

## Les réponses immunes à médiation cellulaire chez le nouveau-né : vers de nouvelles stratégies vaccinales ciblant les cellules dendritiques ?

*La prévention de maladies infectieuses aussi importantes que la tuberculose et la malaria dépend du développement de vaccins actifs très tôt dans l'existence et si possible dès la naissance. La mise au point de ces nouvelles stratégies vaccinales doit prendre en considération l'immaturité relative du système immunitaire chez le nouveau-né. Dans cet article, nous décrivons l'état actuel des*

*connaissances sur les réponses immunes à médiation cellulaