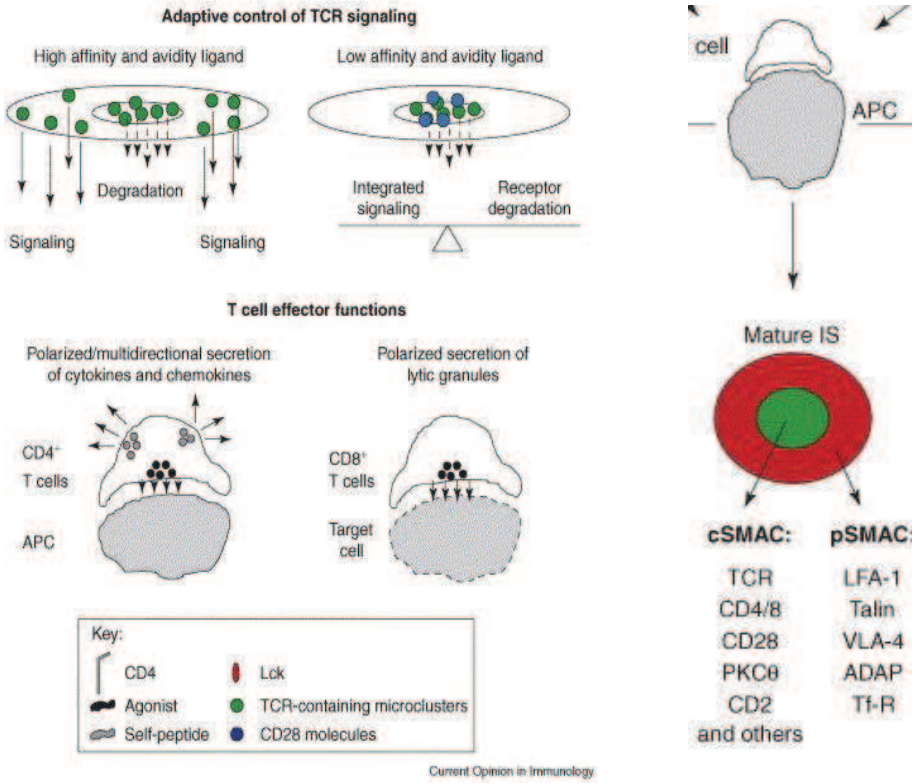


Figure 18 : Mécanismes de formation aboutissant à la formation de la SI- D'après Cemerski et al. Curr Opin Immunol 2006.
En haut à gauche : Schéma de la SI comme un régulateur de l'activation cellulaire T qui dépend de la régulation de la balance entre la signalisation induite par le TCR et la dégradation du TCR au sein de la SI. Avec des ligands d'affinité élevée, la c-SMAC favorise surtout la dégradation du TCR. Pour des ligands de faible affinité, la formation de la c-SMAC en augmentant la densité des récepteurs et des ligands, augmente l'occupation des récepteurs, favorisant la signalisation du TCR.
En bas à gauche : Dans les cellules CD4, la SI favorise la sécrétion polarisée de cytokines telles que l'IL-2 ou l'IFN-γ (en noir) alors que d'autres cytokines comme le TNF ou l'IL-4 sont sécrétées d'une manière multidirectionnelle.
A droite : Schéma de la SI mature et répartition de ses composants.

En résumé, les complexes de signalisation dépendants du TCR initiés à la périphérie du contact sont transloqués vers la c-SMAC et s'arrêtent à cette destination. Ainsi la synapse dite « mature » semble plus importante pour la régulation que pour le déclenchement des évènements de signalisation qui se situent en amont de la formation de la synapse [Purtic et al 2005, Saito et al. 2006, Seminario et al. 2008].

II - Immunité du sujet âgé ou immunosénescence

Le système immunitaire subit des altérations fonctionnelles avec l'âge concomitantes de la diminution de volume de tous les organes lymphoïdes. Ce déclin du système immunitaire avec l'âge, appelé immunosénescence, correspond à un état de dysrégulation affectant de multiples niveaux de réponses immunitaires et contribuant à une augmentation de la susceptibilité des sujets âgés aux maladies infectieuses, à l'auto-immunité, au cancer et à la baisse de la réponse vaccinale [Aw et al. 2007, Bürkle A, et al. 2007, Lesourd B 2004].

L'immunosénescence n'est pas une détérioration immunitaire inévitable et progressive mais plutôt un remodelage où certaines fonctions sont réduites alors que d'autres sont conservées voire augmentées [Burkle et al. 2007, Gomez et al. 2005, Hodes et al. 2005, Lesourd B. 2004]. Ainsi l'altération des immunités innée et adaptative induit des déficits dans la production des réponses immunitaires adaptées contre les pathogènes et après vaccination, favorisant la vulnérabilité des sujets âgés contre un nouvel agent infectieux et la recrudescence d'infections virales et bactériennes [Schmader et al.1999, Webster et al. 2000, Hodes et al. 2005, Gomez et al. 2005, Akha et al. 2005, Silva et al. 2007].

Le vieillissement immunitaire est également marqué par un emballement plus important des cytokines de l'inflammation notamment après un épisode infectieux [Douziech et al. 2002, Gomez et al. 2005, Silva et al. 2007] et pourrait contribuer à l'augmentation de la fréquence des maladies dégénératives cérébrales [Vitte et al. 2004, Perry et al. 2007].

L'impact de ces changements liés à l'âge dans le système immunitaire n'était pas une priorité tant que l'espérance de vie de l'homme était de 40 ans. Cependant le doublement de l'espérance de vie durant les 150 dernières années, grâce aux progrès médicaux, sanitaires et nutritifs, impose au système immunitaire d'être performant 40 années supplémentaires [Aw et al. 2007].

L'étude de l'immunosénescence chez l'homme nécessite une approche clinique rigoureuse incluant des sujets en très bonne santé, en appliquant par exemple les critères stricts définis par le SENIEUR protocole [Ligthart GJ, et al. 1984, Annexe 1]. Ces critères excluent les pathologies telles que infections, maladies inflammatoires, tumeurs malignes, désordres auto-immuns, anomalies biologiques et traitements pouvant influencer l'immunité (corticoïdes,

anti-inflammatoires…). L'application de ces critères stricts permet d'étudier en théorie le vieillissement physiologique mais exclue 90% des sujets âgés de 65 ans ou plus [Wick G et al. 1997, Rowe JW et al. 1998].

La sélection d'une population de référence pour l'étude de l'immunosénescence, selon les critères du « Senieur protocol » a permis de préciser les déficits immunitaires liés à l'âge et de les différencier des déficits intriqués à la pathologie du sujet âgé [Ligthart et al. 1984, Annexe 1].

Dans ces études, le test de référence fréquemment utilisé était le test de prolifération cellulaire en présence de mitogènes en particulier à la PHA. Une constatation fréquemment retrouvée était une diminution des réponses prolifératives aux mitogènes avec le vieillissement [Krause et al.1999, Douziech et al. 2002] bien qu'une étude n'ait pas retrouvé de différence significative entre sujets jeunes et âgés sains [De Greef et al.1992].

Cependant au cours du vieillissement se cumulent les effets du vieillissement physiologique (appelé immunosénescence) et du vieillissement pathologique [Lesourd B 2004] et l'exclusion de sujets âgés fragiles peut limiter la compréhension des mécanismes de vulnérabilité aux infections, dans une population à risque, avec des maladies chroniques sous-jacentes. Il est donc essentiel de connaître les intrications de la pathologie et du système immunitaire.

Pour simplifier la compréhension des phénomènes complexes impliqués dans l'immunosénescence, nous soulignerons successivement les altérations des barrières cutanéo-muqueuses, des cellules souches hématopoïétiques, des immunités innées et adaptatives ainsi que les conséquences cliniques potentielles de l'immunosénescence.

Mais les différents niveaux de réponse immunitaire sont intimement liés, le système immunitaire spécifique étant dépendant de l'intégralité fonctionnelle du système immunitaire inné, sans lequel les cellules présentatrices d'antigène ne pourraient apprêter l'antigène pour le présenter sous une forme stimulante aux les cellules T.

De plus, l'immunité humorale est dépendante d'une réponse cellulaire T correcte pour la génération, la différenciation des cellules B et la production d'anticorps [Burkle et al. 2007].

Nous verrons ensuite les intrications potentielles de l'immunosénescence avec les pathologies chroniques et infectieuses, avec la transplantation rénale et les réponses vaccinales.

1- Anomalies biologiques liées à l'immunosénescence

1-1. Atteintes des barrières cutanéo-muqueuses

Le vieillissement est associé à une altération des barrières épithéliales de la peau, des poumons et du tractus gastro-intestinal, qui favorise l'invasion de ces tissus muqueux fragiles par des organismes pathogènes [Gomez et al. 2005]. Les infections peuvent également être favorisées par des anomalies mécaniques du trafic muco-ciliaire au niveau des muqueuses respiratoires ou encore d'obstacles situés sur les voies urinaires (adénome prostatique) [Cogné 2005].

1-2. L'activité des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques ont la capacité de se différencier en différentes cellules du sang circulant et celle de se renouveler. Le nombre de cellules souches CD34+ décline dans le sang périphérique avec une diminution de leur capacité à s'auto renouveler et à adhérer à l'environnement stromal de la moelle osseuse avec l'âge [Franceschi C, et al. 1999]. Ces anomalies sont également associées à une altération de leur programme de différentiation hématopoïétique avec une réduction de leur capacité à s'orienter vers la lignée lymphoïde alors que l'on note une augmentation du potentiel myéloïde [Aw et al. 2007].

1-3. Cellules de l'immunité innée

Elles représentent la première ligne de défense en étant responsables de la destruction spontanée de nombreuses bactéries, de cellules infectées par des virus et de certaines cellules tumorales.
Le système immunitaire inné a également un rôle important dans l'immunité adaptative [Gomez et al. 2005].

Les polynucléaires neutrophiles voient leurs capacités fonctionnelles diminuer en particulier leur capacité phagocytaire, de chimiotactisme et une diminution de leur production d'anions

superoxyde en réponse à certains facteurs solubles et aux produits bactériens (GM-CSF, LPS, fMLP) [Fulop et al. 2004, Gomez et al. 2005, Aw et al. 2007, Pawelec et al. 2007, Bongrand P et al. 1984, Panda A, et al. 2009]. L'environnement joue probablement un rôle important dans l'activité fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles. Ainsi des sécrétions de cortisol engendrées dans certaines situations de stress et non compensées par la sécrétion de DHEAS diminuant avec l'âge, pourraient favoriser la dysfonction des polynucléaires neutrophiles [Aw et al. 2007, Butcher et al. 2005].

Les CPAs sont responsables de l'apprêtement de l'antigène c'est-à-dire de sa capture, et de sa présentation aux récepteurs antigéniques sur les cellules T en association avec des épitopes distincts du CMH. Les cellules dendritiques sont des CPAs «professionnelles». Elles servent de sentinelles dans les tissus pour optimiser la capture des antigènes puis migrent dans les organes lymphoïdes pour optimiser la sélection clonale des cellules T CD4+ et CD8+.
Les anomalies des cellules dendritiques sont discrètes avec une légère diminution de leur nombre et une capacité légèrement diminuée à stimuler la sécrétion d'IFN γ par les cellules T et à stimuler la sécrétion d'IL-2 par rapport aux cellules dendritiques de sujets jeunes [Pawelec et al. 2007].
On note en effet quelques changements dans la communication entre cellules dendritiques et cellules T qui pourraient probablement avoir un impact sur les déficits cellulaires T au cours de l'immunosénescence. L'expression de molécules de co-stimulation peut être altérée et de ce fait, altérer la production de cytokines par les cellules dendritiques, celles-ci régulant et influençant les fonctions effectrices du lymphocyte T. L'ampleur de ce trouble de communication entre cellules est probablement majorée dans les pathologies chroniques avec une altération de la capacité des cellules dendritiques à se différencier après interaction avec des cellules T [Castle SC 2000]. Cela pourrait s'expliquer par une diminution de production du GM-CSF chez les sujets âgés, un facteur de croissance clé pour les cellules dendritiques [Pawelec G 1999]. Il semble toutefois exister une augmentation de leur fonction chez le sujet âgé en bonne santé et au contraire une dysfonction chez le sujet âgé fragile [Martins et al. 2005].
Les cellules NK n'ont pas besoin d'une sensibilisation antigénique pour lyser les cellules cibles (cellules tumorales ou infectées par des virus). Leur activité fonctionnelle de base diminue avec l'âge avec une baisse de leur fonction essentielle de cytotoxicité et une

diminution de la réponse à la stimulation par l'IL-2 [Pawelec et al. 2007, Burkle et al 2007] ainsi qu'à d'autres cytokines stimulantes comme l'IL-12, L'IFN-α , l'IFN-β et l'IFN-γ [Panda A, et al. 2009, Castle SC 2000]. Le raccourcissement télomérique pourrait également jouer un rôle dans la diminution de leur activité [Pawelec et al. 2007]. Mais cette baisse de l'activité lytique est compensée par l'augmentation du nombre de cellules NK si bien que globalement l'activité des cellules NK varie peu avec l'âge [Burkle et al. 2007].
De plus les cellules NK de sujets centenaires peuvent migrer parfaitement en réponse à des stimuli chimiotactiques et peuvent tuer des cellules cibles comme les cellules de sujets jeunes [Ginaldi L et al. 1999]. Leur nombre absolu et/ou leur activité pourrait avoir un impact sur la sévérité des infections et le taux de mortalité [Ginaldi L et al. 1999a, Ogata K et al. 1997, Franceschi C et al. 1995, Cossarizza A et al. 1997].

Les macrophages jouent probablement un rôle central dans l'immunité innée allant de la phagocytose à la destruction en passant par la production de cytokines qui régule l'activité d'autres cellules de l'immunité innée. Bien que leur nombre ne soit pas modifié au cours du vieillissement, leurs activités de phagocytose et de chimiotactisme sont diminuées [Gomez et al. 2005, Aw et al. 2007]. Leur capacité à produire certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-8 et le TNFα augmente avec l'âge et ces sécrétions sont amplifiées chez le sujet âgé qui exprime des réponses inflammatoires prolongées [Panda A et al. 2009]. L'équilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires pourrait être utilisé comme un profil pour indiquer la fragilité et la mortalité des sujets âgés [Van Der Biggelaar et al. 2004].
Cependant l'immunité naturelle est globalement peu altérée par rapport aux modifications plus profondes affectant l'immunité cellulaire acquise [Martin et al. 2005].

1-4. Cellules de l'immunité spécifique

1-4-1. Modifications de l'immunité humorale

Au cours du vieillissement, on note une diminution de la fréquence et du nombre absolu de lymphocytes pro-B dans la moelle et de leur capacité à se différencier en lymphocytes pré-B (diminution de 60 à 90%). Cependant le nombre de cellules B périphériques reste à peu près

constant car la balance des cellules B mémoires- B naïves est modifiée avec une accumulation de cellules B mémoires au phénotype CD19+CD27+ malgré un renouvellement diminué des cellules naïves B [Aw D et al. 2007].

On ne note pas de diminution de la production des immunoglobulines avec l'âge mais plutôt un taux sérique stable voire une augmentation des taux sériques d'IgA et d'IgG [Lesourd B 2004, Moulias S 2002]. Les déficits en sous-classes d'IgG sont rares excepté le déficit en IgG4 alors que les taux d'IgG1, d'IgG2, et d'IgG3 augmentent [Lesourd B 2004, Ginaldi L, 1999,b].

En revanche le répertoire antigénique des lymphocytes B est altéré avec une diminution de l'hétérogénéité de la réponse anticorps et de la capacité à former des anticorps d'affinité élevée vis-à-vis des antigènes [Lesourd B 2004, Aw D et al 2007, Pawelec et al. 2008]. De plus, les lymphocytes B de sujets âgés ont altération de leurs capacités de prolifération et d'activation. L'atteinte humorale concerne surtout les réponses primaires pour lesquelles les cellules B sont dépendantes de la coopération avec les cellules T alors que les réponses humorales secondaires restent conservées.

Les fonctions humorales sont marquées par une perte d'acuité dans la distinction soi/non-soi (ou reconnaissance des signaux de danger). On observe l'augmentation oligoclonale d'une sous-population de lymphocytes B exprimant CD5+, ayant la capacité de produire des Ac de faible affinité, indépendamment des cellules T [Aw D et al. 2007, Pawelec et al. 2008, Cogné 2005]. Ils favorisent l'émergence de certains clones CD5+ à l'origine d'hémopathies lymphoïdes comme les leucémies lymphoïdes chroniques ainsi que la production d'immunoglobulines monoclonales à l'origine de gammapathies monoclonales [Cogné 2005, Cossarizza A et al. 1997]. Ces gammapathies monoclonales peuvent correspondre à d'authentiques myélomes ou à des MGUS présentes chez 10 % des sujets de plus de 80 ans correspondant à d'authentiques états pré-myélomateux [Landgren 0 et al. 2009] mais avec un risque de transformation relativement faible (1% par an) [Cogné et al 2005].

Ces immunoglobulines monoclonales peuvent également avoir des actions pathogènes par des activités auto-Ac (type agglutinine froide, cryoglobulinémie, facteur rhumatoïde ou anti-MAG) ou par la formation de dépôts tissulaires de certaines chaînes légères monoclonales (amylose AL) [Cogné M 2005].

On note également avec le vieillissement de l'immunité humorale des stigmates d'auto-immunité chez 10 à 20% des sujets après 60 ans avec présence de facteur rhumatoïde (présent

chez 14% de sujets âgés contre 2% des sujets jeunes), d'Ac anti-nucléaires (présents chez 18% des sujets âgés versus 4% des sujets jeunes), antiphospholipide, antithyroglobuline, anti-cellules pariétales. Ces auto-Ac n'ont pas forcément de traduction clinique sauf pour trois pathologies relativement fréquentes chez le sujet âgé : l'anémie de biermer, les dermatoses bulleuses et les thyroïdites auto-immunes. Ainsi la valeur prédictive des tests d'auto-immunité est étroitement liée au contexte clinique, surtout chez le sujet âgé [Cogné et al 2005].

L'expansion oligoclonale de lymphocytes B CD5+ n'est pas la seule impliquée dans les manifestations d'auto-immunité chez le sujet âgé. L'altération fonctionnelle des cellules T et de leur fonction suppressive pourrait favoriser la réactivation de «clones T oubliés». On note également avec l'âge une diminution de l'activité suppressive d'une population connue comme essentielle dans la prévention de manifestations auto-immunes, la population T régulatrice CD4+CD25+.

Malgré toutes ces données, les principaux changements observés dans l'immunité humorale sont dus aux perturbations de la collaboration T-B chez le sujet âgé [Pawelec et al. 2008]. En effet, le déclin de l'expression du CD40L par les lymphocytes T a un rôle non négligeable dans le déclin de l'activation des lymphocytes B. Les cytokines IL-2, IL-4 et IL-5 produites par les lymphocytes T activés favorisent des étapes variées de l'activation des lymphocytes B comme la prolifération et la différenciation en plasmocytes sécrétant des Ac. La diminution de la production d'IL-2 avec l'âge peut favoriser la baisse de la coopération des lymphocytes T dans la production d'Ac par les lymphocytes B [Ginaldi L et al. 1999b, Ginaldi L et al. 2001].

1-4-2. Modifications de l'immunité cellulaire

Les changements les plus marqués de l'immunosénescence affectent les fonctions lymphocytaires T [Akha et al. 2005, Marko et al. 2007]. Les réactions d'hypersensibilité cutanée (de type réaction tuberculinique) sont classiquement diminuées vis-à-vis des antigènes rencontrés dans le passé.

Une des manifestations anatomiques les plus évidentes du vieillissement immunitaire est l'involution précoce du thymus, organe de différenciation des cellules T qui n'existe que sous forme de reliquat chez les sujets de plus de 50 ans [Akha et al. 2005, Marko et al. 2007].

Le thymus est le premier site de développement des cellules T, générant des cellules T immunocompétentes, tolérantes pour elle-mêmes, et restreintes au complexe majeur

d'histocompatibilité. L'involution thymique correspondant à une diminution de l'espace épithélial thymique et du nombre de progéniteurs épithéliaux thymiques et à un déclin dans la capacité du thymus à générer des thymocytes double positifs.

Chez l'homme, l'involution thymique débute à 9 mois et subit plusieurs phases de régression rapide (à moins de 10 ans puis entre 10 et 25 ans puis après 40 ans). Cependant, les mécanismes contrôlant ce processus restent obscurs. Ils pourraient résulter du changement de facteurs solubles, d'hormones et d'altérations du micro-environnement thymique. Ce processus d'involution thymique est sans doute multifactoriel et a des répercussions sur les cellules T périphériques [Pawelec et al. 2008, Goronzy et al. 2005].

Les variations du nombre de lymphocytes T CD3, CD4 et CD8 sont discutées avec une diminution pour certains auteurs [Lesourd B 2004, Ginaldi L et al. 2001] et un nombre peu variable pour d'autres [Burkle et al. 2007]. Cependant la baisse du nombre de lymphocytes n'est pas proportionnelle à l'involution thymique, ce phénomène s'expliquant probablement par la production extra-thymique de lymphocytes T matures [Hakim FT et al. 1997, Mackall CL et al. 1995, Mackall CL et al. 1997 (a, b)].

Le vieillissement est responsable d'une baisse des capacités prolifératives des lymphocytes T et leur degré de réponse serait corrélé à l'âge [Ginaldi L et al. 2001]. Mais ce phénomène n'est pas constant, les lymphocytes de centenaires en bonne santé répondent bien à des stimuli immunologiques comme les Ac anti-CD3 [Sansoni P et al. 1997] et ont une réponse à la PHA retardée mais quantitativement non altérée [Monti et al. 1992]. De même, des études ont montré chez des sujets de 80 ans, en excellent état de santé, des réponses prolifératives comparables à celles de sujets de 20 ans [Lesourd B 2004, Mazari et al. 1998]. Il pourrait y avoir un lien entre longévité et réponses prolifératives mais des études longitudinales sont nécessaires [Lesourd B 2004].

Deux autres phénomènes touchant l'immunité cellulaire sont liés : la sénescence réplicative qui limite l'expansion clonale T [Effros RB et al. 2004] et le raccourcissement des télomères. La longueur des télomères est un indicateur de la sénescence réplicative et le raccourcissement des télomères dans le sang périphérique d'individus âgés est associé à une diminution de la survie et à une augmentation de la mortalité par maladie cardiaque et infection [Cawthorn RM et al. 2003]. Le raccourcissement des télomères leucocytaires est inversement associé aux niveaux plasmatiques de facteur Willebrand [Hjelmborg et al. 2010]. Les études montrent une diminution de la longueur des télomères dans les cellules T et les

cellules B sans modification de l'activité télomérase [Effros RB et al. 2004]. Ce raccourcissent télomérique ne se produit pas à un taux constant mais semble plus rapide dans les 2 ou 3 premières décades de la vie et ne se produit pas dans toutes les cellules immunitaires [Franceschi C et al. 1999].

Le second phénomène correspond à des changements des populations lymphocytaires T avec le passage progressif d'un état ou les cellules naïves dominent à un état où dominent les cellules mémoires [Akha et al. 2005, Burkle et al. 2007, Haynes et al. 2005, Kudlacek et al. 2000, Pawelec et al. 2008].

Malgré les divergences sur le nombre total de lymphocytes, on note tout au long de la vie des modifications des sous-populations de cellules T avec une diminution progressive des lymphocytes T naïfs CD4 et CD8 qui doivent survivre sur une période de plusieurs décennies surtout lorsque l'on considère les centenaires [Burkle et al. 2007].

La diminution du renouvellement des cellules naïves comblée par une prolifération accrue de cellules mémoires répond probablement à un phénomène d'homéostasie. Ainsi on note une proportion de 40% de cellules T mémoires à 20 ans contre 60% à 65 ans [Burkle et al. 2007] et 90% vers 80 ans [Lesourd B et al. 1999, Lesourd B 2004].

En outre, les cellules mémoires produites chez le sujet âgé ont des capacités prolifératives diminuées [Akha et al 2005, Haynes et al. 2005, Pawelec et al. 2008].

On observe également au cours du vieillissement une diminution du rapport CD4/CD8 [Cogné 2005].

La diminution du pool de lymphocytes T CD4+ s'accompagne d'une orientation de la réponse TH1 vers la réponse TH2 anti-inflammatoire mise en évidence par une augmentation de la production d'IL-10 ainsi que d'une diminution de la production d'IL-2, de l'expression du récepteur à l'IL-2, d'une augmentation de la production d'auto anticorps [Lesourd B 2004, Pawelec et al. 1999, Castle et al. 2000, Burns EA et al. 1997, Castle et al. 1997, Castle et la. 1999].

Par ailleurs, certains pools cellulaires diminuent comme les cellules CD8+CD28+ avec augmentation progressive des lymphocytes T mémoire CD8+CD28- [Burkle et al. 2007]. La perte de l'expression du récepteur majeur de co-stimulation CD28 se produit essentiellement dans la population CD8+. Les lymphocytes CD8+CD28- ont une réduction progressive des télomères et une capacité réduite de réplication [Burkle et al. 2007, Aw et al. 2007, Weng N et al. 2009, Chen WH et al. 2009]. Ils portent des marqueurs d'activité cytotoxique et ont un

phénotype comparable à des cellules mémoire. Les cellules T CD8+CD28- représentent plus de 50% des lymphocytes T CD8 périphériques comparées à moins de 20% des lymphocytes T CD4 périphériques chez les sujets âgés [Chen WH et al. 2009].
Ces cellules CD8 de sujets âgés ont également une tendance exagérée à la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ, IL-2, TNF) et sont produites dans un environnement pro-inflammatoire, les infections persistantes favorisant leur accumulation.

L'augmentation des lymphocytes TCD8+CD28- est responsable de la présence de lacunes dans le répertoire T avec représentation inégale des clones et accumulation de clones de cellules mémoire CD8+ spécifiques d'infections persistantes comme l'Epstein Barr Virus et le CMV. La proportion de cellules CD8+CD28-CD57+ augmente avec l'âge, ces cellules caractérisant des clones spécifiques du CMV. Il a été suggéré que l'infection à long terme avec le CMV accélérait les altérations liées à l'âge dans la composition du répertoire T. Dans tous les groupes d'âge, l'infection latente à CMV est typiquement accompagnée d'une diminution des cellules T naïves et d'une accumulation simultanée de cellules T effectrices [Appay Vet al. 2002, Looney RJ et al. 1999, Kuijpers et al. 2003, Khan N et al. 2002].
Le rôle de l'infection à CMV est probablement non négligeable dans le vieillissement immunitaire en détournant l'action du système immunitaire et en participant à l'état inflammatoire chronique du sujet âgé communément appelé « inflamm ageing » et caractérisé par l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNFα) et de paramètres de l'inflammation (augmentation de la protéine-C-réactive et des facteurs de la coagulation) [Schmaltz et al. 2005]. On note des taux d'immunisation contre le CMV de 80 à 90% dans la population âgée [Schmaltz et al. 2005, Pawelec et al. 2010, Derhovanessain et al. 2009].
Cependant de nombreuses questions restent non résolues sur le rôle précis du CMV dans le vieillissement et l'intérêt de son éventuelle éradication [Pawelec et al. 2010, Moss P 2010].

La baisse des cellules naïves de la sous-population T CD8+ pourrait expliquer la plus grande vulnérabilité des sujets âgés vis-à-vis des pathogènes intracellulaires, les cellules CD8+ jouant un rôle majeur dans les maladies infectieuses à germes intracellulaires ainsi que dans la surveillance anti-tumorale.

La capacité du thymus à assurer un répertoire diversifié cesse à partir de la 5ème décennie de la vie. La fin de la 7ème décennie de vie définit une période critique où l'homéostasie des cellules T n'est plus garantie et où l'on observe une rupture dans la diversité du répertoire des cellules naïves [Goronzy et al. 2005].

Le vieillissement s'accompagne également d'une baisse de l'expression du CD3 et de molécules d'adhésion à la surface des lymphocytes T [Ginaldi L et al. 2001]. La distribution des récepteurs de surface est influencée par des micro-domaines appelés « rafts lipidiques ». Avec le vieillissement, les modifications de la composition en cholestérol et en sphingolipide de la membrane pourraient altérer l'organisation de ces rafts lipidiques à la surface de la cellule T participant aux difficultés d'interaction avec la CPA, cet effet étant plus prononcé pour les cellules T CD4+. La reconnaissance de l'antigène notamment la formation de la SI est affectée par une diminution de la redistribution des protéines de signalisation clés [Tamir et al. 2000, Garcia et al. 2001]. La baisse de mobilité de ces molécules est en partie due à l'augmentation de la concentration de cholestérol de la membrane. L'augmentation du niveau de glycosylation des macromolécules à la surface des cellules T (CD43, CD45) avec le vieillissement, empêche l'accolement des cellules du fait de l'encombrement stérique et de leur charge négative. Le clivage de ces macromolécules peut restaurer des niveaux élevés de réponses cellulaires T chez des souris âgées [Akha et al. 2005]. La proportion de cellules capables de former une SI est ainsi diminuée [Akha et al. 2005, Fulop T et al. 1999].

Les voies de co-stimulation de l'allo-reconnaissance sont également altérées chez les sujets âgés. Les niveaux des molécules de co-stimulation CD28, CD40 et CD154 (CD40L) sont réduits alors que le niveau de CTLA4 (CD152), qui a un effet inhibiteur sur l'activation T, est augmenté.

On observe également des défauts de signalisation en réponse à certaines stimulations antigéniques : diminution de la réponse calcique, anomalies des phosphorylations, de la translocation des facteurs de transcription, de l'activation de la PKC, de la production de cytokines [Pawelec et al. 2008, Akha et al. 2005, Fulop et al. 2009]. Les altérations des seconds messagers incluant l'auto-phosphorylation de Lck et l'activation de ZAP-70 et de LAT, entraînent une baisse des facteurs de transcription, essentiellement le NF-κB qui a un rôle de pivot dans la régulation de la production de cytokines, expliquant en partie la

diminution de production d'IL-2 et une altération de la prolifération [Ponnappan U et al. 1999, Simons K et al. 1997, He HT et al. 2005]. Ces changements des seconds messagers peuvent être liés à des changements liés à l'âge de l'activité des phosphatases par modification du contenu lipidique des membranes cellulaires, ces modifications pouvant être reproduites dans les cellules T jeunes en augmentant le contenu en cholestérol de la membrane.

En conclusion, le vieillissement immunitaire cellulaire est un état caractérisé par une altération des réponses immunitaires adaptatives vis-à-vis des nouveaux pathogènes en particulier intracellulaires. Il se caractérise par une accumulation par expansion clonale, de cellules mémoires surtout cytotoxiques.

De ces données découlent certains marqueurs d'immunosénescence regroupés sous le concept de « phénotype à risque immunologique » ou « immune risk phénotype » (« IRP »)

« L' IRP » est décrit comme une augmentation des cellules CD8+CD28-CD57+ (associées à un portage chronique de CMV), un ratio CD4/CD8 inférieur à 1, une diminution des réponses prolifératives aux tests fonctionnels in vitro, et une sérologie CMV positive suggérant que la stimulation antigénique chronique à CMV est la cause de ces changements liés à l'âge [Wikby A et al. 2005]. L'IRP, associé à une augmentation de l'IL-6 et à la présence d'une atteinte cognitive, est un marqueur de mortalité et de fragilité [Olsson J et al. 2000, Wikby A et al. 2005].

1-5. Cytokines et vieillissement

Le profil des cytokines subit des modifications profondes au cours du vieillissement avec augmentation, de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1β, TNFα, IFNγ). Ces cytokines pro-inflammatoires favoriseraient l'émergence de diverses pathologies partageant une pathogénie inflammatoire, telles que la maladie d'Alzheimer, la polyarthrite rhumatoïde et l'athérosclérose [Aw D et al. 2007, Franceschi et al. 2000].

Ce statut « pro-inflammatoire » est prédictif de morbidité et de mortalité chez le sujet âgé. Il représente un des aspects fondamentaux de l'immunosénescence [Burkle et al. 2007].

2- Aspects cliniques de l'immunosénescence

L'immunosénescence est impliquée dans la recrudescence des infections du sujet âgé, dans l'efficacité des vaccinations et probablement dans la transplantation.
Les perturbations de l'immunité sont également impliquées dans la recrudescence de cancers chez le sujet par baisse de la « surveillance anti-tumorale » [Cogné 2005].

2-1. Immunosénescence et infection

Plusieurs études ont suggéré une association entre vieillissement immunitaire, morbidité et mortalité infectieuse chez le sujet âgé [Pawelec et al. 1999, Pawelec et al. 2008, Castle 2000].
Les infections des personnes âgées sont plus sévères, souvent létales, les présentations cliniques atypiques avec des symptômes non spécifiques rendant le diagnostic difficile et souvent retardé [Gavazzi et al. 2002, Ginaldi et al. 2001, Castle et al. 2000, Castle et al. 2005, Fagnono et al. 1999].
Ce sont surtout les micro-organismes à développement intra-cellulaire et/ou qui font appel à la protection par immunité cellulaire qui sont impliqués avec plus particulièrement des réactivations d'infections chroniques virales (herpès virus, varicelle –zona- virus), bactériennes (tuberculose), parasitaires ou mycosiques (candidose) et plus rarement d'infections opportunistes [Cogné 2005, Aubert et al. 2009].
Les modifications de l'immunité rendent plus difficiles la distinction entre tuberculose active (primo-infection ou réactivation) et séquelles.
Les manifestations grippales peuvent être plus sévères de même que les infections respiratoires qui augmentent en fréquence [Cogné 2005, Gavazzi et al. 2002]. Plus de 90% des 10.000 à 40.000 décès attribués à la grippe aux USA surviennent chez des patients de plus de 65 ans [Castle 2000]. Les infections bactériennes typiques comme les infections urinaires, septicémies, endocardites, infections des tissus mous et de la peau sont également un problème fréquent dans cette population. Avec le vieillissement, les réponses immunitaires contre les antigènes connus peuvent être conservées mais la capacité d'immunisation vis-à-vis de nouveaux antigènes décline significativement expliquant la plus grande sensibilité aux nouveaux pathogènes [Lesourd B 2004, Fulop et al. 2009, Katona et al. 2008].
Les centenaires en bonne santé semblent avoir des fonctions immunitaires relativement préservées, plus proches de celles du système immunitaire de sujets jeunes [Franceschi et al. 1995].

Le risque infectieux est également lié à l'état général du patient et à la présence de pathologies multiples et intriquées telles que démence, dénutrition. La dénutrition et les carences vitaminiques fréquentes chez le sujet âgé sont impliquées de façon nette dans la survenue d'infections [Cogné 2005].

2-2. Immunosénéscence et immunopathologie ou impact des maladies chroniques du sujet âgé sur l'immunité

L'impact de la polypathologie, fréquente chez le sujet âgé, est probablement plus important que celui de l'immunosénescence dans la fréquence et la gravité des épisodes infectieux du sujet âgé [Cogné 2005, High KP et al. 2004, Sehl ME et al. 2001]. La présence d'une ou deux maladies chroniques (emphysème, diabète, insuffisance rénale chronique) est associée à une augmentation de l'incidence des pneumonies à influenza virus de 40 à 150 fois [Burns et al. 1997]. L'étude de la charge des maladies chroniques sur l'immunité cellulaire T permet de mettre en évidence une relation inverse entre immunité et polypathologie [Castle et al. 2005]. La dénutrition et les carences vitaminiques fréquentes chez le sujet âgé sont impliquées de façon nette dans la survenue d'infections [Lesourd 2004 (a), Lesourd 2004 (b), Cogné 2005]. La malnutrition protéino-énergétique touche en moyenne 50% des patients âgés hospitalisés et 15 à 40% des sujets âgés vivant en EHPAD [Katona P et al. 2008]. Les cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages au cours d'un épisode infectieux entraînent un hypercatabolisme à l'origine d'une dénutrition endogène par mobilisation des réserves nutritionnelles de l'organisme (protéolyse, lipolyse, ostéolyse). Celles-ci ne seront pas reconstituées en l'absence de régime hyperprotidique, hypercalorique chez un sujet déjà fragilisé [Lesourd B et al. 2004 (a,b), Moulias S et al. 2002, Cederholm et al. 1997].
Les carences en micro-nutriments ont également un rôle sur l'immunité. La vitamine A permet le maintien de l'intégrité de l'épithélium des tractus respiratoires et gastro-intestinaux. La vitamine E est un anti-oxydant ayant un rôle dans l'épuration des radicaux libres [Lesourd B 2004 (a,b), Traber MG et al. 2007]. La supplémentation en vitamine E in vitro et in vivo restaure les déclins liés à l'âge de la fonction cellulaire T chez l'homme et la souris, en réduisant les déficits liés de production d'IL2, de prolifération cellulaire T et en améliorant la formation de la synapse immunologique [Meydani SN et al. 1990, Meydani SN et al. 1997, Beharka et al. 1997, Wu et al. 1998, Marko MG et al. 2009]. La vitamine E intervient

également dans les évènements de signalisation proximaux notamment au niveau de la protéine adaptatrice LAT dont les anomalies de phosphorylation liées à l'âge, après stimulation par un Ac anti-CD3 et anti-CD28, sont compensées par la vitamine E [Marko MG et al. 2009]. La vitamine E jouerait également un rôle de régulation dans les propriétés des rafts lipidiques situés au niveau des membranes, elle constitue en cela un régulateur de la fluidité membranaire [Atkinson et al. 2009]. Elle agit également comme régulateur de l'expression des gènes [Barella L et al. 2004]. Cette augmentation des fonctions immunes par la vitamine E est associée à une amélioration significative de la résistance au virus influenza chez les souris âgées ainsi qu'à une réduction du risque d'infection des voies respiratoires chez les résidents en EHPAD [Meydani SN et al. 2004, Meydani SN et al. 2005].

Les effets anti-microbiens de la vitamine D ont déjà été documentés et le statut de carence en vitamine D est connu pour être associé à une susceptibilité à l'infection à Mycobacterium tuberculosis [Liu PT 2006]. Une supplémentation en vitamine D permet de renforcer les défenses immunitaires contre la tuberculose [Martineau et al. 2007]. La stimulation des Toll-like récepteurs (TLR) sur les macrophages humains induit (1) une enzyme qui catalyse la conversion de $25(OH)D_3$ en $1,25(OH)_2D_3$ active, (2) l'expression du récepteur de la vitamine D (VDR), (3) la production de cibles pertinentes situées en aval du VDR (incluant la cathelicidine). La cathelicidine, peptide antimicrobien, est capable d'induire la destruction des Mycobacterium tuberculosis intracellulaires [Liu PT 2006]. La vitamine D est donc un lien clé entre l'activation des TLR et les réponses anti-bactériennes de l'immunité innée. Il est possible que les variations dans la capacité à synthétiser de la vitamine D incluant les polymorphismes du VDR puissent être un facteur de susceptibilité à la tuberculose [Bornman et al. 2004]. Les sérums d'individus américains noirs, connus pour avoir une plus grande susceptibilité à la tuberculose, ont des niveaux bas de 25-OH-vitamine D et une induction moindre d'ARN messager de la cathélicidine, suggérant un lien entre TLR, vitamine D, immunité innée médiée par la vitamine D et résistance de l'hôte. Ces données pourraient avoir un intérêt clinique surtout chez les sujets âgés fragiles ayant des taux faibles de vitamine D [Liu PT 2006].

Le zinc est un minéral essentiel à l'état de traces dans l'organisme, et indispensable dans l'activité de plus de 300 enzymes, dans la synthèse et la dégradation des protéines, la production d'ADN, la biosynthèse de l'hème et le transport du dioxyde de carbone. Le déficit en zinc réduit l'immunité non spécifique, incluant les fonctions des polynucléaires

neutrophiles, des cellules NK et l'activité du complément. Il favorise la baisse du nombre de lymphocytes T et B et altère l'hypersensibilité retardée, l'activité cytotoxique et la production d'anticorps [Katona P et al. 2008, Haase et al. 2009]. Une étude pilote récente d'une durée de suivi de 12 mois, semble indiquer que la supplémentation en zinc chez le sujet âgé diminue l'incidence des infections [Prasad AS et al. 2007]. Ceci confirmerait les données de Meydani et al. rapportant dans une étude observationnelle, une prévalence plus faible de pneumonies dans une population âgée présentant des taux normaux de zinc comparativement à une population carencée [Meydani SN et al. 2007].

Enfin la carence en fer est associée à une baisse de l'immunité à médiation cellulaire et une réduction des fonctions des polynucléaires neutrophiles avec baisse de l'activité myéloperoxydase et antibactérienne [Katona P et al. 2008].

2-3. Vieillissement et vaccinations

Le vieillissement immunitaire est attesté par la diminution de la qualité des réponses immunes avec l'âge après vaccination.

La réponse vaccinale primaire, qui nécessite une immunité à médiation cellulaire intacte pour permettre une réponse humorale, est clairement diminuée chez les sujets âgés avec une spécificité et une efficacité moindres des anticorps produits par rapport aux sujets jeunes [Aw et al. 2007, Pawelec et al. 1999, Castle et al. 2000, Chen et al. 2009, Burns et al. 1997, Fulop et al. 2009]. Cette diminution de la réponse aux nouveaux antigènes reflète à la fois une diminution de la population résiduelle de cellules spécifiques de l'antigène mais aussi une diminution de la capacité fonctionnelle des cellules T naïves [Ginaldi et al. 2001]. Les réponses vaccinales secondaires sont préservées avec cependant des durées de réponses anticorps plus courtes que chez les sujets jeunes [Lesourd B 2004, Castle et al. 2000, Chen et al. 2009]. Le nombre de cellules T CD28- est un élément prédictif des réponses humorales défectueuses au vaccin antigrippal suggérant un impact négatif de ces cellules sur les réponses vaccinales [Fulop et al. 2009, Ferguson et al. 1995, Goronzy et al. 2001, Saurwein-Teissl 2002, Trzonkowski et al. 2003]. De plus, les réponses cellulaires T permettent de mieux corréler la protection vaccinale contre le virus de la grippe chez les sujets âgés que les taux d'anticorps [Chen et al. 2009, Fulop T et al. 2009]. L'importance du statut nutritionnel dans

l'intégrité de la réponse immune doit être prise en considération chez les sujets âgés. Plusieurs essais basés sur la supplémentation expérimentale du régime avec un ou plusieurs nutriments et vitamines ont démontré une amélioration de plusieurs paramètres immunologiques [Fulop T t al. 1999, Chandra et al. 1992]. Cependant d'autres études ne retrouvent pas de lien entre réponse vaccinale et pathologie chronique ou dénutrition [Burns et al. 1997, Potter JM et al. 1999].

Une autre étude portant sur 154 sujets âgés montrait que les non répondeurs au vaccin antigrippal étaient caractérisés par des niveaux élevés d'IgG anti-CMV, un pourcentage plus important de cellules CD8+CD57+CD28- (correspondant au profil de cellules après exposition au CMV), et des niveaux sériques élevés de TNFα et d'IL-6. Ainsi le statut d'immunisation au CMV, provoquant une élévation du potentiel pro-inflammatoire pourrait contribuer à l'absence de réponse au vaccin antigrippal [Trzonkowski et al. 2003]. Néanmoins, bien que l'efficacité de la réponse anticorps paraisse altérée, l'efficience vaccinale clinique est attestée par de nombreuses études épidémiologiques et si la vaccination antigrippale n'offre que 30 à 50% de protection contre la maladie, elle diminue le risque de pneumonies de 50 à 60%, de mortalité et complications sévères de 70% à 80% et l'incidence des hospitalisations de 50 à 60% [Fulop T et al. 1999, Fulop T et al. 2009, Gross et al. 1995, Jackson et al. 2006]. Dans une étude sur 3 ans ayant inclus plus de 75000 personnes âgées institutionnalisées, on notait une réduction de 46% de toutes les causes de mortalité chez les individus ayant reçu le vaccin antigrippal [Mulloly JP et al. 1994]. L'efficacité clinique du vaccin est probablement liée à l'efficacité de destruction des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques, la durée de cette activité s'avérant conservée chez des sujets âgés [Burns et al. 1997, Bernstein E et al. 1999]. Par ailleurs, la vaccination anti-grippale des soignants permet de réduire significativement la mortalité de personnes âgées vivant en unités de soins de longue durée comparativement aux personnels non vaccinés mais cette protection est efficace si les résidents sont aussi vaccinés [Carman WF et al. 2000, Hayward et al. 2006].

La vaccination anti-pneumococcique est également considérée comme une stratégie efficace pour diminuer la morbidité et la mortalité associée au pneumocoque et la couverture vaccinale reste insuffisante en France [Fulop T et al. 2009, Gavazzi et al. 2007, Delelis-Fanien AS et al. 2009]. Cependant le vaccin actuellement disponible ne parait pas très efficace sur le plan immunologique dans la population la plus fragile avec peu d'études épidémiologiques sur son efficacité. Il existe quelques arguments cependant pour dire que ce vaccin, s'il n'est pas idéal,

confère, au moins au niveau des populations, une protection et un rapport coût-bénéfice intéressant grâce à une réduction suffisante des pneumonies invasives et de la mortalité [Fisman DN et al. 2006, Fedson DS et al. 2004, Vila-Corcoles et al. 2009].

2-4. Immunosénescence et transplantation rénale

Les modifications du système immunitaire liées à l'âge nécessitent une adaptation de l'attribution du greffon et du traitement immunosuppresseur en fonction de l'âge avec une surveillance rapprochée du patient. Les infections des patients transplantés rénaux de plus de 50 ans sont la première cause de mortalité durant la première année représentant 40% des décès [Martin et al. 2005] mais la transplantation chez les sujets âgés offre une espérance de vie et une qualité de vie supérieure à la dialyse [Jassal SV et al. 2003].

Les phénomènes d'immunosénescence sont à l'origine d'une diminution du risque de rejet aigu et tardif chez les patients transplantés âgés [Martin et al. 2005, Jassal SV et al. 1997, Bradley et al. 2002]. Cependant, la réduction d'incidence des rejets aigus ne s'applique pas lorsque les greffons sont issus de donneurs âgés comme le montre un essai clinique récent retrouvant une augmentation de l'incidence des épisodes de rejet aigu dans la période précoce post-transplantation [Kasiske BL, et al. 2000]. L'âge du receveur est un facteur indépendant et puissant pour le développement de lésions chroniques du greffon avec un risque relatif de rejet chronique de 1,67 après 65 ans [Meier-Kriesche et al. 2000]. Les changements importants du système immunitaire pouvant augmenter l'incidence du rejet chronique incluent une augmentation des cellules T mémoires, un ratio CD4/CD8 bas, une orientation de la réponse TH1 vers la réponse TH2 avec un profil de cytokines inflammatoires [TNFα, IL-4, TGF-β-1 et IL-6], une augmentation de l'activation des CPA, de l'expression de HLA-DR et la production d'anticorps anti HLA du donneur. L'IL-4 peut également jouer un rôle important dans le développement de l'artériosclérose du greffon en stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux [Martins et al. 2005].

Ce vieillissement immunitaire doit être pris en compte dans la prise en charge des patients transplantés âgés ainsi que l'âge du donneur et du receveur dans le risque de rejet. En effet, les greffons de donneurs âgés sont considérés comme plus immunogéniques alors que les

receveurs âgés ont une réponse immunitaire diminuée. Ces données nécessitent d'adapter dans le temps et dans la dose le traitement immunosuppresseur avec une surveillance rapprochée du patient.

A l'avenir, l'individualisation d'un traitement immunosuppresseur et les interventions sur des cibles sélectives associées à l'immunosénescence pourraient être des stratégies prometteuses pour améliorer la survie et la qualité de vie de la population transplantée âgée.

2-5. Conclusion sur l'immunosénescence

En conclusion, le vieillissement immunitaire existe sous forme d'un remodelage complexe et hétérogène affectant plus particulièrement la réponse immunitaire cellulaire.
Les faits les plus marquants de l'immunosénescence sont des modifications des populations lymphocytaires avec accumulation de lymphocytes mémoire occupant l'espace immunologique, baisse des réponses prolifératives aux mitogènes et augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires favorisée par l'augmentation de l'immunité innée et par des infections persistantes comme le CMV, ce dernier ayant un rôle probablement majeur dans le vieillissement immunitaire [Schmaltz HN et al. 2005, Pawelec G et al. 2010, Derhovanessian E et al. 2009, Moss P et al. 2010].

L'immunosénescence est probablement le résultat d'une stimulation antigénique chronique se produisant tout au long de la vie, associant altération du répertoire T par diminution des cellules naïves et accumulation de cellules mémoires et, une baisse de réponse immunitaire adaptée vis-à-vis des nouveaux antigènes.
Ainsi le bénéfice initial du système immunitaire visant à protéger l'organisme contre des agents extérieurs dangereux évolue avec l'âge en devenant délétère.

De nombreuses recherches restent à mener pour mieux appréhender les phénomènes qui régissent ces modifications du système immunitaire afin d'élaborer des stratégies préventives.
Les anomalies de l'immunité au cours du vieillissement sont décrites en détail dans l'article de revue sur l'immunosénescence écrit durant ce travail de thèse [Crétel E et al. Med Mal Infect. 2010].

Le but de cette thèse a été d'étudier les étapes précoces de l'activation cellulaire T en amont de la formation de la SI, de mettre au point un test d'évaluation de cette activation T et de l'appliquer à l'analyse du déclin immunitaire chez le sujet âgé.

B- RESULTATS

I- Les tests classiques de mesure de l'immunité cellulaire

1- Mesure de la libération du calcium

La capacité d'activation cellulaire T peut être mesurée par la montée du calcium intracellulaire déclenchée par l'engagement du TCR. Les principales sondes utilisées pour mesurer ce relargage sont le Fura-2 et l'Indo-1 dérivées d'un chélateur de calcium. Dans le cas du Fura-2, la liaison du calcium avec la sonde entraîne essentiellement un déplacement du spectre d'excitation. L'émission de fluorescence du Fura-2 à 515 nm obtenue en réponse à une excitation à 340 nm (F_{340}) et 380 nm (F_{380}) en présence et en absence de Ca^{2+} se traduit par une augmentation de F_{340} et une diminution à F_{380}. La mesure du rapport de fluorescences F_{340} / F_{380} permet de calculer la concentration en Ca^{2+}. Le Fura-2 et l'Indo-1 possèdent un fort rendement quantique ce qui en fait des molécules de choix pour réaliser de l'imagerie calcique sur cellule unique. L'emploi de ces deux molécules nécessite des systèmes de mesure adaptés. Dans le cas de l'Indo-1, l'excitation se fait à une longueur d'onde et les fluorescences émises sont séparées en deux faisceaux dont l'un est filtré à 405 nm et l'autre à 485 nm.
Les expériences réalisées en Fura-2 sont cependant limitées en rapidité en raison du changement continu des filtres d'excitation. D'autre part les excitations aux courtes longueurs d'onde provoquent des dommages sur certaines cellules.
Afin de surmonter ces deux inconvénients, des indicateurs fluorescents mono excitation/mono émission, excitables dans le visible ont été synthétisés. Ces sondes sont le Fluo-3, le Fluo-4, le Fura red, le Ca^{2+} green et Ca^{2+} orange. Ces molécules permettent de visualiser des cinétiques rapides et facilitent le couplage avec des techniques électrophysiologiques. Cependant, les sondes mono excitations ne permettent pas une calibration précise du [Ca^{2+}].

L'utilisation de 2 sondes fluorescentes permet une mesure qualitative de l'activation cellulaire T. Le principe consiste en une incubation de lymphocytes T avec la sonde Fura red-AM et la sonde Fluo4-AM. La sonde Fura red-AM pénètre dans toutes les cellules où une estérase libère le Fura red qui donne une fluorescence rouge. De même, le fluo4-AM n'est pas fluorescent. C'est grâce à sa partie estérifiée que la sonde peut passer les membranes cellulaires. Dans les cellules, les estérases vont hydrolyser la liaison fluo4-AM, libérant la

molécule de Fluo-4 qui donne une fluorescence verte. La fluorescence du Fura red diminue, et celle du Fluo-4 augmente, lorsque la concentration du calcium augmente.
La concentration moyenne du calcium dans le cytosol des cellules est de l'ordre de quelques dizaines de nM, cette concentration après stimulation peut atteintre plusieurs microM.
La mesure de la libération du calcium est une technique délicate car c'est un événement transitoire nécessitant une observation continue des cellules individuelles dont les réponses ne sont pas synchronisées.

2- Phosphorylation de Erk

Les serine-threonine kinases Erk1 et Erk2, ubiquitaires, ont été localisées dans les cellules JURKAT et les lymphocytes T périphériques en 1993 avec la découverte de leur implication dans l'activation cellulaire T, Erk2 étant prépondérante [Whitehurst et al. 1993]. L'activation de la serine-threonine kinase Erk semble corrélée à une activation complète des lymphocytes T.
Après stimulation par un Ac antiCD3 ou du PMA (un ester de phorbol), la phosphorylation de Erk apparaît après 2 minutes, atteint un niveau maximum à 5 minutes et persiste pendant 20 minutes [Whitehurst et al. 1993]. La voie Erk a un rôle majeur d'amplificateur de l'activation cellulaire T [Altan-Bonnet G et al. 2005].
La phosphorylation de Erk peut être mise en évidence par la technique du transfert de protéines (Western Blot) [Shan et al. 2001].
Cependant la mesure de l'expression de Erk est une technique longue, la fixation des cellules peut s'accompagner d'artéfacts rendant cette mesure de l'activation cellulaire délicate. Elle nécessite des Ac anti-phospho Erk très spécifiques avec le risque d'avoir du « bruit de fond ». Il faut donc utiliser des contrôles négatifs pour cette mesure dont la quantification qui consiste à mesurer la fluorescence émise est fastidieuse.

3- Etude de l'expression du CD69 et du CD25

La capacité de réponse cellulaire peut être mesurée par l'expression de marqueurs d'activation comme le CD25 mais également le CD69 par cytométrie de flux [Fuhrmann S et al. 2008].
L'IL-2 exerce ses effets biologiques en se liant à un récepteur spécifique sur les lymphocytes

T, dont 3 formes sont connues selon leur affinité à l'IL-2. Le récepteur de l'IL-2 peut être composé de trois chaînes polypeptidiques non liées de manière covalente. La chaine α, la première à avoir été découverte, est l'antigène CD25 (ou Tac). Elle a un poids moléculaire de 55kDa. C'est une sous-unité de haute affinité du récepteur à l'IL-2 (IL2-Rα) apparaissant environ 24 heures après le début de l'activation [Cotner T et al. 1983]. La chaine β a un poids moléculaire de 75 kDa. La chaine γ a un poids moléculaire de 55 kDa. L'association d'une, de 2 ou de 3 sous-unités différentes permet de moduler l'affinité au ligand et donc la réponse cellulaire. Seuls les lymphocytes T activés expriment en plus grande quantité les sous-unités α et β du récepteur. Seule la sous-unité γ est produite de manière équivalente au niveau des lymphocytes T au repos ou activés.

Parmi les gènes induits durant la phase précoce de l'activation cellulaire T se trouve également le gène de la molécule CD69. Le CD69 est une lectine, récepteur transmembranaire de type II. C'est une glycoprotéine de 60 kDa et de structure dimérique synthétisée de novo et exprimée après activation lymphocytaire T avec une grande variété de stimuli comme les anticorps antiCD3, antiCD2 ou la PHA.

Le CD69 est impliqué dans la prolifération lymphocytaire et fonctionne comme un récepteur de transmission du signal, favorisant l'augmentation du calcium intracellulaire, l'expression de la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 (CD25), la synthèse de différentes cytokines comme l'IL-2, le TNF-α et l'IFN-γ ainsi que la prolifération cellulaire [Lopez-Cabrera et al. 1993]. Il présente également des fonctions immunorégulatrices diverses [Sancho D et al. 2005]. Il apparaît environ 6-8 heures après le début de l'activation avec un maximum entre 12 et 18 heures.

La mise en évidence de l'expression du CD25 et du CD69 peut se faire par cytométrie de flux. Les lymphocytes T activés sont incubés avec des Ac monoclonaux spécifiques puis avec un Ac de souris anti Ig couplé à un colorant type FITC. L'analyse est très précise et permet de déterminer exactement le type de cellules activées (CD4 plus souvent que CD8) si ces lymphocytes sont T naïfs, effecteurs ou mémoires.

Le CD25 peut être scindé de la surface cellulaire et mesuré dans le sérum comme une forme soluble de 45 kDa, dont les concentrations peuvent être utilisées comme marqueur d'activation cellulaire.

Elle peut également se faire par marquage immunofluorescent des cellules activées, déposées sur des lamelles et fixées avec du formaldéhyde. Les cellules sont ensuite incubées avec un

anticorps primaire antiCD69 ou antiCD25 puis avec un anticorps secondaire antiIgG coloré par de la FITC. Les cellules fixées sont ensuite observées au moyen d'une caméra à fluorescence.
Cette technique est également longue, car il faut attendre un minimum de 12 heures pour avoir un marquage suffisant.

4- Dosage de l'IL-2

L'IL-2 est le produit final de l'activation des lymphocytes T Helper et permet de stimuler leur différenciation et leur prolifération, avec en particulier la synthèse de cytokines par les lymphocytes T CD4+ et la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+.
Le dosage de L'IL-2 peut de faire dans le sérum ou plasma humain, ou dans le surnageant de cultures cellulaires par la technique Elisa (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).
Le test décrit correspond au kit de dosage de l'IL-2 développé par Becton, Dickinson Biosciences. Il utilise un Ac monoclonal spécifique de l'IL-2 humaine, attaché au fond de puits de plaques de microtitration. Les échantillons sont ajoutés aux puits et l'IL-2 présente se lie aux Ac immobilisés. Les puits sont alors lavés et un conjugué peroxidase streptavidine couplé à un Ac anti IL-2 humaine est ajouté, produisant un « sandwich Ac-antigène-Ac ».
Les puits sont encore lavés et une solution de substrat TMB est ajoutée produisant une coloration bleue proportionnelle à la quantité d'IL-2 présente dans l'échantillon initial. La solution d'arrêt (acide phosphorique) transforme la couleur bleue en jaune, et l'absorbance des micropuits est lue à 450 nm. Dans ce test, la densité optique lue à 450 nm correspond à un dosage d'IL-2 en pg/ml.
L'IL-2 ne se retrouve dans les surnageants qu'environ 36 heures après stimulation. Le dosage ne donne pas d'indication au niveau des cellules individuelles. Cet inconvénient s'applique également au dosage des mRNA qui pourrait être effectué plus tôt.

5- Etude de la prolifération lymphocytaire

Elle permet d'évaluer la capacité de prolifération de lymphocytes en présence de mitogènes spécifiques (tuberculine, candidine, antigène tétanique) ou non (PHA, PKM, concavaline, Ac antiCD3). Ils se réalisent sur les cellules mononuclées isolées du sang total par centrifugation sur barrière de densité.

Le test de prolifération initialement utilisé comme « gold standard » était le test de prolifération lymphocytaire ou « test de transformation lymphoblastique » (« TTB »).
Ce test consistait à mettre des cellules à proliférer en présence de mitogènes pendant 72 heures à 37°C sous une amosphère de 5% de CO2. La thymidine tritiée ([^{3}H]thymidine) était ensuite ajoutée pendant une période de 6 à 18 heures. Elle était incorporée proportionnellement à la synthèse de DNA et l'évaluation se faisait par la mesure de la radioactivité non précipitable. L'utilisation de la radioactivité, nécessitant des mesures de sécurité appropriées et réglementées, complique la réalisation de ce test.
La mesure de l'incorporation de thymidine peut être remplacée par un test basé sur la mesure de la fluorescence du CFSE.
Le CFSE est un colorant vital fluorescent qui se répartit de manière homogène dans les cellules. C'est une molécule contenant deux groupements acétate et un groupement fonctionnel succinimidyl ester. Sous cette forme, il diffuse librement dans les cellules et n'est pas fluorescent. Après diffusion dans la cellule, les estérases intracellulaires clivent les groupements acétate, convertissant le CFSE en un colorant très fluorescent imperméable à la membrane, retenu dans le cytoplasme sans affecter la fonction cellulaire. A chaque division cellulaire, la fluorescence diminue de moitié [Lyons AB et al. 1994, Lyons AB et al. 1999, Lyons AB et al. 2000]. Cette technique permet la visualisation de 8 à 10 cycles de division cellulaire par la cytométrie de flux.
Les cellules mononuclées obtenues grâce à la méthode au Ficoll ou les lymphocytes T purifiés sont préalablement marqués au CFSE puis incubés à 37°C dans un milieu riche en CO2 pendant 72 heures. Au bout de 72 heures, la prolifération est comptabilisée par l'étude en cytométrie de flux [Scheffold et al. 2000]. Le marquage avec des Ac monoclonaux fluorescents spécifiques des antigènes de différenciation situés à la surface cellulaire permet l'examen de la prolifération des différentes sous-populations lymphocytaires. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dont la fluorescence est diminuée, ce qui correspond au pourcentage de cellules ayant subi au moins une division.
Cette technique remplace le test de prolifération mesurant l'incorporation de thymidine tritiée. Plusieurs études ont montré des taux de concordance élevés entre les deux tests [Angulo et al. 1998, Lyons AB. 1999, Moore et al. 2006, Milovanova TN et al. 2007].

Les critères de positivité de ce test font l'objet de normes définies par notre laboratoire, correspondant au pourcentage de cellules ayant proliféré :

- Ces normes ont été définies dans notre laboratoire sur une population de 30 sujets sains avec des résultats entre le 25ème et le 75ème percentile respectivement à 57 et 78 % avec la PHA soit un seuil de positivité à 57%. La médiane est à 70%.
- Avec l'Ac anti-CD3 les résultats sont de 42 et 75% [25-75ème percentile] avec une médiane à 63,2% soit un seuil de positivité à 42%.

Le TTB a les inconvénients d'une durée de réalisation longue et de nécessiter beaucoup de cellules et donc beaucoup de sang. Il faut attendre 3 jours pour obtenir les résultats. Pour ces diverses raisons, même s'il est l'examen de référence en clinique pour mesurer l'activation cellulaire T, ce n'est pas un examen de routine.

II- Mise en place de notre test

Comme nous l'avons montré, la réalisation des tests classiques de mesure de l'activation cellulaire présente quelques inconvénients. Nous avons voulu mettre au point une méthode quantitative et reproductible permettant d'évaluer la capacité d'activation des cellules T.
Le but de notre étude était :
1/ Analyser l'activation T sur un plan fondamental afin de distinguer les signaux émis après adhésion et après activation,
2/ de développer et de valider un test de mesure de la formation du contact entre des lymphocytes T et des surfaces recouvertes d'anticorps activateurs des cellules T (Ac antiCD3) et mimant partiellement la CPA de façon qualitative ou quantitative,
3/ de comparer cette procédure à des tests immunologiques cellulaires conventionnels classiques d'étude de la prolifération des lymphocytes T,
4/ finalement d'élaborer une nouvelle méthode d'exploration de la fonction des lymphocytes T et de leurs anomalies liées à l'âge en exploitant cette procédure dans une population de patients âgés de 75 ans ou plus.
Cette étude a donc l'avantage d'associer recherche fondamentale et recherche clinique. L'objectif clinique étant de mesurer l'immunité cellulaire pour évaluer l'état immunologique de sujets âgés de manière rapide et peu coûteuse.

Dans un premier temps, nous avons mis au point la technique de recouvrement de lamelles de verre (voir matériels et méthodes dans notre deuxième article et ci-dessous). Après mise au point de cette technique sur des lignées de cellules leucémiques Jurkat, nous avons utilisé des lymphocytes T humains purifiés à partir de poches sang provenant du centre de transfusion sanguine.

Nous avons pu observer une bonne adhérence des cellules avec les Ac antiCD3 et antiHLA-ABC présents et avec un contrôle négatif satisfaisant (IgG1).
Le contact entre les cellules et les lamelles de verre s'observe grâce à la microscopie à interférence réflexion (interference reflection microscopy).
Le contraste de réflexion est une technique de microscopie introduite dans le domaine de la biologie cellulaire par Curtis [Curtis et al. 1964] sous la dénomination d'IRM et Bereiter-Hahn sous le nom de RICM [Bereiter-Hahn et al.1979].
Elle permet d'observer le contact entre une cellule et son substrat sur une hauteur très faible (environ 100 nm) et de mesurer localement la distance cellule substrat avec une précision de l'ordre de quelques nm. Le principe est basé sur les interférences formées entre les rayons lumineux réfléchis par l'interface verre-milieu et l'interface cellule-milieu. Les régions de contact étroit apparaissent sous forme de taches noires.

Le contraste de réflexion a été initialement utilisé pour observer des images d'adhésion par Curtis [Curtis et al. 1964]. Il a permis ensuite l'identification de contacts rapprochés et focaux [Izzard et al. 1976]. Il fut ensusite utilisé pour l'évaluation quantitative des dynamiques de membranes de monocytes durant leur contact précoce avec des surfaces adhérentes [Zidovska et al. 2006, Pierres et al. 2008]. Le contraste de réflexion a également été utilisé pour mesurer de manière qualitative l'interaction de lymphocytes T avec des surfaces activatrices [Dustin et al. 1996, Bunnel et al. 2002].

III- Introduction au premier article

How Cells feel their environment: a focus on early dynamic events

E Crétel[1,2,3,4], A Pierres[1,2,3], AM Benoliel[1,2,3], P Bongrand[1,2,3,4]

[1] Lab. Adhesion and Inflammation, INSERM UMR 600, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France,
[2] CNRS UMR 6212,
[3] Université de la Mediterranée,
[4] Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille. France

"Cellular and Molecular Engineering" (1:5-14, 2008)

Il s'agit d'une revue de la littérature sur les mécanismes d'intégration des signaux environnementaux par les cellules et le retentissement de ces signaux sur leur comportement.

En effet l'adhésion d'une cellule à une surface étrangère influence son comportement et en particulier certaines fonctions comme la survie, la prolifération, la différenciation et la migration. La complexité des molécules intervenant dans les phénomènes d'adhésion et en particulier celles qui sont impliquées dans la réponse aux signaux environnementaux et les cascades de signalisation déclenchées, rend l'étude de l'adhésion et de ses conséquences difficiles.

Une des stratégies pour observer les phénomènes qui déclenchent les modifications comportementales d'une cellule après le début de l'adhésion, est d'étudier ce phénomène dans les premiers instants qui suivent la rencontre entre une cellule et une surface.

Ainsi cette revue comprend essentiellement 3 parties avec d'une part la description de quelques exemples de réponses cellulaires en fonction des propriétés du substrat sur lesquelles elle sont déposées.

Dans une deuxième partie, nous rapportons le concept de lien entre la forme et l'organisation du cytosquelette d'une cellule avec les signaux environnementaux ainsi que les choix comportementaux de la cellule.

Enfin nous décrivons quelques résultats concernant la dynamique des membranes cellulaires, comme base pour l'interaction entre une cellule et son substrat.

Cet article fait le lien avec notre second article qui décrit notre méthodologie d'étude du contact entre une cellule T et des surfaces activatrices. Cette méthode, basée sur la microsopie IRM, nous permet d'étudier en particulier les temps précoces du contact entre une cellule et la surface sur laquelle elle est déposée.

Cet article constitue l'annexe 2.

IV- Introduction au deuxième article

Early contacts between T lymphocytes and activating surfaces

E Crétel[1,2,3,4], D Touchard[1,2,3], AM Benoliel[1,2,3], P Bongrand[1,2,3,4,5] and A Pierres[1,2,3]

[1] INSERM UMR 600, Laboratory Adhesion and Inflammation, Parc Scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09, France

[2] CNRS UMR 6212, France

[3] Aix-Marseille Universit´es, France

[4] Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, France

J. Phys. Condens. Matter 22 (2010) 194107 (12pp)

Notre second article a permis d'exposer notre méthodologie et d'analyser le comportement des cellules aux temps précoces, avant leur adhésion sur des surfaces recouvertes d'Ac activateurs ou non. En effet les cellules sondent en permanence leur environnement, et analysent les surfaces qui leur sont proches tant sur le plan biochimique que physique.

Les décisions d'une cellule sont basées sur la reconnaissance de ligands spécifiques par ses récepteurs membranaires. Leur comportement dépend également des propriétés physiques des surfaces sous-jacentes comme la dureté ou la rugosité [Pierres et al. 2009]. L'étalement d'une cellule est un événement hautement significatif car des cellules étalées et arrondies peuvent afficher des comportements très différents [Pierres et al. 2002, Meyers et al. 2006, Neves et al 2008].

Les questions qui se posent sont :

1/ Quelle information est générée par l'interaction entre une cellule et une surface voisine ?

2/ Comment cette information se traduit-elle en cascades biochimiques intracellulaires ?

3/ Comment ces cascades sont-elles traduites en une décision comportementale ?

Les lymphocytes T circulent dans l'organisme et scannent la surface des cellules qu'ils rencontrent pour détecter la présence de fragments peptidiques étrangers liés aux molécules du CMH des CPA [Bongrand et al. 1998]. Les mécanismes responsables de la génération d'un signal après interaction entre le TCR et son ligand sont partiellement compris [Smith-Garvin

et al. 2009]. Ainsi, comparer les conséquences immédiates de l'interaction de lymphocytes T avec des surfaces activatrices ou non, peut fournir un moyen utile de récolte des informations et des décisions prises par ces lymphocytes T.
Dans cet article, nous présentons une description quantitative de l'interaction initiale entre des lymphocytes T et des surfaces activatrices ou de contrôle.

Nous montrons que :
1/ des lymphocytes touchant une surface adhésive commencent à s'étaler après un intervalle de temps compris entre plusieurs dizaines de secondes et quelques minutes,
2/ durant cet intervalle, des ondulations verticales de la membrane semblent générer des contacts transitoires avec les surfaces sous-jacentes,
3/ Après cette période, l'aire de contact augmente régulièrement de manière linéaire avec un taux d'environ 1,5 $\mu m^2 s^{-1}$ sur les surfaces activatrices et d'environ 0,2 $\mu m^2 s^{-1}$ sur les surfaces de contrôle soit entre 7 et 8 fois plus rapidement sur les surfaces activatrices (recouvertes d'Ac antiCD3).
Parallèlement à l'extension latérale de la cellule sur la surface, la distance entre la membrane cellulaire et la surface diminue progressivement.
L'hypothèse avancée, est que la décision cellulaire de s'étaler rapidement sur les surfaces activatrices résulte de l'intégration de l'information fournie par les contacts transitoires avec la surface, générés par les ondulations de la membrane pendant une période d'environ 1 minute.
Cet article constitue l'annexe 3.

V- Introduction au troisième article

A new method for rapid detection of T lymphocyte decision to proliferate after encountering activating surfaces

Elodie Crétel[a, b, c], Dominique Touchard [a, b, d], Pierre Bongrand[a, b, c, d] and Anne Pierres[a, b, d]
[a] INSERM UMR 600, Lab Adhésion et Inflammation, Parc Scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09, France. http://lai.sciences.univmed.fr.
[b] CNRS UMR 6212, Lab Adhésion et Inflammation.
[c] Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille,
[d] Université de la Mediterranée

Une des étapes critiques dans la réponse adaptative est la décision d'un lymphocyte T d'initier une activation après la rencontre avec une CPA. Les tests de prolifération lymphocytaires, classiquement utilisés pour mesurer cette activation cellulaire nécessitent plusieurs jours pour être réalisés. L'analyse des marqueurs précoces d'activation est rendue difficile par la complexité des cascades de signalisation.

Dans cette étude, nous analysons le contact de lymphocytes T avec des surfaces recouvertes d'Ac activateurs (Ac antiCD3) ou non (Ac antiHLA), en microscopie IRM.

Après des dilutions successives des Ac antiCD3, nous montrons que la zone de contact formée 15 minutes après le contact initial entre des lymphocytes T et des surfaces potentiellement activatrices est fortement corrélée aux réponses prolifératives mesurées avec le test de prolifération lymphocytaire standard au CFSE, réalisé 3 jours après le dépôt de lymphocytes T sur des surfaces recouvertes avec les même dilutions d'Ac antiCD3.

L'étude du contact entre une cellule T et des surfaces activatrices pourrait s'avérer être une méthode simple et utile d'exploration précoce de l'activation de lymphocytes T en pratique clinique.

Cet article est en cours de soumission au journal of immunology

Il constitue l'annexe 4.

VI- Résultats non publiés sur la partie fondamentale

1- Etude des marquages cellulaires avec Ac phosphorylés de la chaine de signalisation après engagement du TCR

La mise en place de notre méthode d'étalement cellulaire permet la réalisation de marquages cellulaires dans le but d'étudier la phosphorylation de certaines protéines des différentes chaines de signalisation aboutissant à l'activation cellulaire T.

Plusieurs anticorps permettant de comparer la fluorescence émise lorsque les cellules sont déposées sur des lamelles recouvertes d'Ac antiCD3 ou d'Ac antiHLA ont été testés.

L'objectif de cette étude était de comparer la signalisation induite par l'adhésion à celle induite par l'activation T complète.

1-1. Matériels et Méthodes

1-1-1. Obtention du sang et séparation des lymphocytes

Les lymphocytes T ont été obtenus à partir de sang périphérique provenant de poches de sang fournies par la banque du sang.

Des cellules mononuclées étaient d'abord isolées par centrifugation dans une solution de gradient de densité (Lymphocyte Separation Medium, Eurobio, Les Ulis, France) en suivant la technique standard.

Afin de prévenir l'activation cellulaire, les lymphocytes T étaient isolés par sélection négative en utilisant une colonne de séparation de triage de cellules magnétiques (MACS) (Miltenyi Biotec France, Paris). Le principe était d'incuber les cellules mononuclées avec des Ac antiHLA-DR conjugués à des microbilles magnétiques qui marquent les cellules B, les cellules dendritiques, les macrophages et les polynucléaires. La colonne placée, dans un champ magnétique, ne laissait s'écouler que les cellules non marquées. L'analyse cytofluorométrique des cellules s'écoulant par la colonne montrait qu'il s'agissait de lymphocytes CD3+ dans 90 à 95% des cas et de lymphocytes NK dans 5-10%.

Dans d'autres manipulations, les cellules non-T étaient indirectement marquées par un cocktail d'Ac conjugués à de la biotine et de microbilles anti-biotine comme second réactif Pan T cell isolation kit II, Miltenyi Biotec) permettant l'obtention de plus de 98% de lymphocytes CD3+.

1-1-2. Préparation des surfaces

Des lamelles en verre (24x24 mm) étaient nettoyées pendant 4 heures dans de l'acide sulfurique (Sigma) puis rincées à l'eau courante puis à l'eau distillée et séchées à 65°C.
Les lamelles propres étaient ensuite silanisées avec du 3-aminopropyl triethoxysilane (Sigma-Aldrich) pendant 4 min à 4°C, rincées dans un tampon de sels de phosphate (PBS) et incubées avec de la glutaraldéhyde à 1% pendant 30 min à température ambiante.
Les lamelles étaient ensuite recouvertes avec des Ac à la concentration de 10 µg/ml pendant 2 heures (CD3, HLA-ABC, IgG1, Pharmingen). Les lamelles étaient finalement rincées au PBS puis recouvertes de 0,1 M d'éthanolamine pendant 30 min.
Ces lamelles étaient ensuite placées dans des chambres en acier et en téflon afin d'être observées en microscopie à interférence reflexion.

1-1-3. Anticorps utilisés

Les Ac suivants étaient utilisés pour recouvrir les lamelles : anti-CD3 (UCHT1, Beckman Coulter, Immunotech), anti-HLA-ABC (Beckman Coulter, Immunotech), contrôle isotypique IgG1 (679.1Mc7, Immunotech, isotype IgG1).
Les Ac utilisés pour réaliser les marquages cellulaires étaient les suivants :
Anticorps de lapin antiphospho-p44/42 MAPK(Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E), antiphospho-ZAP-70 (Tyr319)/syk(Tyr352), antiphospho-ZAP-70 (Tyr493), antiphospho-PLCγ1(Ser1248) et antiphospho-c-Jun (Ser63)II (Cell Signaling Technology, Boston MA), Ac de lapin anti p-Lck (Tyr 192/Ser194)-R :sc-28445-5, anti p-PKCθ (Ser676) :sc-101779, anti p-Vav (Tyr174)-R :sc-16408-R (Santa Cruz Biotechnology, Inc), sonde Alexa Fluor 488 dirigée contre le fragment $(Fab')_2$ d'IgG antilapin (Alexa fluor 488 F(ab')2 fragment of goat antimouse IgG(H+L) (Invitrogen).
Pour le marquage avec l'Ac antiCD69 ont été utilisés l'Ac antiCD69 à 0,2 mg/ml (Beckman-Coulter) et le Zénon Alexa Fluor 488 mouse IgG1 (Invitrogen).

1-1-4. Marquages intra-cellulaires et membranaires

Les lymphocytes T isolés à partir de cellules mononuclées obtenues à partir du sang périphérique étaient déposés à 37°C sur les surfaces recouvertes d'Ac anti-CD3 ou anti-HLA-

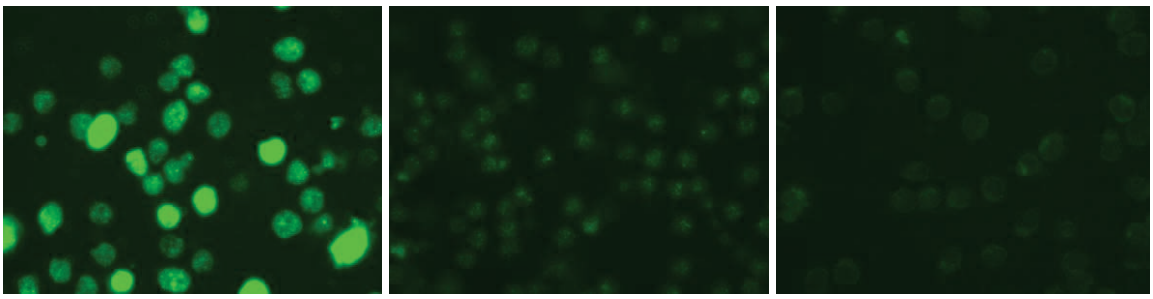
ABC à l'intérieur de chambres constituées d'acier et de téflon.
Les cellules adhérentes étaient ensuite rincées avec du PBS puis fixées avec une solution de PFA glacée à 2%, 1 mM glucose dans du PBS pendant 20 minutes (min) à 4°C.
Après lavage au PBS glacé, les cellules étaient perméabilisées avec du Méthanol glacé à 100% pendant 10 min à -20°C. Les chambres étaient ensuite lavées avec du PBS et les cellules bloquées avec une solution de BSA à 1%, de Triton X-100 à 0,3% pendant 60 min à T°C ambiante.
Après avoir enlevé ce tampon de blocage, l'Ac dilué dans le tampon de dilution (PBS, 1% BSA et Triton X-100 à 0,3%) était appliqué sur les échantillons pendant la nuit à 4°C.

Les chambres étaient ensuite rincées au PBS puis on appliquait la sonde Alexa 488 $(Fab')^2$ goat antirabbit IgG à 2 µg/ml (Concentration à 2 mg/ml soit une dilution *au 1/1000*) dans le tampon de dilution (PBS, 1% BSA et Triton X-100 à 0,3%) pendant 2 heures à T°C ambiante, dans l'obscurité.
Les lamelles étaient de nouveau rincées avant d'être observées avec un microscope Axiovert 200 M inversé (Zeiss) muni d'un objectif spécial (Antiflex) et les images étaient acquises par une caméra cooled triCCD C7880 (Hamamatsu, Japon) en utilisant le logiciel Aquacosmos.
L'analyse de la fluorescence était faite avec le logiciel Image J. Les images observées en visible permettaient de définir les contours de la cellule et la fluorescence moyenne était comptabilisée (après soustraction du background) sur la mesure de la fluorescence d'environ 100 cellules.
Pour le marquage membranaire avec l'Ac antiCD69, la procédure consistait à marquer directement l'Ac antiCD69 dilué au $1/10^{ème}$ avec un réactif spécifique des IgG1a (Zénon™)
Cette solution était déposée durant 1 heure sur les cellules T ayant adhéré pendant 18 heures à la fois sur une lamelle recouverte d'Ac antiCD3 et sur une lamelle recouverte d'Ac antiHLA-ABC. Les cellules T étaient ensuite fixées avec un mélange de paraformaldéhyde à 2% et de glucose à 1mM pendant 20 min à 4°C. Les lamelles étaient ensuite rincées abondamment au PBS.

1-2. Résultats

1-2-1. Marquages avec Ac antiphospho-p44/42 MAPK(Erk1/2)

Le marquage avec l'Ac antiphospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) était positif sur les lamelles CD3 et négatif sur les lamelles HLA ce qui en faisait un bon témoin de l'activation cellulaire T [Figure 19].



a b c

Figure 19 : Marquage des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac anti-p-Erk après un temps d'adhésion de 30 minutes (a) sur une lamelle CD3, (b) sur une lamelle HLA-ABC et (c) sur une lamelle CD3 avec la sonde alexa 488 (Fab')2 goat antirabbit IgG seule (témoin négatif).

L'étude de la cinétique de Erk permettait d'objectiver un pic de fluorescence après 5 minutes d'adhésion, une stagnation jusqu'à 30 minutes puis une décroissance nette de la fluorescence après une adhésion de 60 minutes [Figure 20].

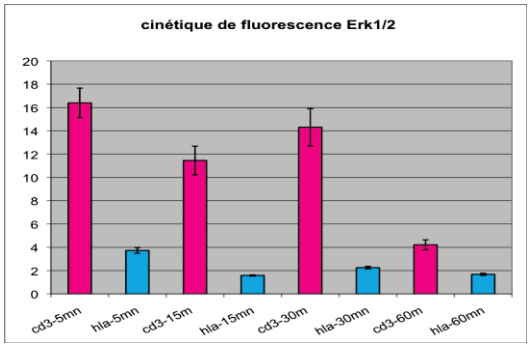


Figure 20: Etude de la fluorescence de Erk en fonction du temps d'adhésion des cellules T purifiées, fixées et marquées (5, 15, 30 et 60 min) sur des lamelles coatées avec l'Ac antiCD3 et l'Ac antiHLA-ABC.

L'étude de la fluorescence des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac anti-phospho-Erk en fonction des dilutions d'Ac antiCD3 sur la lamelle coatée permettait d'objectiver une décroissance de la moyenne de fluorescence avec les dilutions. Cette décroissance était encore plus importante lorsque la médiane de fluorescence était calculée. On observait alors une cassure nette entre la dilution du CD3 au 1/10ème et au 1/20ème [Figure 21].

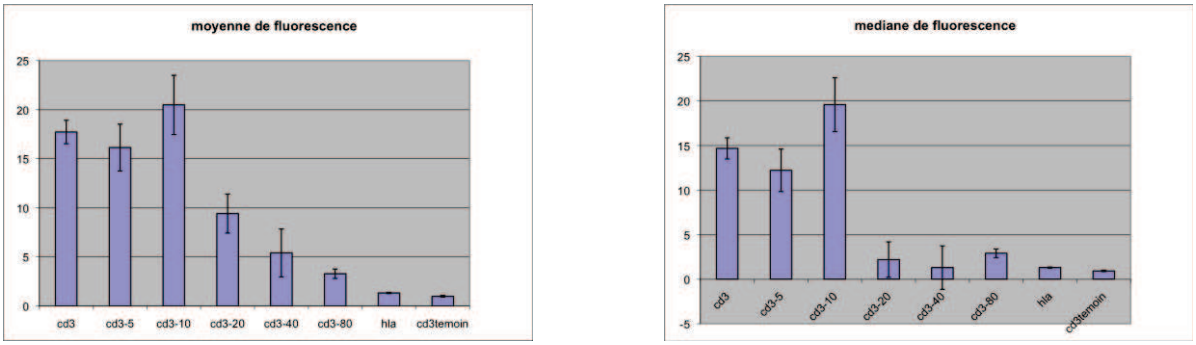
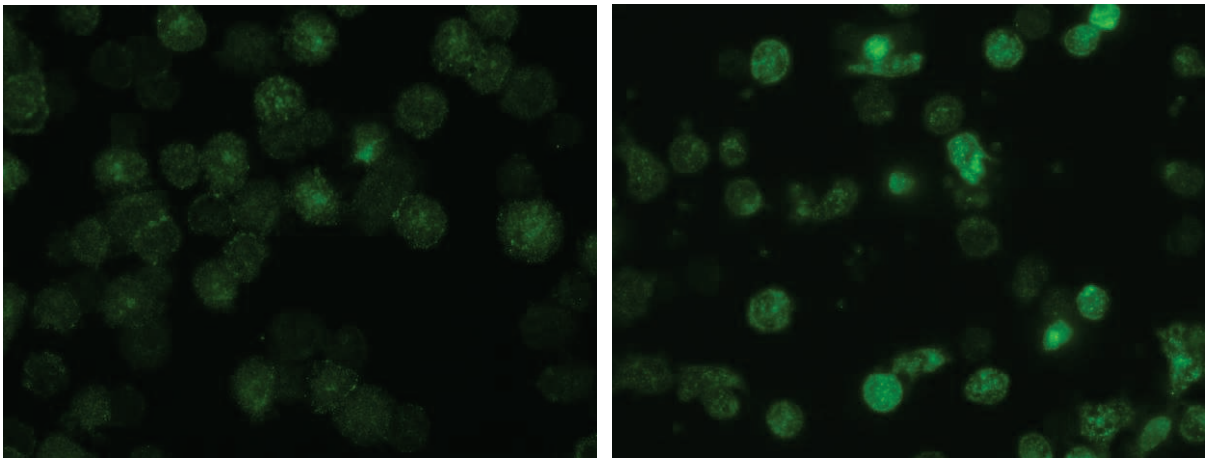


Figure 21 : Etude des moyennes et médianes de fluorescence de Erk selon les dilutions de CD3, les résultats de la fluorescence sur HLA-ABC et du témoin négatif sont également présentés.

1-2-2. Marquages cellulaires avec l'Ac antiphospho-ZAP-70

Le marquage avec l'Ac antiphosphoZAP-70 permettait la mise en évidence de fluorescences identiques que les cellules soient déposées sur CD3 ou HLA-ABC [Figure 22].

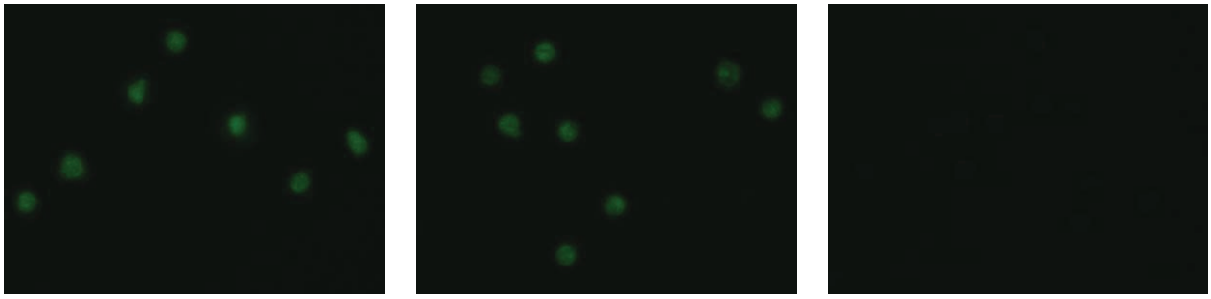


a b

Figure 22 : Marquage des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac anti-p-ZAP-70 (Tyr493) après un temps d'adhésion de 15 minutes (a) sur une lamelle CD3 et (b) sur une lamelle HLA-ABC.

1-2-3. Marquages cellulaires avec l'Ac antiphosphoLck

Le marquage par l'Ac antiphosphoLck était plutôt de répartition membranaire [Figure 23].



a b c

Figure 23 : Marquage des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac anti-p-Lck après un temps d'adhésion de 5 minutes (a) sur une lamelle CD3, (b) sur une lamelle HLA-ABC et (c) sur une lamelle CD3 avec sonde alexa 488 (Fab')2 goat antirabbit IgG seule (témoin négatif).

On ne notait pas de différence en terme de moyenne de fluorescence du marquage des cellules déposées sur les lamelles CD3 et sur les lamelles HLA-ABC [Figure 24].

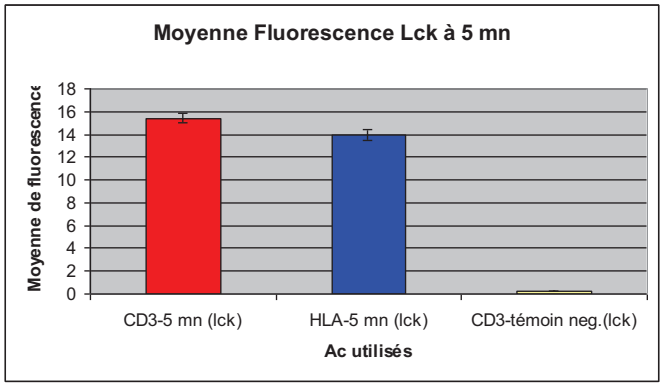
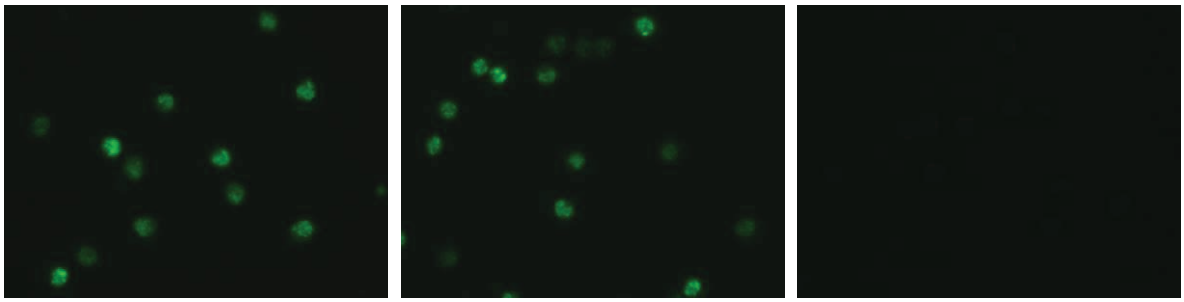


Figure 24 : Etude de la fluorescence de Lck des cellules T purifiées fixées et marquées par l'Ac anti-p-Lck après un temps d'adhésion de 5 min.

1-2-4. Marquages avec l'Ac antiphosphoPKCθ

Le marquage par l'Ac anti-p-PKCθ était plutôt distribué sous forme de mottes à l'intérieur de la cellule [Figure 25].



a b c

Figure 25 : Marquage des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac anti-p-PKCθ après un temps d'adhésion de 30 min (a) sur une lamelle CD3, (b) sur une lamelle HLA-ABC et (c) sur une lamelle CD3 avec un marquage isolé par la sonde alexa 488 (Fab')2 goat antirabbit IgG (témoin négatif).

On ne notait pas de différence en terme de moyenne de fluorescence du marquage des cellules déposées sur les lamelles CD3 et sur les lamelles HLA-ABC [Figure 26].

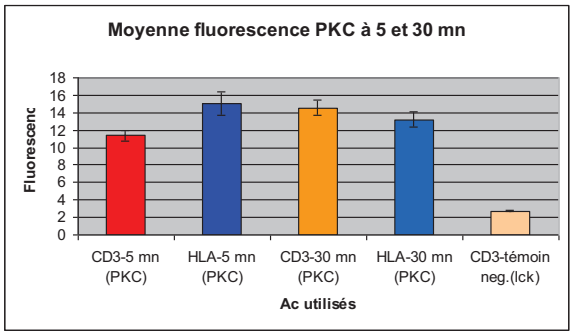
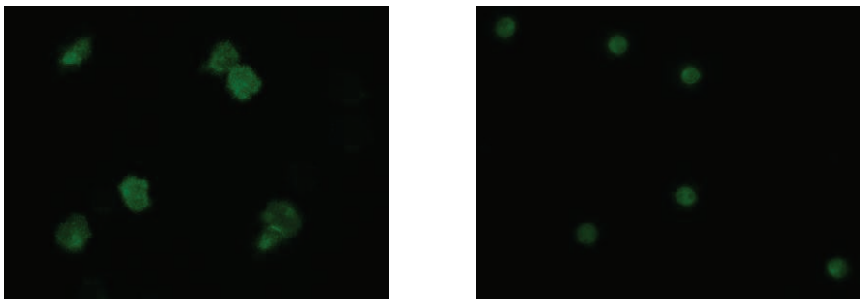


Figure 26 : Etude de la fluorescence de PKCθ des cellules T purifiées fixées et marquées par l'Ac anti-p-PKCθ après un temps d'adhésion de 5 et 30 min sur des lamelles recouvertes avec l'Ac antiCD3 ou antiHLA-ABC et sur une lamelle CD3 avec un marquage isolé par la sonde alexa 488 (Fab')2 goat antirabbit IgG (témoin négatif).

1-2-5. Marquages avec Ac antiphospho-Vav1

Le marquage avec l'Ac anti-p-Vav1 objectivait des fluorescences identiques sur CD3 et HLA-ABC [Figures 27 et 28].



a b

Figure 27 : Marquage des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac anti-p-Vav1 après un temps d'adhésion de 15 min (a) sur une lamelle CD3, (b) sur une lamelle HLA.

La fluorescence était plus faible à 5 qu'à 15 minutes d'adhésion des cellules T mais identique entre HLA-ABC et CD3 [Figure 28].

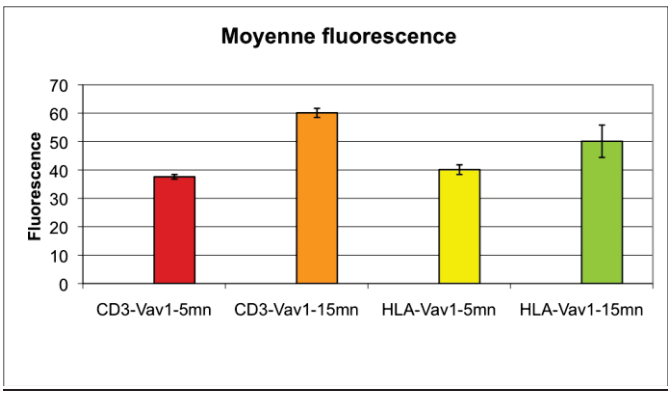
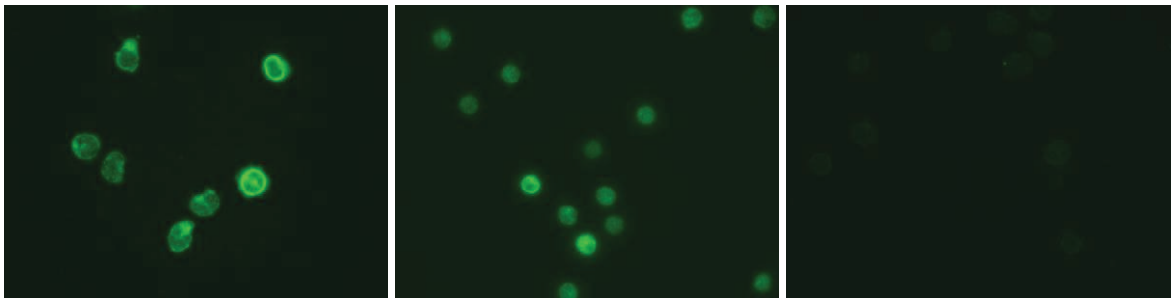


Figure 28 : Etude de la fluorescence de Vav-1 des cellules T purifiées fixées et marquées par l'Ac anti-p-Vav1 après un temps d'adhésion de 5 et 15 min sur des lamelles recouvertes avec des Ac anti-CD3 ou anti-HLA-ABC.

1-2-6. Marquages avec Ac antiphospho-PLCγ1

Le marquage était plutôt de distribution membranaire [Figure 29].



a b c

Figure 29 : Marquage des cellules T purifiées, fixées et par l'Ac anti-p-PLCγ1, après un temps d'adhésion de 30 minutes (a) sur une lamelle CD3, (b) sur une lamelle HLA-ABC et (c) sur une lamelle CD3 avec un marquage isolé par la sonde alexa 488 (Fab')2 goat antirabbit IgG (témoin négatif).

La moyenne de la fluorescence des cellules T marquées avec l'Ac antiphospho-PLCγ1, déposées sur les lamelles CD3 était le double de celle des cellules T déposées sur des lamelles HLA-ABC [Figure 30].

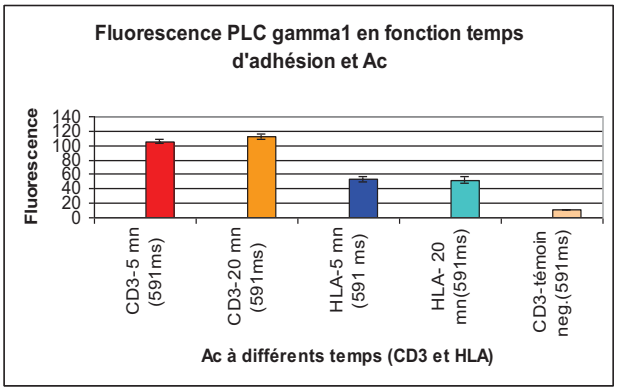
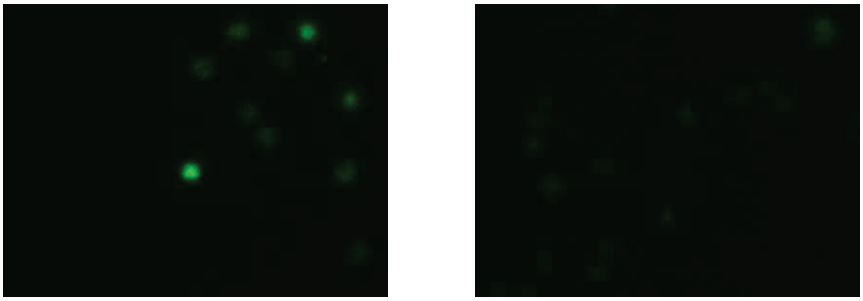


Figure 30: Etude de la fluorescence de la phosphoPLCγ1 des cellules T purifiées fixées et marquées par l'Ac anti-phospho-PLCγ1 après un temps d'adhésion de 5 et 30 min sur des lamelles coatées avec l'Ac antiCD3 et l'Ac antiHLA-ABC

1-2-7. Marquages avec l'Ac anti-p-C-Jun phosphorylé

La fluorescence avec l'Ac C-Jun phosphorylé était plus franche sur CD3 que sur HLA [Figure 31].



a b

Figure 31 : Marquage des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac anti-p-c-JUN après un temps d'adhésion de 15 minutes (a) sur une lamelle CD3, (b) sur une lamelle HLA-ABC.

Comme pour le marquage de la PLCγ1, La moyenne de la fluorescence des cellules T marquées avec l'Ac anti-p-C-Jun, déposées sur les lamelles CD3 était le double de celle des cellules T déposées sur des lamelles HLA-ABC [Figure 32].

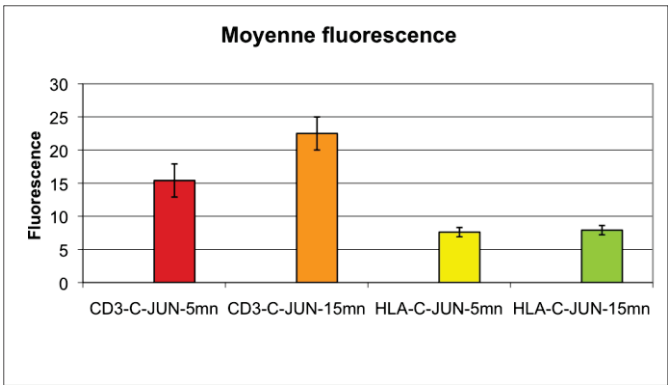
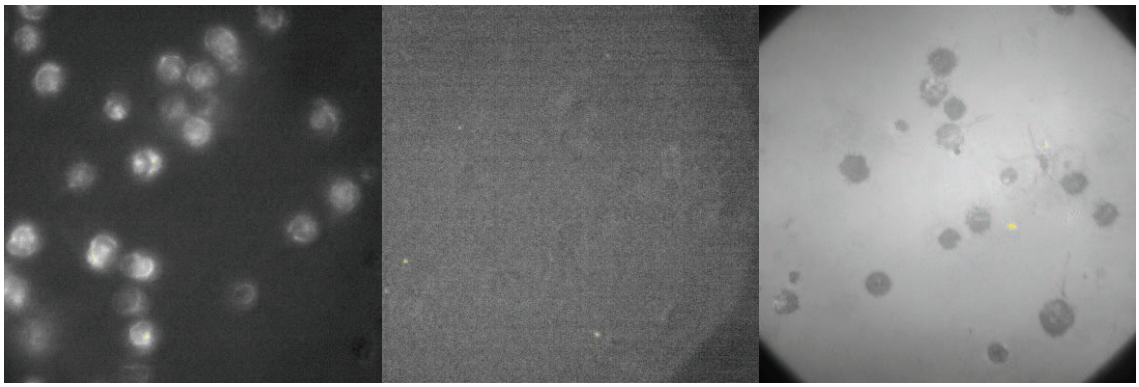


Figure 32 : Etude de la fluorescence de C-Jun des cellules T purifiées fixées et marquées par l'Ac anti-C-Jun après un temps d'adhésion de 5 et 15 min sur des lamelles recouvertes avec les Ac anti-CD3 ou anti-HLA-ABC.

1-2-8. Marquages avec l'Ac anti-CD69

Le marquage avec l'Ac antiCD69 réalisé 18 heures après le dépôt des cellules était franc sur les lamelles CD3 et négatif sur les lamelles HLA-ABC comme le montre la figure 33.



a b c

Figure 33 : Marquage des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac antiCD69 après un temps d'adhésion de 18 heures (a) sur une lamelle CD3, (b) sur une lamelle HLA-ABC, (c) image en microscopie IRM des cellules étalées du la lamelle HLA.

2- Etude de la réversibilité du signal induit par l'Ac antiCD3

2-1. Matériels et méthodes

Le but de cette manipulation était de voir si l'activation cellulaire T est réversible.
Le principe était de déposer les cellules sur une lamelle recouverte d'Ac antiCD3 pendant un certain temps puis de les décoller et de les recoller sur une lamelle recouverte d'Ac anti-HLA pendant 15 minutes. Pour les décoller, on procèdait à plusieurs rinçages toniques de la chambre à la pipette avec du PBS et on collectait le liquide de rinçage dans un eppendorf. Puis on centrifugeait les cellules et on récupèrait le culot de cellules avant de les redéposer sur la lamelle HLA.
On réalisait ensuite un marquage de ces cellules avec l'Ac antiphospho-Erk afin de voir le degré d'activation cellulaire.

En parallèle, on utilisait un système de contrôle positif en déposant des cellules sur une lamelle « CD3 » (15 mn) et un système de contrôle négatif en déposant des cellules sur une lamelle « HLA » (15 mn) avec également un marquage avec l'Ac antiphospho-Erk.

2-2. Résultats et discussion

Après une adhésion des cellules sur des lamelles CD3 de 3 à 20 minutes, avant de les redéposer sur HLA, le marquage Erk est négatif. Les cellules redéposées sont cependant fluorescentes sur le témoin positif (CD3) et non fluorescentes sur le témoin négatif (HLA).
A partir de 30 minutes de temps d'adhésion sur CD3, quelques cellules redéposées sur les lamelles « HLA » sont franchement fluorescentes. Ces expériences ne permettent pas encore de déterminer le temps nécessaire pour que la cellule initie le processus d'activation, et pour que cet engagement devienne irréversible.
Mais cette technique de décrochage est peut-être traumatisante pour les cellules. Donc pour confirmer ces résultats, nous envisageons de fabriquer des surfaces dissociables par des procédés moins agressifs pour la cellule.

3-Principe du micropatterning

La mise en place de notre méthode d'étalement cellulaire permet grâce à la réalisation de tampons, de créer des zones recouvertes d'Ac différents et de suivre le comportement des cellules.

3-1. Matériels et méthodes

3-1-1 Fabrication des tampons de PDMS

La fabrication de ces tampons a été réalisée avec le Dr Kheya Sengupta et Sophie Massou dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du CINaM-CNRS (UPR3118) à Marseille à la faculté de Luminy.
La fabrication des surfaces micropatternées se fesait à partir de tampons en PDMS. Le moulage du PDMS s'effectuait à partir de substrat de silicium recouvert de résine. L'irradiation de la résine par des rayons ultraviolets à travers un masque permettait la

réalisation du moule de silicium. Le PDMS déposé sur ce moule formait un tampon [figure 34].

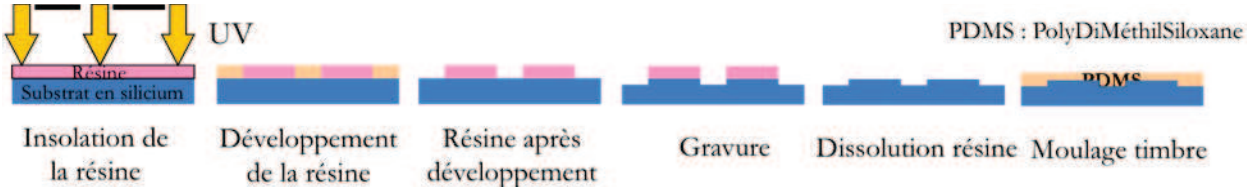


Figure 34 : fabrication des tampons de PDMS

3-1-2 Fabrication des surfaces micropatternées

La fabrication de surfaces micropatternées se faisait à partir des tampons de PDMS recouverts d'une solution de BSA-Biotine [figure 35].

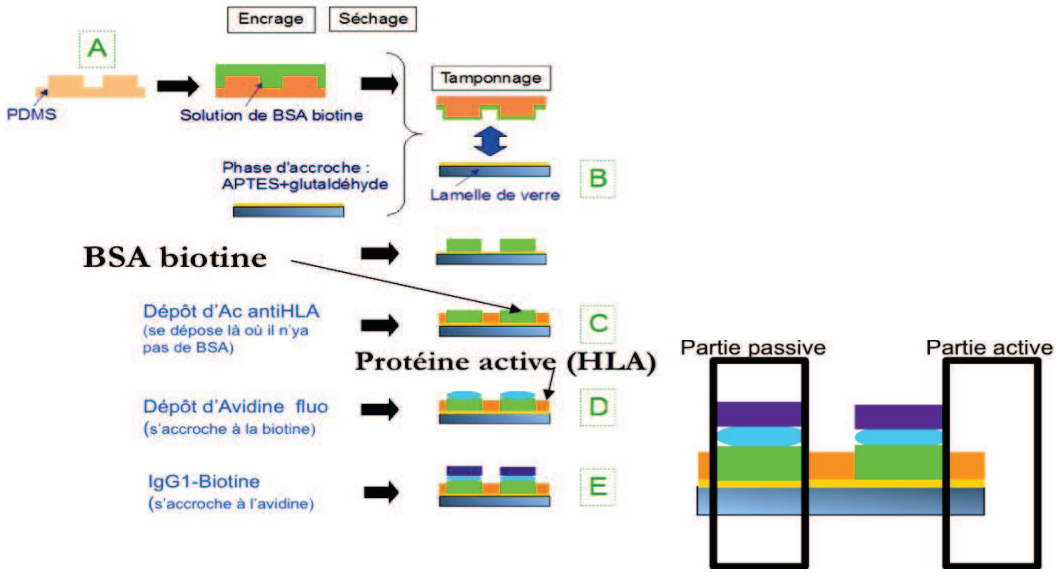


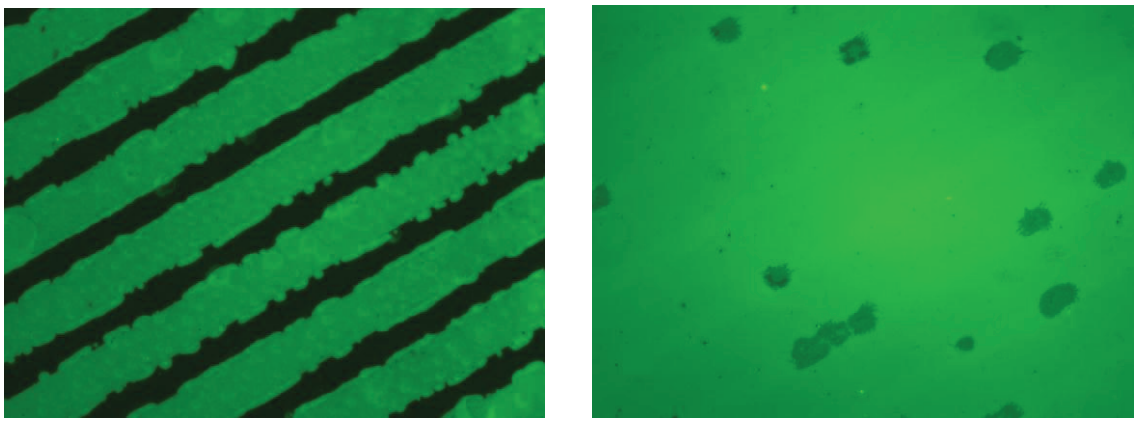
Figure 35 : Fabrication des surfaces micropatternées

Des lamelles en verre (24x24 mm) étaient nettoyées pendant 4 heures dans de l'acide sulfurique (Sigma) puis rincées à l'eau courante puis à l'eau distillée et séchées à 65°C.
Les lamelles propres étaient ensuite silanisées avec du 3-aminopropyl triethoxysilane (Sigma-Aldrich) pendant 4 min à 4°C, rincées dans du PBS et incubées avec de la glutaraldéhyde à 1% pendant 30 min à température ambiante.

Les tampons de PDMS, conservés dans de l'eau déionisée, étaient séchés à l'air comprimé puis immergés dans de la BSA-biotine à une concentration de 1 mg/ml à température ambiante pendant 15 min. Les tampons étaient de nouveau séchés à l'air comprimé puis appliqués sur la lamelle de verre silanisée pendant 2 min en exerçant une légère pression.
La lamelle était ensuite placée dans la chambre et recouverte d'Ac anti-HLA-ABC à la concentration de 10 µg/ml pendant 2 heures puis rincée avec du PBS. Enfin, la lamelle était saturée avec de la BSA à 0,1 mg/ml pendant 20 min. De l'avidine fluorescente (par exemple de la streptavidine Alexa 488 nm) était ensuite déposée à la concentration de 0,1 mg/ml pendant 20 min. La lamelle était de nouveau rincée au PBS avant de rajouter de IgG1-biotine à 10 µg/ml pendant 20 mn et de nouveau rincer avec du PBS et de saturer avec de la BSA à 0,1 mg/ml pendant 20 min. Les cellules étaient ensuite déposées pendant 20 min.

3-2. Résultats et discussion

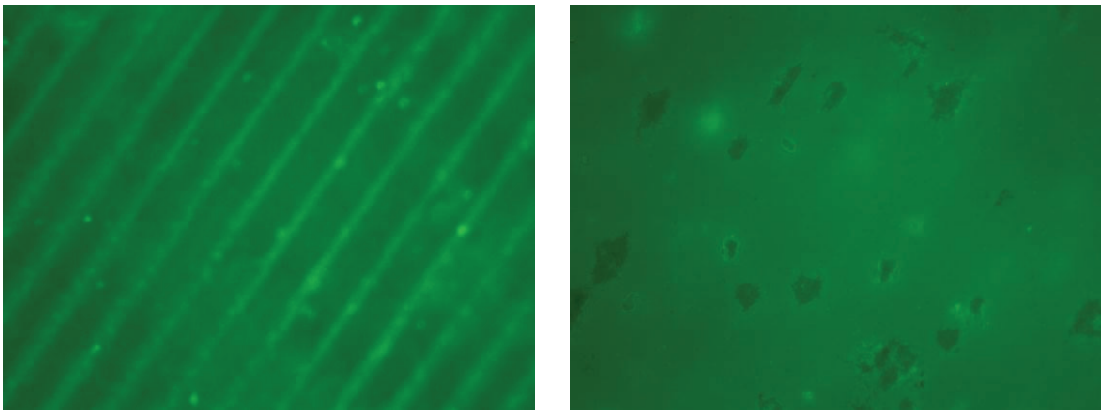
Pour tester la faisabilité de cette technique, nous avons choisi des moules présentant des lignes de 10µm de largeur couverts d'Ac antiHLA-ABC, intercalés avec des lignes de 50µm recouverts d'Ac antiIgG1.
Les cellules observées après 20 min de dépôt, adhèraient plus volontiers dans les lignes non fluorescentes recouvertes d'Ac avec environ 70% de cellules observées dans les lignes [Figure 36].



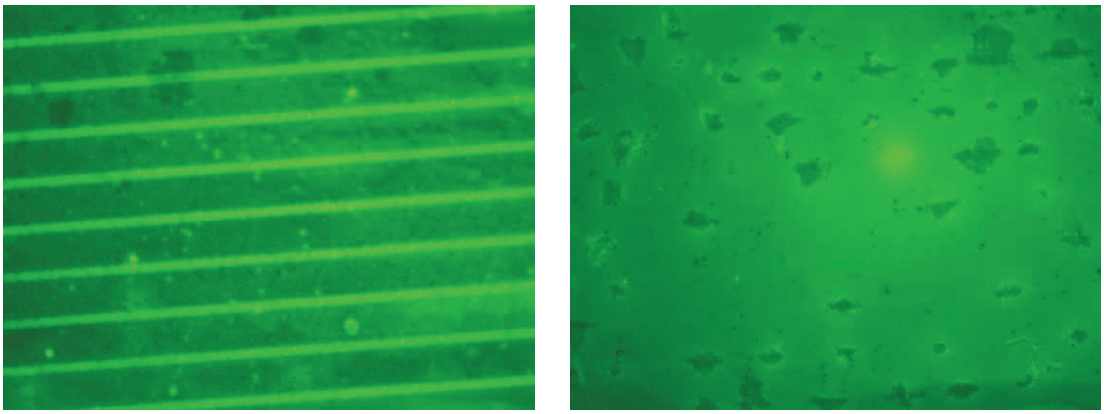
a b

Figure 36 : a/ Image en fluorescence du timbre utilisé. Les lignes fluorescentes correspondent à la surface passive, les lignes noires à la surface active recouverte d'Ac antiHLA-ABC.
b/ Image en IRM de l'image a après addition de cellules T purifiées adhérant sur des surfaces micropatternées préparées selon la technique décrite.

Une autre expérience préliminaire a été réalisée en appliquant de l'avidine non fluorescente et un Ac marqué avec une sonde fluorescente, par exemple le CD11aFITC [Figure 37].
Dans cette manipulation, des cellules T provenant de la lignée Jurkat ont été utilisées.
Les cellules s'alignaient le long des lignes fluorescentes avec 90% des cellules, situées dans ces lignes.



a b



a' b'

Figure 37 : a et a'/ Images en fluorescence du timbre utilisé. Les lignes foncées correspondent à la surface passive, les lignes fluorescentes à la surface active recouverte d'Ac antiCD11aFITC.
b et b'/ Image en IRM des images a et a' après addition de cellules T purifiées adhérant sur des surfaces micropatternées préparées selon la technique décrite. Les cellules se déposent le long des lignes.

3-4 Discussion :

Les surfaces synthétiques recouvertes de ligands immobilisés ont déjà été utilisées pour mesurer certaines fonctions cellulaires comme l'adhésion et la migration [Koo L et al. 2002, Jiang X et al. 2005], le rassemblement de récepteurs [Wu et al. 2004], la différenciation [McBeath et al. 2004] de même que la vie ou la mort cellulaire [Chen et al. 1997].
A l'échelle nanométrique, ces systèmes ont été utilisés pour décortiquer les rôles physiologiques de la synapse immunologique [Mossman KD et al. 2005, Doh J et al. 2006] ou la fonction des intégrines [Arnold M et al. 2004].
Mossman et al. ont utilisé des surfaces nanopatternées correspondant à une bicouche lipidique fluide déposée sur un substrat de silice. Le mouvement des molécules possible dans la bicouche lipidique est bloqué par des barrières mécaniques imposant ainsi des contraintes dans la formation de la synapse. En reconstituant une présentation spatiale de ligands connus ou en contrôlant leur mobilité, la géométrie de la synapse qui en résulte peut être reprogrammée [Mossman KD et al. 2005].
Le modèle de Doh J et al. est basé sur surfaces recouvertes d'Ac dirigés contre la chaîne CD3ε du TCR, utilisés comme des substituts du p-MHC, ligands naturels du TCR, entourés de molécules ICAM-1 (intercellular adhésion molécule-1) [Doh J et al. 2006]. Cela permet de court-circuiter la spécificité antigénique dans les interactions TCR-pMHC. De plus c'est une stratégie fréquemment utilisée pour déclencher la signalisation du TCR [Lee KM et al. 1998].

Notre modèle, à l'échelle micrométrique, peut permettre d'observer le comportement de cellules sur des surfaces différentes. Les étapes préliminaires montrent que les cellules adhèrent préférentiellement le long des zones couvertes d'anticorps spécifiques.
Ce modèle ouvre la voie à d'autres manipulations. La corrélation avec l'activation peut être mesurée avec l'étude du calcium ou par le marquage avec l'Ac anti-p-Erk.

VII- Revue sur l'immunosénescence

Dans le cadre de ce travail de thèse, un article de revue sur l'immunosénescence a pu être réalisé. Il reprend les données exposées en première partie de ce manuscrit.
Cet article contitue l'annexe 5.

VIII- Etude de faisabilité de l'application clinique

Au cours de ce travail de thèse, a été débutée une étude de recherche clinique afin de tester la faisabilité de mise en place d'un test rapide de mesure de l'immunité cellulaire.
Nous rapportons ici les différentes étapes de cette étude, en particulier la justification de notre recherche telle qu'elle a été formulée auprès du promoteur de cette recherche (Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille).
Cette étude a reçu l'approbation d'un comité d'éthique et a démarré en 2009. Les inclusions de patients doivent se terminer fin 2010.

1- Justification de notre recherche

Comme nous l'avons vu, le déclin des fonctions lymphocytaires T a été proposé comme le déficit central de l'immunosénescence [Akha et al. 2005, Marko et al. 2007] mais si l'immunité a été largement étudiée au cours de l'immunosénescence, nous disposons de peu d'études comparatives prospectives avec des sujets âgés pathologiques.
Il y a quelques années, plusieurs travaux ont montré que la jonction spécialisée entre le lymphocyte T et la CPA, appelée "synapse immunologique" constituait une étape importante de l'activation lymphocytaire T [Monks et al. 1998, Revy et al. 2001]. Avec la formation de la SI, le TCR initialement à l'extérieur de la synapse est transporté au centre dans la c-SMAC tandis que LFA1 initialement au centre est transporté à l'extérieur pour former la p-SMAC, aboutissant à la formation de la synapse dite « mature » [Grakaoui et al. 1999].
Si dans les premières études, la formation de la SI semblait être une étape clé dans l'activation lymphocytaire T [Monks et al. 1998, Revy et al. 2001, Marko et al. 2007], des résultats récents suggèrent que les événements d'activation sont déclenchés avant la formation de la synapse par la formation de « microclusters » de TCR qui vont se concentrer ultérieurement dans la c-SMAC où ils subiront une endocytose [Purtic et al. 2005, Saito et al. 2006, Varma et al. 2006]. Ainsi la synapse dite « mature » semble plus importante pour la régulation que pour le déclenchement des évènements de signalisation qui se situent en amont de la formation de la synapse [Purtic et al. 2005, Saito et al. 2006].
D'importantes études dans les modèles murins ont révélé que la proportion de cellules T CD4 et CD8 capables de former des synapses immunologiques décline avec l'âge chez les souris. Il semblerait que les lymphocytes T de souris âgées différent de ceux des souris plus jeunes dans les étapes précoces d'interactions avec la CPA [Garcia et al. 2001, Akha et al. 2005].

L'âge est également associé à une dysrégulation du cytosquelette. En effet il a été montré une réduction de la capacité des lymphocytes T CD4 à former des pseudopodes en réponse à une stimulation par le TCR et des altérations dans la localisation des composants du CD3 dans les fractions du cytosquelette à la fois avant et après stimulation. Les éléments du cytosquelette sont également impliqués dans la relocalisation du CD43 à l'extérieur de la synapse immunologique. Il existe également un déclin des lymphocytes T à exclure le CD43 de la synapse [Akha et al. 2005]. De plus des changements associés à l'âge dans la glycosylation du CD43 et du CD45 pourraient jouer un rôle important dans l'immunosénescence et le traitement de cellules T de souris âgées avec des endopeptidases spécifiques de glycoprotéines peut restaurer la formation de la synapse de cellules CD4 de souris âgées [Akha et al. 2005, Garcia et al. 2005].

Il a également été montré que les lymphocytes T CD4 de souris âgées étaient significativement moins performants pour recruter les protéines de signalisation au niveau de la synapse immunologique que des lymphocytes T CD4 de souris jeunes [Tamir et al. 2000, Marko et al. 2007].

Ces découvertes supportent l'hypothèse que des évènements précoces déclenchés par la rencontre entre le lymphocyte T et la CPA pourraient être utilisés comme des marqueurs du déclin lymphocytaire T.

Si ces données semblent d'importance notable chez l'animal, nous ne disposons pas de données sur la formation de la synapse immunologique chez le sujet âgé.

Grâce à la microscopie IRM, le contact entre la cellule T et la CPA peut être observé de façon précise. La CPA peut être remplacée par des lamelles de verre recouvertes d'anticorps activateurs ou non de la cellule T.

Le microscope à interférence réflexion (IRM) permet d'observer le contact entre une cellule et son substrat sur une hauteur très faible (environ 100 nm). Ce contact étroit est défini sous forme de taches noires. Le principe est basé sur les indices de réfraction de la lumière traversant les zones accolées. L'IRM permet donc de définir la zone de contact et de l'étudier de façon quantitative et qualitative par sa forme [Pierres et al. 2002].

Récemment, nous avons élaboré et validé un moyen quantitatif d'analyse des images IRM pour estimer la distance entre une cellule et la surface [Pierres et al., 2003].

Nous avons mis au point un modèle permettant d'étudier grâce à la microscopie IRM, les étapes précoces de la formation du contact entre des lymphocytes T et des lamelles de verre

recouvertes d'anticorps monoclonaux activateurs (CD3) ou non (HLA classe I) [Pierres et al. 2008]. Cette approche semble pertinente car, comme nous l'avons mentionné plus haut, l'activation lymphocytaire semble davantage liée à la formation précoce de microcontacts qu'à l'établissement d'une synapse immunologique mature.

2- Objectifs de notre étude

2-1. Objectif principal

L'objectif principal de cette recherche était de comparer le statut immunitaire d'une population de patients représentative des sujets hospitalisés en court séjour gériatrique avec des pathologies variées et de le comparer à une population de sujets âgés sains sélectionnés selon des critères stricts [Ligthart et al.1984] afin de préciser l'effet de la polypathologie et de certaines pathologies sur l'immunité.

2-2. Objectifs secondaires

L'objectif secondaire de cette recherche était de tester la faisabilité d'un test explorant la capacité des lymphocytes T à former un contact moléculaire avec une surface activatrice mimant la CPA.

Après mise au point d'un modèle d'étalement de lymphocytes sur des lamelles en verre recouvertes d'anticorps activateurs ou non, nous avons voulu préciser certains paramètres d'étalement des lymphocytes de nos différentes populations et déterminer s'il existait des différences entre ces populations.

Ainsi nous voulions comparer les résultats de notre test avec ceux des tests d'immunité cellulaire classiques. Les résultats pourraient conduire à proposer un test robuste, rapide et peu coûteux qui pourrait être proposé très largement aux sujets hospitalisés dans une unité de court séjour gériatrique.

3- Méthodologie

3-1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude comparative d'un groupe de sujets âgés hospitalisés dans un service de court séjour à un groupe de sujets âgés sains définis selon les critères stricts du « SENIEUR PROTOCOL » [Annexe 1, Ligthart 1984].

Elle porte également sur la faisabilité d'une nouvelle approche diagnostique de l'immunité cellulaire.
Le recrutement et le recueil des données ont été réalisés de façon prospective.

3-2. Centres et médecins investigateurs

L'étude s'inscrit au sein d'une collaboration entre l'unité INSERM UMR 600 du Pr Bongrand à Luminy et le service de court séjour gériatrique du Pr Heim de l'hôpital Sainte Marguerite.
Elle est conduite en étroite collaboration avec le laboratoire d'immunologie du Pr Bongrand à la Conception.
L'étude clinique est menée avec le CIC de Marseille, notamment pour l'étude des sujets sains mais également dans l'aide à leur recrutement grâce à la collaboration du Professeur Jean-Paul Bernard et du Docteur Sophie Morange.
Une collaboration avec le Réseau Gérontologique Sud de Marseille dirigé par le Dr Marie-Josée Mathieu est réalisée pour le recrutement des personnes du groupe témoin.

4- Population d'étude

Les sujets inclus dans l'étude répondent aux critères de sélection suivants :

4-1. Population de sujets âgés pathologiques

Critères d'inclusion

- Sujet âgé de 75 ans ou plus, de sexe féminin ou masculin
- Sujet admis dans le service de court séjour gériatrique de l'hôpital Sainte Marguerite, quel que soit le motif d'admission
- Sujet n'étant pas sous tutelle, ni curatelle
- Sujet bénéficiant d'un régime de protection sociale
- Sujet ayant donné son consentement de participation ou pour lequel la personne de confiance a donné son consentement dans le cas de personne vulnérable

Critères de non inclusion

- Sujet âgé de moins de 75 ans
- Sujet refusant de participer à l'étude ou pour lequel la personne de confiance refuse la participation du sujet.

Les inclusions ont été réalisées par tirage au sort pour s'assurer que la population étudiée était représentative des sujets admis dans le service.

4-2. Population de sujets âgés sains

Critères d'inclusion

- Sujet âgé de 75 ans ou plus, de sexe féminin ou masculin,
- Répondant aux critères définis par le SENIEUR PROTOCOL [annexe 1, Ligthart et al.1984]
- Sujet n'étant pas sous tutelle, ni curatelle
- Sujet bénéficiant d'un régime de protection sociale
- Sujet ayant donné son consentement de participation ou pour lequel la personne de confiance a donné son consentement dans le cas de personne vulnérable

Critères de non inclusion

- Sujet âgé de moins de 75 ans
- Sujet refusant de participer à l'étude ou pour lequel la personne de confiance refuse la participation du sujet.

5- Evaluation des sujets

5-1. Evaluation clinique

Pour les 2 groupes de patients (sains et pathologiques), les données suivantes ont été recueillies :

- Données socio-démographiques : âge, sexe, mode de vie, statut marital, aides au domicile, données sociales avec notamment la désignation des aidants.
- Données d'interrogatoire : antécédents
- Données d'examen clinique : Points notables de l'examen, poids, taille, Indice de Masse Corporelle lorsque cela était possible. En effet chez les patients grabataires, la mesure fiable du poids n'était pas possible. Lorsque la taille n'était pas connue, ou impossible à obtenir en position debout, elle était extrapolée à partir de la distance talon-genou par la

formule de Chumlea [Chez la femme : T(cm) = 84,88 - 0,24 X âge (années) + 1,3 X h talon-genou (cm), chez l'homme : T(cm) = 64,19 - 0,04 X âge (années) + 2,03 X h talon-genou (cm)]

- Données relatives aux traitements :

  Il a été noté tous les traitements pris par les sujets témoins ainsi que par les patients avant l'entrée à l'hôpital. Il a également été noté l'introduction récente d'un nouveau traitement, la prise d'AINS, de corticoïdes ou d'un autre traitement immunosuppresseur (chimiothérapie par exemple) ainsi que de traitements hormonaux qui constitueraient des critères d'exclusion de la population de sujets témoins. Le traitement donné à l'hôpital y compris les nouveaux traitements introduits (par exemple antibiotiques) a été colligé.

- Données relatives à l'évaluation gérontologique standardisée (EGS) réalisée à l'aide des échelles suivantes :
- L'échelle de Lawton (IADL à 4 items) explore la capacité à utiliser le téléphone, à prendre un moyen de transport, à gérer la prise de son traitement, et son budget. Ce sont les activités qui confèrent l'indépendance d'un sujet vis-à-vis de son entourage [Lawton et al .1969].

- L'échelle de Katz (ADL) explore la capacité des transferts, de l'habillage, de l'hygiène corporelle, du déplacement aux toilettes, à la prise des repas et la notion d'incontinence. Ce sont les activités permettant une indépendance dans la vie quotidienne [Katz et al.1963].

  Ces deux échelles explorent le statut fonctionnel du sujet âgé.

- Le "Timed up and go" est un test rapide permettant d'évaluer le statut fonctionnel d'un patient [Podsiallo et al 2001]. Il est dérivé du « Get-up and go test » qui demande au patient de se lever d'une chaise sans accoudoirs, de marcher 3 mètres, de faire demi-tour et revenir s'asseoir [Mathias et al. 1986]. Le « timed up and go » est la version chronométrée du get up and go test. Un score inférieur à 20 secondes permet de prédire la capacité du patient à sortir de son domicile seul en sécurité et donc un état fonctionnel correct.

- La station unipodale consiste à tenir sur un pied sans aides. Une station unipodale inférieure à 5 secondes traduit un risque élevé de chutes.

- Le Mini-Mental State (MMS) : c'est l'instrument le plus fréquemment utilisé pour dépister un syndrome démentiel car il est facile à réaliser (il dure moins de 10 minutes pour un professionnel entraîné) [Folstein et al. 1975].

- La version courte de l'échelle de dépression gériatrique (Gériatric Depression Scale (GDS) permet de dépister un syndrome dépressif, souvent de présentation atypique chez le sujet âgé [Katz IR, 1998].

- Le Mini-Nutritional-Assessment (MNA) est un test très sensible et validé pour dépister la dénutrition ou le risque de dénutrition chez le sujet âgé [Guigoz et al. 1997]

L'EGS permet d'apprécier l'état global d'un patient sur le plan de son autonomie, de son équilibre, de son état cognitif et de son humeur ainsi que de son état sensoriel et nutritif.

L'EGS était réalisée à distance du début de l'hospitalisation entre 5 et 10 jours après l'entrée dans le service. Elle évaluait le patient au moment de son hospitalisation et le sujet sain lors de la consultation.

Pour les patients hospitalisés ont également été recueillies les données médicales relatives au motif d'hospitalisation, aux diagnostics posés pendant l'hospitalisation, aux complications survenues pendant l'hospitalisation et au décès éventuel (date et motif).

Les données relatives à l'existence des pathologies suivantes ont également été recueillies:
- pathologie infectieuse en précisant si possible le ou les sièges de l'infection
- pathologie cancéreuse
- diabète
- dénutrition qui sera définie selon les critères suivants : albuminémie < 35g/l et/ou IMC <21 et/ou un MNA < 17.
- HTA
- pathologie auto-immune

- existence d'un « syndrome gériatrique » traduisant la « fragilité du patient » [Vinograd et al.1991] :
  - maladie neuro-dégénérative (maladie d'Alzheimer et pathologies apparentées, démence vasculaire ou maladie à composante mixte)
  - confusion
  - dépression
  - incontinence urinaire
  - chutes à répétition (≥ 3 par mois)
  - dépendance (score ADL ≤ 3)

Les syndromes gériatriques sont le signe d'une fragilité.

5-2. Evaluation biologique

Dans chaque groupe de patients, le bilan biologique suivant a été réalisé :

1/ Numération formule, plaquettes

2/ Ionogramme, creatininémie, urée, phosphatases alcalines, SGOT, SGPT, gamma GT, calcémie, protidémie,

3/ Mesure de la protéine-C-réactive

4/ Exploration de l'immunité (chapitre 5.3)

5/ Dosage de la vitamine D

Dans le groupe de patients hospitalisés ont également été réalisés

6/ Dosage albuminémie, pré-albuminémie

Dans le groupe contrôle correspondant aux critères du « senieur protocol », les analyses complémentaires suivantes ont été réalisées pour vérifier que les critères d'inclusion soient respectés :

7/ VS

8/ Recherche de protéinurie, glycosurie, analyse du sédiment urinaire

9/ Immunofixation sanguine

Dans tous les groupes, la fonction rénale est évaluée par la clearance de la créatine calculée selon le MDRD [Levey et al 1999].

Le bilan biologique de base a été réalisé dans les 5 jours qui suivaient le début de l'hospitalisation.

5-3. Exploration de l'immunité

- NFS plaquettes avec détermination du nombre absolu de lymphocytes et de polynucléaires
- Sérologie VIH 1 et 2
- Sérologie CMV
- Immunophénotypage lymphocytaire complet avec décompte des différentes populations de lymphocytes dont les lymphocytes CD4 et CD8, par la cytométrie de flux. Il permet aussi de comptabiliser les lymphocytes B, T et NK.
- Electrophorèse des protéines pour écarter un pic monoclonal qui fait rechercher une gammapathie monoclonale par immunofixation sanguine et pour rechercher un déficit en immunoglobulines.
- Le dosage pondéral des immunoglobulines précise l'existence d'un déficit éventuel en immunoglobulines.
- Immunomarquage des lymphocytes T par les Ac CD45RO et Ac CD45RA permettant de différencier les lymphocytes T naïfs des lymphocytes T mémoire
- Test de prolifération lymphocytaire T à la PHA et au CD3 avec marquage au CFSE

Le bilan immunitaire a été réalisé dans les 5 jours qui suivaient le début de l'hospitalisation pour les sujets malades.

5-4. Etude de la formation du contact

La mise en place de notre test a été décrite dans l'article n°2 (Early contacts between T lymphocytes and activating surfaces. E Crétel, D Touchard, AM Benoliel, P Bongrand, A Pierres).
Les critères étudiés sont :

La surface d'étalement des cellules observée 15 minutes après le dépôt des lymphocytes sur la lamelle. Les lymphocytes sont déposés dans un petit volume pour permettre leur bonne synchronisation sur la lamelle. Le calcul de la surface se fait grâce à un logiciel mis au point par le Pr Bongrand à partir des surfaces d'étalement observées en microscopie IRM [Pierres et al. 2008]. Nous pouvons ainsi calculer l'aire moyenne des surfaces d'étalement des

lymphocytes T après dépôt sur des lamelles recouvertes d'Ac CD3 et sur des lamelles recouvertes d'Ac HLA-ABC. Cette différence d'étalement a déjà été observée avec les cellules JURKAT et les lymphocytes T issus de poches de sang où l'on note des surfaces d'étalement plus importantes sur les lamelles recouvertes d'Ac activateurs (CD3) [figure 38].

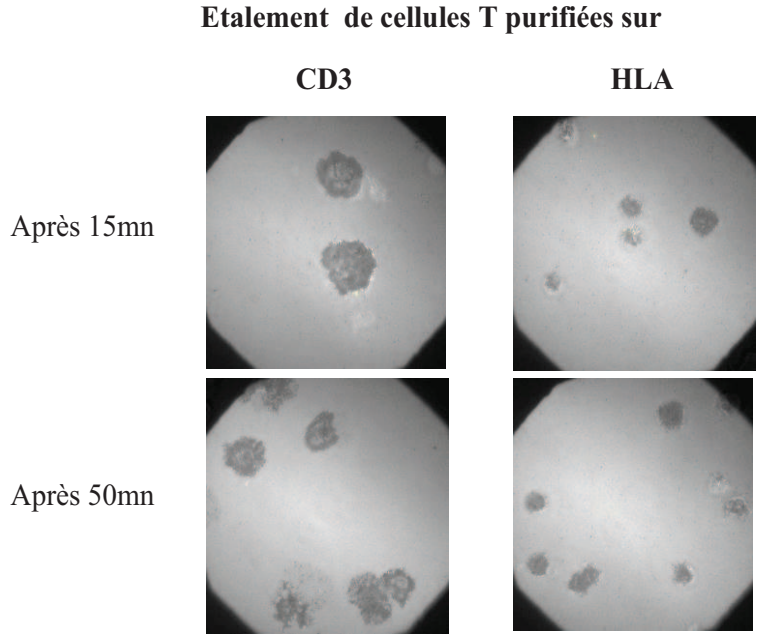


Figure 38: Observation en microscopie IRM et en visible de l'étalement de cellules lymphocytaires T sur des lamelles recouvertes d'Ac anti-CD3 ou anti-HLA-ABC et mesure de la taille des contacts à 15 et 50 minutes.

Le pourcentage d'étalement des cellules peut s'obtenir facilement en comparant dans un même champ les images obtenues en IRM (où l'on observe une tache grise lorsque la cellule est accolée) et en « visible » (ou l'on voit toutes les cellules y compris celles qui ne sont pas accolées).

La recherche d'un seuil critique d'étalement. Il s'agit de réaliser des dilutions successives dans la concentration de l'Ac CD3 et de déterminer le seuil d'Ac CD3 à partir duquel l'étalement sera défectueux. Des différences de seuil critique d'étalement pourraient ainsi être recherchées entre les différentes populations.

6- Critères d'évaluation

6-1. Critère de jugement principal

Le critère d'évaluation principal est représenté par le statut immunitaire évalué à partir du test de prolifération au CD3 avec marquage au CFSE.

Les critères de positivité de ce test ont été établis à partir d'un échantillon de 30 sujets sains au sein du laboratoire du Pr Bongrand. Les résultats de cet échantillon ont rapporté une médiane de pourcentage de cellules fluorescentes de 63 % [25^{éme} –75ème percentile : 42-75%]. La positivité du test est définie avec un pourcentage de fluorescence supérieur ou égal au 25 ^{éme} percentile.

6-2. Critères de jugement secondaires

L'évaluation du statut immunitaire sera complétée par la réalisation des tests suivants :

- *Test de prolifération lymphocytaire T à la PHA avec marquage au CFSE*

Avec une étude sur le même échantillon décrit ci-dessus, les résultats de cet échantillon ont rapporté une médiane de pourcentage de cellules fluorescentes de 70 % [25^{éme} –75ème percentile : 57- 78 %]. La positivité du test est définie avec un pourcentage de fluorescence supérieur ou égal au 25 ^{éme} percentile.

- *Dosage pondéral des immunoglobulines* : les normes de ce test sont définies par les résultats suivants

	IgA	IgG	IgM
Valeurs normales chez la femme	0,7 - 3,7 g/l	6,9 - 14 g/l	0,4 - 2,4 g/l
Valeurs normales chez l'homme	0,88 - 4,1 g/l	6,9 - 14 g/l	0,34 - 2,1 g/l

- *Décompte des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes* dont les valeurs normales se situent respectivement entre 2 et 7 Giga/l pour les polynucléaires neutrophiles et entre 1 et 4 Giga/l pour les lymphocytes.
- *Décompte des différentes populations de lymphocytes* : les normes de ce test sont définies par les résultats suivants :

	Lymphocytes T	Lympho T CD4	Lympho T CD8	Lympho B	Lympho NK
Valeurs en %	70% -80 %	45 à 55%	25 %	5-15%	7-15%
Valeurs absolues	700 à 3200/mm3	310- 1700/mm3	250-1000/mm3	50-600/mm3	70-600/mm3

La faisabilité de notre test « d'étude du contact » sera évaluée sur les paramètres qui auront été jugés les plus pertinents parmi les critères étudiés ainsi qu'en terme de délai d'obtention des résultats.

7- Nombre de sujets- Durée de l'étude

Le calcul du nombre de sujets nécessaires a été établi à partir du critère de jugement principal, à savoir la proportion de sujets avec statut immunitaire perturbé sur le critère test de prolifération au CD3 avec marquage CFSE. Nous avons posé comme hypothèses :

- proportion attendue de sujets avec test de prolifération au CD3 avec marquage CFSE positif dans la population de sujets âgés sains fixée à 70% (il a été montré que la prolifération est diminuée dans une population âgée saine par rapport à une population jeune [Krause et al.1999, Douziech et al. 2002]
- proportion attendue de sujets avec test de prolifération au CD3 avec marquage CFSE positif dans la population de sujets âgés pathologiques fixée à 35% (il a été montré que la moyenne de prolifération au test de prolifération utilisant l'incorporation de thymidine tritiée est inférieure de 50% chez les populations âgées non saines par rapport à une population de type senieur protocol [Hallgren et al. 1988].
- puissance de l'étude fixée à 80%
- risque alpha de 1ère espèce fixé à 5%
- ratio sujets pathologiques / sujets sains fixé à 2

Le nombre de sujets nécessaire à étudier était alors de 69 au total, répartis en 46 sujets âgés pathologiques et 23 sujets âgés sains. Ces effectifs ont été arbitrairement augmentés de 10% afin de prévenir les effets d'exclusion secondaires, perdus de vue.
Ainsi il était convenu d'inclure 77 sujets au total, répartis en 51 sujets pathologiques et 26 sujets sains (N-query Advisor version3.0).
La durée de participation de chaque sujet est variable, et correspond à la durée de son séjour hospitalier. La durée de participation des sujets âgés sains est de 2 jours correspondant à la première consultation avec le prélèvement, ainsi qu'à la deuxième 2 semaines plus tard pour le suivi clinique.

8- Résultats

A ce jour cette étude n'est pas terminée. Nous avons pu inclure 51 patients et 19 sujets sains.
La durée d'inclusion a été fixée à 2 ans.
L'analyse des résultats préliminaires de nos patients malades nous a conduit à la réalisation d'un article soumis à la « revue de médecine interne » accepté pour publication le 1er septembre 2010. Il est présenté au chapitre VII.

Nous avons pu évaluer les surfaces d'étalement de 10 sujets malades de cette étude clinique.
En attendant l'exploitation des données de tous les sujets (sains et malades), nous avons comparé ces résultats à ceux issus des poches de sang obtenues du centre de transfusion sanguine. Il s'agit de poches non utilisées, chez des sujets dont la moyenne d'âge est de 18 ans, et dont les sérologies pour les virus des hépatites B, C et VIH sont négatives. Nous avons pu exploiter les résultats de 12 poches de sang.

En comparant 1'aire moyenne d'étalement des cellules T purifiées de ces 2 populations, nous n'avons pas trouvé de différence statistique entre les surfaces recouvertes d'Ac antiCD3 purs, dilués au 1/10ème ou au 1/20ème. En revanche, on note une aire moyenne d'étalement beaucoup plus faible sur les surfaces HLA (1842 +/-1355) des lymphocytes T de sujets âgés malades, par rapport à celle des sujets jeunes (4454 +/-1339) (p = 0,0001).
Ces résultats sont préliminaires. Les résultats comparatifs de tous les sujets doivent être exploités avant de tirer des conclusions.

IX- Introduction au cinquième article

Etude du profil immunitaire de sujets âgés hospitalisés en unité de court séjour gériatrique

Immune profile of elderly patients admitted in a geriatric short care unit

E. Crétel [a,b] I. Veen [a], A Pierres [b,c], Y. Binan [a] , P. Robert [b,c], A.D. Loundou [d], K. Baumstarck-Barrau [d], A.-M. Hubert [c] , P. Bongrand [b,c], M Heim [a]

[a] Service de Gériatrie Sud, Hôpital Sainte Marguerite, 274 bd de Sainte Marguerite 13274 Marseille Cedex 09

[b] Unité Inserm UMR 600, Adhésion et Inflammation, Parc scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille

[c] Laboratoire d'immunologie, Hôpital de la Conception, 147 bd Baille, 13005 Marseille

[d] Unité d'Aide Méthodologique à la Recherche Clinique, DRC APHM, Laboratoire de Santé Publique-Faculté de Médecine, 27, Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex

Dans cet article, nous avons exploité les résultats de certains paramètres immunologiques des 51 sujets âgés malades inclus (35 femmes et 16 hommes).

Nos résultats confirment une prévalence de 86% d'anomalies immunitaires avec une lymphopénie <1500/mm^3 chez 41% des patients. La prédominance de lymphocytes T mémoire est retouvée dans 80% des cas et l'inversion du rapport CD4/CD8 est présente chez 12% de nos patients.

L'insuffisance en vitamine D (< 30 ng/ml), fréquente parmi ces patients (96%), est un facteur prédictif de lymphopénie totale et de lymphopénie B.

Nous concluons que les anomalies de l'immunité sont fréquentes dans cette population et pourraient constituer un facteur de fragilité, en particulier la lymphopénie. La carence en vitamine D pourrait jouer un rôle dans les anomalies immunitaires de sujets âgés fragiles.

Cet article, soumis à la revue de médecine interne et présenté en annexe 6, a été accepté pour publication.

C- CONCLUSION et PERSPECTIVES

Une des étapes critiques dans la réponse adaptative est la décision d'un lymphocyte T d'initier une activation après la rencontre avec une CPA. Les tests de prolifération lymphocytaires, classiquement utilisés pour mesurer cette activation cellulaire nécessitent plusieurs jours pour être réalisés [Gett et al. 2000]. L'analyse des marqueurs précoces d'activation est rendue difficile par la complexité des cascades de signalisation.

Notre modèle, basé sur le dépôt de cellules T sur des surfaces recouvertes d'Ac antiCD3 ou antiHLA, a l'avantage de différencier l'adhésion simple (sur les surfaces « HLA ») et l'activation (sur les surfaces « CD3 ») avec un témoin négatif correspondant aux surfaces recouvertes d'IgG1 où les cellules n'adhérent pas.

Nos premières conclusions montrent que des lymphocytes T touchant une surface adhésive commencent à s'étaler après un intervalle de temps compris entre plusieurs dizaines de secondes et quelques minutes. Durant cet intervalle, des ondulations verticales de la membrane semblent générer des contacts transitoires avec les surfaces sous-jacentes. La cinétique d'étalement des cellules est 7 et 8 fois plus rapide sur les surfaces activatrices (« CD3 ») que sur les surfaces de contrôle (« HLA »). Parallèlement à l'extension latérale de la cellule sur la surface, la distance entre la membrane cellulaire et la surface diminue progressivement.

L'hypothèse proposée est que la décision cellulaire de s'étaler rapidement sur les surfaces activatrices résulte de l'intégration de l'information fournie par les contacts transitoires avec la surface, générés par les ondulations de la membrane pendant une période d'environ 1 minute.

Pour monitorer les étapes précoces de la stimulation cellulaire, nous avons comparé les aires moyennes de contact de lymphocytes T sur des surfaces recouvertes d'Ac antiCD3 et d'Ac antiHLA. Les aires moyennes de contact rejoignent un plateau à 15 minutes et la valeur du plateau mesurée sur les surfaces « CD3 » est deux fois plus haute que la valeur du plateau sur les surfaces « HLA ».

D'autre part, avec des dilutions successives d'Ac antiCD3 sur les lamelles, nous observons une diminution de l'aire moyenne de la zone de contact formée 15 minutes après le contact initial entre des lymphocytes T et les surfaces activatrices. Parallèlement, la prolifération de

ces cellules diminue progressivement avec les dilutions successives d'Ac antiCD3. L'aire moyenne de contact est fortement corrélée aux réponses prolifératives mesurées avec le test de prolifération lymphocytaire standard au CFSE, réalisé 3 jours après le dépôt de lymphocytes T sur des surfaces recouvertes avec les même dilutions d'Ac antiCD3.

La mise en place de notre méthode d'étude de l'étalement cellulaire nous a également permis d'effectuer des marquages intracellulaires dans le but d'étudier la phosphorylation de certaines molécules impliquées dans la signalisation T.

Plusieurs anticorps dirigés contre ces protéines ont pu être testés, permettant de comparer la fluorescence émise lorsque les cellules sont déposées sur des lamelles recouvertes d'Ac antiCD3 ou d'Ac antiHLA [Figure 39].

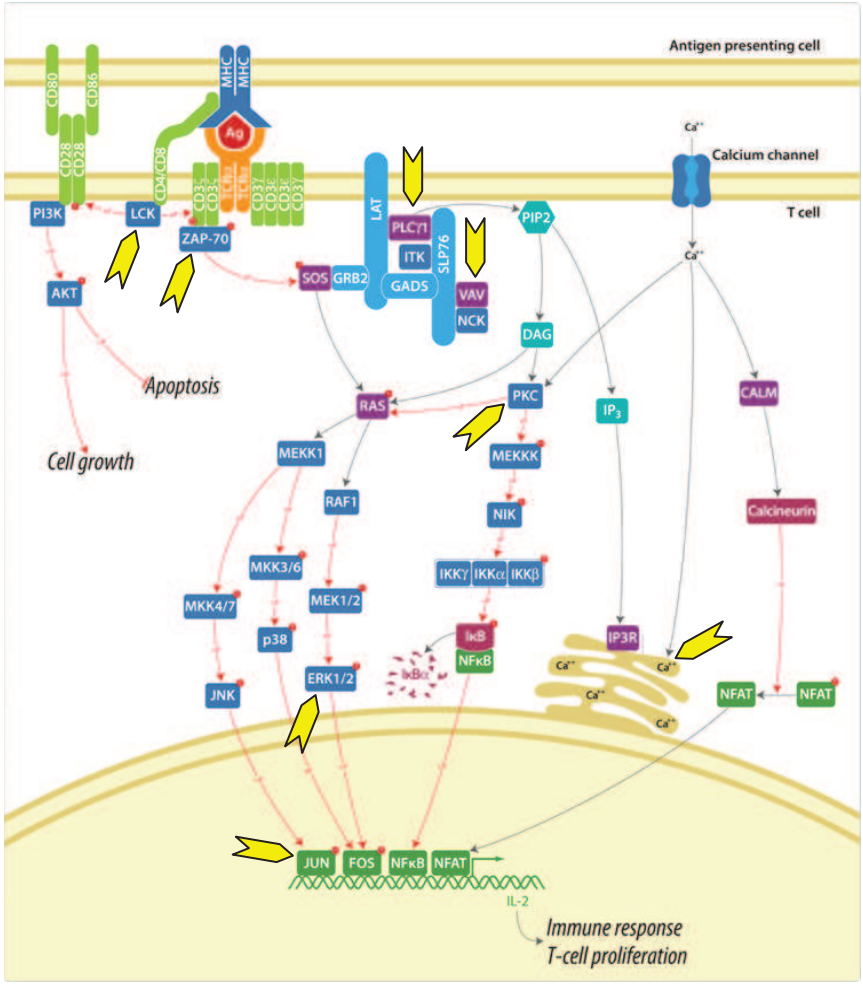


Figure 39 : Schéma des voies de signalisation après engagement du TCR. Les flèches désignent les molécules des voies de signalisation testées dans notre étude.

Nous avons observé des fluorescences comparables, pour certaines protéines phosphorylées, lorsque les cellules étaient déposées sur des surfaces activatrices ou non. C'est le cas des protéines phosphorylées ZAP-70, Lck, PKCθ, et Vav1.

La fluorescence de la p-PLCγ1 était diminuée de moitié sur les surfaces « HLA » de même que la fluorescence de p-C-Jun.

En revanche, la fluorescence de p-Erk était négative sur les surfaces « HLA ».

Ces résultats pourraient suggérer un début de signalisation T lorsque les cellules sont déposées sur les surfaces supposées non activatrices comme HLA. Cette activation n'est pas complète, comme l'attestent l'absence de relargage du calcium, le marquage négatif avec l'Ac antiCD69 après un dépôt des cellules sur des lamelles HLA et l'absence de prolifération.

Il est possible que l'étalement cellulaire engendré par le contact avec HLA déclenche un début de signalisation par un phénomène de mécanotransduction, se rapprochant de la théorie du « piston », ce phénomène étant néanmoins insuffisant pour que l'engagement complet du TCR se produise.

L'étude de la fluorescence des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac anti-p-Erk, permet d'objectiver une décroissance de la moyenne de fluorescence en fonction des dilutions d'Ac antiCD3 sur la lamelle. Cette décroissance est encore plus importante lorsque la médiane de fluorescence est calculée.

En conclusion l'étude du contact entre une cellule T et des surfaces activatrices pourrait s'avérer être une méthode simple et utile d'exploration précoce de l'activation de lymphocytes T et un témoin solide de la décision d'une cellule d'entrer dans un programme d'activation.

De plus, la quantification de la formation du contact entre des lymphocytes T et des lamelles recouvertes d'Ac CD3 avec des dilutions successives, pourrait fournir un moyen rapide et peu onéreux d'évaluer la réactivité lymphocytaire T de patients avec des déficits, en particulier les patients âgés [Crétel et al 2010].

En effet, la mesure de l'aire de contact moléculaire formée entre des lymphocytes T et une surface activatrice après un contact de 15 minutes présente un double avantage :

- d'une part ce paramètre peut être mesuré en temps reel sur des cellules n'ayant subi aucun traitement. Il devrait fournir un moyen précieux de mesurer simultanément d'autres paramètres permettant de suivre différents éléments des cascades de signalisation (par exemple la mesure du calcium, et la redistribution topographique de molécules

membranaires). Ce paramètre peut également être couplé à des techniques de marquages extrèmement fines telles que les Ac phosphospécifiques, associés à une meilleure localisation et un meilleur rapport signal sur bruit qu'apporte la technique récente du duolink. Cependant ces techniques présentent l'inconvénient de nécessiter une fixation des cellules et une deuxième voie consiste à développer des techniques simultanées d'analyse de plusieurs paramètrres **en temps réel** sur des **cellules individuelles (**sondes de FRET).

- Il faut associer à la méthode d'analyse que nous avons mise au point un système automatique qui promène la lame et identifie les cellules une à une. Ce type de système est en cours de développement sur le marché (par exemple pour les lectures de fluorescence).
- Ce marqueur permettrait de rendre plus rapidement des tests de mesure de l'activation lymphocytaire en évaluant rapidement l'état de l'immunité cellulaire d'un patient hospitalisé ou avant une greffe d'organe. L'exemple est donné par la transplantation rénale du sujet âgé où la première cause de mortalité est d'origine infectieuse. L'adaptation du traitement immunosuppresseur en fonction de l'immunité de base pourrait se révéler intéressante. Une autre application pourrait concerner l'étude des déficits immunitaires congénitaux. L'étude de la réactivité de lymphocytes T à certains additifs comme la vitamine E, testée chez la souris [Marko et al. 2007] et pourquoi pas la vitamine D, pourrait également avoir un intérêt scientifique. Un quatrième aspect pourrait être l'étude de la réactivité de lymphocytes T après vaccination. On sait que la mesure du taux d'Ac produits n'est pas un bon reflet de l'immunoprotection.

Notre modèle a l'avantage d'étudier les temps précoces de l'activation. Il pourrait s'appliquer à l'étude de l'immunosénescence.

Chez les personnes âgées, l'immunité cellulaire T est probablement la plus affectée par le vieillissement de l'être humain avec un retentissement sur les déficiences immunitaires au niveau humoral comme au niveau cellulaire. L'immunosénescence contribue à une augmentation de la susceptibilité des sujets âgés aux maladies infectieuses, à l'auto-immunité, au cancer et à la baisse de la réponse vaccinale mais l'intrication avec les pathologies notamment chroniques est mal connue.

Ces résultats nous ont conduits à démarrer une étude prospective comparative des paramètres immunologiques et des surfaces d'étalement de lymphocytes provenant de différentes populations de sujets âgés.

Un des aspects de notre travail, a été d'évaluer certains paramètres de l'immunité dans notre population de sujets âgés malades et de montrer qu'ils étaient fréquemment altérés avec une lymphopénie retrouvée dans 41% des cas et un rôle possible de l'insuffisance en vitamine D dans l'altération de ces paramètres. Ainsi certains paramètres simples de mesure de l'immunité pourraient caractériser un certain degré de fragilité du sujet âgé.

Cependant notre travail n'est pas terminé.

Sur le plan fondamental, les études de micropatterning sont préliminaires et doivent être complétées. En effet, nous souhaitons renouveler les expériences en faisant varier la qualité des surfaces et des anticorps (CD3 et/ou CD28).

Il faut également poursuivre les manipulations de transferts de cellules de lamelles « CD3 » vers les lamelles « HLA » afin de comprendre à partir de quand l'engagement du TCR devient irréversible. Un des problèmes de notre technique actuelle est le « décrochage » des cellules qui est « tonique » et probablement non anodin sur l'activation potentielle des cellules T. Il serait souhaitable de trouver un système de décrochage physique ou chimique des cellules après fixation sur des surfaces semi-synthétiques. Les pistes actuelles sont d'utiliser des enzymes spécifiques qui enlèvent les ligands sans toucher aux cellules, d'utiliser des polymères avec changements de phase (à 37°C) ou encore les nouvelles technologies du DNA. Dans les 3 cas cela nécessite une mise au point complexe.

D'autres Ac de la cascade des phosphorylations doivent être testés pour mieux appréhender les différences entre les 2 types de surface, en particulier des Ac dirigés contre les protéines du signalosome et de la voie ERK. Cependant tous les Ac ne sont pas disponibles sur le marché.

Il serait également intéressant d'étudier le comportement des lymphocytes T avec des molécules de co-stimulation déposées à la surface de nos lamelles.

Nous souhaitons également développer la technique du « duolink » qui utilise 2 Ac dirigés soit contre la même molécule pour amplifier le signal soit contre 2 molécules distinctes pour tester leur distance qui doit être inférieure ou égale à 40 nm pour que le marquage soit effectif.

Sur le plan clinique, les inclusions de sujets âgés « sains » ne sont pas terminées. Le recrutement de sujets de plus de 75 ans regroupant les critères du sénieur protocole a été une des difficultés majeures de cette étude clinique.
Lorsque le nombre de sujets requis sera obtenu nous pourrons comparer les surfaces d'étalement des lymphocytes T des sujets sains et malades tant sur les surfaces « CD3 » que « HLA » et comparer ces surfaces avec les résultats de la prolifération afin de voir s'il existe également en pratique une corrélation entre les 2 tests.
Ce travail a été l'occasion de passer en revue les différents aspects de l'immunosénescence en particulier ses intrications avec le cytomégalovirus. De nombreuses inconnues persistent. Quel est le rôle concret de la pathologie sur le vieillissement immunitaire et inversement du vieillissement immunitaire sur la pathologie ? Quel est potentiellement le rôle de l'immunisation contre le CMV dans le vieillissement ? Etant donné la forte proportion de sujets immunisés dans la population, il est probable que notre population soit en nombre insuffisant pour montrer des différences statistiquement significatives.

En conclusion, il s'agit d'un travail d'approche mixte, à la fois fondamentale et clinique qui pourrait permettre d'élargir le champ des déterminants précoces de l'activation lymphocytaire T et de mieux préciser l'implication de l'immunité cellulaire T dans différents problèmes cliniques en particulier dans le domaine de l'immunosénescence.

D- BIBLIOGRAPHIE

Abram CL, Lowel CA. The Ins and Outs of Leucocyte Integrin Signaling. Annu Rev Immunol 2009;27 :339-62.

Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. Nat Rev Immunol. 2003 ; 3:939-51.

Aivazian D, Stern LJ. Phosphorylation of Tcell receptor ζ is regulated by a lipid dependent folding transition. Nat. Struct. Biol. 2000 ; 7:1023–26.

Akha AAS, Miller RA: Signal transduction and the aging immune system. Curr Opin Immunol 2005;17:486-491.

Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nat Rev Immunol. 2001;1:220-8.

Allen PM, Unanue ER. Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas. J Immunol 1984;132:1077-1079.

Allenspach EJ, Cullinan P, Tong J, Tang Q, Tesciuba AG, et al. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. Immunity 2001;15:739–50.

Alonso A, Rahmouni S, Williams S, van Stipdonk M, Jaroszewski L, Godzik A, Abraham RT, Schoenberger SP, Mustelin T. Tyrosine phosphorylation of VHR phosphatase by ZAP-70. Nat Immunol. 2003;4:44-8.

Altan-Bonnet G, Germain RN. Modeling T cell antigen discrimination based on feedback control of digital Erk responses. PLoS Biol 2005;3:e356.

Anderton SM. Avoiding autoimmune disease--T cells know their limits. Trends Immunol. 2006 ;27:208-14.

Angulo R, Fulcher DA. Measurement of Candida-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. Cytometry 1998;34:143-51.

Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat Med. 2002;8:379-85.

Arnold M, Calvacanti-Adam EA, Glass R, et al. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. ChemPhysChem 2004;5:383-388.

Atkinson J, Epand RF, Epand RM. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. Free Radic Biol Med. 2008;44:739–64.

Aubert T, Rovery C, Bourhaba K, Singeorzan S, Heim M, Crétel E. Non necrotizing bacterial cellulitis and bacteriemia due to Shewanella putrefaciens. Rev Med Interne. 2009; 30:800-2.

Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. Immunology 2007;120: 435-46.

Balamuth, F., D. Leitenberg, J. Unternaehrer, I. Mellman, and K. Bottomly. Distinct patterns of membrane microdomain partitioning in Th1 and Th2 cells. Immunity 2001 ; 15:729–738.

Barella L, Muller PY, Schlachter M, Hunziker W, Stocklin E, Spitzer V, et al. Identification of hepatic molecular mechanisms of action of alpha-tocopherol using global gene expression profile analysis in rats. Biochimica and biophysica acta. 2004;1689:66–74.

Beach D, Gonen R, Bogin Y, Reischl IG, Yablonski D. Dual role of SLP-76 in mediating T

cell receptor-induced activation of phospholipase C-γ1. J. Biol. Chem. 2007;282:2937–46.

Beharka AA, Wu D, Han SN, Meydani SN. Macrophage prostaglandin production contributes to the age-associated decrease in T cell function which is reversed by the dietary antioxidant vitamin E. Mech Ageing Dev. 1997;93:59–77.

Bereiter-Hahn J, Fox C. H, and Thorell B. Quantitative reflection contrast microscopy of living cells. J. Cell Biology 1979;82:767-779.

Berg LJ, Finkelstein LD, Lucas JA, Schwartzberg PL. Tec family kinases in T lymphocyte development and function. Annu. Rev. Immunol. 2005;23:549–600.

Bernstein E, Kaye D, Abrutyn E, Gross P, Dorfman M, Murasko DM. Immune response to influenza vaccination in a large elderly population. Vaccine 1999;17:82–94.

Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. Nat. Rev.Immunol. 2007;7:131–43.

Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases Oncogene 2004; 23:7918-27.

Bokoch GM, Wang Y, Bohl BP, Sells MA, Quilliam LA, Knaus UG. Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). J Biol Chem 1996;271:25746-9.

Bongrand P, Bartolin R, Bouvenot G, Arnaud C, Delboy C, Depieds R. Effect of age on different receptors and functions of phagocytic cells. J Clin Lab Immunol. 1984;15:45-50.

Bongrand P and Malissen B. Quantitative aspects of T-cell recognition: from within the antigen-presenting cell to within the T cell Bioessays 1998;20:412–22.

Boniface JJ, Rabinowitz JD, Wulfing C, Hampl J, Reich Z, Altman JD, Kantor RM, Beeson C, Mc Connell HM, Davis MM. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. Immunity 1998; 9:459-466.

Bradley BA. Rejection and recipient age. Transplant Immunol 2002;10:125-132.

Bornman L, Campbell SJ, Fielding K, Bah B, Sillah J, Gustafson P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. J Infect Dis. 2004 190(9):1631-41.

Brandman O, Liou J, Park WS, Meyer T. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca2+ levels. Cell 2007;131:1327–39.

Brdicka, T, Pavlistova, D, Leo, A, Bruyns, E, Korinek, V, Angelisova, P, Scherer, J, Shevchenko, A, Hilgert, I, Cerny, J, Drbal, K, Kuramitsu, Y, Kornacker, B, Horejsi, V, Schraven, B. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. J Exp Med 2000 ; 191 : 591-604.

Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, and Dustin ML. The immunological synapse. Annu. Rev.immunol. 2001;19:375-396.

Bubeck-Wardenburg J, Pappu R, Bu JY, Mayer B, Chernoff J, Straus D, Chan AC. Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. Immunity 1998;9:607-16.

Bunnell, S. C., D. I. Hong, J. R. Kardon, T. Yamazaki, C. J. McGlade, V. A. Barr, and L. E. Samelson. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. J. Cell Biol. 2002;158:1263–1275.

Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH. The actin cytoskeleton in T cell activation. Annu. Rev. Immunol. 2008; 26:233–59.

Bürkle A, Caselli G, Franceschi C, Mariani E, Sansoni P, Santoni A, et al. Pathophysiology of ageing, longevity and age related diseases. Immun and ageing 2007;4:4.

Burns EA, Goodwin JS. Immunodeficiency of aging. Drugs Aging 1997;11:374–97.

Butcher SK, Killampalli V, Lascelles D, Wang K, Alpar EK, Lord JM. Raised cortisol : DHEAS ratios in the elderly after injury : potential impact upon neutrophil funciton and immunity. Aging cell 2005;4:319-24.

Campi, G., R. Varma, and M. L. Dustin. Actin and agonist MHCpeptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. J. Exp. Med. 2005; 202:1031–1036.

Carman WF, Elder AG, Wallace LA, McAulay K, Walker A, Murray GD, et al. Effects of influenza vaccination of health-care workers on mortality of elderly people in long-term care: a randomised controlled trial. Lancet 2000;355: 93-97.

Castle S, Uyemura K, Wong W, Modlin R, Effros Rl. Evidence of enhanced type 2 response and impaired upregulation of type 1 response in frail elderly nursing home residents. Mech Ageing Dev 1997;94:7–16.

Castle S, Uyemura K, Crawford W, Wong W, Klaustermeyer WB, Makinodan T.. Age-related impaired proliferation of peripheral blood mononuclear cells is associated with an increase in both IL-10 and IL-12. Exp Gerontol 1999;34:243–52.

Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. Clin. Infect. Dis. 2000;31:578-85.

Castle S, Uyemura K, Rafi A, Akande O, Makinidan T. Comorbidity is a better predictor of impaired immunity than chronological age in older adults. J Am Geriatr Soc. 2005;53:1565-1569.

Cawthorn RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. Lancet 2003; 361:393-95.

Cemerski S, Shaw A. Immune synapses in T-cell activation. Curr Opin Immunol 2006;18:298-304.

Chandra R. K. Effect of vitamin and trace-element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects. Lancet 1992;340:1124-1127.

Chang JT Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. Science 2007;315:1687–1691.

Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. Science. 1997;276:1425-8.

Chen WH, Kozlovsky BF, Effros RB, Grubeck-Loebenstein B, Edelman R, Sztein MB. Vaccination in the elderly : an immunological perspective. Trends in immunol 2009;30:351-359.

Chu DH, Morita CT, Weiss A. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. Immunol Rev 1998;165:167-80.

Cogné M. Immunosénescence ; in Vieillissement : les données biologiques. Elsevier 2005;55-70.

Coombs D, Kalergis AM, Nathenson SG, Wofsy C, Goldstein B. Activated TCRs remain marked for internalization after dissociation from pMHC. Nature Immunology 2002;10: 926-31.

Coornaert B, Baens M, Heyninck K, Bekaert T, Haegman M, et al. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-κB inhibitor A20. Nat. Immunol. 2008 ; 9:263–71.

Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C. Cytometric analysis of immunosenescence. Cytometry 1997;27:297-313.

Cotner T, Williams JM, Christenson L, Shapiro HM, Strom TB, Stromingers J. Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. J Exp Med 1983;157:461-472.

Crétel E., Veen I., Pierres A, Bongrand P, Gavazzi G. Immunosenescence and infections, myth or reality ? Med Mal Infect. 2010;40(6):307-18.

Curtis, A. S. G. The mechanism of adhesion of cells to glass. J. Cell Biol.1964;20:199-215.

Davidson D, Bakinowski M, Thomas ML, Horejsi V, Veillette A. Phosphorylation-dependent regulation of T-cell activation by PAG/Cbp, a lipid raft-associated transmembrane adaptor. Mol Cell Biol. 2003;23:2017-28.

Davis MM, et al. Ligand recognition by alphabeta T cell receptors. Annu Rev Immunol 1998;16 : 523-544.

Davis MM. A new trigger for T cells. Cell 2002:110:285-7. Review.

De Greef GE, Van Staalduinen GJ, Van Doorninck H, Van Tol MJD, Hijmans W. Age-related changes of the antigen-specific antibody formation in vitro and PHA-induced T-cell

proliferation in individuals who met the health criteria of the senieur protocol. Mech Ageing Dev 1992;66:1-14.

Delelis-Fanien AS, Séité F, Priner M, Paccalin M. Vaccine coverage against influenza and pneumococcal infections in patients aged 65 and over: a survey on 299 outpatients. Rev Med Intern 2009;30:656-60.

Derhovanessian E, Larbi A, Pawelec G. Biomarkers of human immunosenescence : impact of cytomegalovirus infection. Current opinion in immunol 2009;21:440-5.

De Wazières B. Infectious pneumonia in the elderly. Rev Mal Respir. 2007, 4(6):799-802.

Doh J, Irvine DJ, Immunological synapse arrays: Patterned protein surfaces that modulate immunological synapse structure formation in T cells. PNAS 2006;103:5700-5705.

Dombroski D, Houghtling RA, Labno CM, Precht P, Takesono A, et al. Kinase-independent functions for Itk in TCR-induced regulation of Vav and the actin cytoskeleton. J. Immunol. 2005;174:1385–92.

Douziech N, Seres I, Larbi A, Szikszay E, Roy PM, Arcand M, Dupuis G, Fulop T: Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. Exp. Gerontol. 2002;37:369-387.

Dower NA, Stang SL, Bottorff DA, Ebinu JO, Dickie P, et al. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. Nat. Immunol. 2000;1:317–21.

Duchniewicz M, Zemojtel T, Kolanczyk M, Grossmann S, Scheele JS, Zwartkruis FJ. Rap1A déficient T and B cells show impaired integrin-mediated cell adhesion. Mol. Cell. Biol. 2006; 26:643–53.

Dustin, M. L., Ferguson, L. M., Chan, P-Y, Springer, T. A., Golan D. E. Visualization of CD2 interaction with LFA-3 and determination of the two-dimensional dissociation constant for adhesion receptors in a contact area. J. Cell Biol.1996;132:465-474.

Dustin ML. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. Immunol Rev. 2008;221:77-89.

Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC. RasGRP, a Ras guanyl nucleotidereleasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Science 1998; 280:1082–86.

Ebinu JO, Stang SL, Teixeira C, Bottorff DA, Hooton J, et al. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. Blood 2000; 95:3199–203.

Effros RB. Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing. Exp Gerontol. 2004 Apr;39(4):517-24.

Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. Nature 1993; 363:45–51.

Fagnoni FF, Vascovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. J Am Geriatr Soc. 1999; 47:639-646.

Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VL, Bismuth G, et al. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. Nat. Immunol. 2004;5:272–79.

Fedson DS, Liss C. Precise answers to the wrong question: prospective clinical trials and the meta-analyses of pneumococcal vaccine in elderly and high-risk adults. Vaccine. 2004;22:927-46.

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, et al. A mutation in Orai1 causes

immune deficiency by abrogating CRAC channel function. Nature 2006;441:179–85.

Finco TS, Kadlecek T, Zhang W, Samelson LE, Weiss A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLC-γ1 and the Ras pathway. Immunity 1998; 9:617–26.

Fisman DN, Abrutyn E, Spaude KA, Kim A, Kirchner C, Daley J. Prior pneumococcal vaccination is associated with reduced death, complications, and length of stay among hospitalized adults with community-acquired pneumonia. Clin Infect Dis.2006;42:1093-101.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. The Folstein Minimental State Examination : a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psych Res 1975;12:189-98.

Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. Immunol. Today 1995;15:12-16.

Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafè M. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. Exp Gerontol 1999;34:911-921.

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionnary perspective on immunosenescence. Ann N Y Acad Sci 2000;908:244-254.

Fujihashi K, Kiyono H. Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. Trends in immunol. 2009;30:334-42.

Fulop T, Wagner R, Abdelouhed K, Weber J, Trottier L, Payette E. Relationship between the response to influenza vaccination and the nutritional status in institutionalized elderly subjects. J Gerontol 1999;54: M59-64.

Fulop T, Larbi A, Douziech N, et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. Aging cell 2004;3:217-226.

Fulop T, Pawelec G, Castle S, Loeb M. Immunosenescence and Vaccination in nursing home residents. CID 2009;48 :443-8.

Fuhrmann S, Streitz M, Kern F. How flow cytometry is changing the study of TB immunology and clinical diagnosis. Cytometry A. 2008;73(11):1100-6.

Galisteo ML, Chernoff J, Su YC, Skolnik EY, Schlessinger J. The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. J Biol Chem 1996; 271: 20997-1000.

Garcia GG, Miller RA. Single-cell analyses reveal two defects in peptide-specific activation of naive T cells from aged mice. J. Immunol. 2001:166 :3151-3157.

Garcia GG, Berger SB, Amir AA, Akha S, Miller RA. Age-associated changes in glycosylation of CD43 and CD45 on mouse CD4 T cells. European Journal of Immunology 2005,35: 622-631.

Gavazzi G, Mallaret MR, Couturier P, Iffenecker A, Franco A. Bloodstream infection: differences between young-old, old, and old-old patients. J Am Geriatr Soc. 2002 50(10):1667-73.

Gavazzi G, Krause KH. Ageing and infection. Lancet Infect Dis 2002; 2:659-66.

Gavazzi G, Wazieres B, Lejeune B, Rothan-Tondeur M. Influenza and pneumococcal vaccine coverages in geriatric health care settings in france. Gerontology 2007;53:382-7.

Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. Nature Reviews 2009; 10: 21-32.

Gett AV, Hodgkin PD. A cellular calculus for signal integration by T cells. Nat Immunol 2000;1(3) : 239-244.

Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Recruitment of Nck by CD3ε reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. Cell 2002 ;109:901–12.

Ginaldi L., De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Corsi MP, et al. The immune system in the elderly I. Specific humoral immunity, Immunol. Res. 1999;20:101-108 (a).

Ginaldi L., De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglino D. The immune system in the elderly III. Innate Immunity, Immunol. Res. 1999;20:117-126 (b).

Ginaldi L, Loreto MF, Corsi MP, Modesti M, De Martinis. Immunosenescence and infectious diseases. Microbes Infect. 2001;3:851-7.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Les cytokines. In : Immunologie : le cours de Janis Kuby. Editions Dumod, Paris, 2003. ISBN : 2-10-007396-6

Gomez CR, Boehmer ED, Kovacs EJ. The aging innate immune system. Curr Opin Immunol 2005;17:457-462.

Gomez TS, Kumar K, Medeiros RB, Shimizu Y, Leibson PJ, Billadeau DD. Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. Immunity 2007;26:177–90.

Gong Q, Cheng AM, Akk AM, Alberola-Ila J, Gong G, Pawson T, Chan AC. Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. Nat Immunol. 2001; 2: 29-36.

Goronzy JJ, Weyand CM. T cell development and receptor diversity during aging. Curr Opin Immunol. 2005;17:468-75.

Gough SC, Walker LS, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. Immunol Rev. 2005 ;204:102-15. Review.

Guigoz Y, Vellas B, Garry PJ. Mininutritional assessment : a practical assessment tool, for grading the nutritional status of elderly patients. In : Facts, Research and Interventions in Geriatrics 1997. Nex York : Springer Publishing, 1997:15-60.

Grakaoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM and Dustin M.L. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science, 1999;285:221-227.

Griffiths EK, Penninger JM. ADAP-ting TCR signaling to integrins. Sci STKE 2002; 9;2002 : re3.

Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Lewandowski RA. Ann Intern Med 1995;123:518-27.

Groves JT : Spatial mutation of the T cell immunological synapse. Curr Opin Immunol 2006, 10:544-550.

Haase H, Rink L. The immune system and the impact of zinc during aging. Immunity and ageing 2009;6 :9.

Hahn C, Schwartz M. A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10:53-62.

Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski J, et al. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. Blood 1997;90:3789-98.

Hallgreen HM, Bergh N, Rodysill KJ, O'Leary JJ. Lymphocyte proliferative response to PHA and anti-CD3/Ti monoclonal antibodies, T cell surface marker expression, and serum IL-2 receptor levels as biomarkers of age and health. Mech Ageing Dev 1988, 43:175-185.

Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, et al. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin αIIbβ3. Curr. Biol. 2006;16:1796–806.

Hayward AC, Harling R, Wetten S, Johnson AM, Munro S, Smedley J, et al. Effectiveness of an influenza vaccine programme for care home staff to prevent death, morbidity and health service use among residents : cluster randomised controlled trial. BMJ 2006;333:124.

Hayashi K, Altman A. Protein kinase C theta (PKCq): a key player in T cell life and death. Pharmacol Res. 2007; 55:537-44.

Haynes L. The effect of aging on cognate function and development of immune memory. Curr Opin Immunol 2005;17:476-479.

He HT, Lellouch A, Marguet D. Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. Semin Immunol. 2005;17:23-33.

High KP. Infection as cause of age-related morbidity and mortality. Ageing Research Reviews 2004;3:1-14.

Hjelmborg JV, Nzietchueng R, Kimura M, Gardner JP, Bladbjerg EM, Christensen K, Aviv A, Benetos A. Leukocyte telomere length is inversely correlated with plasma Von Willebrand factor. Thromb Res. 2010.125(6):e339-42.

Hodes RJ: Aging and the immune system. Curr Opin Immunol 2005;17:455-456.

Holsinger LJ, Graef IA, Swat W, Chi T, Bautista DM, et al. Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. Curr. Biol. 1998;8:563–72.

Huang Y, Wange RL. T cell receptor signaling: beyond complex complexes. J Biol Chem. 2004 ; 9 : 279:28827-30.

Incalzi RA, Maini CL, Fuso L, Giordano A, Carbonin PU and Galli G. Effects of aging on mucociliary clearance. Compr Gerontol [A] 1989; 3:65-8.

Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. Nature 2002 ; 419 : 845-9.

Izzard C. S., Lochner L. R. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts : an interference reflexion study with an evaluation of the technique. J. Cell Sci. 1976;2:129-159.

Jaalouk DE, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry- Nature Reviews 2009;10 : 63-73.

Jackson LA, Jackson ML, Nelson JC, Neuzil KM, Weiss NS. Evidence of bias in estimates of influenza vaccine effectiveness in seniors. Int J Epidemiol 2006;35:337-44.

Jacobelli J, Chmura SA, Buxton DB, Davis MM, Krummel MF. A single class II myosin modulâtes T cell motility and stopping, but not synapse formation. Nat. Immunol. 2004;5:531–38.

Jameson SC, Bevan MJ. T cell receptor antagonsits and partial agonists. Immunity 1995 ; 2 :1-11.

Jassal SW, Olpez G, Cole E, et al. transplantation in the elderly: a review. Geriatr Nephrol Urol 1997;7:157-165.

Jassal SV, Murray DK, Naglie G, and al. Kidney transplantation in the elderly: a decision analysis. J Am Soc Nephrol 2003;14:187-196.

Jiang X, Bruzewicz DA, Wong AP, Piel M, Whitesides GM. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:975-8.

Jordan MS, Smith JE, Burns JC, Austin JE, Nichols KE, et al. Complementation in trans of altered thymocyte development in mice expressing mutant forms of the adaptor molecule SLP76. Immunity 2008;28:359–69.

Kane LP, Weiss A. The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3.Immunol Rev. 2003;192:7-20.

Kasiske BL, Chakkera HA, Louis TA, et al. A meta-analysis of immunosuppression withdrawal trial in renal transplantation. J Am Soc Nephrol 2000;11:1910-17.

Kasider-Frieder A, Moran B, Nagrampa-Orje J, Swanson K, Ruggeri ZM, Schraven B, Neel BG, Koretzky G, Shattil SJ. ADAP is required for normal alphaIIbbeta3 activation by VWF/GP Ib-IX-V and other agonists. Blood 2007;109(3):1018-25.

Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M, Kinashi T. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. Nat. Immunol. 2003;4:741–48.

Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie S,Takatsu K, Kinashi T. Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. Mol. Cell. Biol 2000;20:1956–69.

Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, et al. Studies of illness in the aged. The Index of ADL: a standardized measure of biological and psychosocial function. J Am Med Assoc 1963;165:94-9.

Katz IR. What should we do about undertreatment of late life psychiatric disorders in primary care. J Am Ger Soc 1998 ;46:1573-5.

Kersh EN, Shaw AS, Allen PM. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor z phosphorylation. Science 1998; 281:572-575.

Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ,et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. J Immunol 2002;169(4):1984-92.

Kim MJ, Kim E, Ryu SH, Suh PG. The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation Exp Mol Med 2000;30;32:101-9.

Kliche S, Breitling D, Togni M, Pusch R, Heuer K, et al. The ADAP/SKAP55 signaling module regulatesT-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. Mol. Cell. Biol. 2006. 26:7130–44.

Koo LS, Immoos CE, Cohen MS, Farmer PJ, Ortiz de Montellano PR. Enhanced electron transfer and lauric acid hydroxylation by site-directed mutagenesis of CYP119.
J Am Chem Soc. 2002;124:5684-91.

Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. Nat. Rev. Immunol. 2006; 6:67–78.

Krause D, Mastro AM, Handte G, Smiciklas HS-Wright H, Miles MP, Ahluwalia N. Immune did not decline with aging in apparently, well-nourished women. Mech Ageing Dev 1999;112:43-57.

Krause M, Sechi AS, Konradt M, Monner D, Gertler FB, Wehland J. Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. J Cell Biol 2000;149(1):181-94.

Krogsgaard, M., Q. J. Li, C. Sumen, J. B. Huppa, M. Huse, and M. M. Davis. Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. Nature 2005 ; 434:238–243.

Kudlacek S, Willvonseder R, Stohlawetz P, an al. Immunology and aging. Aging Male. 2000 3(3):137-42.

Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. Immunity 2006; 24:133-139.

Kuijpers TW, Vossen MT, Gent MR, Davin JC, Roos MT, Wertheim-van Dillen PM, et al. Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. J Immunol. 2003;170:4342-8.

Kupfer A, Swain SL, Singer SJ. The specific direct interaction of helper T cells and antigenpresenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. J. Exp. Med. 1987;165:1565–80.

Lafuente EM, van Puijenbroek AA, Krause M, Carman CV, Freeman GJ, et al. RIAM, an Ena/VASP and profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. Dev. Cell 2004;7:585–95.

Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people : self-maintaining and Instrumental Activities of Daily Living. Gerontologist 1969;9:179-86.

Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA: Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. Science 1998, 282:2263-2266.

Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signalling precedes immunological synapse formation. Science 2002;295:1539–1542.

Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signaling and degradation. Science 2003;295:1539-1542.

Leo A, Wienands J, Baier G, Horejsí V, Schraven B. Adapters in lymphocyte signaling. J Clin Invest. 2002;109 :301-9.

Lesourd B, Mazari L. Nutrition and immunity in the elderly. Proc Nutr Soc. 1999 58:685-95.

Lesourd B. Modification de la réponse immune chez le sujet âgé. Rev Rhum 2004;71:446-54 (a).

Lesourd B. Nutrition: a major factor influencing immunity in the elderly. J Nutr Health Aging. 2004;8: 28-37 (b).

Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, et al. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the senieur protocol. Mech Ageing Dev 1984;28 :47-55.

Ligthart GJ. The senieur protocol after 16 years : the next step is to study the interaction of ageing and disease. Mech Ageing Dev 2001;122:136-40.

Lin H, Rathmell JC, Gray GS, Thompson CB, Leiden JM, Alegre ML. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. J Exp Med. 1998 ;188:199-204.

Lin J, Weiss A. T cell receptor signaling. J Cell Sci. 2001 Jan; 114(Pt 2): 243-4.
Davis MM. A new trigger for T cells. Cell 110: 285-7. Review.

Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, et al. STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. Curr. Biol. 2005;15:1235–41.

Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamine D-mediated human antimicrobial response. Science 2006;311:1770-3.

Liu SK, Fang N, Koretzky GA, McGlade CJ. The hematopoietic-specific adaptor protein Gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. Curr. Biol. 1999 ;9:67–75.

Liu SK, Berry DM, McGlade CJ. The role of Gads in hematopoietic cell signalling Oncogene 2001 ;20:6284-90.

Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, et al. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. Clin Immunol. 1999;90:213-9.

Lopez-Cabrera M, Santis AG, Fernandez-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez-Mateos P, et al. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. J Exp Med 1993;178:537-547.

Lyons A.B., Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. J Immunol Methods 1994;171:131-7.

Lyons AB. Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Immunol Cell Biol 1999;77:509-15.

Lyons A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. Journal of Immunol Methods 2000;243:147-154.

Ma Z, Sharp K, Janmey PA, Finkel TH. Surface –Anchored Agonist pMHCs Alone Trigger TCR with High Sensitivity. Plos Biology 2008 ; 6(2) : e43.

Ma Z, Janmey PA, Finkel TH. The déformation model of TCR triggering. FASEB J 2008 ; 22 : 1002-8.

Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional

mechanisms underlying lymphocyte tolerance. Cell 2002;109:719–31.

Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. N Engl J Med. 1995;332:143-9.

Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. Blood 1997;89:3700-7 (a).

Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. Immunol Today. 1997;18:245-51 (b).

Madrenas J, Wange RL, Wang JL, Isakov N, Samelson LE, Germain RN. Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. Science 1995 ; 267 : 515-518.

Marinari, B, Simeoni, L, Schraven, B, Piccolella, E, Tuosto, L The activation of Csk by CD4 interferes with TCR-mediated activatory signaling. Eur J Immunol 2003; 33:2609-18.

Marko MG, Ahmed T, Bunnel SC, and S.N. Meydani. Age-associated decline in effective immune synapse formation of CD4+ T cells is reversed by vitamin E supplementation. J. Immunol, 2007;178:1443-1449.

Marko MG, Pang H-JE, Ren Z, Azzi A, Hubber BT, Bunnell SC, Meydani SNM. Vitamin reverses Impaired Linker for Activation of T cells Activation in T cells from aged C57BL/6 mice. J. Nutr.2009; 139:1192-1197.

Martineau AR, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Newton SM, Kampmann B, Hall BM, et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:208–13.

Martins PNA, Pratschke J, Pascher A, and al. Age and immune response in organ transplantation. Transplantation 2005;79:127-132.

Mathias S, Nayak US, Isaacs B. Balance in elderly patients: the “get up and go” test. Arch Phys Med Rehabil. 1986;67:387-9.

Matsumoto R,Wang D, Blonska M, Li H, Kobayashi M, et al. Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T cell receptor-mediated NFκB activation. Immunity 2005; 23:575–85.

McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. Dev Cell. 2004;6:483-95.

McKeithan TW. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. Proc Natl Acd Sci USA 1995 ; 92 : 5042-5046.

Medeiros RB, Dickey DM, Chung H, Quale AC, Nagarajan LR, et al. Protein kinase D1 and the β1 integrin cytoplasmic domain control β1 integrin function via regulation of Rap1 activation. Immunity 2005;23:213–26.

Medeiros RB, Burbach BJ, Mueller KL, Srivastava R, Moon JJ, et al. Regulation of NFκB activation in T cells via association of the adapter proteins ADAP and CARMA1. Science 2007;316:754–58.

Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Cibrik DM, et al. Relationship of recipient age and the development of chronic allograft failure. Transplantation 2000; 70:306-10.

Melowic HR, Stahelin RV, Blatner NR, Tian W, Hayashi K, et al. Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C q. J. Biol. Chem. 2007;282:21467-476.

Menasche G, Kliche S, Bezman N, Schraven B. Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules. Immunol. Rev. 2007;218:82–91.

Meydani SN, Barklund MP, Liu S, Meydani M, Miller RA, Cannon JG, et al. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. Am J Clin Nutr. 1990;52:557–63.

Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Siber G, Loszewski R, et al. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. JAMA. 1997;277:1380–6.

Meydani SN, Leka LS, Fine BC Dallal GE, Keusch GT, Singh MF, et al. Vitamine E and respiratory tract infections in elderly nursing home residents : a randomized controlled trial. JAMA 2004;292:828-36.

Meydani SN, Han SN, Wu D. Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. Immunol Rev 2005; 205:269–84.

Meydani SN, Barnett JB, Dallal GE, Fine BC, Jacques PF, Leka LS, Hamer DH. Serum zinc and pneumonia in nursing home elderly. Am J Clin Nutr. 2007;86:1167-73.

Meyer KC. The role of immunity in susceptibility to respiratory infection in the aging lung. Respir Physiol 2001;128:23-31.

Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Cibrik DM, Hanson JA, Leichtman AB, Magee JC, et al. Relationship of recipient age and the development of chronic allograft failure. Transplantation 2000;70:306-10.

Meyers J, Craig J and Odde D J. Potential for control of signaling pathways wia cell size and shape Curr. Biol. 2006;16:1685–93.

Michel F, Acuto O. CD28 costimulation: a source of Vav-1 for TCR signaling with the help of SLP-76? Sci STKE. 2002 ; 6(144):pe35.

Milanova TN. Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity. Cytometry B Clin Cytom 2007;72:265-275.

Miletic AV, Sakata-Sogawa K, Hiroshima M, Hamann MJ, Gomez TS, et al. Vav1 acidic région tyrosine 174 is required for the formation of T cell receptor-induced microclusters and is essential in T cell development and activation. J. Biol. Chem. 2006:281:38257–65.

Mingueneau M, Sansoni A, Gregoire C, Roncagalli R, Aguado E, et al. The proline-rich sequence of CD3ε controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4+CD8+ thymocytes. Nat. Immunol. 2008 ; 9:522–32.

Monks CR, Kupfer H, Tamir I, Barlow A, Kupfer A. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. Nature 1997;385:83–86.

Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer N: Three-dimensional segregation of supra molecular activation clusters in T-cells. Nature 1998;395:82- 88.

Monti D, Troiano L, Grassilli E, Agnesini C, Tropea F, Capri M, et al. Cell proliferation and cell death in immunosenescence. Ann NY Acad Sci 1992;663:250-261.

Moore SM, Wilkerson MJ, Davis RD, Wyatt CR, Briggs DJ. Detection of cellular immunity to rabies antigens in human vaccines. J Clin Immunol 2006;26:533-45.

Moss P. The emerging role of cytomegalovirus in driving immune senescence: a novel therapeutic opportunity for improving health in the elderly. Curr Opin Immunol 2010;22:529-34.

Mossman KD, Campi G, Groves JT, Dustin ML. Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synpases. Science 2005;310:1191-1193.

Moulias S. Nutrition and immunity in the elderly. Ann Med Interne (Paris). 2002; 153:446-9.

Mullins RD. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. Curr Opin Cell Biol 2000;12: 91-6.

Mullooly JP, Bennett MD, Hornbrook MC, Barker WH, Williams WW, Patriarca PA, et al. Influenza vaccination programs for elderly persons: cost-effectiveness in a health maintenance organization. Ann Intern Med 1994;121:947–52.

Murphy K, Travers P, Walport M. Immunobiology 2008. Garland Science, Taylor & Francis group.

Musci MA, Hendricks-Taylor LR, Motto DG, Paskind M, Kamens J, Turck CW, Koretzky GA. Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. J Biol Chem 1997; 272:11674-7.

Mustelin T, Tasken K Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochem J 2003; 371:15-27.

Neves S R, Tsokas P, Sarkar A, Grace E A, Rangamani P, Taubenfeld S M, Alberini C M, Schaff J C, Blitzer R D, Moraru I I and Iyengar R. Cell shape and negative links in regulatory motives together control spatial information flow in signaling networks. Cell 2008;133:666–80.

Nolz JC, et al. The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC mediated calcium entry during T cell activation. Curr Biol 2006;16:24–34.

Obergfell A, Judd BA, del Pozo MA, Schwartz MA, Koretzky GA, Shattil SJ The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin alphaIIbbeta3 to the actin cytoskeleton. J Biol Chem 2001;276 :5916-23.

Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, Sharma S, Lamperti E, et al. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. Nat.Immunol. 2008; 9:432–43.

Oh-Hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 2008 ; 20:250–58.

Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, et al. Natural killer cells in the late decades of human life. Clin Immunol Immunopathol 1997;84:269–75.

Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. Nat Rev Immunol. 2003 ;3:317-30. Review.

Okkenhaug K, Bilancio A,Emery JL,Vanhaesebroeck B. Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival. Biochem Soc Trans. 2004 Apr;32(Pt 2):332-5. Review.

Ottemann KM, Xiao W, Shin Y, Koshland DE. A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. Science 1999; 285: 1751-1754.

Pagès F, Ragueneau M, Klasen S, Battifora M, Couez D, Sweet R, Truneh A, Ward SG, Olive D. Two distinct intracytoplasmic regions of the T-cell adhesion molecule CD28 participate in phosphatidylinositol 3-kinase association. J Biol Chem. 1996 ;19:9403-9.

Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. Oncogene 2004; 23:7990-8000.

Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. Trends Immunol. 2009;30:325-33.

Pawelec G. Immunosenescence: impact in the young as well as the old ? Mech Ageing Dev 1999;108:1-7.

Pawelec G, Larbi A. Immunity and ageing in man: Annual review 2006/2007. Exp Gerontol. 2008;43:34-8.

Pawelec G, Larbi A, Derhovanessian E. Senescence of the human immune system. J Comp. Path 2010, 142S1:S39-S44. Epub 2009 Nov 8.

Pawelec G, Akbar A, Beverley P, Caruso C, Derhovanessian E, Fulop T and al. Immunosenescence and cytomegalovirus: where do we stand after a decade ? Immunity and ageing 2010;doi:10.1186/1742-4933-7-13.

Perry VH, Cunninngham C, Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. Nat Rev Immunol 2007;7:161-167.

Peterson EJ, Woods ML, Dmowski SA, Derimanov G, Jordan MS, et al. Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. Science 2001;293:2263–65.

Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Cell fitting to adhesive surfaces: A prerequisite to firm attachment and subsequent events. Eur Cell Mater. 2002;30:31-45.

Pierres A, Eymeric P, Baloche E, Touchard D, Benoliel AM, Bongrand P. Cell membrane alignment along adhesive surfaces: active or passive mechanism ? Biophys. 2003;84:2058-2070.

Pierres A, Benoliel AM, Touchard D, Bongrand P. How cells tiptoe on adhesive surfaces before sticking. Biophys J. 2008; 94:4114-22.

Pierres A, Monnet-Corti V, Benoliel A M and Bongrand P. Do membrane undulations help cells probe the world? Trends Cell Biol. 2009;19:428–32.

Pfrepper KI, Marie-Cardine A, Simeoni L, Kuramitsu Y, Leo A, Spicka J, et al. Structural and functional dissection of the cytoplasmic domain of the transmembrane adaptor protein SIT (SHP2-interacting transmembrane adaptor protein). Eur J Immunol. 2001;31:1825-36.

Podsiadlo D, Richardson S. The timed “Up and Go”: a test of basic functional mobility for frail elderly persons. J Am Geriatr Soc. 2000; 39:142-8.

Ponnappan U, Zhong M, Trebilcock GU. Decreased proteasome-mediated degradation in T cells from the elderly: A role in immune senescence. Cell immunol 1999;192:167-74.

Purtic B, Pitcher L A., van Oers NSC. and Wülfing C.T cell receptor (TCR) clustering in the immunological synapse integrates TCR and costimulatory signaling in selected T cells. PNAS 2005;102: 2904-2909.

Qi, Q, August, A Keeping the (kinase) party going: SLP-76 and ITK dance to the beat Sci STKE 2007;24(396):pe39.

Rabinowitz JD, Beeson C, Lyons DS, Davis MM, McConnel HM. Kinetic discrimination in T-cell activation. Proc Natl Acd Sci USA 1996 ; 93 : 1401-1405.

Rebeaud F, Hailfinger S, Posevitz-Fejfar A, Tapernoux M, Moser R, et al. The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. Nat. Immunol. 2008 ; 9:272–81.

Revy P, Sospedra M, Barbour B and Trautmann A. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells . Nature Immunology 2001;10:925 – 931.

Reynolds LF, Smyth LA, Norton T, Freshney N, Downward J, et al. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-γ1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. J. Exp. Med. 2002;195:1103–14.

Reynolds LF, de Bettignies C, Norton T, Beeser A, Chernoff J, Tybulewicz VL. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1. J. Biol. Chem. 2004;279:18239–46.

Rivero-Leczano OM, Marcilla A, Sameshima JH, Robbins KC. Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. Mol Cell Biol 1995;15:5725-31.

Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. J. Cell Biol. 2005;169:435–45.

Roose JP, Mollenauer M, GuptaVA, Stone J,Weiss A. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. Mol. Cell. Biol. 2005;25:4426–41.

Roose JP, Mollenauer M, Ho M, Kurosaki T, Weiss A. Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes. Mol. Cell. Biol 2007; 27:2732–45.

Rowe JW, Kahn RL. Aging (Milano**). Successful aging.** 1998;10(2):142-4.

Rudd CE. Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. Cell. 1999; 96:5-8.

Rudd, CE, Wang, H Hematopoietic adaptors in T-cell signaling: potential applications to transplantation. Am J Transplant 2003 ; 3:1204-10.

Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2003 ; 3:544-56.

Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides and coreceptors. Annu Rev Immunol 2006; 24: 419-466.

Sadra, A, Cinek, T, Arellano, JL, Shi, J, Truitt, KE, Imboden, JB. Identification of tyrosine phosphorylation sites in the CD28 cytoplasmic domain and their role in the costimulation of Jurkat T cells J Immunol 1999;162:1966-73.

Saito T, Yokosuka T. Immunological synapse and microclusters : the site for recognition and activation of T cells. Curr Opin Imm unol 2006;18:305-313.

Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. Trends in immunol 2005;26:136-140.

Sansoni P, Fagnoni F, Vescovini R, Mazzola M, Brianti V, Bologna G, et al. T lymphocyte proliferative capability to defined stimuli and costimulatory CD28 pathway is not impaired in healthy centenarians. Mech Ageing Dev. 1997; 96:127-136.

Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschösser C, Asch E, Blasko I et al. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. J Immunol. 2002 168(11):5893-9.

Savignac M, Mellstrom B, Naranjo JR. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. Pflugers Arch. 2007;454:523–33.

Sawada et al. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. Cell 2006;127:1015-26.

Scheffold A, Kern F. Recent developments in flow cytometry. J Clin Immunol 2000;20:400-7.

Schmader K. Herpes zoster in the elderly: issues related to geriatrics. Clin. Infect. Dis. 1999;28 :736-739.

Schmaltz HN., Fried LP, Xue QL, Walston J., Leng SX., Semba RD. Chronic cytomegalovirus infection and inflammation are associated with prevalent frailty in community-dwelling older women. J Am Geriatr Soc 2005;53:747–754.

Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor κB. Immunity 2006;25:701–15.

Sebzda E, Bracke M, Tugal T, Hogg N, Cantrell DA. Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. Nat. Immunol. 2002;3:251–58.

Sehl ME, Yates FE. Kinetics of human aging: I. Rates of senescence between ages 30 and 70 years in healthy people.J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 200;56:B198-208.

Seminario MC, Bunnell SC. Signal initiation in T-cell receptor microclusters. Immunological Reviews 2008; 221:90-108.

Shan X, Balakir R, Criado G, et al. Zap-70-independent Ca2+ mobilization and Erk activation in Jurkat T cells in response to T-cell antigen receptor ligation. Mol Cell Biol 2001;21:7137-49.

Shaw AS. FERMing up the synapse. Immunity 2001 ; 15 : 683-686.

Silva DA, Palmer DB. Immunosenescence : emerging challenges for ageing population. Immunology 2007;120:435-446.

Simeoni L, Posevitz V, Kolsch U, Meinert I, Bruyns E, Pfeffer K, Reinhold D, Schraven B. The transmembrane adapter protein SIT regulates thymic development and peripheral T-cell functions. Mol Cell Biol. 2005;25:7557-68.

Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature. 1997;387:569-72.

Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. Immunol Res. 1999;19:1-24.

Smith-Garvin J E, Koretzky G A and Jordan M S T cell activation Ann. Rev. Immunol. 2009;27:591–619.

Sommers CL, Samelson LE, Love PE. LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. Bioessays 2004;26:61–67.

Sommer K, Guo B, Pomerantz JL, Bandaranayake AD, Moreno-Garcia ME, et al. Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NFκB activation. Immunity 2005;23:561–74.

Stefanova I, Hemmer B, Vergelli M, Martin R, Biddison WE, Germain RN. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. Nat Immunol 2003 ; 4:248-254.

Sun ZJ, Kim KS, Wagner G, Reinherz EL. Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 εγ heterodimer. Cell 2001;105: 913-923.

Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZJ. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase médiate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. Mol. Cell 2004;14:289–301.

Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a single Peptide–MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. Immunity 1996;4 :565–571.

Szymczak AL, Workman CJ, Gil D, Dilioglou S, Vignali KM, et al. The CD3ε proline-rich sequence, and its interaction with Nck, is not required for T cell development and function. J. Immunol. 2005 ; 175:270–75.

Tailor P, Tsai S, Shameli A, Serra P, Wang J, et al. The proline-rich sequence of CD3ε as an amplifier of low-avidity TCR signaling. J. Immunol. 2008; 181:243–55.

Takeuchi K, Yang H, Ng E, Park SY, Sun ZY, et al. Structural and functional evidence that Nck interaction with CD3ε regulates T-cell receptor activity. J. Mol. Biol. 2008; 380:704–16.

Tamir A, Eisenbraun MD, Garcia GG, Miller RA. Age-dependant alterations in the assembly of signal transduction complexes at the site of T cell/APC interaction. J. Immunol. 2000;165:1243-1251.

Teng, JM, King, PD, Sadra, A, Liu, X, Han, A, Selvakumar, A, August, A, Dupont, B Phosphorylation of each of the distal three tyrosines of the CD28 cytoplasmic tail is required for CD28-induced T cell IL-2 secretion. Tissue Antigens 1996;48(4 Pt 1):255-64.

Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free Radic Biol Med. 2007;43:4–15.

Truneh A, Reddy M, Ryan P, Lyn SD, Eichman C, Couez D, Hurle MR, Sekaly RP, Olive D, Sweet R. Differential recognition by CD28 of its cognate counter receptors CD80 (B7.1) and B70 (B7.2): analysis by site directed mutagenesis. Mol Immunol. 1996;33:321-34.

Trzonkowski P, Myśliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak LB, et al. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. Vaccine. 2003;21:3826-36.

Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many t-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. Nature 1995; 375: 148-151.

Van Der Biggelaar AH, Huizinga TW, De Craen AJ, Gussekloo J, et al. impaired innate immunity predicts frailty in old age. The leiden-85 plus study. Exp Gerontol 2004;39:1407-14.

Van der Merwe PA, Davis SJ. Molecular interactions mediating t cell antigen recognition. Annu Rev Immunol. 2003; 21 :659-684.

Van Leeuwen JE, Samelson LE. T cell antigen-receptor signal transduction. Curr Opin Immunol. 1999;11(3):242-8.

Van Oers, NS, Weiss, A The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. Semin Immunol 1995;7:227-36.

Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T and Dustin ML. Cell Receptor-Proximal Signals Are sustained in Peripheral Microclusters and Terminated in the Central Supramolecular Activation Cluster. Immunity 2006;25:117-127.

Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, et al. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca2+ entry. Science 2006; 312:1220–23.

Vila-Córcoles A. Vaccinate your child and save its grandparents from a heart attack? Current perspectives in antipneumococcal vaccination. J Intern Med. 2009;266:432-44.

Vinograd CH, Gerety MB, Chung M, et al. Screening for frailty : criteria and predictors of outcome. J Am Ger Soc 1991 ;39 :778-84.

Vitte J, Michel BF, Bongrand P, Gastaut JL. Oxidative stress level in circulating neutrophils is linked to neurodegenerative diseases. J Clin Immunol 2004;24:683-692.

Waldmann TA. Effective cancer therapy through immunomodulation. Annu Rev Med. 2006; 57:65-81.

Wang H, McCann FE, Gordan JD, Wu X, Raab M, et al. ADAP-SLP-76 binding differentially regulates supramolecular activation cluster (SMAC) formation relative to T cell-APC conjugation. J. Exp. Med. 2004;200:1063–74.

Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. Nature Reviews 2009;10:75-82.

Wange RL. LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways Sci STKE 2000; 19;2000(63):re1.

Watanabe R, Harada Y, Takeda K, Takahashi J, Ohnuki K, Ogawa S, Ohgai D, Kaibara N, Koiwai O, Tanabe K, Toma H, Sugamura K, Abe R. Grb2 and Gads exhibit different interactions with CD28 and play distinct roles in CD28-mediated costimulation. J Immunol 2006 ;177:1085-91.

Webster RG. Immunity to influenza in the elderly. Vaccine 2000;16:1686-1689.

Weng N, Akbar AN, Goronzy J. CD28 $^{-}$ T cells: their role in the age-associated decline of immune function. Trends in immunology 2009; 30:306-12.

Whitehurst CE, Boulton TG, Cobb MH, Geppert TD. Extracellular signal-regulated kinases in T cells. Anti-CD3 and 4β-Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-Induced Phosphorylation and Activation. J Immunol 1993;148:3230-3237.

Wikby A, Nilsson BO, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Löfgren S, et al. The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: Findings from the Swedish NONA immune longitudinal study of very late life functioning. Mech Ageing and Dev 2006 ; 127 : 695–704.

Wick G, Grubeck-Loebenstein B. The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly. Exp Gerontol 1997; 32:401–13.

Williams BL, Irvin BJ, Sutor SL, Chini CC, Yacyshyn E, Bubeck Wardenburg J, Dalton M, Chan AC, Abraham RT. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-gamma1 and Ras activation. EMBO J. 1999;18:1832-44.

Wu D, Mura C, Beharka AA, Han SN, Paulson KE, Hwang D, et al. Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. Am J Physiol. 1998;275:C661–8.

Wu M, Holowka D, Craighead HG, Baird B. Visualization of plasma membrane compartmentalization with patterned lipid bilayers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:13798-803.

Xu C, Gagnon E, Call ME, Schnell JR, Schwieters CD, et al. Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3 epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. Cell 2008;135:702–13.

Yablonski D, Kadlecek T, Weiss A. Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT Mol Cell Biol 2000;21:4208-18.

Yokosuka, T., K. Sakata-Sogawa, W. Kobayashi, M. Hiroshima, A. Hashimoto-Tane, M. Tokunaga, M. L. Dustin, and T. Saito. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. Nat. Immunol. 2005;6:1253–1262.

Zeng R, Cannon JL, Abraham RT, Way M, Billadeau DD, et al. SLP-76 coordinates Nckdependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott- Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. J. Immunol. 2003;171:1360–68.

Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, et al. Genome-wide RNAi screen of Ca2+ influx identifies genes that regulate Ca2+ release-activated Ca2+ channel activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006;103:9357–62.

Zhang W, Irvin BJ, Trible RP, Abraham RT, Samelson LE. Functional analysis of LAT in TCRmediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line. Int. Immunol 1999; 11:943–50.

Zhang W, Trible RP, Zhu M, Liu SK, McGlade CJ, Samelson LE. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell angigen receptor-mediated signaling. J Biol Chem 2000; 8;275:23355-61.

Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, Ultsch M, Seshagiri S, et al. Bcl10 activates the NF-κB

pathway through ubiquitination of NEMO. Nature 2004;427:167–71.

Zidovska, A., Sackmann, E. Brownian motion of nucleated cell envelopes impedes adhesion. Phys. Rev. Letters 2006;96:048103.

E- ANNEXES

Annexe 1 : Critères du senieur protocol [Ligthart et al.1984]

Critères d'inclusion :

Age : les patients doivent être regroupés en tranches d'âge : 65-74 ans, 75- 84 ans, 85-94 ans, plus de 95 ans. Notre étude inclut les patients à partir de 75 ans.

Données à recueillir :
Age, sexe, origine ethnique, poids et taille, nombre de grossesses, antécédents chirurgicaux, de transfusions sanguines, utilisation de médicaments, consommation alcoolique, habitudes alimentaires, profession, conditions d'habitat, activité de la vie quotidienne
Données de l'examen clinique

Critères d'exclusion : peuvent être groupés en 3 principales rubriques :

A : Informations cliniques (incluant un suivi clinique à 2 semaines)
Infection
Inflammation
1. Tumeur maligne : antécédents ou en cours
2. Autres conditions pouvant influencer le système immunitaire :
   antécédents récents (< 6 mois) d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral ou de chirurgie vasculaire
   insuffisance cardiaque
   démence, grossesse
   dénutrition (IMC < 20 pour les femmes et à 22 pour les hommes)
   alcoolisme chronique et abus de drogues

B : Anomalies biologiques
VS, Hémoglobine, VGM, GB avec formule
Urée, PAL, SGOT, SGPT, glycémie
Protidémie et immunoélectrophorèse
Analyse d'urine : protéines, glucose, sédiment

C : Interférences thérapeutiques
Les exclusions concernent les traitements pris pour une pathologie excluant le patient ou les traitements pouvant influencer le système immunitaire comme les anti-inflammatoires (comprenant les corticoïdes), les hormones et les antalgiques. Si le traitement peut être arrêté alors le volontaire pourra être inclus. Des vaccinations ne doivent pas avoir été effectuées dans les 6 semaines précédant l'étude.

Annexe 2 :

How Cells feel their environment : a focus on early dynamic events

E Crétel[1,2,3,4], A Pierres[1,2,3], AM Benoliel[1,2,3], P Bongrand[1,2,3,4]

[1] Lab. Adhesion and Inflammation, INSERM UMR 600, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France,
[2] CNRS UMR 6212,
[3] Université de la Mediterranée,
[4] Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille. France

Cellular and Molecular Engineering 2008;1:5-14.

Annexe 3 :

Early contacts between T lymphocytes and activating surfaces

E Crétel[1,2,3,4], D Touchard[1,2,3], AM Benoliel[1,2,3], P Bongrand[1,2,3,4,5]

and A Pierres[1,2,3]

[1] INSERM UMR 600, Laboratory Adhesion and Inflammation, Parc Scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09, France
[2] CNRS UMR 6212, France
[3] Aix-Marseille Universit´es, France
[4] Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, France

J. Phys. Condens. Matter 22 (2010) 194107 (12pp)

Annexe 4 :

A new method for rapid detection of T lymphocyte decision to proliferate after encountering activating surfaces

Elodie Cretel[a, b, c], Dominique Touchard [a, b, d], Pierre Bongrand [a, b, c, d] and Anne Pierres[a, b, d]

[a] INSERM UMR 600, Lab Adhésion et Inflammation, Parc Scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09, France. http://lai.sciences.univmed.fr.
[b] CNRS UMR 6212, Lab Adhésion et Inflammation.
[c] Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille,
[d] Université de la Mediterranée

Article soumis au Journal of Immunological Methods

Annexe 5 :

Immunosénescence et infections, mythe ou réalité ?

Immunosenescence and infections, myth or reality?

E. Crétel[a,b], I. Veen[b], A. Pierres[a], P. Bongrand[a], G. Gavazzi[c,d]

[a] *Unité inserm UMR 600, parc scientifique de Luminy, case 937, 13288 Marseille, France*
[b] *Service de gériatrie sud, hôpital Sainte-Marguerite, 274, boulevard de Sainte-Marguerite, 13274 Marseille cedex 09, France*
[c] *GREPI, TIMC-IMAG, CNRS UMR 5525, BP 217, 38043 Grenoble cedex 09, France*
[d] *Pôle pluridisciplinaire de médecine, clinique universitaire de médecine gériatrique, centre hospitalier universitaire A.-Michallon, BP 217, 38043 Grenoble cedex 09, France*
Recu le 19 octobre 2009 ; accepté le 10 décembre 2009

Med Mal Infect. 2010;40:307-18.

Annexe 6 :

Etude du profil immunitaire de sujets âgés hospitalisés en unité de court séjour gériatrique

Immune profile of elderly patients admitted in a geriatric short care unit

E. Crétel [a,b] I. Veen [a], A Pierres [b,c], Y. Binan [a] , P. Robert [b,c], A.D. Loundou [d],

K. Baumstarck-Barrau [d], A.-M. Hubert [c] , P. Bongrand [b,c], M Heim [a]

[a] Service de Gériatrie Sud, Hôpital Sainte Marguerite, 274 bd de Sainte Marguerite 13274 Marseille Cedex 09
[b] Unité Inserm UMR 600, Adhésion et Inflammation, Parc scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille
c Laboratoire d'immunologie, Hôpital de la Conception, 147 bd Baille, 13005 Marseille
d Unité d'Aide Méthodologique à la Recherche Clinique, DRC APHM, Laboratoire de Santé Publique- Faculté de Médecine, 27, Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex

Article accepté pour publication dans la Revue de Médecine Interne.

Résumé

L'immunité cellulaire T est probablement la plus affectée par le vieillissement de l'être humain avec un retentissement sur les déficiences immunitaires au niveau humoral comme au niveau cellulaire. Elle contribue à une augmentation de la susceptibilité des sujets âgés aux maladies infectieuses, à l'auto-immunité, au cancer et à la baisse de la réponse vaccinale mais son intrication avec les pathologies notamment chroniques est mal connue.

Notre travail s'est intéressé aux temps précoces de l'activation cellulaire T et à la mise au point d'un modèle permettant l'évaluation de la capacité d'activation des lymphocytes T vis-à-vis de surfaces recouvertes d'anticorps activateurs (Ac antiCD3) ou non (Ac antiHLA-ABC), observés en microscopie IRM.

Ce modèle nous permet de montrer que l'étalement des lymphocytes T sur les surfaces est précédé d'ondulations verticales de la membrane générant des contacts transitoires durant environ 1 minute et que la cinétique d'étalement est ensuite sept à huit fois plus rapide sur les surfaces supposées activatrices. D'autre part, avec des dilutions successives des Ac antiCD3 sur les lamelles, l'aire moyenne de la zone de contact des lymphocytes T est fortement corrélée aux réponses prolifératives mesurées avec le test de prolifération lymphocytaire standard au CFSE.

Ce modèle permet également l'observation en microscopie à fluorescence de différentes protéines phosphorylées des cascades de signalisation. L'étude de la fluorescence des cellules T purifiées, fixées et marquées par l'Ac anti-phospho-Erk en fonction des dilutions d'Ac antiCD3 sur la lamelle permet d'objectiver une décroissance de la moyenne de fluorescence avec les dilutions.

Notre modèle a l'avantage d'étudier les temps précoces de l'activation. Il pourrait s'appliquer à l'étude de l'immunosénescence. Ainsi l'étude du contact entre une cellule T et des surfaces activatrices pourrait s'avérer être une méthode simple et utile d'exploration précoce de l'activation de lymphocytes T en pratique clinique.

L'application de notre modèle à l'étude de l'immunité du sujet âgé est en cours dans le cadre d'une étude prospective comparative de sujets âgés malades et de sujets âgés « sains » recrutés selon les critères du « senieur protocole ».

En conclusion, il s'agit d'un travail d'approche mixte à la fois fondamentale et clinique permettant d'étudier les phénomènes d'immunosénescence et leur lien avec la pathologie.

Author manuscript, published in "Cellular and Molecular Bioengineering 1 (2008) 5-14"

This unedited manuscript was accepted for publication in "Cellular and Molecular Engineering" (1:5-14, 2008)

How Cells feel their environment : a focus on early dynamic events

Elodie Cretel[1,2,3,4], Anne Pierres[1,2,3], Anne-Marie Benoliel[1,2,3] and Pierre Bongrand[1,2,3,4,5]

[1]Lab. Adhesion and Inflammation, INSERM UMR 600, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France, [2]CNRS UMR 6212, [3]Université de la Mediterranée, [4]Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille. FRANCE

It is now well demonstrated that cell adhesion to a foreign surface strongly influences prominent functions such as survival, proliferation, differentiation, migration or mediator release. Thus, a current challenge of major practical and theoretical interest is to understand how cells process and integrate environmental cues to determine future behaviour. The purpose of this review is to summarize some pieces of information that might serve this task. Three sequential points are discussed. First, selected examples are presented to illustrate the influence of substratum chemistry, topography and mechanical properties on nearly all aspects of cell behaviour observed during the days following adhesion. Second, we review reported evidence that long term cell behaviour is highly dependent on the alterations of cell shape and cytoskeletal organization that are often initiated during the minutes to hours following adhesion. Third, we review recently obtained information on cell membrane roughness and dynamics, as well as kinetics and mechanics of molecular interactions. This knowledge is required to understand the influence of substratum structure on cell signaling during the first minute following contact, before the appearance of detectable structural changes. It is suggested that unraveling the earliest phenomena following cell-to-substratum encounter might provide a tractable way of better understanding subsequent events.

Keywords **: Adhesion, cell behaviour, substratum topography, substratum rigidity, signaling**

Cell adhesion to foreign surfaces strongly influences nearly all functions, including proliferation, differentiation, migration or release of active mediators. These phenomena are of prominent importance for both practical and theoretical reasons. Indeed, a major challenge of tissue engineering consists of elaborating biomaterials inducing adequate response of surrounding tissues, with proper integration and inhibition of potentially harmful inflammatory or infectious processes. Also, the ultimate goal of cell biologists may well be to understand the rules followed by cells for behavioural choices. Studying the consequences of cell adhesion to well-defined controlled structures should bring major insights along this line.

During the last years, numerous investigators provided impressive information on the way cells respond to substrate properties such as molecular structure, lateral density and distribution of active sites, mechanical properties, micrometer- or nanometer-scale topography. Also, the involvement of some well-defined signalling cascades in these sensing events was convincingly demonstrated. The present challenge may well be to make sense from the huge amount of data that have been gathered. The complexity of this task may seem quite overwhelming in view of the number of molecules and genes involved in response to environmental cues. Indeed, since a limited perturbation of the cell environment may affect hundreds of important interrelated molecules, it is very difficult to obtain unambiguous proofs of an immediate relationship between a surface pattern and the triggering of a given signalling cascade in adherent cells.

The strategy we suggest to tackle with these difficulties is to analyze the phenomena occurring during the first few seconds following the encounter between a cell and a

[5] *Correspondence* : Pr. Pierre Bongrand, Lab Adhesion and Inflammation, INSERM UMR600/CNRS UMR6212, Parc Scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09, France. Phone : (33) 491 82. 88. 52. Fax : (33) 491 82 88 51, email : pierre.bongrand@inserm.fr

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

surface. Hopefully, this approach might allow us to identify surface properties liable to influence cell behaviour in a fairly immediate way. However, as will be discussed below, following this line will require to gather some insight on some cell molecular processes that remain incompletely understood at the present time. However, asking questions may be more appropriate than describing solved problems in an inaugural issue of a scientific journal.

This review will include three main parts. First, we shall describe some representative examples of cell response to substratum properties. Second, we shall review some evidence supporting the concept that cell shape and cytoskeletal organization may provide a link between environmental cues and cell behavioural choices. Third, we shall describe some recent results concerning cell membrane dynamics, as a basis for cell-substratum interaction.

SURFACE PROPERTIES KNOWN TO INFLUENCE ADHERENT CELL BEHAVIOUR

Our purpose is to illustrate basic principles with representative examples rather than presenting exhaustive reviews. Therefore, we apologize for the omission of much important work. We shall only list some surface parameters that are now recognized as important determinants of cell behaviour.

Surface chemistry.

The best known example of the importance on surface chemistry on cell behaviour may well be the need to subject plastic (polystyrene) dishes to a specific treatment to make them suitable for cell culture. This emphasizes the important of nonspecific features such as hydroxyl groups that will decrease surface hydrophobicity[1]. Another example is the long-known capacity of phagocytic cells to ingest selectively hydrophobic particles[2]. More recently, a study made at the proteomic level resulted in the identification of 21 genes of Hela Cells whose expression was substantially altered by substratum hydrophobicity after 24h adhesion[3].

Now, while the importance of surface charge or hydrophobicity was studied for decades, it is not obvious that cells are intrinsically sensitive to these nonspecific physical-chemical properties. As recently discussed[4], most recent evidence supports the concept that cells essentially perceive foreign surfaces through membrane receptors that are specific for well defined molecular structures. Since biomaterials become coated with adsorbed molecules within seconds following their exposure to biological media, and the conformation of adsorbed biomolecules is dependent on the physical-chemical properties of underlying surfaces, cells may detect these properties in an indirect way, through exposure of specific binding sites linked to conformational changes. Thus, fibronectin was found to support cell growth much more efficiently when it was adsorbed on hydrophilic rather than hydrophobic surfaces[5].

Nature, density and lateral distribution of specific ligands.

The most general mechanism allowing cells to respond to surfaces they have just encountered is the generation of biochemical signalling cascades following the interaction between cell membrane receptors and their specific ligands when they are exposed on the surfaces. Multiple experiments supported the general concept that the cell response is dependent on the nature of stimulated receptors. As an example, different receptors may be involved in mediating cell attachment to and spreading on a surface[6]. Now, in addition to the ligand species, density and distribution of binding sites may strongly influence cell behaviour. Thus, the migration behaviour of fibroblasts deposited on surfaces coated with an integrin ligand (YRGDS peptide) was markedly influenced by the spatial distribution of binding sites at the nanoscale level[7]. More recently, it was reported that the spreading of rat fibroblasts on surfaces coated with RGD integrin ligands was markedly influenced by the spacing of binding sites: when the distance between binding sites was increased from 58 to 108 nm, spreading efficiency decreased with less regular progression of the cell leading edge and frequent occurrence of retraction events[8].

Several well-demonstrated mechanisms might be responsible for these findings. First, ligand clustering may dramatically enhance cell attachment efficiency since binding strength may increase exponentially with respect to attachment valency[9]. Second, clustering of cell membrane molecules such as integrins may dramatically

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

influence the triggering of signalling cascades as a consequence of interactions between intracellular molecules linked to the receptors. Thus, receptor clustering may influence signalling in a qualitative as well as a quantitative way[10].

Surface topography.

It has been well demonstrated for several decades that cells deposited on substrata bearing micrometric patterns adapted their shape and orientation to the topological features of the surface, a phenomenon called "contact guidance". Thus, cells displayed marked alignment along grooves of micrometrical depth and width[11]. More recently, it was also shown that cells are sensitive to nanoscale topography. Thus, when fibroblasts were deposited on surfaces bearing islands of 13-nanometer height, they displayed marked enhancement of gene expression, as demonstrated with microarray technology[12]. Indeed, 584 responses were detected out of 1,718 tested genes. Also, nanoislands induced filopodium formation and cell spreading. Further work allowed the identification of molecules involved in force generation, such as myosin II, and focal contact development, such as focal adhesion kinase, in topography sensing[71].

Additional information was obtained with different approaches. Thus, when nanoscale patterns were varied, it appeared that the adhesion of human fibroblasts was lower on ordered arrays of nanopits compared to flat surfaces or randomly distributed pits[13]. Another study might provide additional information on underlying phenomena. The activation of T lymphocytes by surfaces exposing complexes formed by cognate peptides and histocompatibility molecules (pMHC) is a process of prominent importance for the development of immune defence. When T lymphocytes were deposited on surfaces bearing pMHC freely diffusing in supported lipid layers, the addition to surfaces of nanobarriers impeding the lateral diffusion of complexes formed between T cell receptors (TCR) and pMHC resulted in marked increase of the lifetime of signal generation by peripheral TCR/pMHC clusters[14]. This work provided a formal proof that the presence of nanostructures on surfaces might strongly influence the development of signaling cascades.

While there is no doubt that cell behaviour is influenced by nanoscale topography, underlying mechanisms remain ill understood. The aforementioned finding that barriers as low as 50 nm might efficiently alter lateral diffusion of molecular complexes is certainly significant. Also, there is some evidence that local surface curvature might influence molecular interactions in the cell membrane[15]. Thus, substratum topography is likely to influence the in-plane movement and interactions of the proteins embedded in the cell membrane. This may drastically influence the generation of signaling cascades.

Surface stiffness.

It is now well demonstrated that the behaviour of adherent cells is markedly altered by surface mechanical properties. Thus, when fibroblasts were deposited on collagen surfaces with local variations of rigidity, they were found to migrate towards stiffer regions, a phenomenon denominated by the authors as "durotaxis"[16]. More recently, when human mesenchymal stem cells were deposited on collagen-coated surfaces of varying rigidity, cell differentiation was dramatically affected by substratum stiffness. Indeed, cells deposited on softer matrices with a Young modulus of ~0.1 - 1 kPa differentiated into neurons. Stiffer surfaces (about 10 kPa) induced muscle cell generation. Finally, cells deposited on the stiffest surfaces (25-40 kPa) turned into osteoblasts[17].

In addition to the formal demonstration that cells are highly sensitive to the substratum rigidity, important information was obtained on possibly involved mechanisms. First, it has long been found that adherent cells usually exert a pulling force on underlying substrata[18]. Second, the force exerted by cells is dependent on the substratum resistance. This phenomenon was cleverly demonstrated by applying controlled forces to fibronectin-coated microspheres deposited on cells and held with an optical trap[19]. Cells were indeed found to sense the restraining force exerted by the trap and locally increase pull. A possibly related finding is that forces were shown to stimulate focal contact development[72]. Third, using cell spread area determination to evidence rigidity sensing, Sheetz and collaborators demonstrated the involvement of some key molecules such as $\alpha_V\beta_3$ integrin and membrane-bound phosphatases in this process[20].

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

Several points must be clarified for full interpretation of available data. First, it is not obvious to understand which precise substratum property is sensed by cells. Indeed, while the tension of cells adhering to a surface seems correlated to the Young modulus, other substratum properties must influence cell perception. Indeed, cells probably sense the kinetics of force increase when they pull on the substratum. This clearly depends on surface viscosity as well as elasticity. Also, it should be interesting to determine whether cells are equally sensitive to resistance to pushing as well as pulling forces. Although little information is available in this respect, it is interesting to note that a force as low as a few piconewtons per µm was reported to stall lamellipodia generated by fish epithelial keratocytes[21].

CELL-SUBTRATUM SENSING: A COMMON MECHANISM?

While there is no doubt that the behaviour of adherent cells is deeply influenced by substratum properties, there is currently no theoretical framework available to achieve a general interpretation of experimental data. In this respect, it is interesting to review several reports suggesting that cell shape might provide a link between environment and fate.

Cell shape as an integrator of environmental signals.

As recently reviewed[22], cell spreading plays a key role in important functions such as proliferation or differentiation. Thus, human mesenchymal cells underwent osteogenic differentiation when they well spread, whereas round cells became adipocytes[23]. That cell shape rather than contact area and number of bound membrane receptors might be the important parameter is suggested by the finding that cell proliferation, that is often dependent on adhesion, was shown to be related to projected area, i.e. cell shape, rather than molecular adhesion area[24].

More studies are needed to understand the link between cell shape and behaviour. As suggested above[15], local curvature might influence interaction between membrane molecules. Another mechanism of potential importance is based on the formation of activity gradients of enzymes that might be activated by plasma membrane receptors and deactivated by cytosolic components, as supported by experimental data and theoretical modeling[25,26]. As another example, there is some evidence that the cytoskeleton organization might link cell shape to behaviour through a control of the small GTPase Rho[27]. More generally, while there is ample evidence that cell cytoskeletal organization is tightly related to cell shape, there is also strong support to the hypothesis that signaling cascades are markedly influenced by cytoskeletal organization. This point is discussed below.

Cell signaling and cytoskeletal organization. In addition to its capacity to propagate mechanical effects within cells and convert stresses into signals[28,29], the cytoskeleton may strongly influence signaling[30]. Since signaling cascades are essentially made of sequential interactions between numerous enzymes, targets and adapters, the cytoskeleton might play a major role by promoting interactions between particular molecules[28]. A possible rationale for such a function was recently suggested on the basis of recent advances in proteomics[31]. Forgacs and colleagues performed a mathematical analysis of the set of molecular interactions (i.e. interactome) disclosed between proteins from Saccharomyces cerevisiae. Starting from a database of 4,480 interactions between 2,115 proteins[32], they were able to show that cytoskeleton related proteins were endowed with a particularly high capacity to interact with molecules involved in signalling.

A FOCUS ON TRANSIENT DYNAMIC EVENTS

As illustrated by the selected examples described above, cells adhering to a foreign surface can perceive a number of features related to surface chemistry, topography or rigidity and integrate all information to select behavioural pathways. Since it is unlikely that cells view these parameters as we do, a major challenge is to understand the general mechanisms of data processing they use. A general problem is that a given cell perturbation will affect hundreds of different parameters, making it difficult to identify clearcut causal phenomena (provided they actually exist !). A possible strategy to achieve this goal might consist of identifying early

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

phenomena determining long-term events, such as differentiation or proliferation monitored after a few days. As briefly sketched above, cell shape and cytoskeletal organization are good candidates since much evidence support the view that they are causally related to both long-term cell behaviour and substratum structure. Thus, it seems warranted to investigate the processes by which adherent substrata influence cell properties, with a special interest in shape and cytoskeletal organization. During the last years, much information was obtained on cell changes detected a few minutes or more after encounter with foreign surfaces. However, relatively little information is available on the cell response observed during the first seconds or tens of seconds following such encounters. We suggest that this study might prove rewarding, since causal relationships may be easier to detect when there is a short time interval between stimuli and responses.

A first question is to know how long it takes a cell encountering a surface to initiate a specific behavioural response. Previous studies done on cell adhesion suggest that metabolic events[33] and cooperation between adhesion molecules[34,35] are less important during the first tens of seconds after contact. Thus, it might be feasible to identify immediate consequences of cell-surface interaction by focussing on the first minutes following contact. For the sake of clarity, we shall discuss separately bulk membrane motion at interfaces, forces potentially generated by this motion, and lateral redistribution of membrane molecules at interfaces as a key determinant of signaling processes.

Bulk membrane motion at interfaces.

Understanding how cells perceive foreign surfaces requires to know how the cell membrane will make contact with its environment. During the last decades, much information was obtained with at least three complementary techniques. Electron microscopy certainly provided the most accurate information. Unfortunately, the need to subject cells to fixation procedures precludes any real-time observation. Interference reflection microscopy (IRM)[36] also denominated as reflection interference contrast microscopy (RICM)[37] allows real-time observation of the distance between a cell and a planar surface with a few nanometer accuracy, while the lateral resolution is not better than several tenths of a micrometer. The interest of this method is that no staining procedure is required. Total internal reflection microscopy (TIRF) takes advantage of evanescent waves to illuminate a region of 100-200 nm thickness adjacent to a planar glass surface. After proper labelling of the extracellular medium[38] or the cell membrane[39], it is possible to achieve real-time determination of the motion of membrane along the surface.

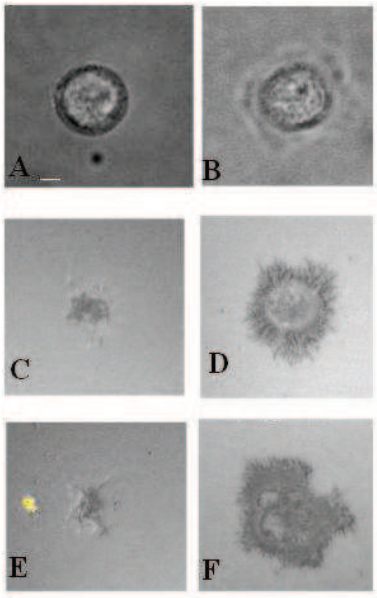


Figure 1. Studying the morphology of cell-to-substratum contact extension with interference reflection microscopy. Human T lymphocytes were deposited on glass surfaces coated with non-activating anti-HLA antibodies (A, C, E) or activating anti-CD3 antibodies (B, D, F). Cell morphology was monitored with standard microscopical observation (A, B) and interference reflection 15 minutes (C, D) or 30 minutes (E, F) after deposition. Clearly, contact extension was mediated by lamellipodia or filopodia depending of substratum structure. Bar length is 2 µm.

Although different cell populations may display widely different behaviour, a general trend is as follows: several minutes to hours after sedimentation on a surface, a cell may begin extending membrane protrusions parallel to the surface. They may be sheet-like lamellipodia or thin filopodia (Fig. 1). It has long been reported that well defined mediators were involved in the choice between different shapes[40] : thus, the small GTPase Rac was reported to induce lamellipodium generation with a branched organization of actin

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

microfilaments, while the small GTPase Cdc42 was found to initiate the extension of cylindrical filopodia shaped by a microfilament bundle. The choice between lamellipodium or filopodium formation may be influenced by substratum properties such as density of binding sites[10], topography[41] or rigidity[17]. A further point is that the cell margin was often reported to display fluctuations with periods of progress and retraction[39]. A typical period was several tens of seconds, and the reported velocity of the cell margin is of order of several tens of nanometers per second. Notably, when the density of adhesive points is high enough, this fluctuating behaviour may be replaced with a smooth progression.

Now, a key point is to know how a cell can select the kind of motion it will display. At least two different mechanisms may be suggested: (i) cells might continuously form a low number of protrusions of varying morphology. Contact with the substratum might lead to reinforcement or inhibition trough a positive or negative feedback. (ii) Alternatively, the acquisition of a particular motile behaviour might be induced during an early phase of cell-substratum interaction as a consequence of some internal switch[42].

Although it is not yet feasible to chose between aforementioned hypotheses, it seems reasonable to investigate the early phenomena following cell-to-surface encounter and preceding the morphological changes associated to spreading. Thus, it seems desirable to achieve a quantitative description of the motion and mechanical properties of the surface of an isolated cell in order to predict the consequences of interaction with a surface of known structure. While it has long been shown with electron microscopy that cell membranes are studded with numerous cylindrical or sheet-like protrusions appearing as folds of the plasma membrane, less information is available on the kinetic and mechanical properties of the membrane. The typical thickness of these protrusions or microvilli is about 0.1 µm, and length may range between a few tenths of micrometers and several micrometers. Since this value is far higher than the length of typical adhesion receptors, it is not surprising that the initial interaction between cells and surfaces involves the tip of microvilli[43]. Now, there remains to understand the dynamics of the cell surface immediately before adhesion.

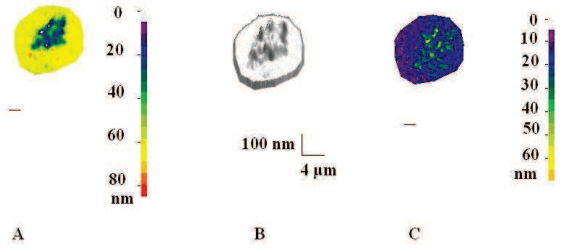


Figure 2. Three-dimensional reconstruction of cell surface morphology and dynamics near an adhesive surface. Human monocytic THP-1 cells were deposited on fibronectin-coated surfaces and observed with interference-reflection microscopy. The shape of the cell membrane is shown as a coded-colour map (A) or a 3-D drawing (B) together with the amplitude of spontaneous membrane fluctuations. Bar length is 2 µm. See ref[44] for more details.

Recently, microscopic studies based on IRM/RICM suggested that the membranes of phagocytes approaching adhesive surfaces displayed fluctuations of higher than 1 Hz frequency and several nanometer amplitude[44,45]. A typical map of cell topography and dynamics near a surface is shown on Fig. 2. Unfortunately, the lateral resolution of IRM/RICM may be insufficient to yield accurate information on the motion of individual microvilli. Also, the mechanical properties of these surface protrusions remain poorly understood. In two sets of experiments based on micropipette and biomembrane force probe, it was shown[46,47] that blood neutrophil microvilli could withstand a pulling force of about several tens of pN before separation between the membrane and underlying cytoskeleton and formation of a lipid tether. Clearly, more information is required to help us determine the kinetics of cell-to-substratum initial contacts together with the intensity of generated forces. This knowledge is important since local molecular organization and signal generation are expected to be strongly influenced by these parameters.

Forces between cell and substratum.

A basic question we must address is to know what force a cell membrane will perceive when approaching a foreign surface. While numerous nonspecific interactions such as electrodynamic or electrostatic forces are likely to occur, it seems acceptable to focus on two dominant phenomena: steric repulsion and specific ligand-receptor interactons[4].

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

Steric repulsion.

As previously reviewed[48], it is well established that essentially all living cells are coated with a polysaccharide-rich layer of widely varying thickness, ranging between a few tenths of a micrometer and several micrometers. This is called the glycocalyx. This highly hydrophilic layer will impede close approach between the plasma membrane and a nearby surface. Therefore, it is usually considered as anti-adhesive, although in some cases the outermost carbohydrate group may bind to lectin-like receptors exposed on adjacent surfaces. The glycocalyx may involve huge polysaccharides or proteoglycans with a molecular weight higher than 1,000,000 dalton. Also, particularly on white blood cells, it includes large mucin-like molecules that have been well identify. The most important examples may be leukosialin (CD43) and CD45.

Clearly, it would be desirable to know the distance dependence of repulsion generated by the glycocalyx. This is difficult in view of the heterogeneity of glycocalyx components. However, a major point that emerged nearly a decade ago[49,50] is that this repulsion exhibits a strong time-dependent decay that may be due (i) to an internal reorganization of repulsive chains (this has not been well demonstrated to-date) and (ii) to an egress of repulsive molecules from contact areas[51,52]. As will be discussed in the next section, this point is of paramount importance since it may strongly influence the outcome of cell-surface interaction.

Molecular attractive bonds.

As recently reviewed[53,54], the formation and dissociation of bonds between surface-attached molecules was subjected to considerable scrutiny during the last decade. A thorough description of these phenomena would not fall into the scope of the present paper and we shall only summarize essential conclusions.

A few years ago, it seemed reasonable to consider that the outcome of an interaction between two surfaces bearing cognate ligand and receptor molecules could be satisfactorily described by two parameters:

- The rate of bond dissociation $k_{off}(F)$ as a function of force exerted on the bond. In many circumstances, it appeared that $k_{off}(F)$ followed so-called Bell's law:

$$k_{off}(F) = k_0 \exp(F/F_0) \quad (1)$$

Many experiments performed at the single molecule level with different tools such as laminar flow chambers, atomic force microscopes, biomembrane force probes or optical traps yielded for parameter F_0 values usually ranging between several piconewtons and several tens of piconewtons. This is the order of magnitude of the force that can be exerted by a bond linking two surfaces subjected by a disruptive force.

- The rate of bond formation k_{on} when surfaces are at binding distance. This parameter proved much more difficult to measure, and even to define, than the rate of bond dissociation, and new methods might bring substantial progress in the near future[55]. A major problem is that the probability of bond formation between two surfaces bearing ligands and receptors is proportional to the number of receptor-ligand couples that are close enough to interact. Since the height of membrane asperities is often much larger than the length of typical adhesion receptors, the number of interacting molecules is strongly dependent on the details of membrane-to-surface alignment. Indeed, surface roughness was shown to change binding frequencies by nearly two orders of magnitude[56].

Recently, another difficulty was recognized. Dissecting individual ligand-receptor couples made more and more obvious the concept that bond formation is a multiphasic process involving numerous intermediate binding states[57,58,59]. This means that bond formation may not be viewed as an all-or-none phenomenon, and the force that can be sustained by a newly formed bond is highly dependent on its history. Thus, it was recently found that adhesion molecules such as cadherins could form associations of widely different strength, with a spontaneous lifetime ranging between at least a few milliseconds and several seconds[60].

Thus, when a cell membrane is close to a ligand-bearing surfaces, the frequency of bond formation and the force exerted by newly formed bonds on the membranes is dependent on complex binding properties that could be understood and measured only very recently. Clearly, this new information must be incorporated in a theoretical framework aimed at explaining how cell membranes perceive the presence of a potentially adhesive surface.

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

Signaling in contact zones: importance of lateral reorganization of membrane molecules.

Clearly, the basic problem addressed in this review is to understand which signaling cascades will be generated by membrane-to-surface interactions.

In view of the above discussion, mechanical forces exerted on the cell membrane may generate signaling cascades through several mechanisms. Indeed, it has long been shown that membrane tension may activate calcium channels through direct interaction with lipid bilayers[61]. Also, it recently became clear that some adhesion molecules such as integrins are flexible machines liable to display large deformations resulting in exposition of new antigenic sites[62]. Clearly, this process might result in formation of docking sites for a variety of signaling molecules. Thus, it is not surprising that mechanical forces exerted on cells were often found to generate multiple biochemical processes such as calcium rise[63] or phosphorylation[64].

However, the main mechanism responsible for signal generation as a consequence of membrane-to-substratum interaction may well be the lateral segregation of membrane molecules. Indeed, due to the huge number of potential interactions between cell molecules[32], generating encounters between enzymes and potential targets may be sufficient to initiate a biochemical cascade. Thus, integrin clustering is likely to play an important role in signal generation after integrin engagement[65]. Also, some evidence suggests that the mere passage of T lymphocyte receptors in a small phosphatase-free zone might increase phosphorylation of activating sites and recruitment of kinases[66].

As a consequence, several different mechanisms might play a role in the perception of an adhesive substratum by a cell:

i) Clusters of binding sites for membrane receptors might result in receptor clustering.

ii) The rearrangement of mobile repulsive molecules might result in phase separation and additional segregation of membrane molecules[67].

iii) Modulation of membrane molecule diffusion by topographic structures[14] might further alter the formation of molecular complexes.

Thus, available evidence suggests potential mechanisms for signal generation during the earliest phase of interaction between a cell and a foreign surface.

CONCLUSION AND PERSPECTIVE.

As summarized in the first part of this review, there is now ample evidence that cells adhering to a surface integrate several properties including chemistry, micrometer- and nanometer-scale topography, and mechanical properties to determine future behaviour. However, relating substratum properties to alterations of the expression of hundreds of genes as a consequence of the perturbation of a complex network of biochemical reactions seems a formidable task.

As indicated in the second part of this review, a possible way of simplifying this challenge may be provided by the frequent observation that important aspects of cell behaviour observed days or weeks after interaction with a surface are tightly related to modifications of cell shape and cytoskeletal organization that may be observed several minutes or days after adhesion. Since much progress was recently achieved in unraveling the mechanisms of cell spreading on a surface, it seems warranted to look for a better understanding of the relationship between substratum properties and cell shape. This is still a most difficult goal since even during the minutes an hours following cell adhesion a huge number of signaling cascades may be triggered.

As briefly sketched in the third part of this review, a possible way of progressing further might consist of investigating the earliest steps of cell-to-substratum interaction. Indeed, relating substratum structure to the phenomena occurring during the first seconds following contact might be conceptually easier than linking this structure to delayed events. The main question is to determine which parameters a cell is really probing. Thus, while it is well accepted that substratum rigidity strongly influences cell behaviour, the very stimulus responsible for cell response is not well understood. Indeed, if cells are sensitive to tension, there remains to understand how the tension generated by a cell is related to substrate resistance to force (is elasticity, or viscosity, or a combination of both the parameter to consider ?). Are the substratum resistance to pulling or pushing forces of

similar importance? A logical way of addressing this problem is to try to relate substratum structure to signal generation, since the perception of a given environmental cue may be considered as equivalent to the signal it will generate. A requirement to approach this goal is to obtain a detailed figure of cell spontaneous motion in the vicinity of a potentially adhesive surface. Much progress was recently done in this domain.

Therefore, it is hoped that the suggested research line might be rewarding. However, a point of caution may be useful: while most studies were done on cells deposited on a 2-dimensional surfaces, it must be kept in mind that in many cases a 3-dimensional environment should be more relevant physiologically[68,69,70]. Despite this restriction, the exquisitely accurate pieces of information that can be obtained on cells interactions with surfaces should strongly increase our understanding of the way cells perceive their environment in the near future.

References.

1. Curtis, A. S. G., J. V. Forrester, C. McInnes, and F. Lawrie. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. J. Cell Biol. 97:1500-1506, 1983.
2. Capo, C., P. Bongrand, A. M. Benoliel, and R. Depieds. Nonspecific recognition in phagocytosis : ingestion of aldehyde treated erythrocytes by rat peritoneal macrophages. Immunology 36:501-508, 1979.
3. Allen, L. T., E. J. P. Fox, I. Blute, Z. D. Kelly, Y. Rochev, A. K. Keenan, K. A. Dawson, and W. M. Gallagher. Interaction of soft condensed materials with living cells : phenotype/transcriptome correlations for the hydrophobic effect. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:6331-6336, 2003.
4. Vitte, J., A. M. Benoliel, A. Pierres, and P. Bongrand. Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface ? European Cells and Materials 7 : 52-63,2004.
5. Grinnell, F., and M. K. Feld. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. J. Biol. Chem. 257 : 4888-4893, 1982.
6. Runyan R. B., J. Versakovic, and B. D. Shur. Functionally distinct laminin receptors mediate cell adhesion and spreading : the requirement for surface galactosyltransferase in cell spreading. J. Cell Biol. 107 : 1863-1871, 1988.
7. Maheswari, G., G. Brown, D. Lauffenburger, A. Wells, and L. G. Griffith. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. J. Cell Sci. 113:1677-1686, 2000.
8. Calvacanti-Adam, E. A., T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, and J. P. Spatz. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. Biophys. J. 92 : 2964-2974, 2007.
9. Seifert, U. Rupture of multiple parallel molecular bonds under dynamic loading. Physical Review Letters 84 : 2750-2753, 2000.
10. Jirouskova, M., J. K. Jaiswal, and B. S. Coller. Ligand density dramatically affects integrin αIIbβ-mediated platelet signaling and spreading. Blood 109:5260-5269, 2007.
11. Clark, P., P. Connolly, A. S. G. Curtis, J. A. T. Dow, and C. D. W. Wilkinson. Topographical control of cell behaviour : II. Multiple grooved substrata. Development 108:635-644, 1990.
12. Dalby, M. J., S. J. Yarwood, M. O. Riehle, H. J. Johnstone, S. Affrossman, and A. S. Curtis. Increasing fibroblast response to materials using nanotopography : morphological and genetic measurements of cell response to 13-nm-high polymer demixed islands. Exp. Cell Res 276:1-9, 2002.
13. Curtis, A. S. G., N. Gadegaard, M. J. Dalby, M. O. Riehle, C. D. W. Wilkinson, and G. Artchison. Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings. IEEE Trans. Nanobiosciences 3:61, 2004.
14. Mossman, K. D., G. Campi, J. T. Groves, and M. L. Dustin. Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses, Science 310:1191-1193, 2005.
15. Reynwar, B. J., G. Illya, V. A. Harmandaris, M. M. Muller, K. Kremer, and M. Deserno. Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. Nature 447:461-465, 2007.
16. Lo, C. M., H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. Biophys. J. 79:144-152, 2000.
17. Engler A. J. , S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. Matric elasticity directs stem cell lineage specification. Cell 126:677-689, 2006.
18. Harris A. K., P. Wild, and D. Stopak. Silicone rubber substrata : a new wrinkle in the study of cell locomotion. Science 208 : 177-179, 1980.

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

19. Choquet, D., D. P. Felsenfeld, and M. P. Sheetz. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. Cell 88:39-48, 1997.
20. Kostic, A., and M. P. Sheetz. Fibronectin rigidity response through Fyn and p130 Cas recruitment to the leading edge. Mol. Biol. Cell 17:2684-2695, 2006.
21. Bohnet, S., R. Ananthakrishnan, A. Mogilner, and J. J. Meister. Weak force stalls protrusion at the leading edge of the lamellipodium. Biophys. J. 90:1810-1820, 2006.
22. Pierres, A., A. M. Benoliel, and P. Bongrand. Cell fitting to adhesive surfaces : a prerequisite to firm attachment and subsequent events. Eur Cell Materials 3 : 31-45, 2002.
23. McBeath, R., D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, and C. S. Chen. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. Dev. Cell 6:483-495, 2004.
24. Chen, C. S., M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber. Geometric control of cell life and death. Science 276:1425-1428, 1997.
25. Meyers, J., J. Craig, and D. J. Odde. Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. Current Biol. 16:1685-1693, 2006.
26. Haugh, J. M. Membrane-binding/modification model of signaling protein activation and analysis of its control by cell morphology. Biophys. J. 107:L93-L95, 2007.
27. Mammoto, A., S. Huang, and D. E. Ingber. Filamin links cell shape and cytoskeletal structure to Rho regulation by controlling accumulation of p190RhoGAP in lipid rafts. J. Cell Sci. 120:456-467, 2007.
28. Janmey, P. A. The cytoskeleton and cell signalling : component localization and mechanical coupling. Physiol. Rev. 78:763-781.
29. Zhao, X. H., C. Lashinger, P. Arora, K. Szaszi, A. Kapus, and C. A. McCulloch. Force activates smooth muscle α-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. J. Cell Sci. 120:1801-1809, 2007.
30. Pennington, S. R., B. J. Foster, S. R. Hawley, R. E. Jenkins, O. Zolle, M. R. H. White, C. J. McNamee, P. Sheterline, and A. W. M. Simpson. J. Biol. Chem. 282:32112-32120, 2007.
31. Forgacs, G., S. H. Yook, P. A. Janmey, H. Jeong, and C. G. Burd. Role of the cytoskeleton in signaling networks. J. Cell Sci. 117:2769-2775.
32. Uetz, P., L. Giot, G. Cagney, T. A. Mansfield, R.S. Judson, J. R. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadamovar, M. Yang, M. Johnston, S. Fields, and J. M. Rothberg. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisia. Nature 403:623-627, 2000.
33. Pierres, A., O. Tissot, B. Malissen, and P. Bongrand. Dynamic adhesion of CD8-positive cells to antibody-coated surfaces the initial step is independent of microfilaments and intracellular domains of cell-binding molecules. J. Cell Biol. 125 : 945-953, 1994.
34. Garcia, A. J., and D. Boettiger. Integrin-fibronectin interactions at the cell-material interface : initial integrin binding and signaling. Biomaterials 20:2427-2333, 1999.
35. Taubenberger, A., D. A. Cisneros, J. Friedrichs,P. H. Puech, D. J. Muller, and C. M. Franz. Revealing early steps of α2β1 integrin-mediated adhesion to collagen type I by using single-cell force spectroscopy. Mol. Biol. Cell 18:1634-1644, 2007.
36. Curtis, A. S. G. The mechanism of adhesion of cells to glass. J. Cell Biol. 20:199-215, 1964.
37. Simson, R.,E. Wallraff, J. Faix, J. Niewöhner, G. Gerish, and E. Sackmann. Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of Dictyostelium lacking talin or cortexillins. Biophys. J. 74:514-522, 1998.
38. Gingell, D., I. Todd, and J. Bailey. Topography of cell-glass apposition revealed by total internal reflection fluorescence of volume markers. J. Cell Biol. 100:1334-1338, 1985.
39. Döbereiner, H. G., B. Dubin-Thaler, G. Giannone, H. S. Xenias, and M. P. Sheetz. Dynamic phase transitions in cell spreading. Phys. Rev. Letters 93:108105, 2004.
40. Ridley, A. J., M; A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz. Cell migration : integrating signals from front to back. Science 302:1704-1709, 2003.
41. Dalby, M. J., S. Childs, M. O. Riehle, H. J; H. Johnstone, S. Affrossman, and A. S. G. Curtis. Fibroblast reaction to island topography : changes in cytoskeleton and morphology with time. Biomaterials 24:927-935, 2003.
42. Pankov, R., Y. Endo, S. Even-Ram, M. Araki, K. Clark, E. Cukierman, K. Matsumoto, and K. M. Yamada. A Rac switch regulates random versus directionally

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

persistent cell migration. J. Cell Biol. 170:793-802, 2005.
43. Jones, G. E., R. Gillett, and T. Partridge. Rapid modification of the morphology of cell contact sites during the aggregation of limpet haemocytes. J. Cell Sci. 22:21-33, 1976.
44. Zidovska, A., and E. Sackmann. Brownian motion of nucleated cell envelopes impedes adhesion. Phys. Rev. Letters 96:048103, 2006.
45. Pierres, A., Benoliel, A. M., Touchard, D., and Bongrand, P. How cells tiptoe on adhesive surfaces before sticking. Biophys. J. in press.
46. Shao, J. Y., H. P. Ting-Beall, and R. M. Hochmuth. Static and dynamic lengths of neutrophil microvilli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 6797-6802, 1998.
47. Evans, E., V. Heinrich, A. Leung, and K. Kinoshita. Nano- to Microscale dynamics of P-selectin detachment from leukocyte interfaces. I. Membrane separation from the cytoskeleton. Biophys. J. 88:2288-2298, 2005.
48. Robert, P., Limozin, L., Benoliel, A. M., Pierres, A., and Bongrand, P. "Glycocalyx Regulation of Cell Adhesion." In: Principles of Cellular Engineering, edited by M. R. King, Amsterdam : Elsevier. Academic Press, 2006, pp143-169.
49. Patel, K. D., M. U. Nollert, and R. P.McEver. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils, J. Cell Biol., 131 : 1893-1902, 1995.
50. Sabri, S., A. Pierres, A. M. Benoliel, and P. Bongrand. Influence of surface charges on cell adhesion : difference between static and dynamic conditions. Biochem. Cell Biol. 73 : 411-420, 1995.
51. Soler, M., C. Merant, C. Servant, M. Fraterno, C. Allasia, J. C. Lissitzky, P. Bongrand, and C. Foa. Leukosialin (CD43) behavior during adhesion of human monocytic THP-1 cells to red blood cells. J. Leukocyte Biol., 61 : 609-618, 1997.
52. Leupin, O., R. Zaru, T. Laroche, S. Müller, and S. Valitutti. Exclusion of CD45 from the T-cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes. Current Biology 10:277-280, 2000.
53. Pierres, A., J. Vitte, A. M. Benoliel, and P. Bongrand. Dissecting individual ligand-receptor bonds with a laminar flow chamber. Biophys. Rev. Letters 1:231-257, 2006.
54. Robert, P., A. M. Benoliel, A. Pierres, and P. Bongrand. What is the biological relevance of the specific bond properties revealed by single molecule studies ? J. Mol. Recognition. 20:432-447, 2007.
55. Chen, W., E. A. Evans, R. P. McEver, and C. Zhu. Monitoring receptor-ligand interactions between surfaces by thermal fluctuations. Biophys. J. 94:694-701, 2008.
56. Williams, T. E., S. Nagarajan, P. Selvaraj, and C. Zhu. Quantifying the impact of membrane microtopology on effective two-dimensional affinity. J. Biol. Chem. 276:13283-13288, 2001.
57. Pierres, A., D. Touchard, A. M. Benoliel, and P. Bongrand P. Dissecting streptavidin-biotin interaction with a laminar flow chamber. Biophys. J. 82 : 3214-3223, 2002.
58. Pincet, F. and J. Husson. The solution to the streptavidin-biotin paradox : the influence of history on the strength of single molecular bonds. Biophys. J. 89:4374-4381, 2005.
59. Marshall, B. T., K. K. Sarangapani, J. Lou, R. P. McEver, and C. Zhu. Force history dependence of receptor-ligand dissociation. Biophys. J. 88:1458-1466, 2005.
60. Pierres, A., A. Prakasam, D. Touchard, A. M. Benoliel, P. Bongrand, and D. Leckband. Dissecting subsecond cadherin bound states reveals an efficient way for cells to achieve ultrafast probing of their environment. FEBS Lett. 581:1841-1846, 2007.
61. Kung, C. A possible unifying principle for mechanosensation. Nature 436:647-654, 2005.
62. Luo, B. H., C. V. Carman, and T. A. Springer. Structural basis of integrin regulation and signaling. Ann. Rev. Immunol. 25:619-647, 2007.
63. Horoyan, M., A. M. Benoliel, C. Capo, and P. Bongrand. Localization of calcium and microfilament changes in mechanically stressed cells. Cell Biophys 17:243-256, 1990.
64. Matthews, B. D., D. R. Overby, R. Mannix, and D. E. Ingber. Cellular adaptation to mechanical stress : role of integrins, rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channes. J. Cell Sci. 119 : 508-518, 2006.
65. Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. Integrin signaling. Science 285:1028-1032, 1999.
66. Burroughs, N. G., Z. Lazic, and P. A. van der Merwe. Ligand detection and discrimination by spatial relocalization : a kinase-phosphatase segregation model of TCR activation. Biophys. J. 91:1619-1629, 2006.
67. Bruinsma, R., A. Behrisch, and E. Sackmann. Adhesive switching of membranes : experiment and theory. Phys. Rev. E. 61:4253-4267, 2000.

68. Cukierman, E., R. Pankov, D. R. Stevens, and K. M. Yamada. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science 294:1708-1712, 2001.
69. Mao, Y., and J. E. Schwarzbauer. Stimulatory effects of a three-dimensional microenvironment on cell-mediated fibronectin fibrillogenesis. J. Cell Sci. 118:4427-4436, 2005.
70. Jiang, H., and F. Grinnell. Cell-matrix entanglement and mechanical anchorage of fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. Mol. Biol. Cell 16:5070-5076, 2005.

hal-00319588, version 1 - 8 Sep 2008

IOPscience iopscience.iop.org

Home Search Collections Journals About Contact us My IOPscience

Early contacts between T lymphocytes and activating surfaces

This article has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text article.

2010 J. Phys.: Condens. Matter 22 194107

(http://iopscience.iop.org/0953-8984/22/19/194107)

View the table of contents for this issue, or go to the journal homepage for more

Download details:
IP Address: 147.142.186.54
The article was downloaded on 27/04/2010 at 21:46

Please note that terms and conditions apply.

J. Phys.: Condens. Matter **22** (2010) 194107 (12pp) doi:10.1088/0953-8984/22/19/194107

Early contacts between T lymphocytes and activating surfaces

E Cretel[1,2,3,4], **D Touchard**[1,2,3], **A M Benoliel**[1,2,3], **P Bongrand**[1,2,3,4,5] **and A Pierres**[1,2,3]

[1] INSERM UMR 600, Laboratory Adhesion and Inflammation, Parc Scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09, France
[2] CNRS UMR 6212, France
[3] Aix-Marseille Universités, France
[4] Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, France

E-mail: pierre.bongrand@inserm.fr

Received 29 October 2009, in final form 21 December 2009
Published 26 April 2010
Online at stacks.iop.org/JPhysCM/22/194107

Abstract
Cells continually probe their environment to adapt their behaviour. A current challenge is to determine how they analyse nearby surfaces and how they process information to take decisions. We addressed this problem by monitoring human T lymphocyte attachment to surfaces coated with activating anti-CD3 or control anti-HLA antibodies. Interference reflection microscopy allowed us to monitor cell-to-surface apposition with a few nanometre vertical resolution during the first minutes following contact. We found that (i) when a cell fell on a surface, contact extension was preceded by a lag of several tens of seconds. (ii) During this lag, vertical membrane undulations seemed to generate transient contacts with underlying surfaces. (iii) After the lag period, the contact area started increasing linearly with a rate of about 1.5 $\mu m^2\ s^{-1}$ on activating surfaces and about 0.2 $\mu m^2\ s^{-1}$ on control surfaces. (iv) Concomitantly with lateral surface extension, the apparent distance between cell membranes and surfaces steadily decreased. These results are consistent with the hypothesis that the cell decision to spread rapidly on activating surfaces resulted from the integration of information yielded by transient contacts with these surfaces generated by membrane undulations during a period of about 1 min.

(Some figures in this article are in colour only in the electronic version)

1. Introduction

1.1. Cell behaviour is dependent on both chemical and physical properties of their environment

Cells continually probe their environment in order to adapt immediate and long-term behaviour. Here are some examples: a macrophage may decide to phagocytize a pathogen it has just encountered, which may be completed within a few seconds (Evans 1989). A polymorphonuclear phagocyte may start migrating along a chemotactic gradient within minutes (Zigmond 1977). An anchorage-dependent cell may decide to die after being deposited on a non-adhesive surfaces, and this may occur within several hours (Chen *et al* 1997). Blood monocytes deposited on solid surfaces may begin differentiating into macrophages within a few days (Kaplan and Gaudernack 1982).

It has long been considered that cell decisions were based on the recognition of specific ligands by their membrane receptors. Thus, when melanoma cells were deposited on laminin-coated culture dishes, spreading, not attachment, was inhibited when galactosidase substrata were removed by enzymatic treatment (Runyan *et al* 1988). However, a number of recent reports demonstrated that cells are not only sensitive to biochemical signals. Indeed, their behaviour is strongly dependent on physical properties of underlying surfaces such as stiffness, micrometre- and nanometre-scale roughness, or two-dimensional topography of recognition sites (Pierres *et al* 2009). Here are some examples: (i) *substratum stiffness*. It was long ago shown

[5] Author to whom any correspondence should be addressed.

 © 2010 IOP Publishing Ltd Printed in the UK & the USA

by Harris *et al* (1980) that adherent cells exerted forces on underlying substrata. More recently, it was shown that fibroblasts deposited on collagen-coated polyacrylamide gels of heterogeneous stiffness preferentially migrated toward less deformable surfaces, a property denominated as durotaxis (Lo *et al* 2000). Also, when mesenchymal stem cells were cultured on collagen-coated gels of varying cross-linking, they exhibited highly different differentiation pathways depending on the mechanical properties of the underlying surfaces (Engler *et al* 2006). (ii) *Substratum roughness*. It has long been shown that substratum roughness might influence cell adhesion. Thus, macrophages were found to accumulate on roughened areas of culture dishes (Rich and Harris 1981). More precise information could be obtained when electronic miniaturization techniques were used to deposit cells on surfaces bearing well controlled patterns. Thus, cells were found to align along grooves of micrometrical width and submicrometrical depth (Clark *et al* 1990). More recently, nanotechnologies allowed various authors such as Dalby *et al* (2002) to demonstrate that nanopillars of only 13 nm height strongly influenced protein synthesis by deposited fibroblasts. (iii) *Binding site topography*. It is now well accepted that the topography of binding sites exposed by cultured surfaces may significantly influence cell behaviour. Thus, Maheshwari *et al* (2000) showed that rat fibroblasts readily attached to substrata bearing clustered ligands of their integrin membrane receptors, but adhesion was impaired when ligand molecules were homogeneously distributed with the same surface density.

1.2. The mechanisms used by cells to analyse neighbouring structures and make behavioural choices remain poorly understood

While it is well demonstrated and accepted that cells can sense the physical and chemical properties of underlying substrata, many questions remain unanswered: (i) what kind of information is generated by the interaction between a cell and a nearby surface? (ii) How is this information translated into intracellular biochemical cascades? (iii) How are these cascades translated into a behavioural decision?

It is difficult to answer these questions because even basic terms need further analysis (Pierres *et al* 2009). Can a local change of membrane curvature, a force or a change of the 2D distribution of membrane molecules be considered as an informative event? Also, while it seems reasonable to assume that a biochemical event such as a rise of cell cytosolic calcium concentration is a significant phenomenon (Wei *et al* 2009), the link between signalling molecules and cellular outcomes was recently recognized to be poorly defined (Smith-Garvin *et al* 2009). Recording, and even defining, a cell decision is also fraught with difficulties: thus, while cell differentiation may sometimes appear as a limited sequence of fairly irreversible commitments (Gurdon and Melton 2008), much recent evidence suggests that differentiation is more flexible than was previously considered. Thus, fairly simple treatments were shown to induce a lineage switch in human neutrophils that are usually considered as terminally differentiated cells (Araki *et al* 2004). Considering short-term events, sending a filopodium along a chemoattractant gradient may be considered as an early decision, while random filopodium generation may be considered as a permanent property of some cellular states. Discriminating between both events may not be straightforward.

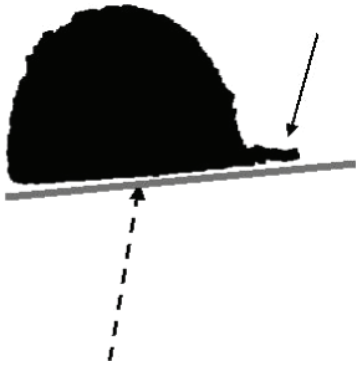


Figure 1. Cell spreading on adhesive surfaces. This figure shows the exact shape of a rat thymocyte deposited on an adherent (concanavalin A-coated) plastic surface, as shown with electron microscopy (Mége *et al* 1986). The formation of a molecular contact area involves (i) micrometre-scale flattening of a spherical cell into a truncated sphere, (ii) nanometre-scale smoothing of the rough cell surface to match the smooth plastic surface (broken arrow), (iii) active lamellipodium formation (full arrow).

In addition to the need for a careful phrasing of the addressed problem, it must be emphasized that it is very difficult to elucidate the role of a given signalling molecule due to a combination of (i) the high redundancy of intracellular phenomena, (ii) the dependence of the role of a molecule on surrounding molecules (thus, the role of a molecule is not an intrinsic property), and (iii) a multiplicity of the functions of a given molecules. See e.g. Abram and Lowell (2009) for an impressive exemplification of this situation by integrin receptors.

1.3. Cell spreading on a surface may be considered as a suitable model for studying cell decision-making

In view of the aforementioned difficulties, a suitable experimental setup to study cell decision-making should meet the following requirements: (i) the cell decision should be liable to real-time monitoring, (ii) information retrieval should be monitored sufficiently rapidly to minimize the chain of events linking cell stimulation and response, (iii) an event defined as a decision should significantly influence future cell behaviour, to ensure that it is not a random event. Arguably, cell spreading on an adhesive surface (figure 1) meets all these requirement. Indeed, while cell attachment may occur without any active cell participation (Pierres *et al* 1994), spreading does not always follow attachment and may indeed involve specific requirements (Runyan *et al* 1988, Pierres *et al* 2002). Therefore, spreading initiation requires a definite cell decision. Further, as will be shown below, spreading may be completed within a few minutes or even tens of seconds after initial contact. Finally, spreading is a highly significant event since spread and rounded cells may display quite different behaviour (Pierres *et al* 2002, Meyers *et al* 2006, Neves *et al*

2008). Interestingly, general models of spreading kinetics were recently reported (Chamaraux *et al* 2005, Cuvelier *et al* 2007).

1.4. The cell decision to spread on a surface is dependent on biochemical, chemical and physical properties of this surface

While it has long been shown that cell spreading on a surface is not a mere consequence of physical attachment and requires the presence of suitable ligands of membrane receptors (Runyan *et al* 1988), more recent results show that the physical and topographical properties of surfaces are perceived and accounted for by deposited cells. Thus, cell spreading on ligands of membrane integrins was found to require that the spacing of these ligand sites be lower than a clearcut threshold (Massia and Hubbell 1991, Calvacanti-Adam *et al* 2007). Also, a minimal substratum stiffness is required to allow spreading initiation. Fibroblast spreading on fibronectin-coated surfaces required that the substratum Young modulus be higher than 3000 kPa (Yeung *et al* 2005), and rat macrophages spread on collagen-coated glass (70 MPa Young modulus), not polyacrylamide (40 kPa, Féréol *et al* 2006). Finally, cell spreading is influenced by the roughness of the underlying surfaces (Wocjiak-Stothard *et al* 1996).

1.5. T lymphocyte spreading on activating surfaces may be considered as a workable model for visualizing cell decision

Mature T lymphocytes are known to circulate throughout living organisms and scan the surface of encountered cells to detect the presence of foreign protein fragments that are bound to major histocompatibility complex molecules of the presenting cells (see Bongrand and Malissen 1998). Even a few molecular interactions between T lymphocyte receptors (TCRs) and cognate ligands can induce a lymphocyte response, including extensive contact formation with antigen presenting cells and triggering of significant processes such as target cell destruction (Grakoui *et al* 1999). The lymphocyte decision to initiate an immune response is based on a number of parameters, including quantitative properties of TCR–ligand association (van der Merwe and Davis 2003). The mechanisms responsible for signal generation as a consequence of TCR–ligand interaction remain incompletely understood (Smith-Garvin *et al* 2009). Therefore, comparing the immediate consequences of T lymphocyte interaction with activating and non-activating surfaces might provide an useful way of analysing information-gathering and decision-making. In the present paper, we present a quantitative description of the initial interaction between T lymphocytes and activating or control surfaces. Our results provides a basis for real-time analysis of data acquisition and decision-making by individual cells.

2. Model and methods

2.1. Cells

Peripheral blood from healthy volunteers was provided by the blood bank (EFS). Peripheral blood mononuclear cells were purified by centrifugation on a density barrier following standard techniques. These cells are known to include monocytes and different lymphocyte subpopulations. In order to avoid any undesirable activation, T lymphocytes were obtained by negative selection using magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec). It was checked with flow cytometry and CD3 labelling that more than about 85% of the remaining cells were T lymphocytes.

2.2. Surfaces

Glass coverslips were silanized and covalently coated with antibodies using glutaraldehyde chemistry, as previously described (Pierres *et al* 2008). Antibodies were either control IgG1 that were not expected to bind cells, anti-HLA (human leucocyte antigen) monoclonal antibodies (Beckman-Coulter-Immunotech, IgG1 isotype) that were expected to induce cell-substrate adhesion without activation, and anti-CD3 (UCH1, Beckman-Coulter-Immunotech, IgG1) that bound the T cell receptor/CD3 (TCR-CD3) complex on the lymphocyte membrane and were expected to trigger cell activation as well as adhesion.

Using the standard carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labelling technique (Gett and Hodgkin 2000), it was checked that T lymphocytes deposited on anti-HLA, not anti-CD3, displayed robust proliferation after a 3-day culture (not shown).

2.3. Microscopic monitoring of early cell–surface contacts

T lymphocytes were suspended (12.5×10^6 cells ml^{-1}) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 culture medium supplemented with 10% foetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 50 μM 2-mercaptoethanol, 50 U ml^{-1} penicillin and 50 U ml^{-1} streptomycin. Twenty microlitres of cell suspensions were deposited on antibody-coated coverslips on the stage of an Axiovert 135 inverted microscope (Zeiss, Germany) equipped with a heating stage set at 37 °C. Observation was performed with an antiflex™ objective and reflection interference contrast microscopy (RICM) filter block with 546 nm illumination, as previously described (Pierres *et al* 2008). Image acquisition was performed with a C4742-95-10 charged coupled device (CCD) camera (Hamamatsu, Japan). In each experiment, about 300 images were acquired with 1Hz frequency immediately after cell deposition. A single field was monitored, thus allowing us to record the immediate cell contact with the surface. A total of about 5000 images were used to record the initial contact of activating (anti-CD3-coated) surfaces with 13 individual cells and control (anti-HLA-coated) surfaces with 23 individual cells.

2.4. Image processing

The basis of our procedure was to use the zero aperture angle approximation to estimate the distance between cells and underlying surfaces (Curtis 1964, Simson *et al* 1998, Pierres *et al* 2003, 2008), yielding the following equation:

$$z = (\lambda/4\pi)\arccos[(2I - I_m - I_M)/(I_m - I_M)] \quad (1)$$

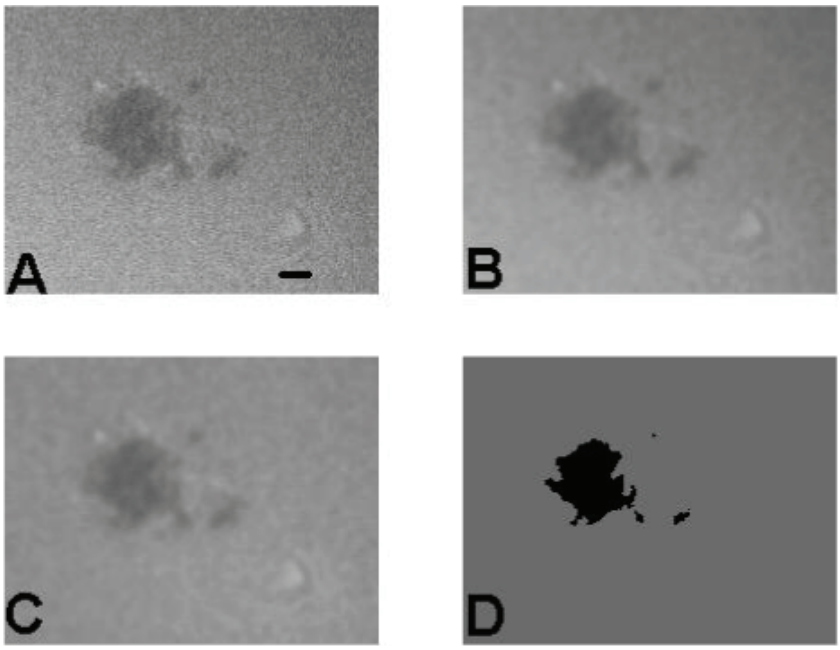


Figure 2. Image processing for contact determination. An image with a particularly high defect was selected to illustrate the requirement for basic corrections. (A) Due to the intrinsic noise of the camera, the coefficient of variation of individual pixel intensity is about 6%. In addition, illumination inhomogeneities result in a 15% coefficient of variation of average intensities between corners of the field. Performing spatial averaging (B) and linear correction for intensity variations (C) reduces the local pixel intensity variation to less than 1.5% and the overall spatial variation to less than 2%. Using equation (1) the region where the membrane-to-surface distance was estimated at less than 34 nm (Pierres *et al* 2003) was defined as the contact area and shown as a black area on (D). Bar = 2 μm.

where λ is the light wavelength in water (i.e. $546/1.33 = 410$ nm), I is the light intensity on a given pixel, and I_m and I_M are respectively the minimum and maximum intensity levels corresponding to $z = 0$ and $\lambda/4$. The interest of this formula is that it remains valid when intensities are subjected to affine transformation for contrast enhancement or when the illumination intensity fluctuates. As previously discussed (Pierres *et al* 2003, 2008), there is definite experimental support to the conclusion that this formula provides a semi-quantitative estimate of membrane-to-surface distance. In any case, it does not seem feasible to measure and even to define with nanometre accuracy the distance between a plane and a membrane studded with protrusions that may range between typically 10 and 100 nm length, which corresponds to individual molecules or membrane folds. Due to limited lateral resolution, interference microscopy is expected to yield a spatially averaged cell-to-substratum distance.

I_m and I_M were estimated by determining the ratio between the minimum or maximum and average illumination I_{av} on hundreds of images, yielding 0.77 and 1.18 for I_m/I_{av} and I_M/I_{av} respectively. A custom-made program was written to perform the following steps (figure 2).

(i) Intensity averaging was performed on 525×525 nm^2 areas to minimize camera noise.
(ii) a linear correction was performed to eliminate possible variations of illumination intensity in a box of typically 20×20 μm^2 surrounding a given cell.
(iii) The average illumination intensity was calculated in an empty area and corresponding parameters I_m and I_M were thus determined.
(iv) Equation (1) was thus used to calculate cell-to-surface separation.

Equation (1) was then used to convert microscopic images into distance maps, using coded colours to allow direct reading of cell-surface distance with nearly nanometre resolution. Sequential sequences of 8 images were then used to calculate the standard deviation of intensities at each pixel, yielding a quantitative estimate of local fluctuation amplitude. Data were used to yield fluctuation maps, as previously reported on cells (Pierres *et al* 2008) and lipid vesicles (Smith *et al* 2008).

3. Results

3.1. Quantitative analysis of contact extension

As shown on figure 3, in a typical experiment, cells were added during continuous monitoring of the microscope field and image recording with about 1 Hz frequency.

First, the evolution of the average cell–surface distance calculated on the whole cell area was studied, revealing three different kinds of behaviour as exemplified in figure 4.

- When cells were deposited on non-adhesive, IgG1-coated surfaces, they remained barely visible for minutes under the interference reflection microscopy (IRM)/RICM observation. They appeared as disks slightly brighter than empty areas. The distance calculated with equation (1) is shown in figure 4, this cannot be considered as reliable due to the ambiguity of distance calculation for values higher than about 60 nm.

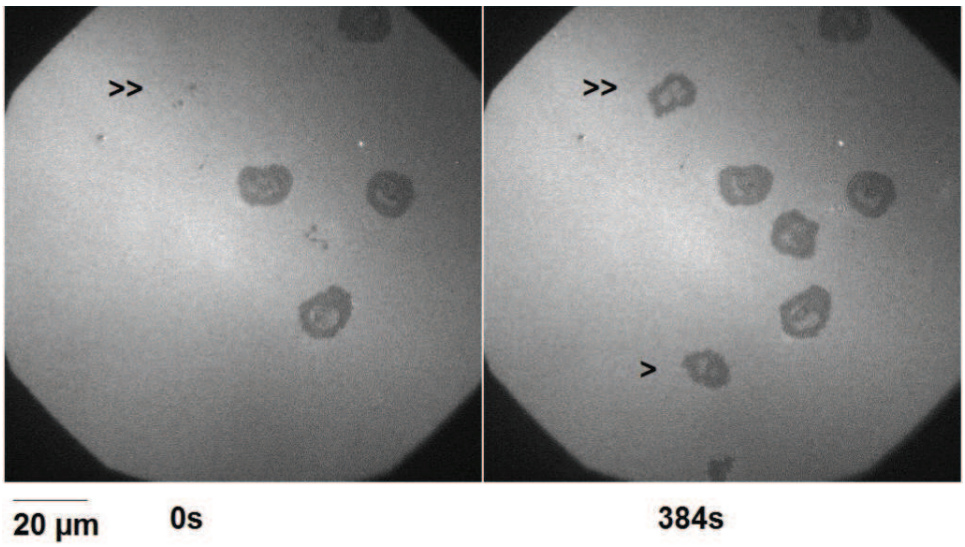


Figure 3. Real-time monitoring of contact formation between a cell and an adhesive surface. Human T lymphocytes were allowed to sediment on a surface coated with activating anti-CD3 monoclonal antibodies. During a period of 384 s, a cell was found to appear and spread on the surface (arrow). Another cell that had just sedimented at time zero (double arrow) also extensively spread during the observation period.

- When cells were deposited on adhesive non-activating surfaces (anti-HLA), contact was soon visible and the average cell–surface displayed a steady decrease after a lag on the order of 1 min.
- When cells were deposited on adhesive activating surfaces (anti-CD3), contact formation displayed a rapid increase after a lag of an order-of-magnitude duration comparable to that found on anti-HLA-coated surfaces. The lag duration displayed by individual cells varied between about 30 s and 2 min, and no significant difference could be demonstrated between the lag duration on activating and non-activating surfaces.

In order to obtain an objective definition of cell–surface contacts, the histograms of pixel brightness were determined on a series of sequential images. A typical example is shown in figure 5: during the first tens of seconds following contact, brightness histograms became bimodal, suggesting a natural intensity threshold for discrimination between free and surface-touching areas. Interestingly, the threshold of about 34 nm, that had been chosen in an earlier study made on monocyte attachment (Pierres *et al* 2003), was found to allow a fairly robust determination of contact areas, and the shape of the plots exemplified in figure 6 was only weakly dependent on the precise choice of the cutoff. Further, during the following minutes, the cell–surface distance exhibited a steady decrease, that was previously denominated as contact maturation (Pierres *et al* 2008).

Using this threshold to define contact, the kinetics of contact extension was calculated on 23 cells deposited on anti-HLA-coated surfaces and 13 cells deposited on anti-CD3-coated surfaces, yielding respectively 0.20 ± 0.04 (S.E.M.) $\mu m^2\,s^{-1}$ and 1.47 ± 0.27 (S.E.M) $\mu m^2\,s^{-1}$. Representative plots are shown in figure 6.

Thus, measuring contact extension kinetics appeared as a rapid and objective means of monitoring TCR-mediated lymphocyte activation.

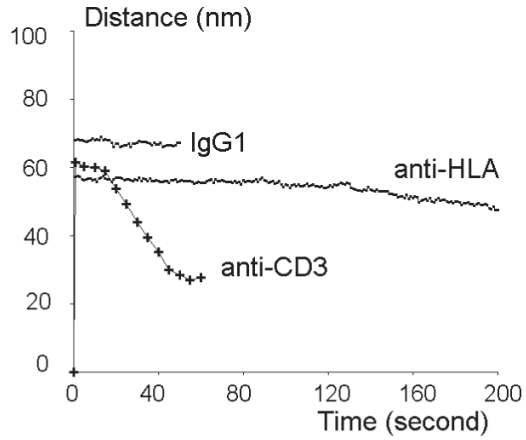


Figure 4. Kinetics of cell-to-surface interaction tightening after initial contact. The average distance between cells and surfaces was calculated with equation (1) after processing IRM/RICM images. While cell–surface distances remained higher than about 60 nm in the absence of ligand–receptor interaction (IgG1-coated surfaces), adhesive non-activating surfaces (anti-HLA) often induced a very slow decrease of distance. In contrast, anti-CD3 rapidly induced rapid contact extension. Note that time zero represents the onset of image acquisition, not cell–surface contact.

3.2. The onset of cell spreading is preceded by a formation of transient cell–surface contacts as a consequence of continual membrane undulations of nanometric amplitude

In order to obtain a better understanding of spreading initiation, a series of sequential images were processed for the determination of membrane-to-surface distance during several tens of minutes preceding and following spreading initiation. In order to convey a quantitative feeling of cell motility, the standard deviation of cell–surface distance was calculated at each pixel for a series of eight sequential values. Numerical data were displayed by building *distance maps* and *fluctuation*

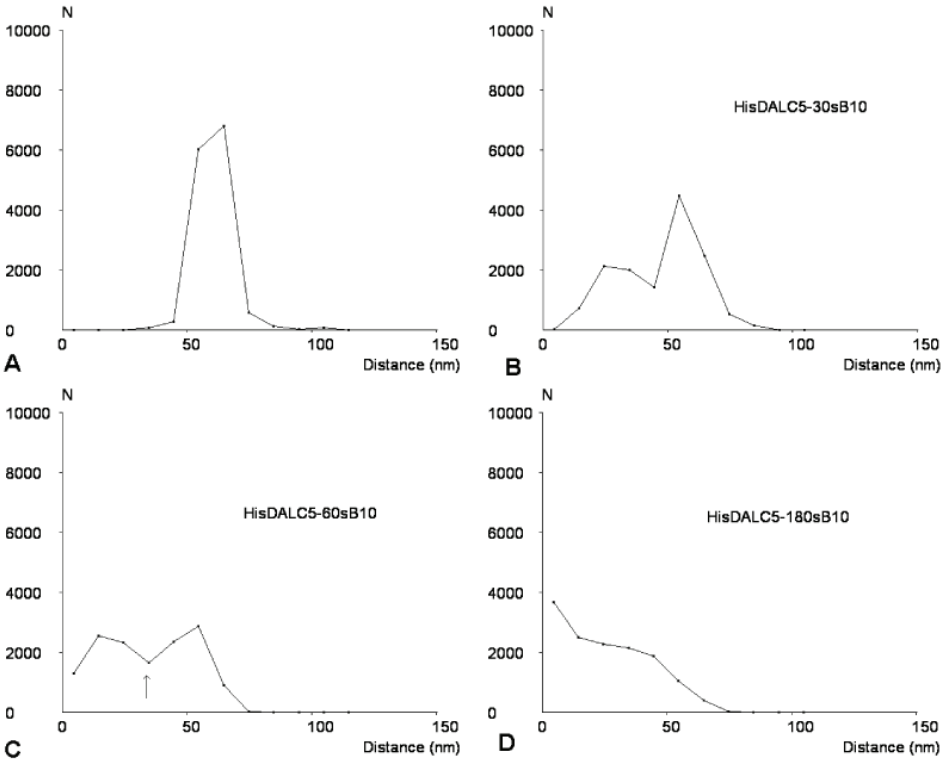


Figure 5. Contact tightening between cells and anti-CD3-coated surfaces. The histogram of average calculated distance between cells and anti-CD3-coated surfaces was calculated 30, 60 and 180 s after sedimentation. Contact first appeared as a region where the estimated cell–surface distance was lower than about 34 nm (arrow). During the following minutes, this distance displayed a steady decrease, which was defined as contact maturation.

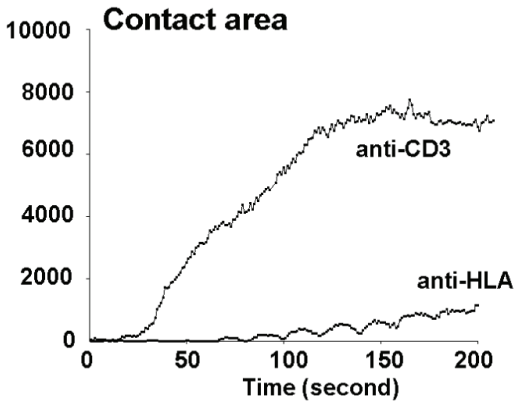


Figure 6. Spreading kinetics of T lymphocytes on activating and non-activating surfaces. Representative curves of contact extension between T lymphocytes and activating (anti-CD3) or adhesive non-activating (anti-HLA) surfaces are shown. Anti-CD3 antibodies induced rapid contact extension. Interestingly, the contact area observed between lymphocytes and anti-HLA-coated surfaces displayed slow fluctuations of about a 20 s period.

maps with coded colours. Typical images of cells falling on anti-HLA-coated (figure 7) and anti-CD3-coated (figure 8) surfaces are shown. The following conclusions were obtained:

- Cell arrival into contact with the substratum was revealed by a local increase of apparent fluctuation amplitude from about 3 nm (corresponding to background level) to 10–15 nm (figures 7(AK) and 8(AL)).
- During a lag period on the order of 1 min, cells displayed continual undulations of typically 4–6 nm amplitude with possibly transient increases to 15 nm or more (figures 7(AZ) and 8(AP)).
- These fluctuations provided a possible mechanism for the rapid formation and dissociation of transient membrane-to-surface contacts (figure 9).
- More experiments are needed to determine whether the duration of the lag period is dependent on the molecules exposed by surfaces encountered by cells.

3.3. Cell spreading involved concomitant lateral extension of contact areas and a decrease of membrane-to-surface distance

- After the lag period, the contact area started increasing quite abruptly (figures 7(BC)–(BD) and 8(AY)–(AZ)).
- While contact areas formed on anti-HLA-coated surfaces resembled fairly regular disks, contacts formed on activating anti-CD3-coated surfaces soon resembled rings with the formation of a central zone where the membrane-to-substrate distance began to increase (figures 8(BO)–(BP)).
- During the period of contact extension, vertical fluctuations of the membrane–substrate distance remained apparent. As exemplified in figure 10, a general trend was

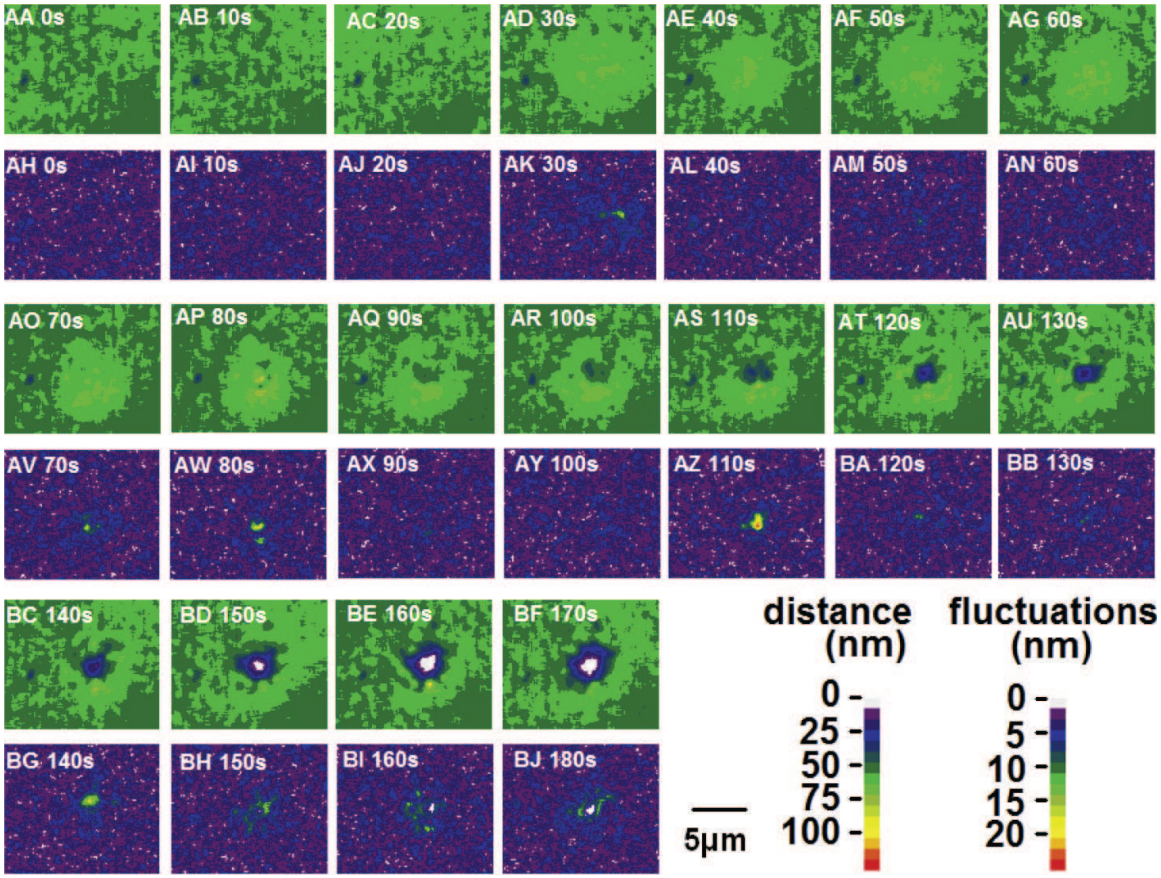


Figure 7. Spreading of a lymphocyte on a control surface. Quantification of average cell–surface distance (odd rows) and distance standard deviation (even rows) on series of sequential images reveals the cell arrival near the surface (AD/AK) and spreading initiation (AS/AZ).

that (i) the fluctuation amplitude increased when the cell–substratum distance decreased from about 50 to 10 nm and (ii) the fluctuation amplitude for membrane regions located at a given distance of the surface decreased during the first minutes following contact.

- During the first minutes following contact, the width of the gap formed between cell membranes and surface decreased by several tens of nanometres (figure 11). We compared the narrowing rate of contacts formed on control and activating surfaces by monitoring the average distance between surfaces and membrane areas that displayed 0 apparent distance at the end of each experiment. The time required for this average distance to decrease from 34 to 14 nm apparent distance was 48.2 ± 7.3 s S.E.M. ($n = 13$ cells) on activating surfaces and 75.9 ± 9.9 S.E.M ($n = 20$) on control surfaces. These results suggest that contact-narrowing was more rapid on activating surfaces.

- In order to convey an intuitive feeling for the mechanism of cell spreading, distance maps were used to build 3D drawings of the regions of the cell membrane interacting with surfaces. As shown in figure 12, results suggest that spreading involved both in-plane and perpendicular reorganization of cell membranes in contact areas.

4. Discussion

4.1. Suitability of our experimental model

The aim of our work was to describe a suitable model for understanding how a motile cell can analyse a surface it encounters and take appropriate decisions. Our strategy consisted of monitoring, as accurately as possible, the membrane deformations undergone by lymphocytes encountering control or activating surfaces. We expected to obtain two kinds of information. First, we wished to record cell–surface contacts in order to know which kind of information could be generated by the cell–surface interaction. Secondly, in view of previously reported data, the extensive membrane reorganization involved in contact extension and tightening might be considered as an early and readily detectable witness of the cell decision to undergo an activation process.

Our choice is supported by two well-accepted pieces of information. First, activating T lymphocytes with anti-CD3 antibodies is a recognized way of testing lymphocyte function in humans. Second, T lymphocytes have a need to be able to detect TCR ligands during a few minute contact with antigen presenting cells (Miller *et al* 2004), and adhesion tightening is a well known outcome of detection events, with subsequent extensive reorganization processes leading to the formation of the so-called immune synapse (Monks *et al* 1998, Grakoui *et al*

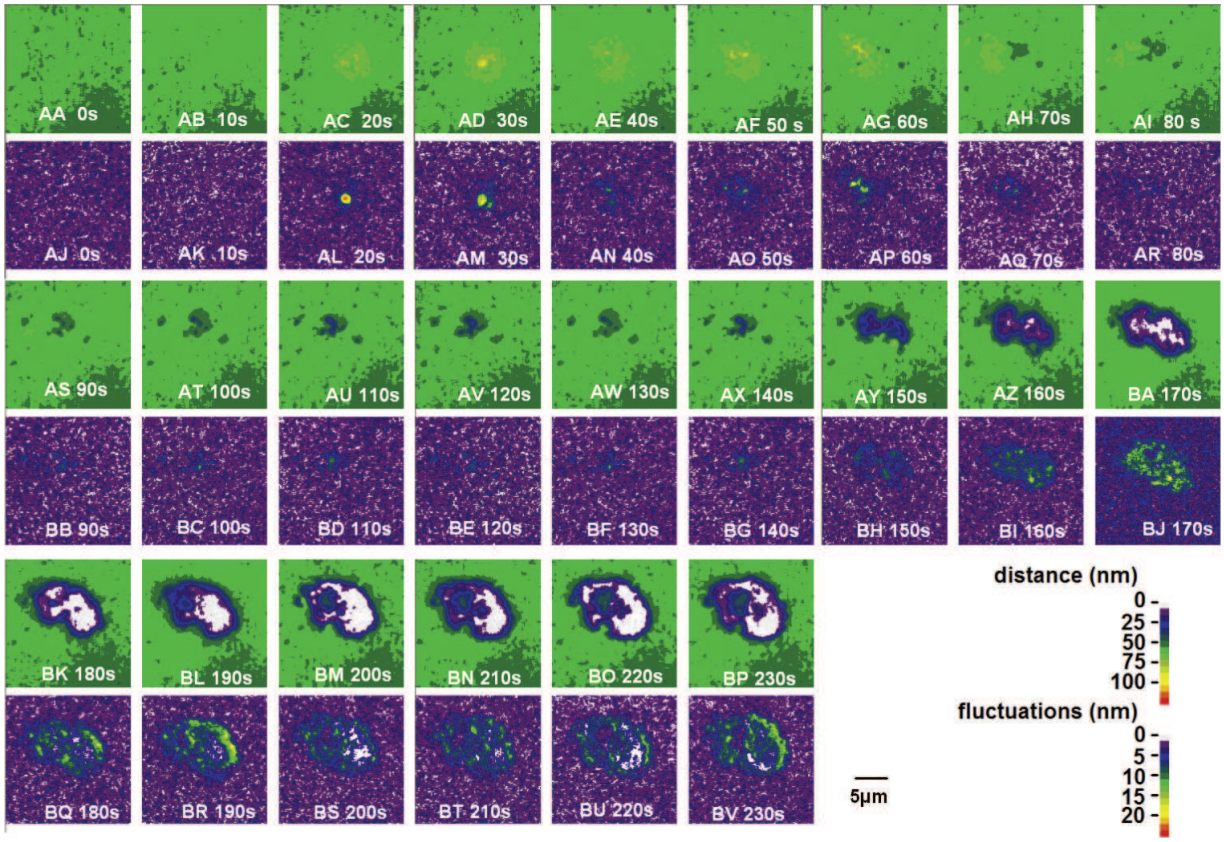


Figure 8. Lymphocyte spreading on an activating surface. The initial interaction between a lymphocyte and the anti-CD3-coated surface is shown.

1999). Therefore, both our cellular model and the measured parameters are relevant to important physiological processes.

4.2. First conclusions

The major conclusion of our study is that T lymphocytes touching an adhesive surface started spreading after a lag ranging between several tens of seconds and a few minutes. Further, the rate of lateral contact extension was between sevenfold and eightfold higher on activating (anti-CD3-coated) surfaces than on control surfaces that were not expected to trigger cell activation.

The second point is that in addition to lateral contact extension, the apparent distance between touching surfaces steadily decreased during several tens of seconds. This point may be significant in view of the reported functional significance of the width of the gap formed between immune cells and targets (McCann *et al* 2003). More work is required to confirm the finding that contact tightening was more rapid on activating than on control surfaces.

Now, it is warranted to examine some problems that will have to be considered in order to achieve a full understanding of the significance of the obtained data.

4.3. Interpretative issues

4.3.1. What is the significance of calculated cell-surface distances. While IRM/RICM has long been used to determine the distance between cell or vesicle membranes and surfaces, equation (1) cannot be expected to yield more than a semi-quantitative estimate of this distance (Pierres *et al* 2003, 2008). Indeed, while changes or absolute values of the distance between artificial bilayers and surfaces were estimated

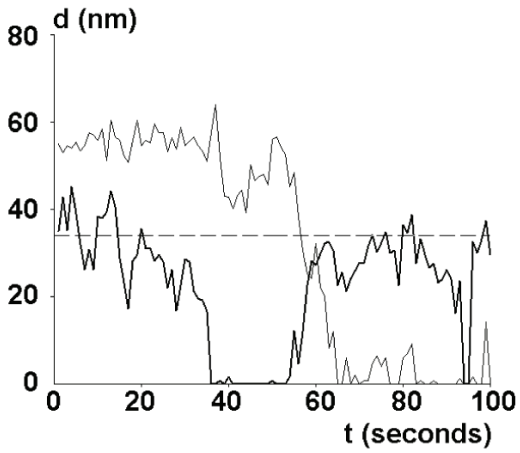


Figure 9. Membrane undulations may generate transient contacts with underlying surfaces. The thin and bold lines show the time-dependence of the distance between the (anti-CD3-coated) surface and two representative membrane areas of 0.14 μm^2. The horizontal broken line shows the threshold chosen for contact definition.

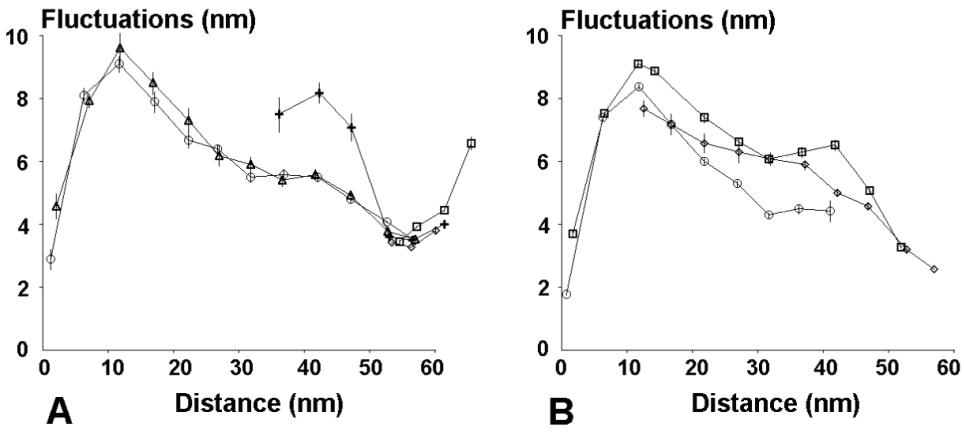


Figure 10. Variations of membrane undulations during contact formation. T lymphocytes were deposited on control anti-HLA-coated (A) or activating anti-CD3-coated (B) surfaces and the images of individual cells were monitored. During sequential periods of 7 s, the amplitude of membrane undulation was calculated and the relationship between the undulation amplitude and z coordinate was calculated. (A): time 1 s (diamonds), 30 s (squares), 110 s (crosses), 170 s (circles). (B): 1 s (diamonds), 40 s (squares), 340 s (circles). The vertical bar length is the standard error for the mean of all pixels with a comparable z coordinate.

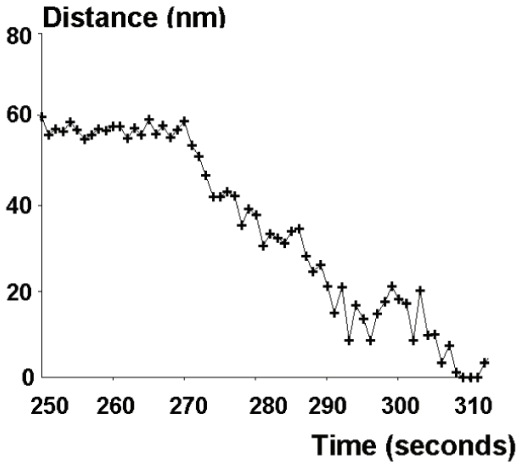


Figure 11. Decrease of membrane-to-surface distance in contact areas. A lymphocyte was deposited on an anti-CD3-coated surface and the average distance between the surface and a representative patch of 0.56 μm^2 was monitored during about 350 s. Results obtained during contact formation are shown.

to be measurable with respectively about 5 nm and 15 nm accuracy (Marx *et al* 2002), cell membranes are studded with molecules that may protrude above the bilayer by tens of nanometres: the sizes of T lymphocyte receptor, LFA-1 integrin, or the bulky CD43 molecules are about 8 nm, 20 nm and 40 nm respectively. Thus, our numerical estimates of membrane–substratum distance must be considered as relative estimates, including a notable spatial averaging. It is therefore clearly warranted to check our results with complementary methods such as total internal reflection fluorescence (TIRF; Gingell *et al* 1985), fluorescence resonance energy transfer or electron microscopy (Heath 1982). However, it must be pointed out that the conclusion that nonmuscle cells such as lymphocytes display nanometre-scale undulations is consistent with previously reported experiments made with dark field microscopy (Krol *et al* 1990) or atomic force microscopy (Pelling *et al* 2007). Therefore, while more work is required to assess the significance of our findings, it seems acceptable to conclude that lymphocyte membranes displayed nanometre-scale undulations in contact areas at the moment of initial contact and further spreading.

4.3.2. How can we detect and even define cell-surface contacts. While observations exemplified in figure 9 strongly suggest that cell membrane movements have the potential to initiate multiple contacts with neighbouring surfaces, it would be important to define these contacts and determine whether they have the capacity to generate intracellular signals. A possible means of detecting mechanical interactions between cells and surfaces would be to monitor the deformations of soft substrata underlying sedimented cells. Also, it would be attractive to monitor a number of fluorescence-based reporters of intracellular cascades (Wang *et al* 2005, Pertz *et al* 2006, Randriamampita *et al* 2008). Transient rises of intracellular calcium would be attractive candidates, since they were shown to be early markers of cell spreading (Kruskal *et al* 1986) or lymphocyte activation (Campi *et al* 2005). However, preliminary ratiometric determinations of calcium concentration with cells doubly labelled with Fluo-4 and Fura red did not reveal any conclusive correlation between calcium changes and immediate spreading initiation (not shown).

4.3.3. Are membrane undulations driven by active intercellular processes and are they influenced by ligand-coated surfaces independently of contact formation? While passive thermal processes might account for nanometre-amplitude undulations (Zidovska and Sackmann 2006), it is certainly warranted to further investigate the dependence of these movements on cell function. Indeed, in addition to the theoretical interest of this question, an attractive possibility would be that cell undulations might act as a reporter of surface detection by sedimenting cells. Thus, results displayed on figure 10 would be consistent with the hypothesis that the detection of a surface

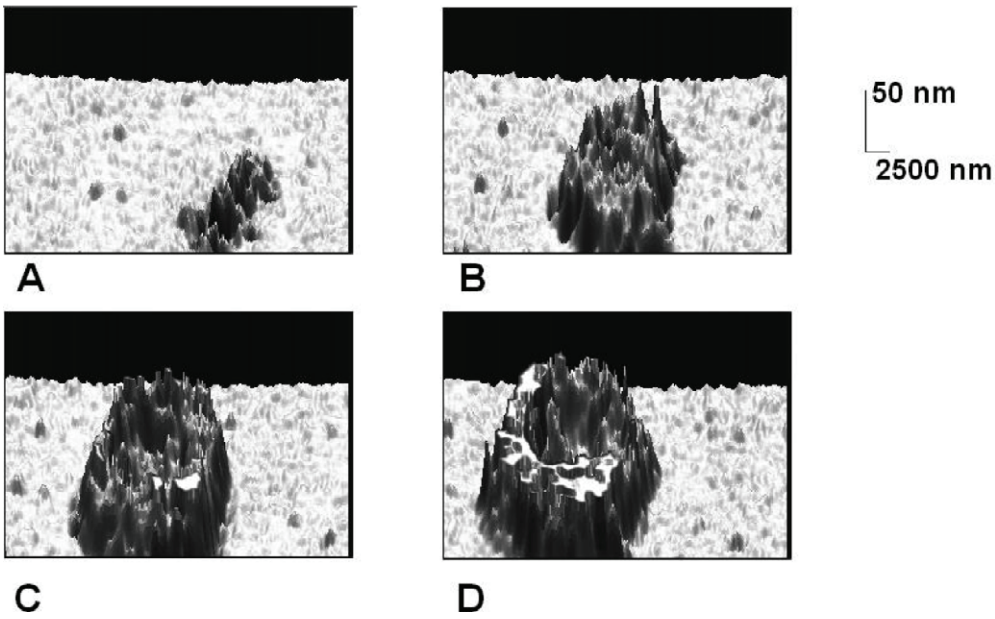


Figure 12. Membrane deformation during contact formation. Distance maps were used to build 3D images of the membrane region of a cell sedimented on an activating surface at times 1, 30, 60 and 180 s after the onset of the experiment. Different scales were used for coordinates x and y (parallel to the surface) and z (perpendicular to the surface).

at about 50 nm apparent distance by a cell might result in a change of undulation amplitude within a few tens of seconds before a tight contact occurred. A major difficulty is that it is, in principle, fairly difficult to discriminate between active and passive cell processes, since cell rheological parameters that are expected to strongly influence surface undulations are highly dependent on cell metabolism.

4.3.4. Is the spreading rate determined before the onset of spreading? An attractive interpretation of our results would be that cells might start spreading on the basis of information gathered during the nearly 1 min period of distant interaction following initial contact. This hypothesis might be tested by subjecting cells to rapid blockade or stimulation of a class of membrane receptors during the spreading phase and monitoring the effect of this treatment on the spreading rate. Indeed, it would be interesting to know the time required by cells to change their behaviour when the environment is altered. This information would be very useful to relate signalling phenomena to behavioural outcomes.

4.3.5. Is there a tight correlation between early spreading and later activation events. While experiments done at the population level clearly demonstrated that anti-CD3, not-anti-HLA, induced lymphocyte proliferation and rapid spreading, it would be informative to extend our study by monitoring, at the single cell level, the occurrence of spreading and activation markers such as CD69 or CD25 expression, interleukin 2 production and proliferation, as well as intracellular biochemical cascades when the intensity of stimulation is varied.

5. Conclusion

Here we provided a quantitative description of the shape changes displayed by T lymphocytes during the first minutes following contact formation with surfaces exposing two different ligands of their membrane molecules. We found that initial contact was followed by a lag period on the order of 1 min duration during which cell membrane undulations allowed the formation of transient molecular contacts with underlying surfaces. Then cells started extending molecular contact with a rate that was highly dependent on surface treatment. The morphology of contact areas was also markedly dependent on surface treatment. Since spreading is well recognized as a significant behavioural pattern, it is concluded that this experimental setup provides a strong basis for analysing cell information-gathering and decision-making. In addition, this might provide the basis for a rapid and innovative test of T lymphocyte function that might complement currently available ways of exploring the immune system.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer).

References

Abram C L and Lowell C A 2009 The ins and outs of leukocyte integrin signaling *Ann. Rev. Immunol.* **27** 339–62

Araki H, Katayama N, Yamashita Y, Mano H, Fujeda A, Usui E, Mitani H, Kohshi M, Nishii K, Masuya M, Minami N, Nobori T and Shiku H 2004 Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors *Blood* **103** 2373–80

Bongrand P and Malissen B 1998 Quantitative aspects of T-cell recognition: from within the antigen-presenting cell to within the T cell *Bioessays* **20** 412–22

Calvacanti-Adam E A, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B and Spatz J P 2007 Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands *Biophys. J.* **92** 2964–74

Campi G, Varma R and Dustin M L 2005 Actin and agonist MHC-peptide complex-dependend T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling *J. Exp. Med.* **202** 1031–6

Chamaraux F, Fache S, Bruckert F and Fourcade B 2005 Kinetics of cell spreading *Phys. Rev. Lett.* **94** 158102

Chen S C, Mrksich M, Huang S, Whiteside G M and Ingber D E 1997 Geometric control of cell life and death *Science* **276** 1425–8

Clark P, Connolly P, Curtis A S G, Dow J A T and Wilkinson C D W 1990 Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata *Development* **108** 635–44

Curtis A S G 1964 The mechanism of adhesion of cells to glass *J. Cell Biol.* **20** 199–215

Cuvelier D, Théry M, Chu Y-S, Dufour S, Thiéry J P, Bornens M, Nassoy P and Mahadevan L 2007 The universal dynamics of cell spreading *Curr. Biol.* **17** 694–9

Dalby M J, Yarwood S J, Riehle M O, Johnstone H J, Affrossman S and Curtis A S 2002 Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13 nm-high polymer demixed islands *Exp. Cell Res.* **276** 1–9

Engler A J, Sen S, Sweeney H L and Discher D E 2006 Matrix elasticity directs stem cell lineage specification *Cell* **126** 677–89

Evans E 1989 Kinetics of granulocyte phagocytosis: rate limited by cytoplasmic viscosity and constrained by cell size *Cell Motil. Cytoskeleton* **14** 544–51

Féréol S, Fodil R, Labat B, Galiacy S, Laurent V M, Louis B, Isabey D and Planus E 2006 Sensitivity of alveolar macrophages to substrate mechanical and adhesive properties *Cell Motil. Cytoskeleton* **63** 321–40

Gett A V and Hodgkin P D 2000 A cellular calculus for signal integration by T cells *Nat. Immunol.* **1** 239–44

Gingell D, Todd I and Bailey J 1985 Topography of cell-glass apposition revealed by total internal reflection fluorescence of volume markers *J. Cell Biol.* **100** 1334–8

Grakoui A, Bromley S K, Sumen C, Davis M M, Shaw A S, Allen P M and Dustin M L 1999 The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation *Science* **285** 221–7

Gurdon J B and Melton D A 2008 Nuclear reprogramming in cells *Science* **322** 1811–5

Harris A K, Wild P and Stopak D 1980 Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion *Science* **208** 177–9

Heath J P 1982 Adhesions to substratum and locomotory behaviour of fibroblastic and epithelial cells in culture *Cell Behaviour* ed R Bellairs, A Curtis and G Dunn (Cambridge: Cambridge University Press) pp 108–77

Kaplan G and Gaudernack G 1982 *In vitro* differentiation of human monocytes. Differences in monocyte phenotypes induced by cultivation on glass or on collagen *J. Exp. Med.* **156** 1101–14

Krol A Y, Grinfeldt M G, Levin S V and Smilgavichus A D 1990 Local mechanical oscillations of the cell surface within the range 0.2–30 Hz *Eur. Biophys. J.* **19** 93–9

Kruskal B A, Shak S and Maxfield R F 1986 Spreading of human neutrophils is immediately preceded by a large increase in cytoplasmic free calcium *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83** 2919–23

Lo C M, Wang H B, Dembo M and Wang Y L 2000 Cell movement is guided by the rigidity of the substrate *Biophys. J.* **79** 144–52

Maheshwari G, Brown G, Lauffenburger D, Wells A and Griffith L G 2000 Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering *J. Cell Sci.* **113** 1677–86

Marx S, Schilling J, Sackmann E and Bruinsma R 2002 Helfrich repulsion and dynamical phase separation of multicomponent bilayers *Phys. Rev. Lett.* **88** 138102

Massia S P and Hubbell J A 1991 An RGD spacing of 440 nm is sufficent for integrin alpha v beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J. Cell Biol.* **114** 1089–100

McCann F E, Vanherberghen B, Eleme K, Carlin L M, Newsam R J, Goulding D and Davis D M 2003 The size of the synaptic cleft and distinct distributions of filamentous actin, ezrin, CD43, and CD45 at activating and inhibitory human NK cell immune synapses *J. Immunol.* **170** 2862–70

Mége J L, Capo C, Benoliel A M, Foa C, Galindo R and Bongrand P 1986 Quantification of cell surface roughness: a method for studying cell mechanical and adhesive properties *J. Theoretical Biol.* **119** 147–60

Meyers J, Craig J and Odde D J 2006 Potential for control of signaling pathways wia cell size and shape *Curr. Biol.* **16** 1685–93

Miller M J, Hejazi A S, Wei S H, Cahalan M D and Parker I 2004 T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101** 998–1003

Monks C R F, Freiberg B A, Kupfer H, Sciaky N and Kupfer A 1998 Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells *Nature* **395** 82–6

Neves S R, Tsokas P, Sarkar A, Grace E A, Rangamani P, Taubenfeld S M, Alberini C M, Schaff J C, Blitzer R D, Moraru I I and Iyengar R 2008 Cell shape and negative links in regulatory motives together control spatial information flow in signaling networks *Cell* **133** 666–80

Pelling A E, Veraitch F S, Chu C P K, Nicholls B M, Hemsley A L, Mason C and Horton M A 2007 Mapping correlated membrane pulsations and fluctuations in human cells *J. Mol. Recognit.* **20** 467–75

Pertz O, Hodgson L, Klemke R L and Hahn K M 2006 Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells *Nature* **440** 1069–72

Pierres A, Benoliel A M and Bongrand P 2002 Cell fitting to adhesive surfaces: a prerequisite to firm attachment and subsequent events *Eur. Cell Mater.* **3** 31–45

Pierres A, Benoliel A M, Touchard D and Bongrand P 2008 How cells tiptoe on adhesive surfaces before sticking *Biophys. J.* **94** 4114–22

Pierres A, Eymeric P, Baloche E, Touchard D, Benoliel A M and Bongrand P 2003 Cell membrane alignment along adhesive surfaces: active or passive mechanism? *Biophys. J.* **84** 2058–70

Pierres A, Monnet-Corti V, Benoliel A M and Bongrand P 2009 Do membrane undulations help cells probe the world? *Trends Cell Biol.* **19** 428–32

Pierres A, Tissot O, Malissen B and Bongrand P 1994 Dynamic adhesion of CD8-positive cells to antibody-coated surfaces the initial step is independent of microfilaments and intracellular domains of cell-binding molecules *J. Cell Biol.* **125** 945–53

Randriamampita C, Mouchacca P, Malissen B, Marguet D, Trautmann A and Coffman-Lellouch A 2008 A novel ZAP-70 dependent FRET based biosensor reveals kinase activity at both the immunological synapse and the antisynapse *PLoS ONE* **3** e1521

Rich A and Harris A K 1981 Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata *J. Cell Sci.* **50** 1–7

Runyan R B, Versakovic J and Shur B D 1988 Functionally distinct laminin receptors mediate cell adhesion and spreading: the requirement for surface galactosyltransferase in cell spreading *J. Cell Biol.* **107** 1863–71

Simson R, Wallraff E, Faix J, Niewöhner J, Gerish G and Sackmann E 1998 Membrane bending modulus and adhesion energy of wild-type and mutant cells of dictyostelium lacking talin or cortexillins *Biophys. J.* **74** 514–22

Smith A-N, Sengupta K, Goennenwein S, Seifert U and Sackmann E 2008 Force-induced growth of adhesion domains is controlled by receptor mobility *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105** 6906–11

Smith-Garvin J E, Koretzky G A and Jordan M S 2009 T cell activation *Ann. Rev. Immunol.* **27** 591–619

van der Merwe P A and Davis S J 2003 Molecular interactions mediating T cell antigen recognition *Annu. Rev. Immunol.* **21** 659–84

Wang Y, Botvinick E L, Zhao Y, Berns M W, Usami S, Tsien R Y and Chien S 2005 Visualizing the mechanical activation of Src *Nature* **434** 1040–5

Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song L-S and Cheng H 2009 Calcium flickers steer cell migration *Nature* **457** 901–4

Wocjiak-Stothard B, Curtis A, Monaghan W, MacDonald K and Wilkinson C 1996 Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography *Exp. Cell Res.* **223** 426–35

Yeung T, Georges P C, Flanagan L A, Marg B, Ortiz M, Funaki M, Zahir N, Ming W, Weaver V and Janmey P A 2005 Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure and adhesion *Cell Motil. Cytoskeleton* **60** 24–34

Zidovska A and Sackmann E 2006 Brownian motion of nucleated cell envelopes impedes adhesion *Phys. Rev. Lett.* **96** 048103

Zigmond S H 1977 Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors *J. Cell Biol.* **75** 606–16

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Author's personal copy

Journal of Immunological Methods 364 (2011) 33–39

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim

Research paper

A new method for rapid detection of T lymphocyte decision to proliferate after encountering activating surfaces

Elodie Cretel [a,b,c,1], Dominique Touchard [a,b,d,1], Pierre Bongrand [a,b,c,d,*,1], Anne Pierres [a,b,d,1]

[a] INSERM UMR 600, Lab Adhésion et Inflammation, Parc Scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09, France
[b] CNRS UMR 6212, Lab Adhésion et Inflammation, France
[c] Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, France
[d] Université de la Mediterranée, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 May 2010
Received in revised form 16 September 2010
Accepted 19 October 2010
Available online 29 October 2010

Keywords:
Interference reflection microscopy
T lymphocyte activation
CFSE
T cell receptor complex stimulation
Spreading

ABSTRACT

A critical step of the adaptive response is the detection of foreign peptides on antigen presenting cells by T lymphocytes. It is a major challenge for a T lymphocyte to detect the presence of a few tens of cognate ligands or less on the membrane of a cell exposing millions of protein molecules. Detection is followed by the cell decision to undergo full or partial activation or even to start an inhibitory program. While the measurement of cell proliferation or cytokine synthesis is accepted as a reliable means of monitoring T lymphocyte activation, this requires hours or days to complete, which is a significant drawback to relate decision to particular signaling events or to assess lymphocyte reactivity in patients. Here we show that the contact area formed between T lymphocytes and potentially activating surfaces is exquisitely correlated to the proliferative response measured with the standard CFSE technique. Correlation is even better than the Erk activation that was reported as a digital reporter of cell activation. The simple and accurate method of assessing lymphocyte-to-surface contact extension that we describe might be very useful both to monitor lymphocyte reactivity for clinical purposes and to identify early steps of lymphocyte activation.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A critical step of the adaptive immune response is the T lymphocyte decision to initiate an activation program after encountering and scanning an antigen presenting cell. Lymphocyte proliferation is commonly accepted as a reliable reporter of complete activation. Accordingly, proliferation tests are currently performed both for theoretical purpose, in order to analyze the basis of lymphocyte choice of developing an immune response (Gett and Hodgkin, 2000), and for medical practice, to monitor the immune status of patients (Brandes et al., 2009; Ohdan, 2010). A major drawback of gold standards such as measurement of lymphocyte proliferation or interleukin 2 production is that they require at least several hours and often several days to be completed. This is an inconvenience when rapid diagnosis is desirable. Also, on the theoretical side, the complexity of signaling networks makes it nearly impossible to correlate early signals to delayed responses. Therefore, a simple method allowing early and reliable detection of lymphocyte entry into an activation program would be of enormous interest.

During the last decade, the initial steps of T lymphocyte encounter with antigen presenting cells were subjected to considerable scrutiny. While extensive topological

Abbreviations: CFSE, Carboxyfluorescein succinimidyl ester;Erk, extracellular signal-regulated kinase;FCS, fetal calf serum;IRM, interference reflection microscopy;mAb, monoclonal antibody;PBMC, peripheral blood mononuclear cells;PHA, phytohaemagglutinin;PWM, pokeweed mitogen; RICM, reflection interference contrast microscopy;RPMI, Roswell Park Memorial Institute;TCR, T cell receptor.

* Corresponding author. Lab Adhesion et Inflammation, Parc Scientifique de Luminy, 163 Avenue de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09, France. Tel.: +33 491 82 88 52; fax: +33 491 82 88 51.
E-mail address: pierre.bongrand@inserm.fr (P. Bongrand).
[1] http://www.lai.sciences.univmed.fr.

0022-1759/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jim.2010.10.007

Author's personal copy

remodeling of the cell membrane in contact areas results in the formation of the so-called immune synapse within a few tens of minutes (Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999), important events such as T cell receptor clustering, kinase recruitment (Richie et al., 2002) or rise of intracellular calcium concentration (Irvine et al., 2002; Campi et al., 2005) occur within seconds or tens of seconds after contact initiation and they are attractive candidates as early reporters of lymphocyte activation. However, while a single molecular contact may suffice to trigger a transient cell response such as calcium rise (Irvine et al., 2002), it is likely that several signals must be integrated for initiation of the activation program (Valitutti et al., 1995). It is therefore important to determine which early consequence of T lymphocyte to APC encounter is an appropriate reporter of definitive activation. As otherwise stated (Locasale, 2007), it would be useful to identify a bistable switch in the T cell signaling network, the triggering of which would allow completion of the activation program without any further stimulation. A possible candidate might be Erk phosphorylation which was shown to behave as an all-or-none consequence of T cell activation (Altan-Bonnet and Germain, 2005), but this possibility has not been fully explored.

An early event related to the triggering of the immune response is the T lymphocyte decision to prolong contact with an antigen presenting cell it has just encountered instead of moving to another cell. Therefore, the extent of molecular contact between a T cell and an activating surface might provide a suitable read-out of cell activation. Interestingly, this contact may be subjected to real-time monitoring on label-free cells with interference reflection microscopy (IRM) also denominated as reflection interference contrast microscopy (RICM). This optical method is easily performed with commercially available fluorescence microscopes. The distance between cells and planar surfaces may be semi-quantitatively estimated with a few nanometer accuracy. This was first used to image adhesion by Curtis (1964). It allowed clear identification of close contacts and focal contacts (Izzard and Lochner, 1976). It was later used for quantitative assessment of the dynamics of monocyte membranes with nearly nanometer and second resolution during early contact with adherent surfaces (Zidovska and Sackmann, 2006; Pierres et al., 2008). IRM was also used in a qualitative way to monitor T lymphocyte interaction with activating surfaces (Dustin et al., 1996; Bunnell et al., 2002).

Here, we describe an accurate procedure for IRM-based analysis and we apply this to the quantitative monitoring of the kinetics of contact formation between T lymphocytes and activating (anti-CD3-coated) or control (anti-HLA-A,B,C-coated) surfaces. Activating (anti-CD3) antibodies triggered a dramatic increase of the kinetics and extent of contact formation. Further, experiments done with serial dilution of anti-CD3 antibodies revealed a striking correlation between contact areas measured after 15 minute incubation and cell proliferation measured 3 days later. Monitoring Erk-1 phosphorylation with immunofluorescence showed that i) phosphorylation is triggered by cell contact with immobilized anti-CD3, not anti-HLA, as expected. ii) Dose–response curves show that these phosphorylation events were less predictive of subsequent proliferation than rapid contact extension.

It is concluded that quantitative determination of the interaction area of lymphocytes and adhesive surfaces after 15 minute contact provides a simple way of assessing the cell decision to initiate an activation program. Since measurements can be performed both at the single cell and population level, it is concluded that this method provides a rapid and unexpensive way of quantifying lymphocyte activation and this should be useful for both fundamental and clinically oriented studies.

2. Materials and methods

2.1. Blood donors and lymphocyte separation

Blood from healthy volunteers was provided by the French blood bank. In addition, a few tests were performed with samples for patients examined for T lymphocyte activity. The protocol was approved by AP-HM who accepted to promote a clinical trial to assess the significance of our method. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified by centrifugation on a density gradient solution (Lymphocyte Separation Medium, Eurobio, Les Ulis, France) following standard techniques. In order to avoid cell activation, T lymphocytes were isolated by negative selection using magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec France, Paris). In some cases, PBMC were magnetically labeled with HLA-DR microbeads and separated on a column placed in a magnetic field. The unlabeled cells were more than 88% positive for CD3. In other cases, non-T cells were indirectly labeled with a cocktail of biotin-conjugated monoclonal antibodies and anti-biotin microbeads as a secondary reagent (Pan T cell isolation kit II, Miltenyi Biotec). Recovered cells were 98% positive for CD3.

2.2. CFSE staining and cell culture

Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) and stored frozen as a 10 mM stock solution until used. A pellet of 5×10^6 cells was resuspended in 200 µl of 1 µM CFSE labeling solution in RPMI 1640 medium (Gibco-Invitrogen), 2% FCS (Gibco), and incubated 10 min at 37 °C in the dark. After incubation, 1 ml of cold FCS was added to the sample which was then transferred on ice for 5 min. Cells were washed three times and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gibco). Cells stained with CFSE were analyzed after 72 h of culture on an EPICS flow cytometer (Beckman Coulter).

2.3. Lymphocyte proliferation assay

Stained PBMC (2×10^5/well, 200 µl) were cultured in 96-well flat bottom plates (Falcon, Becton Dickinson France, Pont de Claix) with either medium alone, 2 µg/ml phytohemagglutinin A (PHA, Sigma Aldrich, Germany), pokeweed mitogen (PWM, Sigma) or 10 µg/ml anti-CD3 (Beckman Coulter). Stained purified T cells (10^5/well, 200 µl) were cultured in 96-well flat bottom plates precoated with monoclonal antibodies (mAbs) as follows: wells were incubated with 10 µg/ml anti-CD3, anti-HLA-ABC, control

Author's personal copy

IgG1 or serial dilutions of anti-CD3 in IgG1 (all from Beckman Coulter) overnight at 4 °C and washed before adding the cells. Each condition was done in triplicate. All cultures were incubated at 37 °C in a 5% CO_2 incubator for 72 h.

After 3 days, each well was harvested and analyzed separately with an EPICS flow cytometer. Propidium iodide was used to label dead cells. From each sample a minimum of 5000 events was collected.

2.4. Surfaces

Glass coverslips were dipped in sulphuric acid (Sigma) for 4 h, rinsed under running water, then distilled water and dried. They were then treated with (3-aminopropyl) triethoxysilane (Sigma-Aldrich) for 4 min on ice, washed in phosphate buffered saline (PBS) and incubated with 1% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature. They were rinsed with PBS and coated with 10 μg/ml monoclonal anti-CD3, HLA-ABC, or IgG1 control (all from Beckman Coulter) for 2 h at room temperature. Blocking was done by incubation in 0.1 M ethanolamine at pH 7.8 for 30 min before adding the cells.

2.5. Microscopic monitoring of contacts

Purified T cells (2.5×10^5) were deposited on mAb-coated coverslips on the stage of an Axiovert 135 inverted microscope (Zeiss, Germany) equipped with a heating stage set at 37 °C. Observation was performed with a 63× antiflex™ objective and reflection interference contrast microscopy (RICM) filter block supplemented with a H546 band pass excitation filter. Images were obtained with an Orca C4742-95-10 camera (Hamamatsu, Japan). Pixel size was 125×125 nm^2. Contact determination and quantification was performed with a custom-made software for rapid completion of the following steps (Pierres et al., 2003, 2008): *i*) average filtering was performed on 5×5 pixel^2 areas for noise reduction. *ii*) A linear correction was performed on 25×25 μm^2 areas surrounding individual cells to compensate for variations of background intensity. *iii*) The average illumination intensity was determined on a cell-free region. *iv*) The contact area was then defined as the region where the light intensity was less than 0.87 times the average intensity. Using the low incidence approximation (Pierres et al., 2003), the corresponding threshold for membrane/substratum separation distance was estimated at about 34 nm, which was deemed reasonable on the basis of the size of typical adhesion molecules and examination of the histograms of hundreds of cell images (Pierres et al., 2003, 2008).

2.6. Intracellular staining

Cells were allowed to settle for different periods of time at 37 °C. Then adherent cells were rinsed in PBS and fixed with ice-cold 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich), 1 mM glucose solution in PBS for 20 min at 4 °C. After extensive washing with PBS, cells were permeabilized with ice-cold methanol for 10 min at −20 °C. Samples were then washed and blocked with 5% normal rabbit serum (Jackson Immunoresearch Europe, New Market, UK), 0.3% triton X-100 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) in PBS for 60 min at room temperature. After blocking-buffer removal, anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Boston MA) was applied in PBS, 1% BSA (Sigma), 0.3% triton X-100 overnight at 4 °C. After three washes in PBS, samples were incubated with Alexa Fluor 488 $(F_{ab}')_2$ fragment of goat anti-rabbit IgG (H + L) in PBS, 1% BSA, 0.3% triton X-100 for 2 h at room temperature in the dark. Samples were washed and examined with an Axiovert 200 M inverted microscope (Zeiss) and images collected by a cooled tri-CCD C7780 camera (Hamamatsu, Japan) using Aquacosmos software. Fluorescence analysis was done with Image J. Visible images were used to delineate cell boundaries and mean fluorescence was calculated (with proper background subtraction) on about 100 cells per studied condition.

3. Results and discussion

A standard way of assessing T lymphocyte activity consists of stimulating them with anti-CD3 antibodies and quantifying cell proliferation a few days later (Gett and Hodgkin, 2000). As expected, when CFSE-labeled T lymphocytes were deposited on surfaces coated with anti-CD3 and assayed 3 days later with flow cytometry, 79.8% ± 2.3% of recovered cells had undergone at least one division (mean ± standard error, 13 separate experiments). Comparable stimulation was obtained with phytohaemagglutinin (69.1% ± 0.24%), whereas no stimulation was detected when cells were deposited on IgG1-coated surfaces (1.4% ± 0.15%) or even anti-HLA-coated surfaces (2.1% ± 0.24%). As shown on Fig. 1, cell proliferation displayed monotonous decrease when the amount of anti-CD3 antibodies was subjected to sequential dilution.

In order to monitor the earliest steps of cell stimulation, we deposited T lymphocytes on surfaces coated with anti-CD3 or control antibodies under continuous microscopic observation. As exemplified in Fig. 2, IRM revealed the rapid growth of a region of close molecular apposition between cell membranes and substrata during the first tens of seconds following initial contact. Quantitative information was

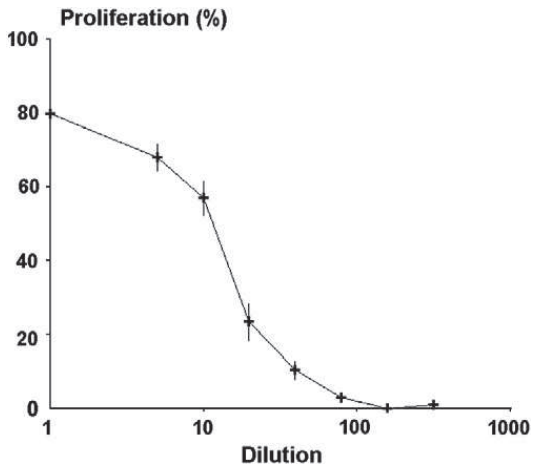


Fig. 1. T lymphocyte activation with anti-CD3. Human T lymphocytes were deposited on surfaces derivatized with various amounts of anti-CD3 antibodies. The fraction of cells having undergone at least one division (mean of 13 experiments ± standard error of the mean) was plotted versus dilution of anti-CD3 coating solution.

Author's personal copy

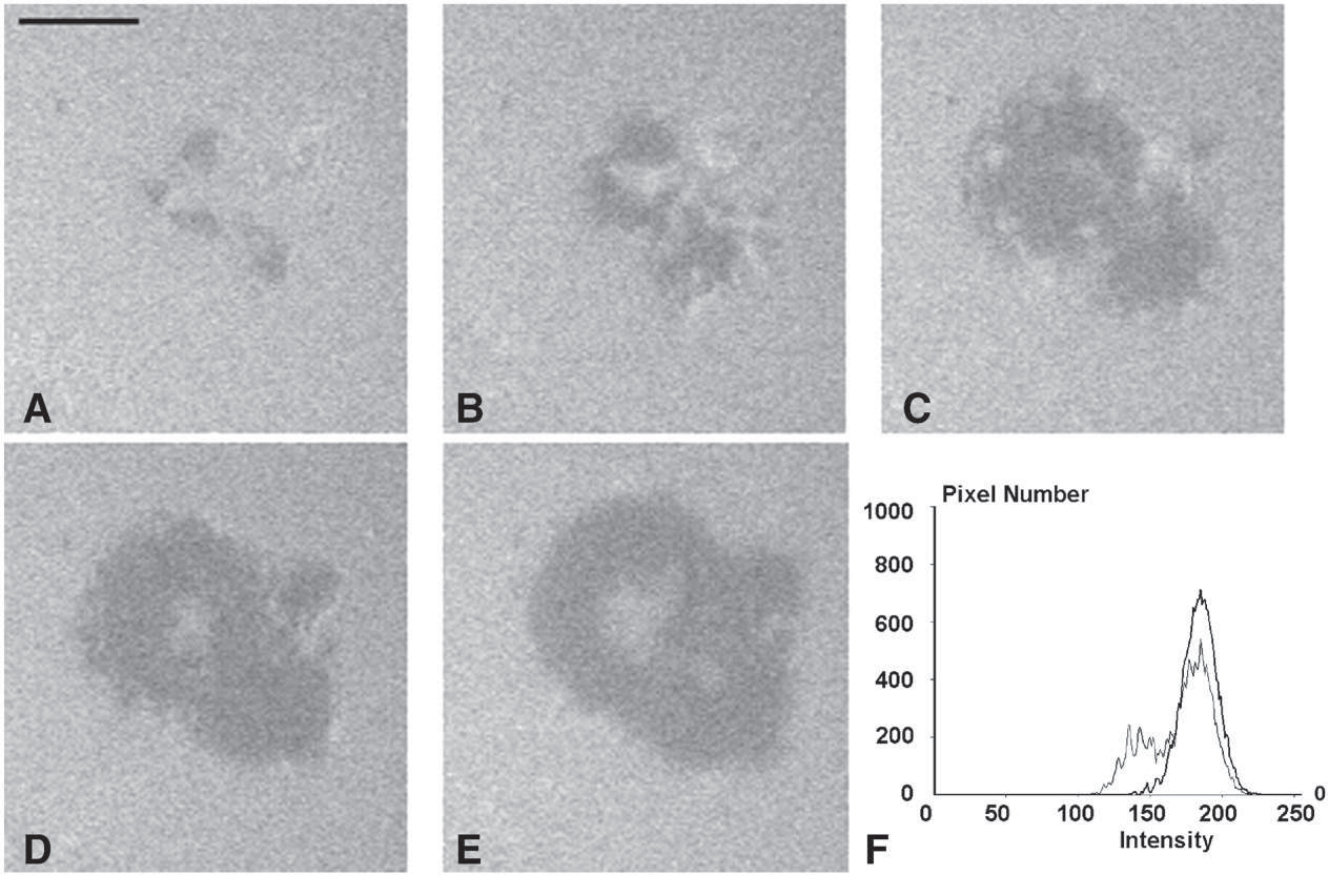


Fig. 2. Contact formation between T lymphocytes and anti-CD3-coated surfaces. T lymphocytes were deposited on anti-CD3-coated surfaces and observed microscopically with IRM/RICM. Images obtained about 1 min after sedimentation (Fig. 2A), and 25 s, 50 s, 75 s and 125 s later (B–E) are shown. Bar is 5 μm. The histograms of images A (thick line) and E (thin line) are shown in F. These histograms account for the whole rectangular regions shown in images A and B. The bimodal shape of the E histogram supports the feasibility of defining contact zones.

obtained by monitoring tens of individual cells: As shown on a representative example (Fig. 3A), lymphocytes deposited on surfaces coated with either anti-HLA or anti-CD3 started forming visible contacts after a lag of about 1 min. A contact area of several hundreds of μm^2 was formed with anti-CD3-coated surfaces within a few tens of seconds. In contrast, contact areas formed with anti-HLA-coated surfaces grew much more sluggishly during several minutes. Thus, cells readily discriminated activating from non-activating surfaces.

While the maximal rate of contact growth displayed dramatic differences between individual cells deposited on different surfaces, this parameter could not be robustly determined in routine studies. Therefore, we quantified the kinetics of contact increase on cell populations by recording a number of microscope fields after different periods of time following cell deposition on antibody-coated surfaces. As shown in Fig. 3B, average contact areas reached a stable plateau about 15 min following deposition, and the plateau value measured on anti-CD3-coated surfaces was about twofold higher than that found on anti-HLA. In contrast, no detectable contact was visible when surfaces were coated with control IgG1 antibodies. Since the average plateau contact area could be measured very easily without any cell labeling, it was interesting to determine whether this might act as a suitable reporter of cell activation. As shown in Fig. 4, the dependence on anti-CD3 dilution of the contact area measured 15 min after cell deposition strongly resembled that observed on proliferation (Fig. 1). As shown in Fig. 5, an excellent correlation was found between proliferation and mean contact (Pearson correlation coefficient was 0.94).

It was important to know whether the correlation between cell spreading and proliferation could be observed in situations of clinical interest. In view of the current importance of age-related immune defects (Cretel et al., 2010), we started studying T lymphocyte activation in elderly patients. In a preliminary study, ten aged patients that did not suffer any specific trouble were assayed for anti-CD3-stimulated T lymphocyte proliferation and spreading. Interestingly, while substantial proliferation and spreading were observed in all cases when undiluted anti-CD3 was used for stimulation, a single patient displayed a drastic decrease of proliferation induced by 1/10 and 1/20 anti-CD3 dilution with less than 1% of cells having proliferated as compared to mean values of 21% and 13% for all patients. Remarkably, the cells from the same patient displayed the lowest spreading activity (with average contact areas of 20 μm^2 and 0 μm^2 respectively on surfaces coated with 1/10 and 1/20 CD3, as compared to 52 and 18 μm^2 respectively for all patients). While a clinical trial has been initiated to obtain more significant information and determine normal ranges, these data support the hypothesis that our technique may provide a simple way of detecting decrease of T lymphocyte activity in risk populations.

Another important point is to know whether this method may be of practical interest and does not require any

Author's personal copy

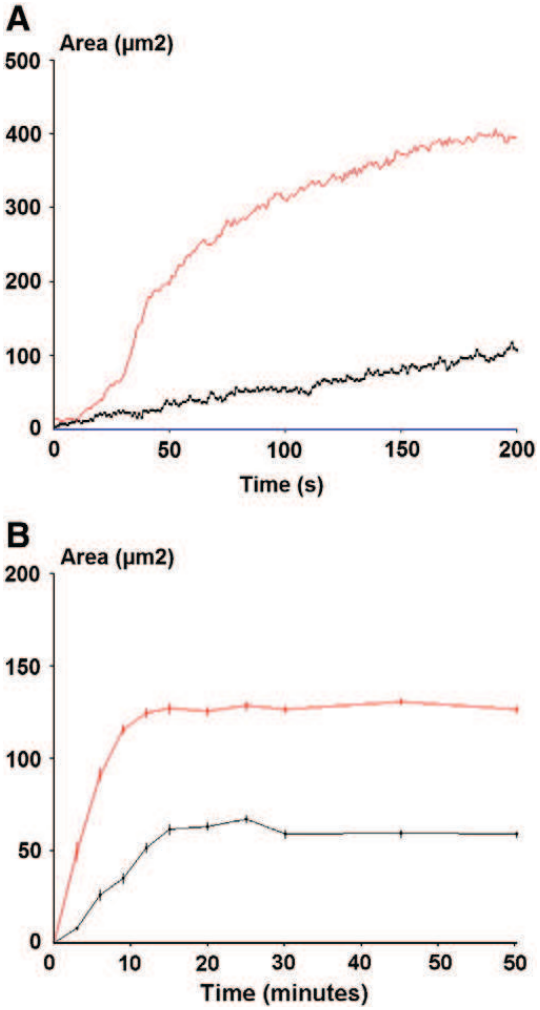


Fig. 3. Kinetics of contact formation between T lymphocytes and anti-CD3-coated surfaces. T lymphocytes were deposited on surfaces coated with anti-CD3 (red curve) or anti-HLA (black curve) under microscopic observation and contact areas were determined. Curves obtained with representative invididual cells are shown in A. Mean values obtained after monitoring 4304 individual cells (about 200 per condition) are shown in B. Vertical bar length is 2 × SEM.

prohibitive time for data acquisition and analysis. The experiments presented in this paper were performed manually. About 15 fields including about 150 cell images were easily recorded within about 5 min. In order to facilitate analysis, we developed a Windows™ compatible software allowing us to perform a number of image analysis tasks (Sabri et al., 1997; Pierres et al., 2008). Contact areas can be determined within less than a second after manual determination of areas (such as shown in Fig. 2) by clicking on the top left and bottom right corners of the rectangle. While this software is not yet fully user-friendly, the authors are happy to make it available on request. We now plan to integrate it with a microscope endowed with a motorized stage and autofocus system in order to allow full automatic analysis as demonstrated to perform similar tasks such as blood smear analysis (Cornet et al., 2008). Thus, if further experiments support the clinical interest of this method, automatic implementation should be achieved rapidly.

It was interesting to assess the significance of other methods previously used to monitor T lymphocyte activation.

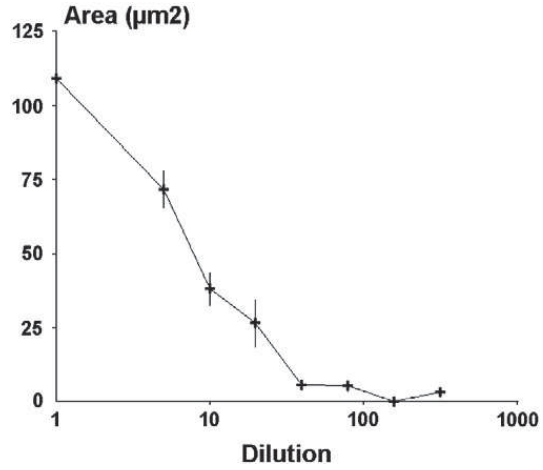


Fig. 4. T lymphocyte spreading on anti-CD3-coated surfaces. Human T lymphocytes were deposited on surfaces derivatized with various amounts of anti-CD3 antibodies. The mean contact area formed after 15 minute contact (mean ± standard error of the mean) was plotted versus dilution of anti-CD3 coating solution.

A transient rise of cytosolic calcium is an early reporter of T cell activation (Delon et al., 1998). When T lymphocytes were dually loaded with Fluo4 and Fura Red before being deposited on CD3-coated surfaces, calcium transient was readily demonstrated (Fig. 6A) while no calcium rise was monitored when cells were deposited on surfaces coated with IgG1 (Fig. 6B) or anti-HLA (not shown). However, this response was more difficult to quantify than the growth of contact area since this was transient and cell responses were not synchronized.

A rise of CD69 expression was also used as a reporter of T lymphocyte activation (Gaudenzio et al., 2009). Therefore, standard immunofluorescence was used to monitor the expression of CD69 on T lymphocytes after deposition on

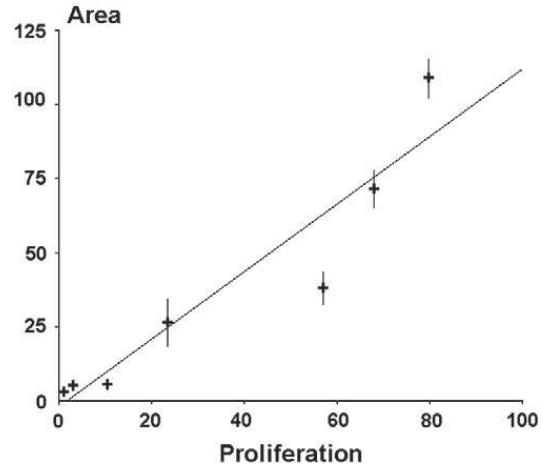


Fig. 5. Correlation between anti-CD3-induced induction of T-cell proliferation and spreading. Human T lymphocytes were deposited on surfaces coated with increasing dilutions of anti-CD3 (range 1/1 to 1/320) and assayed for i) mean contact area 15 min later, ii) Proliferation 3 days later. Early contact formation is strongly correlated (Pearson correlation coefficient r = 0.94) to proliferation. Vertical bar length = 2 × SEM. At least 13 independent experiments.

Author's personal copy

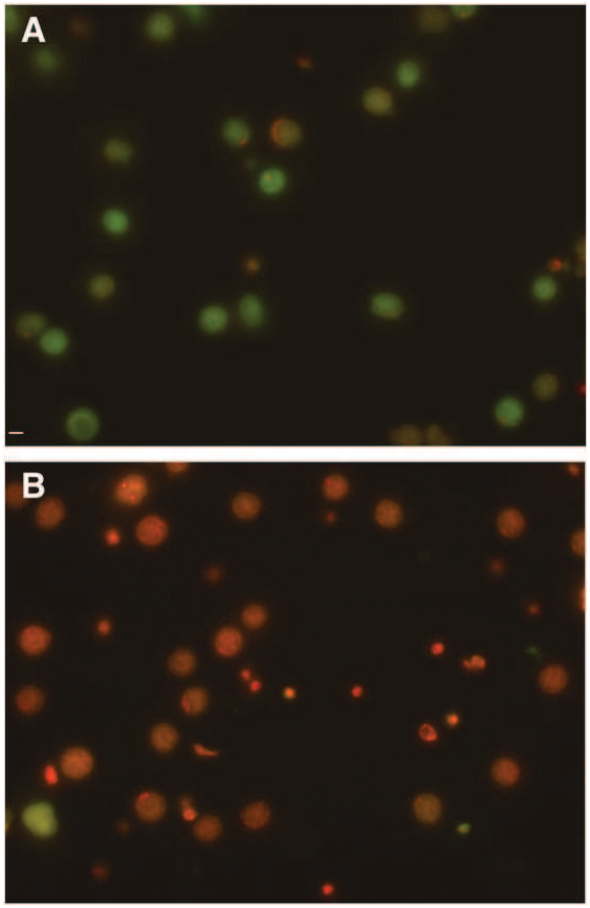


Fig. 6. Calcium increase following contact between T lymphocytes and activating surfaces. Human T lymphocytes were labeled with a mixture of fluo-4 and fura-red before deposition of surfaces coated with anti-CD3 (A) or anti-HLA (B) under microscopic observation with a high sensitivity color camera. Only anti-CD3 triggered intracellular calcium rise, making cells appear as bright green/yellow (A) rather than red (B).

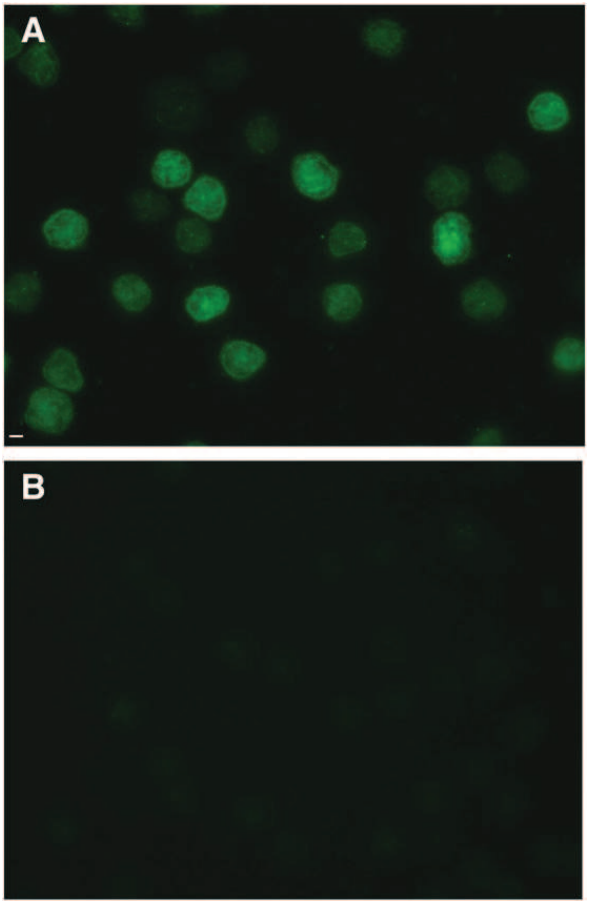


Fig. 7. Erk phosphorylation following contact between T lymphocytes and activating surfaces. Human T lymphocytes were deposited on surfaces coated with anti-CD3 (A) or anti-HLA (B) and labeled for phosphorylated Erk after 15 minute contact. Only anti-CD3 induced Erk phosphorylation. Bar = 10 μm.

activating surfaces: No reliable rise of CD69 was found during the first 6 h following cell deposition (not shown).

Tyrosine phosphorylation is an early consequence of TCR engagement (reviewed by Smith-Garvin et al., 2009). While Tyr phosphorylation and activation of the Syk family ZAP-70 kinase is an essential component of T lymphocyte activation (Randriamampita et al., 2008), we found (not shown) that both anti-HLA- and anti-CD3-coated surfaces induced ZAP-70 phosphorylation in deposited T lymphocytes. Therefore, this process could not be considered as a workable reporter of full T lymphocyte activation.

The recent report of highly amplified and digital nature of extracellular related kinase (Erk) activation in T cells made this an attractive reporter. As shown in Fig. 7, Erk phosphorylation was readily detected in T lymphocytes deposited on anti-CD3, not anti-HLA. However, as shown in Fig. 8, Erk phosphorylation was not correlated to lymphocyte proliferation after deposition on surfaces coated with various amounts of anti-CD3 antibodies. However, a difficulty with these experiments was that a significant proportion of cells might be lost during the staining procedure, which might artefactually change the proportion of positive cells. More experiments are needed to clarify this point.

The overall conclusion of our experiments is that the amount of T lymphocyte proliferation measured with standard CFSE technique 3 days after deposition on a surface coated with varying amounts of anti-CD3 antibody is strongly correlated to

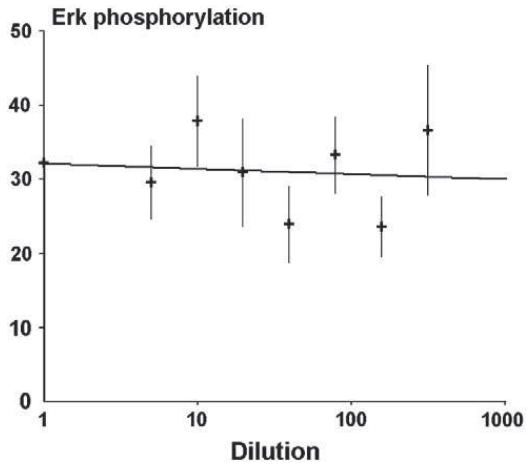


Fig. 8. Erk phosphorylation in T lymphocytes deposited on anti-CD3-coated surfaces. Human T lymphocytes were deposited on surfaces derivatized with various amounts of anti-CD3 antibodies and labeled for Erk phosphorylation. The mean specific fluorescence (mean of ± standard error of the mean) was plotted versus dilution of anti-CD3 coating solution.

Author's personal copy

the area of molecular contact formed 15 min after the initial contact. This finding raises two important prospects.

First, it is attractive to speculate that T lymphocyte spreading on an activating surface a few minutes after contact is a robust reporter of the cell decision to enter an activation program. This hypothesis is supported by the following two points: Firstly, since the duration of the contact between antigen presenting cells and T lymphocytes in lymph nodes is on the order of 5–10 min (Miller et al., 2004; Mempel et al., 2004), this is precisely the amount of time allowed for the cell to prolong contact rather than depart. Secondly, cell spreading consumes more cellular resources than a few phosphorylation events or a transient calcium rise. Thus, spreading must be considered as a more significant event from the cell point of view. Thirdly, cell spreading is known to influence cell function (reviewed by Pierres et al., 2002) through mechanisms that begin being understood (Meyers et al., 2006; Neves et al., 2008). Thus, contact formation might be an invaluable help for understanding the significance of the numerous biochemical events correlated with initial T lymphocyte activation since contact extension is amenable to real-time monitoring with an easy association to other reporters such as fluorescent markers (Randriamampita et al., 2008). Clearly, it is warranted to determine whether the engagement of lymphocyte membrane receptors such as CD4, CD8 (Delon et al., 1998), CD28 or LFA-1 (Bachmann et al., 1997) influences in similar proportions the proliferative response and spreading kinetics. Indeed, we plan to use the method we described to study the activation of T cells deposited on surfaces exposing mixtures of stimulatory ligands including anti-CD3, anti-CD4 or anti-CD8, anti-CD28 and ICAM-1.

Second, while cell proliferation is dependent on a high number of cell properties, it is tempting to speculate that the initial detection of cognate pMHC complexes is the most demanding and critical component of the chain of events leading to proliferation. Therefore, quantification of contact formation between T lymphocytes and graded series of anti-CD3-coated surfaces should provide a rapid and rather inexpensive way of assessing T lymphocyte reactivity in a number of patients where a quantitative deficiency of the immune system is suspected, such as aging patients (Cretel et al., 2010). This is a strong incentive to assess the interest of contact measurement as a simple tool for exploring T lymphocyte activity in clinical immunological laboratories.

References

Altan-Bonnet, G., Germain, R.N., 2005. Modeling T cell antigen discrimination based on feedback control of digital ERK responses. PLoS Biol. 3:e356.

Bachmann, M.F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D.E., Mak, T.W., Ohashi, P., 1997. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during the activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. Immunity 7:549–57.

Brandes, M., Willimanna, K., Bioley, G., Lévy, N., Eberl, M., Luod, M., Tampé, R., Lévy, F., Romero, P., Mosera, B., 2009. Cross-presenting human gamma delta T cells induce robust CD8alpha beta T cell responses. Proc. Natl Acad. Sci. USA 106:2307–12.

Bunnell, S.C., Hong, D.I., Kardon, J.R., Yamazaki, T., McGlade, C.J., Barr, V.A., Samelson, L.E., 2002. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. J. Cell Biol. 158:1263–75.

Campi, G., Varma, R., Dustin, M.L., 2005. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. J. Exp. Med. 202:1031–6.

Cornet, E., Perol, J.P., Troussard, X., 2008. Performance evaluation and relevance of the CellaVision™ DM96 System in routine analysis and in patients with malignant hematological disease. Int. J. Lab. Hematol. 30:536–42.

Cretel, E., Veen, I., Pierres, A., Bongrand, P., Gavazzi, G., 2010. Immunosénescence et infections, mythe ou réalité? Med. Mal. Infect. 40:307–18.

Curtis, A.S.G., 1964. The mechanism of adhesion of cells to glass. J. Cell Biol. 20:199–215.

Delon, J., Grégoire, C., Malissen, B., Darch, S., Lemaître, F., Kourilsky, P., Abastado, J.-P., Trautmann, A., 1998. CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. Immunity 9:467–73.

Dustin, M.L., Ferguson, L.M., Chan, P.-Y., Springer, T.A., Golan, D.E., 1996. Visualization of CD2 interaction with LFA-3 and determination of the two-dimensional dissociation constant for adhesion receptors in a contact area. J. Cell Biol. 132:465–74.

Gaudenzio, N., Espagnolle, N., Mars, L.T., Liblau, R., Valitutti, S., Espinosa, E., 2009. Cell-cell cooperation at the T helper cell/mast cell immunological synapse. Blood 114:4979–88.

Gett, A.V., Hodgkin, P.D., 2000. A cellular calculus for signal integration by T cells. Nat. Immunol. 1:239–44.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L., 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science 285:221–7.

Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M., Davis, M.M., 2002. Direct observation of ligand recognition by T cells. Nature 419:846–9.

Izzard, C.S., Lochner, L.R., 1976. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. J. Cell Sci. 21:129–59.

Locasale, J.W., 2007. Computational investigations into the origins of short-term biochemical memory in T cell activation. PLoS ONE 2:e627.

Mempel, T.R., Henrickson, S.E., von Andrian, U.H., 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. Nature 427:154–9.

Meyers, J., Craig, J., Odde, D.J., 2006. Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. Curr. Biol. 16:1685–93.

Miller, M.J., Safrina, O., Parker, I., Cahalan, M.D., 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. J. Exp. Med. 200:847–56.

Monks, C.R.F., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., Kupfer, A., 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. Nature 395:82–6.

Neves, S.R., Tsokas, P., Sarkar, A., Grace, E.A., Rangamani, P., Taubenfeld, S.M., Alberini, C.M., Schaff, J.C., Blitzer, R.D., Moraru, I.I., Iyengar, R., 2008. Cell shape and negative links in regulatory motivs together control spatial information flow in signaling networks. Cell 133:666–80.

Ohdan, H., 2010. Quantification of T-Cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients. Clin. Pharmacol. Ther. 87:23–6.

Pierres, A., Benoliel, A.M., Bongrand, P., 2002. Cell fitting to adhesive surfaces: a prerequisite to firm attachment and subsequent events. Eur. Cell Mater. 3:31–45.

Pierres, A., Eymeric, P., Baloche, E., Touchard, D., Benoliel, A.M., Bongrand, P., 2003. Cell membrane alignment along adhesive surfaces: active or passive mechanism? Biophys. J. 84:2058–70.

Pierres, A., Benoliel, A.M., Touchard, D., Bongrand, P., 2008. How cells tiptoe on adhesive surfaces before sticking. Biophys. J. 94:4114–22.

Randriamampita, C., Mouchacca, P., Malissen, B., Marguet, D., Trautmann, A., Coffman-Lellouch, A., 2008. A novel ZAP-70 dependent FRET based biosensor reveals kinase activity at both the immunological synapse and the antisynapse. PLoS ONE 3:e1521.

Richie, L.I., Ebert, P.J.R., Wu, L.C., Krummel, M.F., Owen, J.J.T., Davis, M.M., 2002. Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3zeta to form a stable central accumulation during negative selection. Immunity 16:595–606.

Sabri, S., Richelme, F., Pierres, A., Benoliel, A.-M., Bongrand, P., 1997. Interest of image processing in cell biology and immunology. J. Immunol. Meth. 208:1–27.

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S., 2009. T cell activation. Annu. Rev. Immunol. 27:591–619.

Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., Lanzavecchia, A., 1995. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. J. Exp. Med. 181:577–84.

Zidovska, A., Sackmann, E., 2006. Brownian motion of nucleated cell envelopes impedes adhesion. Phys. Rev. Lett. 96:048103.

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Médecine et maladies infectieuses

Médecine et maladies infectieuses 40 (2010) 307–318

Revue générale

Immunosénescence et infections, mythe ou réalité ?

Immunosenescence and infections, myth or reality?

E. Crétel [a,b], I. Veen [b], A. Pierres [a], P. Bongrand [a], G. Gavazzi [c,d,*]

[a] *Unité inserm UMR 600, parc scientifique de Luminy, case 937, 13288 Marseille, France*
[b] *Service de gériatrie sud, hôpital Sainte-Marguerite, 274, boulevard de Sainte-Marguerite, 13274 Marseille cedex 09, France*
[c] *GREPI, TIMC-IMAG, CNRS UMR 5525, BP 217, 38043 Grenoble cedex 09, France*
[d] *Pôle pluridisciplinaire de médecine, clinique universitaire de médecine gériatrique, centre hospitalier universitaire A.-Michallon, BP 217, 38043 Grenoble cedex 09, France*

Reçu le 19 octobre 2009 ; accepté le 10 décembre 2009
Disponible sur Internet le 25 janvier 2010

Résumé

La susceptibilité infectieuse du sujet âgé est généralement associée à une majoration des facteurs de risque retrouvés chez l'adulte jeune. Cependant, se discute aussi le rôle du vieillissement immunologique et, s'il est certes associé à un déclin des fonctions immunitaires, ce déclin n'est pas homogène, certaines fonctions étant altérées comme l'immunité cellulaire alors que d'autres paraissent augmentées comme l'immunité innée. Les faits les plus marquants du vieillissement immunitaire sont des modifications des populations lymphocytaires avec accumulation de lymphocytes mémoire, une baisse des réponses prolifératives et la présence d'un état inflammatoire chronique. La charge antigénique chronique tout au long de la vie est à l'origine de trous dans le répertoire antigénique induisant une plus grande susceptibilité aux nouveaux antigènes. Les modifications du système immunitaire sont d'autant plus importantes que les pathologies sont évoluées et/ou qu'existe une dénutrition associée. Ces pathologies vont à leur tout accélérer le processus de vieillissement. L'intrication entre immunosénescence et pathologie est un phénomène important à prendre en considération. Cette revue fait le point sur les changements du système immunitaire avec l'âge, leur intrication avec les pathologies du sujet âgé et l'impact de ces modifications sur l'efficacité des vaccinations.
© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Immunosénescence ; Immunité cellulaire T ; Sujet âgé ; Infection ; Vaccinations

Abstract

The susceptibility of elderly people to infectious diseases is usually associated to increasing risk factors found in young adults. However, the role of immune function ageing is associated with the decline of immune function but this decline is not homogenous. Some functions such as the cellular immune system are altered but others are enhanced such as innate immunity. The important events of immune ageing are modifications of lymphocyte subsets with accumulation of memory cells, decrease in proliferative response, and a chronic inflammatory state. The chronic antigenic load throughout life is responsible for gaps in the antigenic system with a greater sensitivity to new antigens. These immune system changes are all the more important that diseases are severe and that denutrition is associated. These diseases will speed up the ageing process. The interaction between immunosenescence and pathology is an important phenomenon to consider. This review outlines the immune system changes due to ageing, their relationship with diseases of the aged patient, and the consequences of these modifications on vaccination effectiveness.
© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Immunosenescence; T cell immunity; Elderly; Infection; Vaccination

1. Introduction

Au sein des pays industrialisés, les populations âgées et très âgées représentent une part croissante de la population [1]. Les pathologies dans cette population sont non seulement plus fréquentes, mais aussi plus graves. Différents facteurs prédisposent

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : GGavazzi@chu-grenoble.fr (G. Gavazzi).

0399-077X/$ – see front matter © 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.medmal.2009.12.008

les sujets âgés aux infections et la fréquence de comorbidités tels que diabète, rhumatismes inflammatoires, bronchopathie chronique obstructive (BPCO), accidents vasculaires cérébraux, participe à ce risque plus élevé d'infections [2–4] Parmi ces facteurs, l'impact du vieillissement immunitaire est probablement non négligeable dans la gravité et de la fréquence des infections du sujet âgé. En effet, le système immunitaire subit un remodelage complexe et continu avec l'âge concomitant de la diminution de volume de tous les organes lymphoïdes. Ce déclin du système immunitaire avec l'âge, appelé immunosénescence, n'est pas une détérioration immunitaire inévitable et progressive mais plutôt un remodelage où certaines fonctions sont réduites alors que d'autres sont conservées, voire augmentées [5,6]. L'immunosénescence correspond à un état de dysrégulation de la fonction immunitaire, affectant de multiples niveaux de réponses immunitaires et contribue non seulement à une augmentation de la susceptibilité des sujets âgés aux maladies infectieuses mais aussi à la diminution de la réponse vaccinale et, probablement, à aux phénomènes d'auto-immunité et à la pathologie cancéreuse [6–8]. Grâce aux progrès médicaux, sanitaires et nutritifs, le doublement de l'espérance de vie durant les 150 dernières années impose au système immunitaire d'être performant 40 années supplémentaires [7].

L'étude de l'immunosénescence chez l'homme nécessite une approche clinique rigoureuse incluant des sujets en très bonne santé, en appliquant par exemple les critères stricts définis par le SENIEUR protocole [9]. Ces critères excluent les pathologies telles que infections, maladies inflammatoires, tumeurs malignes, désordres auto-immuns, anomalies biologiques et traitements pouvant influencer l'immunité (corticoïdes, anti-inflammatoires). L'application de ces critères stricts permet d'étudier en théorie le vieillissement physiologique mais exclut 90 % des sujets âgés de 65 ans ou plus [10,11]. Cependant, au cours du vieillissement se cumulent les effets du vieillissement physiologique (appelé immunosénescence) et du vieillissement pathologique [6], et l'exclusion de sujets âgés fragiles peut limiter la compréhension des mécanismes de vulnérabilité aux infections dans une population à risque avec des maladies chroniques sous-jacentes. Il est donc essentiel de connaître les intrications de la pathologie et du système immunitaire.

Pour simplifier la compréhension des phénomènes complexes impliqués dans l'immunosénescence, nous soulignerons successivement les altérations des barrières cutanéomuqueuses, des cellules souches hématopoïétiques, des immunités innées et adaptatives mais il faut d'emblée concevoir que ces différents niveaux de réponse immunitaire sont intimement liés [5]. Nous aborderons ensuite les conséquences cliniques potentielles de l'immunosénescence sur les infections et sur l'efficacité des vaccinations ainsi que l'intrication entre immunosénescence et pathologies chroniques.

2. Anomalies biologiques du vieillissement immunitaire

Les principales anomalies du système immunitaire associé au vieillissement sont résumées dans le Tableau 1.

2.1. Atteintes des barrières cutanéomuqueuses

Le vieillissement est associé à une altération des barrières épithéliales de la peau, des poumons et du tractus gastro-intestinal, qui favorise l'invasion de ces tissus muqueux fragiles par des organismes pathogènes [12]. Ainsi, si le tissu lymphoréticulé associé aux muqueuses nasopharyngées semble relativement préservé avec le vieillissement [13], les modifications de la muqueuse du tractus respiratoire sont nombreuses : la diminution des réflexes protecteurs des voies aériennes, les anomalies mécaniques du trafic mucociliaire avec diminution de la clairance mucociliaire [14,15], la réduction de l'immunité locale (cellules T et immunoglobulines diminuées dans les sécrétions bronchiques) et la diminution de la production d'acide gastrique sont autant de facteurs qui permettent d'expliquer la fréquence des pneumonies du sujet âgé mais aussi, en partie, leur sévérité [16]. Pour exemple, une majoration du réflexe de toux par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion a été rapportée comme étant un facteur protecteur des pneumonies dans quelques études [17], dépendant cependant du génotype de l'enzyme de conversion [18]. Une modification de la flore oropharyngée, pouvant être favorisée par des facteurs tels que mauvaise hygiène buccodentaire, pression de sélection des antibiotiques, atrophie gastrique et hypochlorhydrie, jouerait un rôle considérable dans l'épidémiologie microbienne des pneumonies puisque le mode de contamination se fait le plus souvent à partir de l'oropharynx à l'occasion de troubles de déglutition cliniquement évidents ou de micro-inhalations [19,20]. Allant dans le même sens, et bien que peu de données soient disponibles, une amélioration de l'hygiène buccodentaire réduirait aussi l'incidence des infections respiratoires basses [21].

Concernant le tractus urinaire, plusieurs facteurs peuvent favoriser sa colonisation ou son infection dans la population âgée : des modifications mécaniques (diminution de la capacité vésicale, diminution du flux urinaire et résidu post-mictionnel favorisé par l'hypertrophie prostatique et l'hypotonie du muscle lisse vésical ou l'atonie vésicale), une augmentation de l'adhérence bactérienne à l'urothélium favorisée par la carence en estrogènes et une augmentation du pH chez la femme. Ces facteurs conjugués ou non pourraient expliquer la prévalence des bactériuries asymptomatiques chez les sujets âgés (15 à 30 % chez les hommes et de 25 à 50 % chez les femmes selon que le patient vit à domicile ou est institutionnalisé) [2]. En revanche, ces facteurs n'expliquent pour l'heure ni la prévalence ni l'incidence des infections urinaires telles qu'elle peuvent être rapportées [2,22]. Le vieillissement digestif concerne à la fois des aspects moteurs, biochimiques et histologiques [23]. Il existe une réduction des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses avec également un émoussement des réponses anticorps (Ac) de type IgA spécifiques d'antigènes intestinaux [13], une diminution de l'acidité gastrique favorisant la pullulation bactérienne de l'ensemble du tube digestif et par là probablement une malabsorption [24]. Il existe également une majoration des troubles fonctionnels coliques dont la haute prévalence de la diverticulose colique témoigne ; l'infection diverticulaire étant également une des complications les plus

Tableau 1
Principales modifications de l'immunité avec le vieillissement.
Main modifications of immunity due to ageing.

Immunité innée	Références
Polynucléaires neutrophiles	[5,6,33,42]
↓ Des capacités phagocytaires de chimiotaxisme	
↓ De production des anions superoxyde	
Réduction de la capacité de réponse aux facteurs solubles (GM-CSF) et bactériens (LPS, fMLP)	
Cellules dendritiques	[6,32,33,34]
↓ De leur nombre	
↓ De leur capacité à stimuler les lymphocytes chez le sujet âgé fragile	
↑ De leur fonction chez le sujet âgé en bonne santé	
Macrophages	[7,28,30]
↓ De l'activité de phagocytose et de chimiotactisme	
Déficit global de la fonction des *toll-like receptors* (TLR)	
↑ De la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNFα, IL-1β)	
Cellules NK	[5,33,14,30]
↓ De leur fonction de cytotoxicité	
Compensée par une augmentation de leur nombre	
↓ De la sécrétion d'IFN-γ induite par l'IL-2, d'IL-2 et de la production de chémokines induites par l'IL-12	
Immunité adaptative	
Immunité cellulaire	
Thymus	
Involution du thymus dès l'âge de 9 mois, reliquat thymique après 50 ans	
Lymphocytes T	[5,6,33,42]
Modification du nombre variable (↓de la prolifération à la PHA, variable selon âge et état de santé) – phénotype HLA B8/DR3 associé aux fortes réponses prolifératives	
↑ De la proportion de cellules mémoires (CD45RO+) surtout CD8+	[5,49]
↓ De la proportion de cellules naïves (CD45RA+)	
Cellules mémoires : ↓ de leurs capacités prolifératives, ↓ de la synthèse d'IL-2 et du récepteur à l'IL-2	[5,48]
↓ Des lymphocytes T CD28+	
↑ Des lymphocytes T CD28− surtout les TCD8+CD28− (caractérisés par une expansion oligoclonale, un raccourcissement des télomères, un potentiel diminué de prolifération, une résistance à l'apoptose, et une production accrue de TNF et d'IL-6)	[54]
↓ Des lymphocytes T CD4	
Orientation de la réponse Th1 vers la réponse Th2 avec ↓des réponses à médiation cellulaire dirigées contre les germes intracellulaires (fonction des Th1) et relative préservation de l'immunité humorale (fonction des Th2)	[33,52,64,65]
↓ De la population T régulatrice CD4+CD25+ jouant un rôle dans les manifestations d'auto-immunité	
Altération de la formation de la synapse immunologique et des voies de signalisation (réponse calcique, phosphorylations)	
↓ du rapport CD4/CD8	
Immunité humorale	
Lymphocytes B	[6,7,33,38]
↓ Des lymphocytes pré-B avec nombre de lymphocytes B périphérique inchangé	
↑ Des lymphocytes B CD5+ (clones B CD19+CD5+) qui produisent des Ac de faible affinité sans coopération cellulaire T	
↓ des cellules B naïves	
Accumulation de cellules B mémoire avec ↓de la diversité et de l'affinité des Ac	
Atteinte humorale des réponses primaires (dépendant de la coopération cellulaire T)	
Réponses humorales secondaires conservées	
Immunoglobulines	[6,7,14,39,40]
↑ Des taux sériques d'IgA et des IgG (IgG1, IgG2 et IgG4)	
Production d'immunoglobulines monoclonales par les clones CD19+CD5+	
Sécrétion d'auto-Ac non spécifiques d'organes (facteur rhumatoïde, Ac antinucléaires, antiphospholipides, antithyroglobulines et anticellules pariétales)	
Interleukines	[8,32,61,62]
↓ De la production d'IL-2 traduisant la ↓de coopération des lymphocytes T dans la production d'Ac par les lymphocytes B	
↑ De la production d'IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 et TNFα	
↓ De la production d'IL-1 et d'IFN-γ	

NK : *natural killers* ; Ac : anticorps ; IFN-γ : interféron-γ.

fréquentes de la diverticulose et par là responsable de la majoration des infections digestives dans la population âgée.

L'élasticité de la peau diminue également ainsi que l'épaisseur du tissu sous-cutané augmentant le risque d'infection par augmentation du risque d'effraction cutanée [15]. Récemment enfin, plusieurs auteurs ont décrit une forme particulière du vieillissement cutané dénommée « dermatoporose », soulignant à la fois les modifications des caractéristiques mécaniques de la peau mais aussi des éléments cellulaires qui la constituent, un certain nombre de ces caractéristiques pouvant être considéré

comme des facteurs majorant le risque infectieux cutané [25]. Cette description permettra probablement de mieux connaître les mécanismes impliqués et par là de mettre en place des stratégies préventives [26].

2.2. L'activité des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques ont la capacité de se différencier en différentes cellules du sang circulant et celle de se renouveler. Le nombre de cellules souches CD34+ dans le sang périphérique décline avec l'âge [27] avec une diminution de leur capacité à s'auto-renouveler et à adhérer à l'environnement stromal de la moelle osseuse. On observe aussi une altération de leur programme de différentiation hématopoïétique avec une réduction de leur capacité à s'orienter vers la lignée lymphoïde alors que le potentiel myéloïde est augmenté [7].

2.3. Rappels sur l'interaction entre système immunitaire inné et adaptatif

Le système immunitaire présente deux composants interactifs : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. La réponse immune innée a un composant cellulaire (macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules *natural killers* [NK] et cellules dendritiques) et un composant non cellulaire impliquant des molécules de reconnaissance (comme la protéine C-réactive, la protéine sérum amyloïde, les protéines liant le mannose et la cascade du complément). La réponse immune adaptée ou acquise a les caractéristiques suivantes uniques :

- une réponse spécifique à un antigène donné ;
- une réponse cellulaire (cytotoxique) et/ou humorale (Ac) par l'interaction de cellules ;
- l'établissement d'une mémoire qui permet une réponse plus rapide dès la présentation ultérieure du même antigène.

Pour initier la réponse cellulaire adaptative, les cellules T doivent être activées par des cellules fonctionnelles présentatrices d'antigène (CPA). Le degré d'interaction entre les cellules T et les CPA peut influencer la différenciation ultérieure ou au contraire faciliter l'initiation de l'apoptose. Les réponses immunitaires spécifiques sont liées à la reconnaissance de peptides antigéniques dérivés de pathogènes restreints par le complexe majeur d'histocompatibilité afin d'activer une variété de cellules effectrices T (cellules *helper* ou cytotoxiques) qui interagissent elles-mêmes avec les cellules B pour produire des protéines effectrices (Ac). La spécificité de la réponse permet au système d'avoir une plasticité pour reconnaître jusqu'à 10^{18} structures antigéniques différentes soit par les récepteurs T (limités essentiellement à la reconnaissance des peptides, diversité totale de 10^{18}) ou bien par les Ac (diversité totale de 5×10^{13}).

2.4. Cellules de l'immunité innée

Elles représentent la première ligne de défense en étant responsables de la destruction spontanée de nombreuses bactéries, de cellules infectées par des virus et de certaines cellules tumorales. Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules inflammatoires recrutées au niveau des tissus en réponse à une inflammation ou une infection. Ils voient leurs capacités fonctionnelles diminuer avec l'âge, en particulier, leur capacité phagocytaire, de chimiotactisme ainsi que leur production d'anions superoxyde en réponse à certains facteurs solubles et aux produits bactériens (GM-CSF, LPS, fMLP) [7,8,28,12,29,30]. L'environnement joue probablement un rôle important dans l'activité fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles. Ainsi, des sécrétions de cortisol engendrées dans certaines situations de stress et non compensées par la sécrétion de déhydroépiandrostérone sulfate (DHEAS), diminuant avec l'âge, pourraient favoriser la dysfonction des polynucléaires neutrophiles [7,31]. Les CPA sont responsables de l'apprêtement de l'antigène, c'est-à-dire de sa capture et de sa présentation aux récepteurs antigéniques sur les cellules T en association avec des épitopes distincts du CMH. Les cellules dendritiques sont des CPA « professionnelles ». Elles servent de sentinelles dans les tissus pour optimiser la capture des antigènes puis migrent dans les organes lymphoïdes pour optimiser la sélection clonale des rares cellules T CD4+ et CD8+. La capacité des cellules dendritiques à se différencier après interaction avec des cellules T peut être altérée avec l'âge ou au cours des maladies chroniques [32]. Cela pourrait s'expliquer par une diminution de production du GM-CSF chez les sujets âgés, un facteur de croissance clé pour les cellules dendritiques [8]. Les anomalies des cellules dendritiques sont néanmoins discrètes avec une légère diminution de leur fonction et de leur nombre et une capacité légèrement diminuée à stimuler la sécrétion d'interféron-γ (IFN-γ) par les cellules T et à stimuler la sécrétion d'IL-2 par rapport aux cellules dendritiques de sujets jeunes [33]. On note, en effet, quelques changements dans la communication entre cellules dendritiques et cellules T qui pourraient probablement avoir un impact sur les déficits cellulaires T au cours de l'immunosénescence. L'expression de molécules de co-stimulation qui facilitent l'efficacité de la communication entre cellules peut être altérée et de ce fait altérer la production de cytokines par les cellules dendritiques, celles-ci régulant et influençant les fonctions effectrices en aval du lymphocyte T. L'ampleur de ce trouble de communication entre cellules est probablement majorée dans les pathologies chroniques [32]. Il semblerait toutefois exister une augmentation de la fonction des cellules dendritiques chez le sujet âgé en bonne santé et au contraire une dysfonction chez le sujet âgé fragile [34].

Les cellules NK n'ont pas besoin d'une sensibilisation antigénique pour lyser les cellules cibles (cellules tumorales ou infectées par des virus). Leur activité fonctionnelle de base diminue avec l'âge avec une baisse de leur fonction essentielle de cytotoxicité et une diminution de la réponse à la stimulation par l'IL-2 [5,33] ainsi qu'à d'autres cytokines stimulantes comme l'IL-12, L'IFN-α, l'IFN-β et l'IFN-γ [30,32]. Le raccourcissement télomérique pourrait jouer un rôle dans la diminution de leur activité [33]. Mais cette baisse de l'activité lytique est compensée par l'augmentation du nombre de cellules NK si bien que globalement l'activité des cellules NK varie peu avec l'âge [5]. De plus, les cellules NK de sujets centenaires peuvent migrer

parfaitement en réponse à des stimuli chimiotactiques et peuvent tuer des cellules cibles comme les cellules de sujets jeunes [35]. Leur nombre absolu et/ou leur activité pourrait avoir un impact sur la sévérité des infections et le taux de mortalité [8,36–38].

Les macrophages jouent probablement un rôle central dans l'immunité innée avec des fonctions variées allant de la phagocytose à la destruction en passant par la production de cytokines qui régule l'activité d'autres cellules de l'immunité innée pour déclencher une réponse acquise primaire ou la bloquer. Le nombre des macrophages n'est pas modifié au cours du vieillissement cependant leurs activités de phagocytose et de chimiotactisme sont diminuées [7,12]. Leur capacité à produire certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-8 et le TNFα augmente avec l'âge et ces sécrétions sont prolongées chez le sujet âgé qui exprime des réponses inflammatoires prolongées [30]. Malgré ces données l'immunité innée est globalement peu altérée par rapport aux modifications plus profondes affectant l'immunité cellulaire [34].

3. Cellules de l'immunité spécifique

3.1. Modifications de l'immunité humorale

Au cours du vieillissement, on note une diminution de la fréquence et du nombre absolu de lymphocytes pro-B dans la moelle et de leur capacité à se différencier en lymphocytes pré-B (diminution de 60 à 90 %). Cependant, le nombre de cellules B périphériques reste à peu près constant car l'équilibre entre cellules B mémoires et cellules B naïves est modifié avec une accumulation de cellules B mémoires au phénotype CD19+CD27+ et un renouvellement diminué des cellules B naïves [7]. Les niveaux d'immunoglobulines augmentent avec l'âge particulièrement les taux sériques d'IgA et d'IgG [6,39]. Les déficits en sous-classes d'IgG sont rares excepté le déficit en IgG4 alors que les taux d'IgG1, d'IgG2 et d'IgG3 augmentent [7,35]. Le répertoire antigénique des lymphocytes B est altéré avec une diminution de la diversité des réponses Ac et une diminution de l'affinité des Ac [6,7,33]. En effet, les lymphocytes B de sujets âgés présentent une prolifération et une activation altérées. L'atteinte humorale concerne surtout les réponses primaires pour lesquelles les cellules B sont très dépendantes de la coopération avec les cellules T alors que les réponses humorales secondaires sont mieux conservées. Il existe également une perte de précision dans la distinction soi/non-soi (ou reconnaissance des signaux de danger) avec l'augmentation oligoclonale d'une sous-population de lymphocytes B exprimant CD5+. Ils ont la capacité de produire des Ac de faible affinité, indépendamment des cellules T [7,33]. On peut ainsi voir l'émergence de certains clones CD19+CD5+ à l'origine d'hémopathies lymphoïdes et de leucémies lymphoïdes chroniques ainsi que la production d'immunoglobulines monoclonales [38]. Ces gammapathies monoclonales peuvent correspondre à d'authentiques myélomes ou à des *monoclonal gammapathy of undeterminated signification* (MGUS) présentes chez 10 % des sujets de plus de 80 ans [15] mais sont d'authentiques états prémyélomateux [40]. On note également avec le vieillissement de l'immunité humorale des stigmates d'auto-immunité chez 10 à 20 % des sujets après 60 ans avec sécrétion d'Ac non spécifiques d'organes (présence de facteur rhumatoïde chez 14 % de sujets âgés contre 2 % des sujets jeunes, d'Ac antinucléaires chez 18 % des sujets âgés versus 4 % des sujets jeunes, d'Ac antiphospholipide, ou d'Ac antithyroglobuline ou anti-cellules pariétales). Ces auto-Ac n'ont pas forcément de traduction clinique sauf pour trois pathologies relativement fréquentes chez le sujet âgé : l'anémie de Biermer, les dermatoses bulleuses et les thyroïdites auto-immunes. Ainsi, la valeur prédictive des tests d'auto-immunité est étroitement liée au contexte clinique, surtout chez le sujet âgé [15]. L'expansion oligoclonale de lymphocytes B CD5+ n'est pas la seule impliquée dans les manifestations d'auto-immunité chez le sujet âgé. L'altération fonctionnelle des cellules T et de leur fonction suppressive pourrait favoriser la réactivation de « clones T oubliés ». On note également avec l'âge une diminution de l'activité suppressive d'une population connue comme essentielle dans la prévention de manifestations auto-immunes, la population T régulatrice CD4+CD25+. Malgré toutes ces données, les principaux changements observés dans l'immunité humorale sont essentiellement dus aux perturbations de la collaboration T-B chez le sujet âgé [33]. Le déclin de l'expression du CD40L par les lymphocytes T a un rôle non négligeable dans le déclin de l'activation des lymphocytes B. Les cytokines IL-2, IL-4 et IL-5 produites par les lymphocytes T activés favorisent des étapes variées de l'activation des lymphocytes B comme la prolifération et la différenciation en plasmocytes sécrétant des Ac. La diminution de la production d'IL-2 avec l'âge peut favoriser la baisse de la coopération des lymphocytes T dans la production d'Ac par les lymphocytes B [41,42].

3.2. Modifications de l'immunité cellulaire

Les réactions d'hypersensibilité cutanée (de type réaction tuberculinique) sont classiquement diminuées vis-à-vis des antigènes rencontrés par le sujet dans le passé.

Une des manifestations anatomiques les plus évidentes du vieillissement immunitaire est l'involution précoce du thymus, organe de différenciation des cellules T qui n'existe que sous la forme de reliquat chez les sujets de plus de 50 ans. Le thymus est le premier site de maturation des cellules T, générant des cellules T immunocompétentes, tolérantes pour elle-mêmes, et restreintes par le complexe majeur d'histocompatibilité. Ce processus d'involution thymique est sans doute multifactoriel et a des répercussions sur les cellules T périphériques [33]. Les variations du nombre de lymphocytes T CD3, CD4 et CD8 sont discutées avec une diminution pour certains auteurs [6,42] et un nombre peu variable pour d'autres [5]. Cependant, la baisse du nombre de lymphocytes n'est pas proportionnelle à l'involution thymique, ce phénomène s'expliquant probablement par la production extrathymique de lymphocytes T matures [43–46]. Le vieillissement est responsable d'une diminution des capacités prolifératives des lymphocytes T et leur degré de réponse est corrélé à l'âge [42]. Ce phénomène n'est pas constant, les lymphocytes de centenaires en bonne santé répondent bien à des stimuli immunologiques définis comme les Ac anti-CD3 [47] et ont une réponse à la phytohémaglutinine (PHA) retardée mais

quantitativement non altérée. De même, des études ont montré chez des sujets de 80 ans, en excellent état de santé, des réponses prolifératives comparables à celles de sujets de 20 ans [6,48]. Il pourrait y avoir un lien entre longévité et réponses prolifératives mais des études longitudinales sont nécessaires [6].

Deux autres phénomènes touchant l'immunité cellulaire sont liés : la sénescence réplicative qui limite l'expansion clonale T [49] et le raccourcissement des télomères. La longueur des télomères est un indicateur de la sénescence réplicative et le raccourcissement des télomères dans le sang périphérique d'individus âgés est associé à une diminution de la survie ainsi qu'à une augmentation de la mortalité par maladie cardiaque et infection [50]. Les études montrent une diminution de la longueur des télomères dans les cellules T et les cellules B sans modification de l'activité télomérase [49]. Ce raccourcissent télomérique ne se produit pas à un taux constant mais semble plus rapide dans les deux ou trois premières décades de la vie et ne se produit pas dans toutes les cellules immunitaires [27].

Le second phénomène correspond à des changements des populations lymphocytaires T avec le passage progressif d'un état ou les cellules naïves dominent à un état où dominent les cellules mémoires. Avec l'atrophie thymique, les cellules naïves doivent survivre sur une période de plusieurs décennies surtout lorsque l'on considère les centenaires [5]. Les hypothèses actuelles seraient la possibilité de production de cellules T naïves par des reliquats thymiques, ou provenant d'autres organes prenant le relais sur le thymus. La diminution du renouvellement des cellules naïves (CD45RA+) semble progressivement comblée par une expansion accrue des cellules mémoires (CD45RO+) répondant à un phénomène d'homéostasie. Ainsi, on note une proportion de 40 % de cellules T mémoires (CD45 RO+) à 20 ans contre 60 % à 65 ans [5] et 90 % vers 80 ans [6,51]. Les cellules mémoires produites chez le sujet âgé ont des capacités prolifératives diminuées, une diminution de l'expression de l'IL-2 et du récepteur à l'IL-2 et des capacités de production de cytokines inférieures à celles des cellules mémoires des sujets jeunes. Elles présentent également une augmentation de la glycosylation de certaines molécules (CD43 et CD45), l'ensemble de ces phénomènes contribuant à la baisse de l'immunité cellulaire [52,53,33,8]. La diminution du pool des cellules naïves s'observe à la fois parmi les lymphocytes T CD4 mais aussi parmi les CD8+ et s'accompagne d'une augmentation du pool des cellules CD8+CD28− (cytotoxiques/effectrices) [5]. La perte de l'expression du récepteur majeur de co-stimulation CD28 se produit essentiellement dans la population CD8+. En effet, la combinaison de l'involution thymique, d'expositions antigéniques répétées et d'une altération de la susceptibilité à l'apoptose (augmentée pour les lymphocytes CD4 et diminuée pour les CD8) entraîne l'accumulation de lymphocytes CD8+CD28− anergiques dans les tissus thymiques et lymphoïdes [8,49]. Ces lymphocytes CD8+CD28− ont une réduction progressive de leurs télomères et une capacité de réplication réduite [5,7,54,55]. Ils portent des marqueurs d'activité cytotoxique et ont un phénotype comparable à des cellules mémoires. Les cellules T CD8+CD28− représentent plus de 50 % des lymphocytes T CD8 périphériques comparées à moins de 20 % des lymphocytes T CD4 périphériques chez les sujets âgés [55] Les cellules CD8+ de sujets âgés ont également une tendance exagérée à la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ, IL-2, TNF) et sont produites dans un environnement pro-inflammatoire, les infections persistantes favorisant leur accumulation. Ce phénomène est responsable de la présence de lacunes dans le répertoire T avec représentation inégale des clones et accumulation de clones de cellules mémoires CD8+ spécifiques d'infections persistantes comme l'Epstein-Barr virus et le cytomégalovirus (CMV). La proportion de cellules CD8+CD28−CD57+ augmente avec l'âge, ces cellules caractérisant des clones spécifiques du CMV. Il a été suggéré que l'infection à long terme avec le cytomégalovirus accélérait les altérations liées à l'âge dans la composition du répertoire T. Dans tous les groupes d'âge l'infection latente à CMV est typiquement accompagnée par une diminution des cellules T naïves et une accumulation simultanée de cellules T effectrices [56–59]. La capacité du thymus à assurer un répertoire diversifié cesse à partir de la cinquième décennie de la vie. La fin de la septième décennie de vie définit une période critique où l'homéostasie des cellules T n'est plus assurée et où l'on observe une rupture dans la diversité du répertoire des cellules naïves [60]. La baisse des cellules naïves de la sous-population T CD8+ pourrait expliquer la plus grande vulnérabilité des sujets âgés vis-à-vis des pathogènes intracellulaires. En effet, les cellules CD8+ restreintes par la classe I jouent un rôle majeur dans les maladies infectieuses à germes intracellulaires ainsi que dans la surveillance anti-tumorale.

La diminution du pool de lymphocytes T CD4+ s'accompagne d'une orientation de la réponse TH1 vers une réponse TH2 anti-inflammatoire mise en évidence par une augmentation de la production d'IL-10 [6,8,32,61,62,63] ainsi qu'une augmentation de la production d'auto-Ac. On note également une baisse de l'expression du CD3 et de molécules d'adhésion à la surface des lymphocytes T [42]. La distribution des récepteurs de surface est influencée par des microdomaines appelés « rafts lipidiques ». Avec le vieillissement, les modifications de la composition en cholestérol et en sphingolipide de la membrane pourraient altérer l'organisation de ces rafts lipidiques à la surface de la cellule T participant aux difficultés d'interaction avec la CPA, cet effet étant plus prononcé pour les cellules T CD4+. La reconnaissance de l'antigène notamment la formation de la synapse immunologique est affectée par une diminution de la redistribution des protéines de signalisation clés impliquées dans la synapse immunologique [64,65]. La baisse de mobilité de ces molécules est en partie due à l'augmentation de la concentration de cholestérol de la membrane. Le vieillissement augmente également le niveau de glycosylation des macromolécules à la surface des cellules T (CD43) qui du fait de l'encombrement stérique et de leur charge négative empêchent l'accolement des cellules. Le clivage de ces macromolécules peut restaurer des niveaux élevés de réponses cellulaires T chez des souris âgées [52]. La proportion de cellules capables de former une synapse immunologique est ainsi diminuée [52,66]. Les voies de co-stimulation de l'alloreconnaissance sont également altérées chez les sujets âgés. Les niveaux des molécules de co-stimulation CD28, CD40 et CD154 (CD40L) sont réduits alors que le niveau de

CTLA4 (CD152), qui a un effet inhibiteur sur l'activation T, est augmenté. On observe également des défauts de signalisation en réponse à certaines stimulations antigéniques : diminution de la réponse calcique, anomalies des phosphorylations, de la translocation des facteurs de transcription, de l'activation de la protéine kinase C (PKC), de la production de cytokines [33,52,67]. Les altérations des seconds messagers incluant l'auto-phosphorylation de Lck et l'activation de ZAP-70 et du *linker of activated T cells* (LAT) entraînent une baisse des facteurs de transcription, essentiellement le NF-κB qui a un rôle de pivot dans la régulation de la production de cytokines, expliquant en partie la diminution de production d'IL-2 et une altération de la prolifération [68–70]. Ces changements des seconds messagers peuvent être liés à des changements liés à l'âge de l'activité des phosphatases par modification du contenu lipidique des cellules, ces modifications pouvant être reproduites dans les cellules T jeunes en diminuant le contenu en cholestérol de la membrane.

En conclusion, le vieillissement immunitaire cellulaire est un état caractérisé par une altération des réponses immunitaires adaptatives vis-à-vis des nouveaux pathogènes, en particulier intracellulaires. Il se caractérise par une accumulation par expansion clonale, de cellules mémoires surtout cytotoxiques du fait d'une altération de leur apoptose.

Le déséquilibre entre voies apoptotiques et anti-apoptotiques entre lymphocytes CD4 (avec apoptose augmentée) et lymphocytes T CD8 (avec apoptose diminuée) explique la diminution du rapport CD4/CD8 fréquemment observée au cours du vieillissement [15]. De ces données découlent certains marqueurs d'immunosénescence regroupés sous le concept de « phénotype à risque immunologique » ou *immune risk phenotype* (IRP).

« L'IRP » est décrit comme une augmentation des cellules CD8+CD28−CD57+ (associées à un portage chronique de CMV), un ratio CD4/CD8 inférieur à 1, une diminution des réponses prolifératives aux tests fonctionnels in vitro et une sérologie CMV positive suggérant que la stimulation antigénique chronique à CMV est la cause de ces changements liés à l'âge [71]. L'IRP, associé à une augmentation de l'IL-6 et à la présence d'une atteinte cognitive, est un marqueur de mortalité et de fragilité [72,73].

3.3. Cytokines et vieillissement

Le profil des cytokines subit des modifications profondes au cours du vieillissement.

La commutation d'une réponse Th1 vers une réponse Th2 entraîne une réduction de la production d'IFN-γ alors que la production d'IL-4 et d'IL-10 augmente. Les macrophages sont responsables d'une augmentation de production de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8 et le TNF-α [32,74]. Au cours d'un épisode infectieux, il est classique de voir une activation des macrophages avec sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires. Mais il existe aussi avec le vieillissement une activation non spécifique de ces substances pro-inflammatoires par le système immunitaire inné [8,61]. Cette sur-régulation des cytokines pro-inflammatoires pourrait refléter un phénomène compensateur de la baisse de l'immunité cellulaire. Le niveau d'IL-6 faible chez les sujets jeunes augmente progressivement à partir de 50 à 60 ans. Bien que des niveaux élevés aient été retrouvés chez des centenaires en bonne santé, l'augmentation du taux d'IL-6 est le marqueur prédictif le plus puissant de morbidité et de mortalité chez le sujet âgé [5,75–79]. Des niveaux élevés d'IL-6 sont rapportés dans de nombreuses maladies chroniques avec une légère augmentation (de 27 à 72 %) du risque relatif de décès mais surtout une augmentation significative du risque de maladie coronarienne, d'accident vasculaire cérébral et d'insuffisance cardiaque congestive chez des sujets de 70 à 79 ans [80,81]. Ces cytokines pro-inflammatoires favoriseraient l'émergence de diverses pathologies partageant une pathogénie inflammatoire, telles que maladie d'Alzheimer, polyarthrite rhumatoïde, ostéoporose et athérosclérose [7,74,77]. Une étude a montré une relation entre des marqueurs « d'inflammation » (albumine inférieure à 38 g/l, cholestérol inférieur à 1,7 g/l, IL-6 supérieur à 3,8 pg/ml, et CRP supérieure à 2,65 mg/l) et le risque de mortalité chez des sujets ayant trois à quatre marqueurs d'inflammation [80]. L'équilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires pourrait être utilisé comme un profil pour indiquer la fragilité et la mortalité des sujets âgés [74,82]. Le statut « pro-inflammatoire », état prédictif de morbidité et de mortalité chez le sujet âgé, représente un des aspects fondamentaux de l'immunosénescence [5].

4. Aspects cliniques du vieillissement immunitaire l'immunosénescence

4.1. Immunosénescence et infection

Plusieurs études ont suggéré une association entre vieillissement immunitaire, morbidité et mortalité infectieuse chez le sujet âgé [8,33].

Les infections des personnes âgées sont plus sévères, souvent létales, les présentations cliniques atypiques avec symptômes non spécifiques rendant le diagnostic difficile et souvent retardé [2,42,83,84]. Mais cette association concerne surtout les micro-organismes à développement intracellulaire qui font appel à la protection par immunité cellulaire, en particulier les réactivations d'infections chroniques virales (herpès virus, varicelle-zona virus), bactériennes (tuberculose), parasitaires ou mycosiques (candidose) et plus rarement d'infections opportunistes [85]. Les modifications de l'immunité rendent plus difficiles la distinction entre tuberculose active (primo-infection ou réactivation) et séquelles. Les manifestations grippales peuvent être plus sévères de même que les infections respiratoires qui augmentent en fréquence [15,83]. Plus de 90 % des 10 000 à 40 000 décès attribués à la grippe aux États-Unis surviennent chez des patients de plus de 65 ans [32]. Les infections bactériennes typiques comme les infections urinaires, septicémies, endocardites, infections des tissus mous et de la peau sont également un problème fréquent dans cette population. Avec le vieillissement, les réponses immunitaires contre les antigènes connus peuvent être conservées mais la capacité d'immunisation vis-à-vis des de nouveaux antigènes décline significativement expliquant la plus grande sensibilité aux nouveaux pathogènes [6,67,86]. Les centenaires en bonne santé semblent avoir des fonctions immuni-

taires relativement préservées, plus proches de celles du système immunitaire de sujets jeunes [37]. Il existe probablement un lien entre immunosénescence et infections mais nous manquons d'études longitudinales prospectives établissant de façon formelle une corrélation entre immunosénescence et susceptibilité infectieuse, ce d'autant qu'existent d'autres facteurs de vieillissement immunitaire tels que les co-morbidités [73].

4.2. Immunosénescence et immunopathologie ou impact des maladies chroniques du sujet âgé sur l'immunité

L'impact de la polypathologie, fréquente chez le sujet âgé, est probablement plus important que celui de l'immunosénescence dans la fréquence et la gravité des épisodes infectieux du sujet âgé [15,84,87]. La présence d'une ou deux maladies chroniques (emphysème, diabète, insuffisance rénale chronique) est associée à une augmentation de l'incidence des pneumonies à influenza virus de 40 à 150 fois [61]. L'étude de la charge des maladies chroniques sur l'immunité cellulaire T permet de mettre en évidence une relation inverse entre immunité et polypathologie [88]. La dénutrition et les carences vitaminiques fréquentes chez le sujet âgé sont impliquées de façon nette dans la survenue d'infections [6,15]. La malnutrition protéino-énergétique touche en moyenne 50 % des patients âgés hospitalisés et 15 à 40 % des sujets âgés vivant en EHPAD [89]. Les cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages au cours d'un épisode infectieux entraînent un hypercatabolisme à l'origine d'une dénutrition endogène par mobilisation des réserves nutritionnelles de l'organisme (protéolyse, lipolyse, ostéolyse). Celles-ci ne seront pas reconstituées en l'absence de régime hyperprotidique, hypercalorique chez un sujet déjà fragilisé [6,39,90]. Les carences en micronutriments ont également un rôle sur l'immunité. La vitamine A permet le maintien de l'intégrité de l'épithélium des tractus respiratoires et gastro-intestinaux. La vitamine E est un anti-oxydant ayant un rôle dans l'épuration des radicaux libres [6,91]. La supplémentation en vitamine E in vitro et in vivo restaure les déclins liés à l'âge de la fonction cellulaire T chez l'homme et la souris, en réduisant les déficits liés à l'âge de production d'IL-2, de prolifération cellulaire T et en améliorant la formation de la synapse immunologique [92–96]. La vitamine E intervient également dans les évènements de signalisation proximaux notamment au niveau de la protéine adaptatrice LAT dont les anomalies de phosphorylation liées à l'âge, après stimulation par un Ac anti-CD3 et anti-CD28, sont compensées par la vitamine E [96]. La vitamine E jouerait aussi un rôle de régulation dans les propriétés des rafts lipidiques situés au niveau des membranes, elle constitue en cela un régulateur de la fluidité membranaire [97]. Elle agit également comme régulateur de l'expression des gènes [98]. Cette augmentation des fonctions immunes par la vitamine E est associée à une amélioration significative de la résistance au virus influenza chez les souris âgées ainsi qu'à une réduction du risque d'infection des voies respiratoires chez les résidents en EHPAD [99,100].

Les effets antimicrobiens de la vitamine D ont déjà été documentés et le statut de carence en vitamine D est connu pour être associé à une susceptibilité à l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* [101]. Une supplémentation en vitamine D permet de renforcer les défenses immunitaires contre la tuberculose [102]. La stimulation des *toll-like* récepteurs (TLR) sur les macrophages humains induit :

- une enzyme qui catalyse la conversion de $25(OH)D_3$ en $1,25(OH)_2D_3$ active ;
- l'expression du récepteur de la vitamine D (VDR) ;
- la production de cibles pertinentes situées en aval du VDR (incluant la cathélicidine) [103].

La cathélicidine, peptide antimicrobien, est capable d'induire la destruction des *M. tuberculosis* intracellulaires[103]. La vitamine D est donc un lien clé entre l'activation des TLR et les réponses antibactériennes de l'immunité innée. Il est possible que les variations dans la capacité à synthétiser de la vitamine D incluant les polymorphismes du VDR puissent être un facteur de susceptibilité à la tuberculose [104]. Les sérums d'individus américains noirs, connus pour avoir une plus grande susceptibilité à la tuberculose, ont des niveaux bas de 25-OH-vitamine D et une induction moindre d'ARN messager de la cathélicidine, suggérant un lien entre les *toll-like* récepteurs, la vitamine D, l'immunité innée médiée par la vitamine D et la résistance de l'hôte. Ces données pourraient avoir un intérêt clinique surtout chez les sujets âgés fragiles ayant des taux faibles de vitamine D [103]. Le zinc est un minéral essentiel à l'état de traces dans l'organisme, et indispensable dans l'activité de plus de 300 enzymes, dans la synthèse et la dégradation des protéines, la production d'ADN, la biosynthèse de l'hème et le transport du dioxyde de carbone. Le déficit en zinc réduit l'immunité non spécifique, incluant les fonctions de polynucléaires neutrophiles, des cellules NK et l'activité du complément. Il favorise la baisse du nombre de lymphocytes T et B et altère l'hypersensibilité retardée, l'activité cytotoxique et la production d'Ac [89]. Une étude pilote récente d'une durée de suivi de 12 mois, semble indiquer que la supplémentation en zinc chez le sujet âgé diminue l'incidence des infections [105]. Cela confirmerait les données de Meydani et al. rapportant dans une étude observationelle une prévalence plus faible de pneumonies dans une population âgée présentant des taux normaux de zinc comparativement à une population carencée [106]. Enfin, la carence en fer est associée à une baisse de l'immunité à médiation cellulaire et une réduction des fonctions des polynucléaires neutrophiles avec baisse de l'activité myéloperoxydase et antibactérienne[89].

4.3. Immunosénescence et transplantation

L'âge de la transplantation augmente régulièrement, en particulier dans la transplantation rénale. Les infections des patients transplantés rénaux de plus de 50 ans sont la première cause de mortalité durant la première année, représentant 40 % des décès [34] mais la transplantation rénale chez les sujets âgés offre une espérance de vie et une qualité de vie supérieure à la dialyse [107]. Les phénomènes d'immunosénescence sont à l'origine d'une diminution du risque de rejet aigu et tardif chez les patients transplantés âgés [34,107,108]. Cependant, la réduction d'incidence des rejets aigus ne s'applique pas lorsque les greffons sont issus de donneurs âgés comme le

montre un essai clinique récent retrouvant une augmentation de l'incidence des épisodes de rejet aigu dans la période précoce post-transplantation [109]. L'âge du donneur et du receveur doivent également être pris en compte dans le risque de rejet, les greffons de donneurs âgés étant considérés comme plus immunogéniques alors que les receveurs âgés ont une réponse immunitaire diminuée. Ces données nécessitent d'adapter dans le temps et dans la dose le traitement immunosuppresseur avec une surveillance rapprochée des patients âgés greffés.

4.4. Immunosénescence et vaccinations

Le vieillissement immunitaire est attesté par la diminution de la qualité des réponses immunes après vaccination. La réponse vaccinale primaire, qui nécessite une immunité à médiation cellulaire intacte pour permettre une réponse humorale, est clairement diminuée chez les sujets âgés avec une spécificité et une efficacité moindres des Ac produits par rapport aux sujets jeunes [7,8,32,55,61,67]. Cette diminution de la réponse aux nouveaux antigènes reflète à la fois une diminution de la population résiduelle de cellules spécifiques de l'antigène mais aussi une diminution de la capacité fonctionnelle des cellules T naïves [42]. Les réponses vaccinales secondaires sont préservées avec cependant des durées de réponses Ac plus courtes que chez les sujets jeunes [6,32,55]. Le nombre de cellules T CD28− est un élément prédictif des réponses humorales défectueuses au vaccin antigrippal suggérant un impact négatif de ces cellules sur les réponses vaccinales [67,110–113]. De plus, les réponses cellulaires T permettent de mieux corréler la protection vaccinale contre le virus de la grippe chez les sujets âgés que les taux d'Ac [55,67]. L'importance du statut nutritionnel dans l'intégrité de la réponse immune doit être prise en considération chez les sujets âgés. Plusieurs essais basés sur la supplémentation expérimentale du régime avec un ou plusieurs nutriments et vitamines ont démontré une amélioration de plusieurs paramètres immunologiques [66,114]. D'autres études ne retrouvent pas de lien entre réponse vaccinale et pathologie chronique ou dénutrition. Une étude chez des résidents en maison de retraite montrait une réponse vaccinale chez seulement 50 % des résidents (correspondant à une multiplication par quatre du taux d'Ac), cette réponse n'était pas corrélée à l'état nutritionnel [61]. Dans une autre étude, seuls 36 % de 137 résidents vaccinés avaient une augmentation du titre d'Ac mais on ne notait pas de corrélation avec l'âge, l'index de masse corporelle, ou le statut fonctionnel [115]. Une autre étude portant sur 154 sujets âgés montrait que les non-répondeurs au vaccin antigrippal étaient caractérisés par des niveaux élevés d'IgG anti-CMV, un pourcentage plus important de cellules CD8+CD57+CD28− (correspondant au profil de cellules après exposition au CMV) et des niveaux sériques élevés de TNFα et d'IL-6. Ainsi, le statut d'immunisation au CMV, provoquant une élévation du potentiel pro-inflammatoire, pourrait contribuer à l'absence de réponse au vaccin antigrippal [113].

Néanmoins, bien que l'efficacité de la réponse Ac paraisse altérée, l'efficience vaccinale clinique est attestée par de nombreuses études épidémiologiques et si la vaccination antigrippale n'offre que 30 à 50 % de protection contre la maladie, elle diminue le risque de pneumonies de 50 à 60 %, de mortalité et complications sévères de 70 à 80 % et l'incidence des hospitalisations 50 à 60 % [66,67,116,117]. Dans une étude sur trois ans ayant inclus plus de 75 000 personnes âgées institutionnalisées, on notait une réduction de 46 % de toutes les causes de mortalité chez les individus ayant reçu le vaccin antigrippal [118]. L'efficacité clinique du vaccin peut probablement être liée à l'efficacité de destruction des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques, la durée de cette activité s'avérant conservée chez des sujets âgés [61,119]. Par ailleurs, la vaccination anti-grippale des soignants permet de réduire significativement la mortalité de personnes âgées vivant en unités de soins de longue durée comparativement aux personnels non vaccinés mais cette protection est efficace si les résidents sont aussi vaccinés [120,121]. La vaccination anti-pneumococcique est également considérée comme une stratégie efficace pour diminuer la morbidité et la mortalité associée au pneumocoque et la couverture vaccinale reste insuffisante en France [67,122,123]. Cependant, le vaccin actuellement disponible ne paraît pas très efficace sur le plan immunologique dans la population la plus fragile et les études épidémiologiques adaptées à la question n'existent pas. Il existe quelques arguments cependant pour dire que ce vaccin, s'il n'est pas idéal, confère, au moins au niveau des populations, une protection et un rapport coût-bénéfice intéressant grâce à une réduction suffisante des pneumonies invasives et de la mortalité [124–126].

5. Conclusion

Le vieillissement immunitaire proprement dit (immunosénescence) n'est donc pas un mythe ; il existe sous forme d'un remodelage complexe et très hétérogène en affectant plus particulièrement la réponse immunitaire cellulaire. L'immunosénescence est probablement le résultat d'une stimulation antigénique chronique se produisant tout au long de la vie, associant altération du répertoire T par diminution des cellules naïves et accumulation de cellules mémoires, et une baisse de réponse immunitaire adaptée vis-à-vis des nouveaux antigènes.

Ainsi, le bénéfice initial du système immunitaire visant à protéger l'organisme contre des agents extérieurs dangereux évolue avec l'âge en devenant délétère. Cependant, la réalité de la susceptibilité infectieuse des sujets âgés est probablement encore plus complexe, non seulement liée à l'immunosénescence mais aussi à des altérations physiologiques et pathologiques des barrières cutanéomuqueuses et à l'interaction des pathologies associées en première ligne desquelles la malnutrition protéino-énergétique.

En conséquence, de nombreuses recherches restent à mener pour mieux appréhender les phénomènes qui régissent ces modifications et leurs liens afin bien sûr, d'élaborer des stratégies préventives.

Conflit d'intérêt

Les auteurs n'ont pas transmis de conflit d'intérêt.

Références

[1] Lloyd-Sherlock P. Population ageing in developed and developing regions: implications for health policy. Soc Sci Med 2000;51:887–95.

[2] Gavazzi G, Krause KH. Ageing and infection. Lancet Infect Dis 2002;2:659–66.

[3] Yoshikawa TT. Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases. Clin Infect Dis 2000;30:931–3.

[4] Leibovici L, Pitlik SD, Konisberger H, Drucker M. Bloodstream infections in patients older than eighty years. Age Ageing 1993;22:431–42.

[5] Bürkle A, Caselli G, Franceschi C, Mariani E, Sansoni P, Santoni A, et al. Pathophysiology of ageing, longevity and age related diseases. Immunol Ageing 2007;2(4):4.

[6] Lesourd B. Modification de la réponse immune chez le sujet âgé. Rev Rhum 2004;71:446–54.

[7] Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. Immunology 2007;120:435–46.

[8] Pawelec G. Immunosenescence: impact in the young as well as the old? Mech Ageing Dev 1999;108:1–7.

[9] Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, et al. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the senieur protocol. Mech Ageing Dev 1984;28:47–55.

[10] Wick G, Grubeck-Loebenstein B. The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly. Exp Gerontol 1997;32:401–13.

[11] Rowe JW, Kahn RL. Aging (Milano). Successful aging 1998;10(2):142–4.

[12] Gomez CR, Boehmer ED, Kovacs EJ. The aging innate immune system. Curr Opin Immunol 2005;17:457–62.

[13] Fujihashi K, Kiyono H. Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. Trends Immunol 2009;30:334–42.

[14] Incalzi RA, Maini CL, Fuso L, Giordano A, Carbonin PU, Galli G. Effects of aging on mucociliary clearance. Compr Gerontol [A] 1989;3:65–8.

[15] Cogné M. Immunosénescence. In: Vieillissement : les données biologiques. Elsevier; 2005. p. 55–70.

[16] Meyer KC. The role of immunity in susceptibility to respiratory infection in the aging lung. Respir Physiol 2001;128:23–31.

[17] Arai T, Yasuda Y, Takaya T, Toshima S, Kashiki Y, Shibayama M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin-II receptor antagonists, and pneumonia in elderly hypertensive patients with stroke. Chest 2001;119:660–1.

[18] Morimoto S, Okhaishi K, Onishi M, Katsuya T, Yang J, Okuro M, et al. Deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene as a risk factor for pneumonia in elderly patients. Am J Med 2002;112:89–94.

[19] De Wazières B. Infectious pneumonia in the elderly. Rev Mal Respir 2007;4(6):799–802.

[20] Palmer LB, Albulak K, Fields S, Filkin AM, Simon S, Smaldone GC. Oral clearance and pathogenic oropharyngeal colonization in the elderly. Am J Respir Crit Care Med 2001;164(3):464–8.

[21] Yoneyama T, Yoshida M, Ohrui T, Mukaiyama H, Okamoto H, Hoshiba K, et al. Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. J Am Geriatr Soc 2002;50:430–3.

[22] Stamm WE, Raz R. Factors contributing to susceptibility of postmenopausal women to recurrent urinary tract infections. Clin Infect Dis 1999;28:723–5.

[23] Salles N. Basic mechanisms of the aging gastrointestinal tract. Dig Dis 2007;25:112–7.

[24] Parlesak A, Klein B, Schecher K, Bode JC, Bode C. Prevalence of small bowel bacterial overgrowth and its association with nutrition intake in nonhospitalized older adults. J Am Geriatr Soc 2003;51:768–73.

[25] Toutous-Trellu L, Michel JP, Perrenoud JJ. Practicing dermatology in an integrated geriatric Swiss hospital. J Am Geriatr Soc 2008;56: 1984–5.

[26] Kaya G, Saurat JH. Dermatoporosis: a chronic cutaneous insufficiency/fragility syndrome. Clinicopathological features, mechanisms, prevention and potential treatments.Dermatology. 2007;215(4):284–94.

[27] Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafè M. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. Exp Gerontol 1999;34:911–21.

[28] Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard KP, Lesur O, et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. Aging Cell 2004;3:217–26.

[29] Bongrand P, Bartolin R, Bouvenot G, Arnaud C, Delboy C, Depieds R. Effect of age on different receptors and functions of phagocytic cells. J Clin Lab Immunol 1984;15(1):45–50.

[30] Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. Trends Immunol 2009;30:325–33.

[31] Butcher SK, Killampalli V, Lascelles D, Wang K, Alpar EK, Lord JM. Raised cortisol: DHEAS ratios in the elderly after injury: potential impact upon neutrophil function and immunity. Aging Cell 2005;4: 319–24.

[32] Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. Clin Infect Dis 2000;31:578–85.

[33] Pawelec G, Larbi A. Immunity and ageing in man: Annual review 2006/2007. Exp Gerontol 2008;43:34–8.

[34] Martins PNA, Pratschke J, Pascher A, Fritsche L, Frei U, Neuhaus P, et al. Age and immune response in organ transplantation. Transplantation 2005;79:127–32.

[35] Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglino D. The immune system in the elderly III. Innate Immunity. Immunol Res 1999;20:117–26.

[36] Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, et al. Natural killer cells in the late decades of human life. Clin Immunol Immunopathol 1997;84:269–75.

[37] Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. Immunol Today 1995;15:12–6.

[38] Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C. Cytometric analysis of immunosenescence. Cytometry 1997;27:297–313.

[39] Moulias S. Nutrition and immunity in the elderly. Ann Med Interne (Paris) 2002;153:446–9.

[40] Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood 2009;113(22):5412–7.

[41] Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Corsi MP, et al. The immune system in the elderly I. Specific humoral immunity. Immunol Res 1999;20:101–8.

[42] Ginaldi L, Loreto MF, Corsi MP, Modesti M, De Martinis. Immunosenescence and infectious diseases. Microbes Infect 2001;3:851–7.

[43] Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski J, et al. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. Blood 1997;90:3789–98.

[44] Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. N Engl J Med 1995;332:143–9.

[45] Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. Blood 1997;89:3700–7.

[46] Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. Immunol Today 1997;18:245–51.

[47] Sansoni P, Fagnoni F, Vescovini R, Mazzola M, Brianti V, Bologna G, et al. T lymphocyte proliferative capability to defined stimuli and costimulatory CD28 pathway is not impaired in healthy centenarians. Mech Ageing Dev 1997;96:127–36.

[48] Mazari L, Lesourd BM. Nutritional influences on immune response in healthy aged persons. Mech Ageing Dev 1998;104:25–40.

[49] Effros RB. Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing. Exp Gerontol 2004;39(4):517–24.

[50] Cawthorn RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. Lancet 2003;361:393–5.
[51] Lesourd B, Mazari L. Nutrition and immunity in the elderly. Proc Nutr Soc 1999;58(3):685–95.
[52] Akha AAS, Miller RA. Signal transduction and the aging immune system. Curr Opin Immunol 2005;17:486–91.
[53] Haynes L. The effect of aging on cognate function and development of immune memory. Curr Opin Immunol 2005;17:476–9.
[54] Weng N, Akbar AN, Goronzy J. CD28- T cells: their role in the age-associated decline of immune function. Trends Immunol 2009;30(7):306–12.
[55] Chen WH, Kozlovsky BF, Effros RB, Grubeck-Loebenstein B, Edelman R, Sztein MB. Vaccination in the elderly: an immunological perspective. Trends Immunol 2009;30:351–9.
[56] Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat Med 2002;8:379–85.
[57] Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, et al. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. Clin Immunol 1999;90:213–9.
[58] Kuijpers TW, Vossen MT, Gent MR, Davin JC, Roos MT. Wertheim-van Dillen PM, et al. Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. J Immunol 2003;170:4342–8.
[59] Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. J Immunol 2002;15(169):1984–92, 4.
[60] Goronzy JJ, Weyand CM. T cell development and receptor diversity during aging. Curr Opin Immunol 2005;17:468–75.
[61] Burns EA, Goodwin JS. Immunodeficiency of aging. Drugs Aging 1997;11:374–97.
[62] Castle S, Uyemura K, Wong W, Modlin R, Effros Rl. Evidence of enhanced type 2 response and impaired upregulation of type 1 response in frail elderly nursing home residents. Mech Ageing Dev 1997;94:7–16.
[63] Castle S, Uyemura K, Crawford W, Wong W, Klaustermeyer WB, Makinodan T. Age-related impaired proliferation of peripheral blood mononuclear cells is associated with an increase in both IL-10 and IL-12. Exp Gerontol 1999;34:243–52.
[64] Tamir A, Eisenbraun MD, Garcia GG, Miller RA. Age-dependent alterations in the assembly of signal transduction complexes at the site of T cell/APC interaction. J Immunol 2000;165:1243–51.
[65] Garcia GG, Miller RA. Single-cell analyses reveal two defects in peptide-specific activation of naive T cells from aged mice. J Immunol 2001;166:3151–7.
[66] Fulop T, Wagner R, Abdelouhed K, Weber J, Trottier L, Payette E. Relationship between the response to influenza vaccination and the nutritional status in institutionalized elderly subjects. J Gerontol 1999;54:M59–64.
[67] Fulop T, Pawelec G, Castle S, Loeb M. Immunosenescence and Vaccination in nursing home residents. CID 2009;48:443–8.
[68] Ponnappan U, Zhong M, Trebilcock GU. Decreased proteasome-mediated degradation in T cells from the elderly: A role in immune senescence. Cell Immunol 1999;192:167–74.
[69] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature 1997;387:569–72.
[70] He HT, Lellouch A, Marguet D. Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. Semin Immunol 2005;17:23–33.
[71] Castle S, Uyemura K, Fulop T, Makinodan T. Host resistance and immune responses in advanced age. Clin Geriatr Med 2007;23: 463–79.
[72] Olsson J, Wikby A, Johansson B, Löfgren S, Nilsson BO, Ferguson FG. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. Mech Ageing Dev 2000;121:187–201.
[73] Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Löfgren S, et al. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2005;60: 556–65.
[74] Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, frailty. Annu Rev Med 2000;51:245–70.
[75] Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WHJ, et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in elderly. Am J Med 1999;106:506–12.
[76] Ferrucci L, Harris TB, Guralnik JM, Tracy RP, Corti MC, Cohen HJ, et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. J Am Geriatr Soc 1999;47:639–46.
[77] Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-Aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. Ann NY Acad Sci 2000:244–54.
[78] Wick G, Jansen-Dürr P, Berger P, Blasko I, Grubeck-Loebenstein B. Diseases of aging. Vaccine 2000;18:1567–83.
[79] Shoenfeld Y, Sherer Y, Harats D. Artherosclerosis as an infectious, inflammatory and autoimmune disease. Trends Immunol 2001;22:293–5.
[80] Reuben DB, Cheh AI, Harris TB, Ferrucci L, Rowe JW, Tracy RP, et al. Peripheral blood markers of inflammation predict mortality and functional decline in high-functioning community-dwelling older persons. J Am Geriatr Soc 2002;50:638–44.
[81] Brüünsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. Immunol Allergy Clin North Am 2003;23:15–39.
[82] Van Der Biggelaar AH, Huizinga TW, De Craen AJ, Gussekloo J, Heijmans BT, Frölich M, et al. impaired innate immunity predicts frailty in old age. The leiden-85 plus study. Exp Gerontol 2004;39:1407–14.
[83] Gavazzi G, Mallaret MR, Couturier P, Iffenecker A, Franco A. Bloodstream infection: differences between young-old, old, and old-old patients. J Am Geriatr Soc 2002;50(10):1667–73.
[84] High KP. Infection as cause of age-related morbidity and mortality. Ageing Res Rev 2004;3:1–14.
[85] Aubert T, Rovery C, Bourhaba K, Singeorzan S, Heim M, Crétel E. Non necrotizing bacterial cellulitis and bacteriemia due to Shewanella putrefaciens. Rev Med Interne 2009;30:800–2.
[86] Fagnoni FF, Vascovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. J Am Geriatr Soc 1999;47:639–46.
[87] Sehl ME, Yates FE. Kinetics of human aging: I. Rates of senescence between ages 30 and 70 years in healthy people. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2001;56:B198–208.
[88] Castle SC, Uyemura K, Rafi A, Akande O, Makinodan T. Comorbidity is a better predictor of impaired immunity than chronological age in older adults. J Am Geriatr Soc 2005;53(9):1565–9.
[89] Katona P, Katona-Apte J. The interaction between nutrition and infection. Clin Infect Dis 2008;46:1582–8.
[90] Cederholm T, Wretlind B, Hellström K, Andersson B, Engström L, Brismar K, et al. Enhanced generation of interleukins 1 beta and 6 may contribute to the cachexia of chronic disease. Am J Clin Nutr 1997;65(3):876–82.
[91] Traber MG, Atkinson J, Vitamin E. antioxidant and nothing more. Free Radic Biol Med 2007;43:4–15.
[92] Meydani SN, Barklund MP, Liu S, Meydani M, Miller RA, Cannon JG, et al. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. Am J Clin Nutr 1990;52:557–63.
[93] Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Siber G, Loszewski R, et al. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. JAMA 1997;277:1380–6.
[94] Beharka AA, Wu D, Han SN, Meydani SN. Macrophage prostaglandin production contributes to the age-associated decrease in T cell function which is reversed by the dietary antioxidant vitamin E. Mech Ageing Dev 1997;93:59–77.
[95] Wu D, Mura C, Beharka AA, Han SN, Paulson KE, Hwang D, et al. Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. Am J Physiol 1998;275: C661–8.
[96] Marko MG, Pang H-JE, Ren Z, Azzi A, Hubber BT, Bunnell SC, et al. Vitamin reverses Impaired Linker for Activation of T cells Activation in T cells from aged C57BL/6 mice. J Nutr 2009;139:1192–7.

[97] Atkinson J, Epand RF, Epand RM. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. Free Radic Biol Med 2008;44:739–64.
[98] Barella L, Muller PY, Schlachter M, Hunziker W, Stocklin E, Spitzer V, et al. Identification of hepatic molecular mechanisms of action of alpha-tocopherol using global gene expression profile analysis in rats. Biochimt Biophys Acta 2004;1689:66–74.
[99] Meydani SN, Leka LS, Fine BC, Dallal GE, Keusch GT, Singh MF, et al. Vitamine E and respiratory tract infections in elderly nursing home residents: a randomized controlled trial. JAMA 2004;292:828–36.
[100] Meydani SN, Han SN, Wu D, Vitamin. E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. Immunol Rev 2005;205:269–84.
[101] Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamine D-mediated human antimicrobial response. Science 2006;311:1770–3.
[102] Martineau AR, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Newton SM, Kampmann B, Hall BM, et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:208–13.
[103] Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamine D - mediated human antimicrobial response. Science 2006;311:1770–3.
[104] Bornman L, Campbell SJ, Fielding K, Bah B, Sillah J, Gustafson P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. J Infect Dis 2004;190(9):1631–41.
[105] Prasad AS, Beck FW, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. Am J Clin Nutr 2007;85:837–44.
[106] Meydani SN, Barnett JB, Dallal GE, Fine BC, Jacques PF, Leka LS, et al. Serum zinc and pneumonia in nursing home elderly. Am J Clin Nutr 2007;86:1167–73.
[107] Jassal SV, Olpez G, Cole E. Transplantation in the elderly: a review. Geriatr Nephrol Urol 1997;7:157–65.
[108] Bradley BA. Rejection and recipient age. Transplant Immunol 2002;10:125–32.
[109] Kasiske BL, Chakkera HA, Louis TA, Ma JZ. A meta-analysis of immunosuppression withdrawal trial in renal transplantation. J Am Soc Nephrol 2000;11:1910–7.
[110] Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and non survivors. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 1995;50:B378–82.
[111] Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. J Virol 2001;75:12182–7.
[112] Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschösser C, Asch E, Blasko I, et al. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. J Immunol 2002;168(11):5893–9.
[113] Trzonkowski P, Myśliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak LB, et al. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination–an impact of immunosenescence. Vaccine 2003;21:3826–36.
[114] Chandra RK. Effect of vitamin and trace-element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects. Lancet 1992;340:1124–7.
[115] Potter JM, O'Donnel B, Carman WF, Roberts MA, Stott DJ. Serological response to influenza vaccination and nutritional and functional status of patients in geriatric medical long-term care. Age Ageing 1999;28: 141–5.
[116] Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Lewandowski RA. The efficacy of influenza vaccine in elderly persons, A meta-analysis and review of the literature. Ann Intern Med 1995;123:518–27.
[117] Jackson LA, Jackson ML, Nelson JC, Neuzil KM, Weiss NS. Evidence of bias in estimates of influenza vaccine effectiveness in seniors. Int J Epidemiol 2006;36(35):337–44.
[118] Mullooly JP, Bennett MD, Hornbrook MC, Barker WH, Williams WW, Patriarca PA, et al. Influenza vaccination programs for elderly persons: cost-effectiveness in a health maintenance organization. Ann Intern Med 1994;121:947–52.
[119] Bernstein E, Kaye D, Abrutyn E, Gross P, Dorfman M, Murasko DM. Immune response to influenza vaccination in a large elderly population. Vaccine 1999;17:82–94.
[120] Carman WF, Elder AG, Wallace LA, McAulay K, Walker A, Murray GD, et al. Effects of influenza vaccination of health-care workers on mortality of elderly people in long-term care: a randomised controlled trial. Lancet 2000;355:93–7.
[121] Hayward AC, Harling R, Wetten S, Johnson AM, Munro S, Smedley J, et al. Effectiveness of an influenza vaccine programme for care home staff to prevent death, morbidity and health service use among residents: cluster randomised controlled trial. BMJ 2006;333:124.
[122] Gavazzi G, Wazieres B, Lejeune B, Rothan-Tondeur M. Influenza and pneumococcal vaccine coverages in geriatric health care settings in France. Gerontology 2007;53(6):382–7.
[123] Delelis-Fanien AS, Séité F, Priner M, Paccalin M. Vaccine coverage against influenza and pneumococcal infections in patients aged 65 and over: a survey on 299 outpatients. Rev Med Interne 2009;30:656–60.
[124] Fisman DN, Abrutyn E, Spaude KA, Kim A, Kirchner C, Daley J. Prior pneumococcal vaccination is associated with reduced death, complications, and length of stay among hospitalized adults with community-acquired pneumonia. Clin Infect Dis 2006;42:1093–101.
[125] Fedson DS, Liss C. Precise answers to the wrong question: prospective clinical trials and the meta-analyses of pneumococcal vaccine in elderly and high-risk adults. Vaccine 2004;22:927–46.
[126] Vila-Córcoles A. Vaccinate your child and save its grandparents from a heart attack? Current perspectives in antipneumococcal vaccination. J Intern Med 2009;266(5):432–44.

Elsevier Editorial System(tm) for La Revue de Medecine Interne
Manuscript Draft

Manuscript Number: REVMED-D-10-00042R3

Title: Etude du profil immunitaire de sujets âgés hospitalisés en unité de court séjour gériatrique
Immune profile of elderly patients admitted in a geriatric short care unit

Article Type: Article original

Keywords: Mots-clés :
Immunosénescence; sujet âgé; polypathologie; vitamine D; lymphopénie
Keywords:
Immunosenescence; elderly; polypathology; vitamin D; lymphopenia

Corresponding Author: Docteur Elodie Crétel, M.D.

Corresponding Author's Institution:

First Author: Elodie Crétel, M.D.

Order of Authors: Elodie Crétel, M.D.; Ildiko Veen, M.D.; Anne Pierres; Yves Binan, M.D.; Philippe Robert, M.D.; Anderson Loundou, M.D.; Karine Baumstarck-Barrau, M.D.; Anne-Marie Hubert, M.D.; Pierre Bongrand, PU-PH; Marc Heim, PU-PH

Abstract: Résumé

Introduction - L'immunosénescence, définie par les changements immunitaires liés à l'âge, est caractérisée par un émoussement de l'immunité à médiation cellulaire et des modifications importantes du répertoire immunologique. Le retentissement de la pathologie sur le vieillissement immunitaire est mal connu et peu de données existent sur l'immunité de patients âgés polypathologiques.
Méthodes - Nous rapportons les résultats d'une étude prospective dont le but était d'évaluer certaines caractéristiques immunologiques de patients de 75 ans ou plus admis pour des pathologies diverses dans une unité de court séjour gériatrique.
Résultats - Parmi les 51 patients inclus (35 femmes et 16 hommes), 90% étaient polypathologiques. Les résultats montrent une prévalence de 86% d'anomalies immunitaires avec une lymphopénie < 1500/mm3 chez 41% des patients et 95% de phénotypages lymphocytaires anormaux à partir de 85 ans. La prédominance de lymphocytes T mémoire (CD45RO+) sur les lymphocytes T naïfs (CD45RA+) est retrouvée dans 80% des cas et l'inversion du rapport CD4/CD8 est présente chez 12% de nos patients. L'insuffisance en vitamine D (< 30 ng/ml), fréquente parmi ces patients (96%), est un facteur prédictif de lymphopénie totale et de lymphopénie B.
Conclusion - Les anomalies de l'immunité sont fréquentes dans cette population fragile et pourraient constituer un facteur de fragilité en particulier la lymphopénie. La carence en vitamine D pourrait jouer un rôle dans les anomalies immunitaires de sujets âgés fragiles.

Abstract

Introduction - Immunosenescence embraces the whole of age-induced changes observed in the immunomodulatory functions of a living organism, and is mostly characterized by a decrease in cell-mediated immunity and important modifications of the immunological repertoire. The impact of the pathology on ageing immunity is poorly understood and few data are available on the immunological status of old polypathological patients.
Methods - We report the results of a prospective study aiming at characterizing several established immunological parameters in patients of 75 years old or more, and admitted for diverse pathologies in a unit of acute geriatric ward.
Results - Among the 51 included patients (35 women and 16 men), 90% displayed poly-pathologies. We found a prevalence of 86% of immunological abnormalities, with lymphopenia among 41% of the patients (< 1500 / mm3) and abnormal lymphocytes phenotypes among 95% of the oldest patients (> 85 years). A strong skewing towards memory T lymphocytes (CD45RO +) over naive T lymphocytes (CD45RA +) is found in 80 % of the cases and inverted CD4 / CD8 T cells ratio is observed in 12% of our patients. Vitamin D insufficiency (< 30 ng/ml), which is frequent among the patients (94%), is a predictive factor for T and B cell lymphopenia.
Conclusion - Immunological abnormalities are frequent in this frail population and lymphopenia, in particular, could constitute a reinforcing factor of fragility. Vitamin D deficiency could also affect elderly patients' immunity.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

Réponses aux commentaires sur le manuscrit n° : REVMED-D-10-00042R1-RMI le 30 aout 2010

Title: Statut immunitaire de sujets âgés hospitalisés en unité de court séjour gériatrique
Immune status of elderly patients admitted in a geriatric short care unit

Cher Monsieur,

J'ai effectué les révisions demandées :

- relecture de l'abstract en anglais par un chercheur en immunologie, directeur de recherche DR1 à l'INSERM ayant séjourné dans des pays anglosaxons et publiant régulièrement dans des revues anglo-saxones
- J'ai enlevé la note de pied de page
- J'ai également complété les résultats de la section 3-2-1

En espérant que ces modifications conviendront.

Je vous remercie de votre confiance

Bien cordialement

Dr Elodie Crétel

Etude du profil immunitaire de sujets âgés hospitalisés en unité de court séjour gériatrique

Immune profile of elderly patients admitted in a geriatric short care unit

E. Crétel [a,b], I. Veen [a], A Pierres [b,c], Y. Binan [a] , P. Robert [b,c], A.D. Loundou [d], K. Baumstarck-Barrau [d], A-M. Hubert [c] , P. Bongrand [b,c], M Heim [a]

a. Service de Gériatrie Sud, Hôpital Sainte Marguerite, 274 bd de Sainte Marguerite 13274 Marseille Cedex 09.

b. Unité Inserm UMR 600, Adhésion et Inflammation, Parc scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille.

c. Laboratoire d'immunologie, Hôpital de la Conception, 147 bd Baille, 13005 Marseille.

d. Unité d'Aide Méthodologique à la Recherche Clinique, DRC APHM, Laboratoire de Santé Publique- Faculté de Médecine, 27, Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex.

Correspondance :

Dr Elodie Crétel

Service de Gériatrie Sud
Hôpital Sainte Marguerite
274 bd de Sainte Marguerite
13274 Marseille Cedex 09

Mél : elodie.cretel@ap-hm.fr

Résumé

Introduction. L'immunosénescence, définie par les changements immunitaires liés à l'âge, est caractérisée par un émoussement de l'immunité à médiation cellulaire et des modifications importantes du répertoire immunologique. Le retentissement de la pathologie sur le vieillissement immunitaire est mal connu et peu de données existent sur l'immunité de patients âgés polypathologiques.

Méthodes. Nous rapportons les résultats d'une étude prospective dont le but était d'évaluer certaines caractéristiques immunologiques de patients de 75 ans ou plus admis pour des pathologies diverses dans une unité de court séjour gériatrique.

Résultats. Parmi les 51 patients inclus (35 femmes et 16 hommes), 90% étaient polypathologiques. Les résultats montrent une prévalence de 86% d'anomalies immunitaires avec une lymphopénie <1500/mm^3 chez 41% des patients et 95% de phénotypages lymphocytaires anormaux à partir de 85 ans. La prédominance de lymphocytes T mémoire (CD45RO+) sur les lymphocytes T naïfs (CD45RA+) est retrouvée dans 80% des cas et l'inversion du rapport CD4/CD8 est présente chez 12% de nos patients. L'insuffisance en vitamine D (<30 ng/ml), fréquente parmi ces patients (94%), est un facteur prédictif de lymphopénie totale et de lymphopénie B.

Conclusion. Les anomalies de l'immunité sont fréquentes dans cette population fragile et pourraient constituer un facteur de fragilité en particulier la lymphopénie. La carence en vitamine D pourrait jouer un rôle dans les anomalies immunitaires de sujets âgés fragiles.

Mots clés : immunosénescence, sujet âgé, polypathologie, vitamine D, lymphopénie

Abstract

Introduction. Immunosenescence embraces the whole of age-induced changes observed in the immunomodulatory functions of a living organism, and is mostly characterized by a decrease in cell-mediated immunity and important modifications of the immunological repertoire. The impact of the pathology on ageing immunity is poorly understood and few data are available on the immunological status of old polypathological patients.

Methods. We report the results of a prospective study aiming at characterizing several established immunological parameters in patients of 75 years old or more, and admitted for diverse pathologies in a unit of acute geriatric ward.

Results. Among the 51 included patients (35 women and 16 men), 90% displayed poly-pathologies. We found a prevalence of 86% of immunological abnormalities, with lymphopenia among 41% of the patients (<1500/mm^3) and abnormal lymphocytes phenotypes among 95% of the oldest patients (>85 years). A strong skewing towards memory T lymphocytes (CD45RO +) over naive T lymphocytes (CD45RA +) was found in 80% of the cases and inverted CD4/CD8 T cells ratio was observed in 12% of our patients. Vitamin D insufficiency (<30 ng/ml), which is frequent among the patients (94%), is a predictive factor for T and B cell lymphopenia.

Conclusion. Immunological abnormalities are frequent in this frail population and lymphopenia, in particular, could constitute a reinforcing factor of fragility. Vitamin D deficiency could also affect elderly patients' immunity.

Keywords: immunosenescence, elderly, polypathology, vitamin D, lymphopenia.

1. Introduction

Le vieillissement immunitaire appelé immunosénescence correspond à un état de dysrégulation de la fonction immunitaire. Il contribue non seulement à une augmentation de la susceptibilité des sujets âgés aux maladies infectieuses mais aussi à la diminution de la réponse vaccinale, et à certains phénomènes d'auto-immunité [1-4].

L'étude de l'immunosénescence chez l'homme nécessite une approche clinique rigoureuse incluant des sujets en très bonne santé, en appliquant des critères stricts comme ceux définis par le protocole SENIEUR [5]. Ces critères excluent les pathologies telles que les infections, les maladies inflammatoires, les tumeurs malignes, les désordres auto-immuns, certaines anomalies biologiques (syndrome inflammatoire, anémie, anomalie du bilan hépatique, protidémie ou albuminémie anormale) et les traitements pouvant influencer l'immunité (corticoïdes, anti-inflammatoires, etc.). L'application stricte de ces critères permet d'étudier en théorie le vieillissement physiologique, mais exclue 70% des sujets de tout âge [6]. En effet au cours du vieillissement se cumulent les effets du vieillissement physiologique et du vieillissement pathologique [3] et l'exclusion de sujets âgés fragiles peut limiter la compréhension des mécanismes de vulnérabilité aux infections dans une population à risque avec des maladies chroniques sous-jacentes. Il est donc intéressant de connaître les intrications entre les pathologies chroniques et le système immunitaire.

Les objectifs de cette étude sont, d'une part de décrire le statut immunitaire des sujets âgés de plus de 75 ans, hospitalisés dans un service de court séjour gériatrique, d'autre part de comparer les paramètres immunitaires au sein de différents sous-groupes en fonction de la présence d'un diabète, d'une infection ou d'un traitement pouvant influencer les paramètres immunitaires (corticoïdes per os ou inhalés, anti-inflammatoires).

2. Patients et méthodes

Il s'agit d'une étude exploratoire, réalisée pendant quatre mois (janvier à mai 2009) dans une unité de court séjour gériatrique. La population étudiée correspondait à des sujets dont l'âge était supérieur à 75 ans, hospitalisés dans le service, n'étant ni sous tutelle ni sous curatelle et ayant la capacité de comprendre les objectifs et le déroulement de l'étude. Cette étude a été réalisée selon les bonnes pratiques cliniques et a reçu l'autorisation d'un comité de protection des personnes. Tous les participants ont signé un consentement éclairé.

2.1. Données socio-démographiques, cliniques et paracliniques

Pour chaque patient ont été recueillis : l'âge, le sexe, les antécédents médicaux (notamment infection, cancer, maladie inflammatoire et auto-immune, diabète, hémopathie...), l'ensemble des traitements (à l'admission, pendant l'hospitalisation et à la sortie), et le diagnostic de sortie.

Tous les patients ont bénéficié à l'inclusion d'un examen clinique et d'une évaluation gérontologique standardisée comprenant : l'état nutritionnel (indice de masse corporelle (IMC), albuminémie et Mini-Nutritional Assessment (MNA) [7]), l'état cognitif (Mini-Mental-State (MMS) [8]), l'état thymique (mini-GDS [9]), l'autonomie (échelles « Activities of Daily Life » (ADL) [10], « Instrumental Activities of Daily Life » (IADL) [11] et « get up and go test » [12]) et l'équilibre (temps de station unipodale >5 secondes), ainsi qu'une évaluation sociale (situation maritale, mode de vie, conditions d'isolement ou non, aides au domicile).

Chaque patient a bénéficié d'un prélèvement sanguin le jour de l'inclusion comportant : numération formule sanguine, ionogramme, créatininémie, albuminémie, protéine-C-réactive, dosage de la vitamine D, et d'un bilan de l'immunité humorale (dosage pondéral des immunoglobulines, électrophorèse des protéines sérique complétés par une immunofixation ou dosage des sous-classes d'IgG en cas d'anomalie), une sérologie VIH-1 et VIH-2 et un phénotypage lymphocytaire. Le dosage pondéral des immunoglobulines a été effectué par néphélométrie et les valeurs normales sont celles de « l'international federation of clinical chemistry » [13]. L'analyse immunophénotypique des lymphocytes circulants a été réalisée sur sang total par cytométrie de flux (FACS, Beckman Coulter) avec des anticorps monoclonaux marqués : anti-CD2–phycoerythrin (PE), anti-CD19–fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD3–phycocyanin 5, anti-CD4–PE, anti-CD8–PE Texas Red, anti-CD45–FITC, anti-CD16–FITC, anti-CD56–PE, (Beckman Coulter). Les valeurs normales ont été obtenues à partir d'une cohorte de sujets sains et considérées entre le 10^{e} et le 90^{e} percentile (tableau 1) [14].

2.2. Sous-groupes de patients étudiés

Trois sous-groupes de sujets ont été définis :

- Un groupe de sujets diabétiques définis par les critères OMS de 1999 [15].
- Un groupe de sujets infectés correspondant à des sujets présentant un diagnostic de pneumopathie ou de bronchite ou d'infection urinaire définies ci-après. Le diagnostic de pneumopathie infectieuse était retenu devant l'existence d'au moins un critère dit

majeur (toux, fièvre, expectoration purulente) ou de 2 critères mineurs (dyspnée, douleur pleurale, confusion, hyperleucocytose supérieure à 12 G/l) associés à un infiltrat radiologique récent [16]. Le diagnostic de bronchite ou d'exacerbation de bronchite chronique obstructive (BPCO) était retenu devant la recrudescence ou la majoration d'un des symptômes suivants : toux, expectoration purulente, dyspnée [16]. Le diagnostic d'infection urinaire (pyélonéphrite aiguë, cystite aiguë) était retenu selon les critères de l'AFSSAPS [17].

- Un troisième sous-groupe de sujets recevant un traitement pouvant influencer l'immunité (traitement par corticothérapie per os ou inhalée, anti-inflammatoires non stéroïdiens).

2.3. Définitions retenues

- La dénutrition était définie par la présence d'un ou plusieurs des critères suivants selon les recommandations de la HAS de 2007 : une albuminémie <35 g/l et/ou un IMC <21 ou un MNA <17/30. Elle était considérée comme sévère lorsque l'albuminémie était <30 g/l ou l'IMC <18 [18].
- Les diagnostics de démence et de dépression étaient définis par les critères du DSM-IV [19].
- Un patient était défini comme *polypathologique* lorsqu'ils présentait au moins trois pathologies chroniques, comme *polymédiqué* lorsqu'il recevait au moins trois traitements différents et comme *dépendant* lorsque le score ADL était <3.
- Les données biologiques ont été définies comme pathologiques en fonction des valeurs de référence fournies par les laboratoires associés à l'étude. Les valeurs de référence des sous populations lymphocytaires sont détaillées dans le tableau 1.

2.4. Analyses statistiques

Les données ont été traitées de façon anonyme. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le seuil de significativité a été fixé à 5%. Dans un premier temps, une description de l'échantillon d'étude a été réalisée. Les variables continues étaient exprimées sous forme de moyenne ± écart type lorsque la distribution suivait une loi normale, sous forme de médiane et 25/75^{e} percentiles lorsque la distribution ne suivait pas une loi normale. Les variables qualitatives étaient présentées sous forme d'effectifs et de pourcentages.

Dans un second temps, des analyses comparatives ont été réalisées entre les sous-groupes de sujets définis précédemment : patients diabétiques, avec infection ou recevant un traitement pouvant influencer l'immunité. Les paramètres quantitatifs ont été comparés à l'aide du test t de Student ou du test non paramétrique de Mann-Whitney lorsque les conditions d'utilisation du test t n'étaient pas remplies. Les paramètres qualitatifs ont été comparés à l'aide des tests de Chi2 ou exacts de Fisher.

3. Résultats

3.1. Caractéristiques de la population

Les 51 patients (35 femmes et 16 hommes) inclus avaient une moyenne d'âge de 84 ± 5 ans (75 à 98 ans). La répartition par tranche d'âge comprenait : 9 patients âgés de 75 à 79 ans, 26 patients de 80 à 85 ans, 10 patients de 86 à 90 ans et 6 patients âgés de plus de 90 ans.

Les patients rapportaient respectivement une moyenne de 3 ± 1,9 et 4 ± 2 antécédents chirurgicaux et médicaux. Un antécédent de pathologie maligne en rémission était noté chez 8 patients. Deux patients présentaient respectivement une thrombocytémie essentielle et un lymphome malin non hodgkinien de bas grade évoluant depuis 12 ans. Sept patients (14%) avaient une maladie inflammatoire ou auto-immune (thyroïdite Hashimoto, anémie Biermer, myasthénie associée à une maladie Basedow, polyarthrite de type RS3PE, maladie de Horton, polyarthrite rhumatoïde associée à un syndrome de Gougerot-Sjögren et pemphigoïde bulleuse). Trente-deux patients (63%) étaient traités pour hypertension artérielle.

A l'admission, 96% des patients étaient polymédiqués, avec une moyenne de 7 ± 3 traitements par patient. Quatre patientes recevaient un traitement par anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) soit au long cours pour des douleurs arthrosiques (n=3) soit en cure courte pour un lumbago aigu (n=1). Six patients recevaient une corticothérapie orale, avec des doses variant de 5 à 50 mg/j, pour une pseudo-polyarthrite rhizomélique, une maladie de Horton, une myasthénie, une polyarthrite de type RS3PE, une polyarthrite rhumatoïde ou des polyarthralgies diffuses non étiquetées. Un patient prenait une corticothérapie inhalée pour une bronchopathie chronique obstructive.

Parmi les 51 patients, 23 (45%) étaient hospitalisés pour une pathologie infectieuse, dont 13 pneumopathies, 3 bronchites aiguës ou exacerbations de bronchite chronique obstructive et 9 infections des voies urinaires. Un patient présentait un abcès péricolique et deux une infection double (pulmonaire et urinaire).

Onze patients (22%) présentaient un diabète de type 2, insulino-requérant pour 9 patients. Parmi 8 de ces 22 patients, on notait une élévation de l'HbA1c à plus de 7%.

Une maladie neuro-dégénérative (démence de type Alzheimer ou apparentée) était probable chez 25 patients (49%), tandis que le MMS était anormal chez 39 patients, expliqué par la présence d'un syndrome confusionnel d'origine plurifactorielle (pathologie aiguë, hospitalisation, médication).

Un syndrome dépressif était observé chez 29 patients (56,8%) et une dépendance chez 22 (43%). La station unipodale était impossible à réaliser pour 42 patients et le « get up and go test » était irréalisable pour 29 d'entre eux (57%). Neuf patients présentaient également des chutes à répétition.

Trente-quatre patients (67%) étaient dénutris dont 14 (28%) présentant une dénutrition sévère. Au total, 46 (90%) de ces patients étaient polypathologiques.

Parmi les anomalies biologiques constatées, une carence en vitamine D était fréquemment retrouvée : 69% en considérant comme valeur seuil 16 ng/ml (valeur du laboratoire), 94% en considérant comme valeur seuil les nouvelles valeurs cibles proposées dans la littérature soit 30 ng/ml [20]. La sérologie VIH était négative chez tous les patients.

3.2. Anomalies immunitaires

3.2.1. Lymphopénie

Une lymphopénie, était documentée chez 21 patients (41%) parmi lesquels 6 avaient des lymphocytes <1000/mm³. Les patients lymphopéniques n'étaient pas plus dénutris que les non lymphopéniques (71% et 67%, respectivement, p=0,718), mais présentaient plus souvent une carence en vitamine D (86% et 57%, respectivement, p=0,028), notamment en cas de lymphopénie B (p=0,013). Le nombre de patients déments n'était pas différent selon l'existence ou non d'une lymphopénie (33% chez les sujets lymphopéniques, contre 60%, p=0,061). Par contre, les patients avec une lymphopénie T CD8 étaient moins souvent atteints de démence (25%, contre 56%, p=0,050).

3.2.2. Répartitions des anomalies du phénotypage lymphocytaire

Un phénotypage lymphocytaire anormal était noté chez 38 patients (75%), plusieurs anomalies étant associées chez 18 d'entre eux (figure 1).

Dix-neuf patients présentaient une lymphopénie B, isolée (10 cas) ou associée à d'autres anomalies (9 cas : lymphopénie T CD4, T CD8, NK, ou hyperlymphocytose TCD8).

Cinq patients (9,8%) présentaient une lymphopénie T CD4. Un seul avait des CD4 <200/mm³, il présentait un tableau infectieux avec double foyer pulmonaire et urinaire, et un diabète de découverte fortuite.

L'inversion du rapport CD4/CD8 <1, classiquement associée au « phénotype à risque immunologique » n'a été retrouvée que chez 6 patients (12%) [21,22].

Une augmentation des lymphocytes T mémoire (CD45RO+) et une diminution parallèle des lymphocytes T naïfs (CD45RA+) avec augmentation du rapport cellules mémoire / cellules naïves (>1) était documentée chez 41 patients (80,3%).

Les patients de plus de 85 ans présentaient un phénotypage anormal dans 95% des cas contre 59% chez les moins de 85 ans (p=0,003) (Figure 2).

3.2.3. Électrophorèse des protéines

Quatre patients (7,8%) présentaient une gammapathie monoclonale de type MGUS (monoclonal gammopathy of undeterminated signification).

Une anomalie quantitative ou qualitative du dosage pondéral des immunoglobulines était observée chez 22 patients (43,1%) :

- augmentation polyclonale du taux sérique des IgA chez 12 patients (24%) avec une moyenne de 2,92 g/l ± 1,55g/l,
- augmentation polyclonale discrète du taux d'IgG chez 2 patients,
- déficit en IgG chez 3 patients (comprenant un déficit combiné en IgG1 et IgG3 chez un patient et en IgG1, IgG2 et IgG4 chez un autre),
- diminution des taux d'IgM en dessous des valeurs seuils pour 5 patients avec une moyenne de 0,96 g/l ± 1,36 g/l.

Au total, l'immunité cellulaire et humorale était anormale chez 44 patients (86%).

3.3. Analyse en sous-groupes

On notait un nombre plus important de pathologies chroniques parmi les patients avec lymphopénie B (en moyenne 4,5 contre 3,4 en l'absence de lymphopénie, p=0,013) et un nombre de pathologies aiguës plus important chez les patients avec lymphopénie CD4 (en moyenne 3,2 contre 2,2, p=0,036).

Les 22 patients diabétiques présentaient certaines particularités immunitaires comparativement aux sujets non diabétiques, détaillées dans le tableau 2 : un nombre de lymphocytes NK plus bas (160 ± 78/mm³ versus 248 ± 138/mm³ ; p=0,040) ; une augmentation du taux des IgA (3,6 ± 1,2 g/l versus 2,8 ± 1,6 g/l ; p=0,031) ; une augmentation

des lymphocytes mémoire (573 ± 265 /mm³ versus 368 ± 203/mm³ ; p=0,014) ; une carence en vitamine D dans 100% des cas (p=0,050).

Par rapport aux 28 sujets non infectés, les 23 patients infectés, présentaient plus souvent une lymphopénie et une dénutrition (tableau 2).

Les patients recevant un traitement par corticoïdes ou AINS (n=11) présentaient plus souvent une lymphopénie B (p=0,037) et un taux de lymphocytes CD4 significativement supérieur à celui des patients ne recevant pas ces traitements (p=0,031) (tableau 2).

Dans cette étude, on ne notait pas de corrélation entre les paramètres immunologiques (existence d'une lymphopénie, d'une diminution des sous-populations lymphocytaires, une diminution du rapport CD4/CD8 ou d'une augmentation des lymphocytes mémoires) et certains paramètres comme la dépendance, les chutes à répétition, l'impossibilité de maintenir une station unipodale ou de réaliser le « get up and go test ».

4. Discussion

L'immunosénescence, définie par les changements immunitaires liés à l'âge, est caractérisée par un déclin non homogène, certaines fonctions étant altérées comme l'immunité cellulaire alors que d'autres paraissent augmentées comme l'immunité innée [23]. Les faits les plus marquants du vieillissement immunitaire sont des modifications des populations lymphocytaires avec accumulation de lymphocytes mémoire, une baisse des réponses prolifératives et la présence d'un état inflammatoire chronique. La charge antigénique chronique tout au long de la vie est à l'origine de lacunes dans le répertoire antigénique induisant une plus grande susceptibilité aux nouveaux antigènes [23].

L'intrication entre immunosénescence et pathologie est un phénomène important à prendre en considération et le retentissement de la pathologie sur le vieillissement immunitaire est mal connu.

L'objectif de cette étude prospective était de décrire certains paramètres de l'état immunitaire de patients âgés de 75 ans ou plus, hospitalisés dans une unité de court séjour gériatrique. Ce travail nous semble original car peu de données ont été rapportées sur l'influence de la polypathologie sur l'immunité [24-26]. Ces études incluaient généralement un petit nombre de patients et concluaient à l'impact des comorbidités [25] et du stress inflammatoire et métabolique sur l'immunité [26].

Notre étude, menée sur une population particulièrement fragile, polypathologique, polymédiquée, d'une moyenne d'âge de 84 ans, retrouve une prévalence de 86% d'anomalies

immunitaires (cellulaire et/ou humorale) avec des anomalies cellulaires quasi constantes à partir de 85 ans (95% de phénotypages anormaux).

Parmi les anomalies immunitaires retrouvées, la lymphopénie concernait 41% des patients. Elle était plus fréquente chez les patients infectés mais contrairement à ce qui est attendu, elle n'était pas plus fréquente chez les patients dénutris. Ces anomalies pourraient favoriser la survenue d'infections qui représentent la première cause de mortalité chez les sujets âgés [23]. L'insuffisance relative en vitamine D semble être un facteur important associé à la lymphopénie B en particulier puisque les patients avec des taux de vitamine D inférieurs à 30 ng/ml étaient plus fréquemment lymphopéniques. La carence en vitamine D est fréquente parmi nos patients avec une prévalence de 69% si nous considérons la valeur seuil de 16 ng/ml et de 94% si nous utilisons les nouvelles valeurs cibles proposées par Holick (30 ng/ml) [20]. L'hypovitaminose D est également corrélée avec une dénutrition et avec la présence d'une lymphopénie B associée statistiquement à une carence en vitamine D dans 89% des cas laissant supposer que la carence en vitamine D pourrait favoriser une lymphopénie B. Il aurait été intéressant de pouvoir recontrôler ces anomalies après recharge en vitamine D.

La 1-25 dihydroxy-vitamine D3, forme active de la vitamine D est un immuno-modulateur reconnu [20] et une carence en vitamine D favorise une plus grande susceptibilité à certaines infections [27]. Lorsque les taux sériques de vitamine D sont inférieurs à 20 ng/ml, l'initiation de la réponse immune innée est défectueuse, entraînant un risque majoré de tuberculose et de formes plus sévères de la maladie [27,28]. Le récepteur à la vitamine D, un membre de la super famille des récepteurs hormonaux nucléaires, est présent sur les lymphocytes T, B et sur les cellules dendritiques [28]. La 1-25 dihydroxy vitamine D3 peut également favoriser la migration de cellules dendritiques, activées à partir des sites d'infection ou de vaccination, vers les organes lymphoïdes secondaires créant ainsi des conditions favorables à la réponse immune adaptative [29]. L'activation de cellules B induit également l'expression du gène de la 25-hydroxyvitamine-D3-1α-hydroxylase (CYP1α). Ces cellules B génèrent et sécrètent des quantités significatives de vitamine D3 (calcitriol) [30].

Ces résultats nous semblent intéressants car ils posent la question de l'intérêt d'un traitement substitutif pour améliorer les performances immunitaires des sujets âgés et en particulier la lymphopénie. Ils confortent également les arguments de Holick selon lesquels les valeurs cibles de vitamine D à atteindre sont plutôt 30 ng/ml que 20 ng/ml [20].

Parmi les autres anomalies notables, nous constatons une diminution des lymphocytes T naïfs (CD45RA+) et une augmentation parallèle des lymphocytes T mémoire (CD45RO+) avec un rapport cellules naïves/cellules mémoire inférieur à 1 dans 80% des cas. L'inversion de ce rapport représente une des caractéristiques du vieillissement immunitaire et explique l'altération du répertoire antigénique avec l'âge [2,3]. En effet, avec l'atrophie thymique associée au vieillissement, on observe des changements des populations lymphocytaires T avec le passage progressif d'un état ou les cellules naïves dominent à un état où dominent les cellules mémoires. La réduction du renouvellement des cellules naïves (CD45RA+) dérivées du thymus est progressivement comblée par une expansion homéostatique des cellules mémoires (CD45RO+) favorisant la restriction du répertoire antigénique et l'immunosénescence. Par ailleurs, on note une expansion de clones spécifiques d'infections persistantes comme l'Epstein Barr Virus et le cytomégalovirus [23].

En revanche, malgré la grande fragilité de notre population, l'inversion du rapport CD4/CD8 associée au phénotype de vieillissement immunitaire est plus faible que ce qui est décrit dans la littérature (12% dans notre étude, versus 16% dans l'étude de Wikby et al. [22]).

Une lymphopénie B est retrouvée chez 37% de nos patients. Des variations individuelles des lymphocytes B sont décrites dans la littérature mais le déclin modéré des lymphocytes B est classique [31]. Cependant l'augmentation du nombre de lymphocytes B CD19+ est associée à une meilleure survie [32]. Dans notre étude, la lymphopénie B est corrélée au nombre de pathologies chroniques puisque ces patients ont en moyenne 4,5 pathologies chroniques contre 3,4 pour les autres (p=0,013). Ces résultats sont originaux et n'ont à notre connaissance jamais été rapportés.

Dans cette étude, on note également une diminution du nombre de démences chez les sujets lymphopéniques T CD8 (25% vs 56%, p=0,050), suggérant une association entre diminution du risque de démence et lymphopénie CD8. Des anomalies immunitaires divergentes ont été décrites au cours de la démence de type Alzheimer comme une lymphopénie [33], une diminution des lymphocytes CD3+ et CD19+ ainsi que des lymphocytes T CD8+ [34], et une augmentation des lymphocytes T CD8+ [35,36]. Dans l'étude de Spéciale et al., il est retrouvé une augmentation de la prévalence des lymphocytes T CD8+CD28+ parmi les patients atteints de démence de type Alzheimer alors que le nombre de lymphocytes T CD8+CD28- est diminué [36]. Aucune étude n'a décrit de diminution significative des démences parmi les patients lymphopéniques, en particulier les lymphocytes T CD8+. Ces résultats pourraient

s'expliquer par la physiopathologie « neuro-inflammatoire » de la maladie d'Alzheimer mais sont insuffisants pour tirer des conclusions.

Concernant les immunoglobulines, nous remarquons une augmentation des IgA dans 24% des cas, ce qui est comparable aux données de la littérature [37]. Il en est de même pour la prévalence des gammapathies monoclonales de type MGUS de 7,8% [38].

Chez les patients diabétiques de cette étude, on note une augmentation significative du taux d'IgA comme cela a déjà été souligné dans la littérature [39-41]. L'augmentation des IgA pourrait être associée aux complications du diabète en particulier vasculaires [40]. Par contre nous n'avons pas observé d'étude retrouvant des anomalies des lymphocytes NK et mémoire chez les patients diabétiques. Une étude récente a objectivé un vieillissement thymique prématuré chez des souris et patients obèses avec diminution du renouvellement des lymphocytes naïfs et accumulation homéostatique de lymphocytes mémoire [42].

Dans cette étude, il n'est pas mis en évidence de lien entre la sédentarité et les paramètres immunologiques contrairement à ce qui a déjà été cité dans la littérature [43] cependant il s'agit d'une population extrêmement fragile, très dépendante et en nombre insuffisant pour dégager certaines différences.

Parmi les facteurs environnementaux classiquement responsables d'anomalies secondaires du système immunitaire figure la dénutrition, phénomène extrêmement fréquent en gériatrie. Pourtant aucun lien statistique entre dénutrition et anomalies immunitaires n'est mis en évidence, probablement en raison de la fréquence de la dénutrition dans notre population (67% des patients).

Notre travail comporte des limites. Tout d'abord, l'effectif étudié reste faible, et ne permet qu'une approche exploratoire de l'ensemble de ces phénomènes immunitaires. Les approches multivariées n'ont pu être réalisées, limitant la compréhension des liens décrits entre les paramètres immunitaires et certains paramètres comme les thérapeutiques ou les pathologies associées. De même un certain nombre de nos résultats, peu décrits dans la littérature, comme par exemple le lien entre lymphopénie et carence en vitamine D ou avec la maladie d'Alzheimer, nécessiteront d'être de nouveau documentés dans des études de plus grande envergure, sur des populations ayant des profils différents. L'extrapolation de nos résultats à l'ensemble de la population âgée doit être prudente au regard du recrutement spécifique de nos sujets au sein d'une unité de gériatrie et après exclusion des patients incapables de signer un consentement écrit. Enfin, il s'agit d'une étude partielle de l'immunité, les tests fonctionnels en particulier d'étude de prolifération des lymphocytes en présence de mitogènes, les fonctions macrophagiques et des polynucléaires, les dosages de cytokines

d'intérêt clinique (IL-1, IL-6, TNF-α, etc.) et des sous-fractions du complément n'ont pas été réalisés. De même chez ces patients dénutris, les dosages d'autres micro-nutriments (vitamines A, E, zinc) pouvant être impliqués dans le déficit immunitaire du sujet âgé, n'ont pas été réalisés [23].

En conclusion, nous confirmons que les anomalies du système immunitaire sont très fréquentes chez les personnes âgées polypathologiques et augmentent avec l'âge. Contrairement à d'autres études, nous n'avons pas retrouvé de lien entre anomalie immunitaire et dénutrition. L'impact de la carence en vitamine D sur le vieillissement immunitaire mérite d'être mieux exploré. A côté de l'« IRP » (« immune risk profile ») décrit par les Suédois [22], les anomalies de l'immunité pourraient constituer un nouveau marqueur de fragilité chez le sujet âgé en particulier la lymphopénie totale et B. La carence en vitamine D pourrait jouer un rôle dans les anomalies immunitaires de sujets âgés fragiles.

Conflit d'intérêt : aucun.

Références

1- Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. Immunology 2007;120:435-46.

2- Bürkle A, Caselli G, Franceschi C, Mariani E, Sansoni P, Santoni A, et al. Pathophysiology of ageing, longevity and age related diseases. Immun Ageing 2007;4:4.

3- Lesourd B. Modification de la réponse immune chez le sujet âgé. Rev Rhum 2004;71:446-54.

4- Pawelec G. Immunosenescence: impact in the young as well as the old? Mech Ageing Dev 1999;108:1-7.

5- Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, et al. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the senieur protocol. Mech Ageing Dev 1984;28:47-55.

6- Wick G, Grubeck-Loebenstein B. The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly. Exp Gerontol 1997;32:401-13.

7- Guigoz Y, Vellas B, Garry PJ. Mininutritional assessment: a practical assessment tool, for grading the nutritional status of elderly patients. In: Facts, Research and Interventions in Geriatrics 1997. New York : Springer Publishing;1997. p.15-60.

8- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. The Folstein Minimental State Examination: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psych Res 1975;12:189-98.

9- Katz IR. What should we do about undertreatment of late life psychiatric disorders in primary care. J Am Ger Soc 1998;46:1573-5.

10- Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW. Studies of illness in the aged. The Index of ADL: a standardized measure of biological and psychosocial function. JAMA 1963;165:914-9.

11- Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: self-maintaining and Instrumental Activities of Daily Living. Gerontologist 1969;9:179-86.

12- Mathias S, Nayak US, Isaacs B. Balance in elderly patients: the “get up and go” test. Arch Phys Med Rehabil 1986;67:387-9.

13- Dati F, Schumann G, Thomas L, Aguzzi F, Baudner F, Bienvenu J, et al. Consensus of a group of Professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470). International Federation of Clinical Chemistry. Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities. College of American Pathologists. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:517-20.

14- Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WCJ, Groeneveld K, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood- references values for lymphocytes subpopulations. J Pediatr 1997;130:388-93.

15- World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Org.1999. Consultable sur: http//www.who.int/diabetes/publications.

16- Prise en charge des infections des voies respiratoires basses de l’adulte immunocompétent. XV^{e} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française Med Mal Inf 2006;36:235-44.

17- Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires chez l’adulte - Recommandations de bonne pratique - AFSSAPS 23/06/2008. Consultable sur :http://www.afssaps.sante.fr

18- Stratégie de prise en charge en cas de dénutrition protéino-énergétique chez la personne âgée - Recommandations de la Haute Autorité de Santé de 2007. Consultable sur :http://www.has-sante.fr
19- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manuel of mental disorders.4th, ed-Text Revision. Washington, (DC): American Psychiatric Publishing 2000.
20- Holick M F. Vitamin D Deficiency. N Engl J Med 2007;357:266-81.
21- Castle S, Uyemura K, Fulop T, Makinodan T. Host resistance and immune responses in advanced age. Clin Geriatr Med 2007;23:463-79.
22- Wikby A, Mansson IA, Johansson B, Strindhall J, Nilsson SE. The immune risk profile is associated with age and gender : findings from three Swedish population studies of individuals 20-100 years of age. Biogerontology 2008;9:299-308.
23- Crétel E, Veen I, Pierres A, Bongrand P, Gavazzi G. Immunosenescence and infections, myth or reality? Med Mal Inf 2010;40:307-18.
24- Fulop T, Pawelec G, Castle S, Loeb M. Immunosenescence and vaccination in nursing home residents. Clin Infect Dis 2009;48:443-8.
25- Castle SC, Uyemura K, Rafi A, Akande O, Makinodan T. Comorbidity is a better predictor of impaired immunity than chronological age in older adults. JAGS 2005;53:1565-9.
26- Belmin J, Ortega MN, Bruhat A, Mercadier A, Valensi P. CD4 lymphopenia in elderly patients. Lancet 1996;30:911-2.
27- Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamine D-mediated human antimicrobial response. Science 2006;311:1770-3.
28- Bornman L, Campbell SJ, Fielding K, Bah B, Sillah J, Gustafson P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. J Infect Dis 2004;190:1631-41.
29- Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. TLR-induced local metabolism of vitamine D3 plays an important role in the diversification of adaptative immune responses. J Immunol 2009;182:4296-305.
30- Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, Zügel U, Zuberbier T, et al. 1.25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. Eur J Immunol 2008;38:2210-8.
31- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto F, Modesti M, et al. Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis. Am J Hematol 2001;67:63-72.
32- Huppert FA, Pinto EM, Morgan K, Brayne C. Survival in a population sample is predicted by proportions of lymphocyte subsets. Mech Ageing Dev 2003;124:449-51.
33- Dysken MW, Minichiello MD, Hill JL, Skare S, Little JT, Molchan SE, et al. Distribution of peripheral lymphocytes in Alzheimer patients and controls. J Psychiatr Res 1992;26:213-8.
34- Richarts-Salzburger E, Batra A, Stransky E, Laske C, Kölher N, Bartels M, et al. Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease. J Psychiatr Res 2007;41:174-8.
35- Schindowski K, Eckert A, Peters J, Gorriz C, Schramm U, Weinandi T, et al. Increased T-cell reactivity and elevated levels of CD8+ memory T-cells in Alzheimer's disease-patients and T-cell hyporeactivity in an Alzheimer's disease-mouse model: implications for immunotherapy. Neuromolecular Med 2007;9:340-54.
36- Speciale L, Calabrese E, Saresella M, Tinelli C, Mariani C, Sanvito L, et al. Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. Neurobiol Aging 2007;28:1163-9.
37- Listi F, Candore G, Modica MA, Russo M, Di Lorenzo G, Esposito-Pelliterri M, et al. A Study of serum immunoglobulin levels in elderly persons that provides new insights into B cell immunosenescence. Ann NY Acad Sci 2006;1089:487-95.

38- Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammapathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood 2009;113:5412-7.
39- Rodriguez-Segade S, Camina MF, Carnero A, Lorenzo MJ, Alban A, Quinteiro C, et al. High serum IgA concentrations in patients with diabetes mellitus : agewise distribution and relation to chronic complications. Clin Chem 1996;42:1064-7.
40- Figueredo A, Ibarra JL, Rodriguez A, Molino AM, Gomez-de la Concha E, Fernandez-Cruz A, et al. Increased serum levels of IgA antibodies to hsp70 protein in patients with diabetes mellitus: their relationship with vascular complications. Clin Immunol Immunopathol 1996;79:252-5.
41- Ardawi MS, Nasrat HA, Bahnassy AA. Serum immunoglobulin concentrations in diabetic patients. Diabet Med 1994;11:384-7.
42- Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, Butler AA, et al. Obesity accelerates thymic aging. Blood 2009;29:3803-12.
43- Senchina DS, Kohut ML. Immunological outcomes of exercise in older adults. Clin Interv Aging 2007;2: 3-16.

Tableaux et figures

Tableau 1. Valeurs de références des sous-populations lymphocytaires.

Tableau 2. Comparaison des groupes de patients infectés, diabétiques ou traités par anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) ou corticoïdes (per os ou par voie inhalée).

Figure 1. Répartition des anomalies des phénotypages lymphocytaires.

Figure 2. Répartition des phénotypages anormaux en fonction de l'âge.

Table

Tableau 1. Valeurs de références des sous-populations lymphocytaires

Type de lymphocyte	Valeurs de référence du laboratoire
Lymphocytes totaux	1500 à 4000/mm³
Lymphocytes T (CD3+)	700 à 1900/mm³
Lymphocytes T CD4+	400 à 1300/mm³
Lymphocytes T CD8+	200 à 700/mm³
Lymphocytes B	100 à 400/mm³
Lymphocytes NK	100 à 400/mm³

Table

Tableau 2. Comparaison des groupes de patients infectés, diabétiques ou traités par anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) ou corticoïdes (per os ou par voie inhalée).

	Patients avec infection (n=23)	Patients sans infection (n=28)	p	Patients avec traitement par corticoïde ou AINS (n=11)	Patients sans traitement corticoïde ou AINS (n=40)	p	Patients diabétiques (n=11)	Patients non diabétiques (n=40)	p
Age moyen (ans)	86	83	0,082	83	85	0,282	83	85	0,282
Antécédents de pathologie maligne ou d'hémopathie	5 (22%)	5 (18%)	0,739	1 (9%)	9 (23%)	0,428	4 (36%)	7 (18%)	0,222
Dénutrition	19 (83%)	15 (54%)	0,029*	6 (55%)	19 (48%)	0,679	4 (36%)	30 (75%)	0,028
Dénutrition sévère	9 (39%)	5 (18%)	0,090*	3 (27%)	11 (28%)	1	2 (18%)	12 (30%)	0,705
Diabète	4 (17%)	7 (25%)	0,734	4 (36%)	7 (18%)	0,222			
Infection				4 (36%)	19 (48%)	0,734	4 (36%)	19 (48%)	0,734
Traitement par corticoïde ou AINS	4 (17%)	7 (25%)	0,734				4 (36%)	7 (18%)	0,222
Vitamine D <16 ng/ml	16 (70%)	18 (64%)	0,691	5 (46%)	29 (73%)	0,147	9 (82%)	26 (65%)	0,466
Vitamine D <20 ng/ml	18 (78%)	20 (71%)	0,577	8 (73%)	30 (75%)	1	11 (100%)	27 (68%)	0,046*
Vitamine D <30 ng/ml	21 (91%)	27 (96%)	0,583	10 (91%)	38 (94%)	0,526	11 (100%)	37 (93%)	1
Phénotypage anormal	15 (65%)	23 (82%)	0,168	6 (55%)	32 (80%)	0,121	6 (55%)	29 (73%)	0,288
Lymphocytes <1500/mm^3	10 (44%)	11 (39%)	0,03*	4 (36%)	17 (43%)	0,603	4 (36%)	17 (43%)	1
Lymphocytes T <700/mm^3	5 (22%)	4 (14%)	0,714	1 (9%)	8 (20%)	0,663	1 (9%)	8 (20%)	0,663
Lymphocytes B <100/mm^3	10 (44%)	9 (32%)	0,405	1 (9%)	18 (45%)	0,037**	4 (36%)	15 (38%)	1
Lymphocytes NK <100/mm^3	4 (17%)	2 (7%)	0,390	0 (0%)	6 (15%)	0,319	2 (18%)	4 (10%)	0,598
Taux moyen de lymphocytes NK (/mm^3)	214	242	0,222	216	219	0,299	160	248	0,040*
Lymphocytes T CD8 < 200/mm3	5 (22%)	7 (25%)	0,785	3 (27%)	9 (23%)	0,706	2 (18%)	10 (25%)	1
Lymphocytes T CD4 <400/mm^3	4 (17%)	1 (3,6%)	0,162	0 (0%)	5 (13%)	0,572	0	5 (13%)	0,572
Taux moyen de CD4 (/mm^3)	695	924	0,030*	1067	753	0,031**	980	777	0,106
Rapport lymphocytes TCD4/CD8 <1	4 (17%)	2 (7%)	0,39	0 (0%)	6 (15%)	0,319	2 (18%)	4 (10%)	0,598
Taux moyen de lymphocytes mémoires (/mm^3)	369	451	0,186	478	396	0,303	573	368	0,014*
Rapport lymphocytes mémoire/naïfs >1	17 (74%)	24 (86%)	0,316	7 (64%)	34 (85%)	0,193	10 (91%)	31 (78%)	0,428
Taux moyen d'IgA (g/l)	3,2	2,7	0,427	3	2,9	0,686	3,6	2,8	0,031*
Taux moyen d'IgG (g/l)	9,5	11	0,03*	10,4	10,2	0,834	10,5	10,1	0,723
Phénotypage anormal	15 (65%)	23 (82%)	0,168	6 (55%)	32 (80%)	0,121	6 (55%)	29 (73%)	0,288
Anomalie de l'immunité	20 (87%)	24 (86%)	1	9 (82%)	35 (88%)	0,635	10 (23%)	34 (77%)	1

Figure

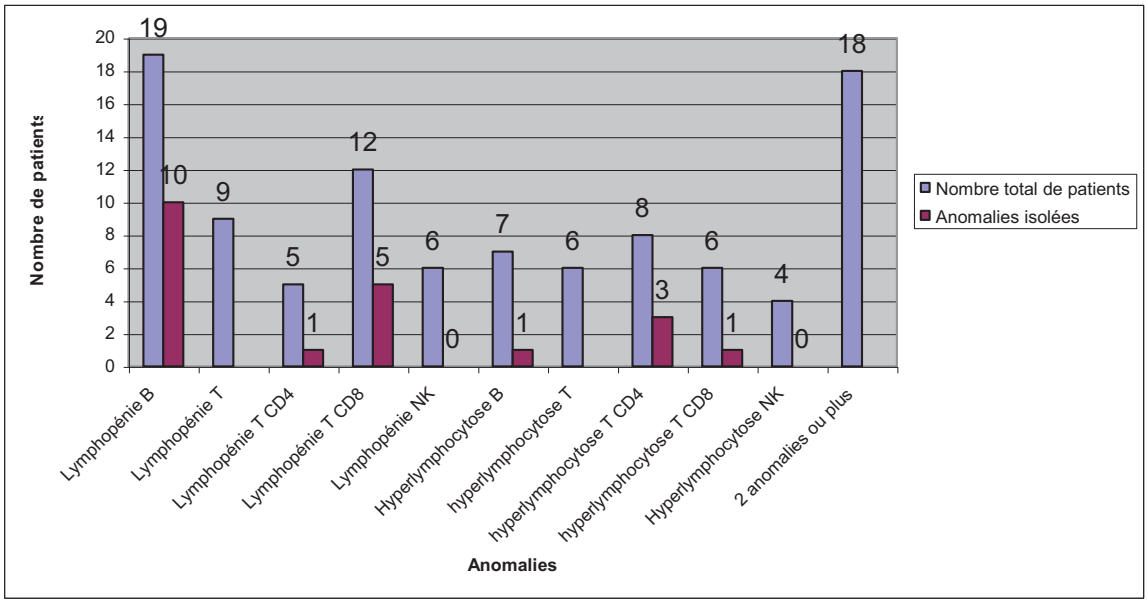


Figure 1. Répartition des anomalies des phénotypages lymphocytaires

Figure

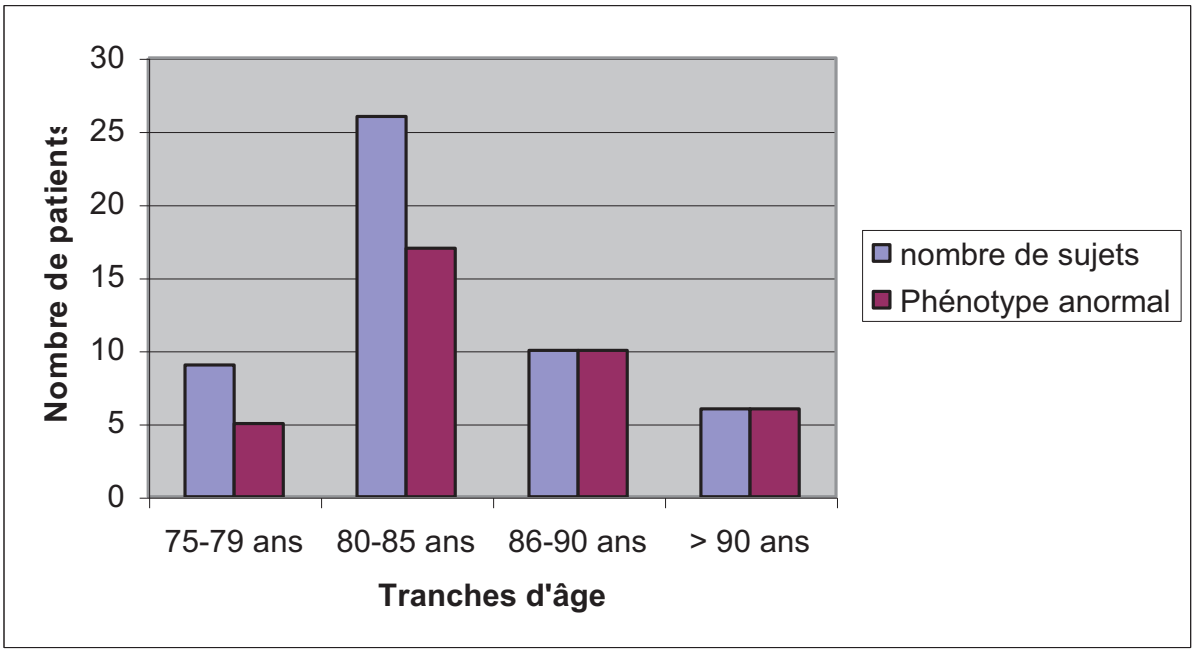


Figure 2. Répartition des phénotypages anormaux en fonction de l'âge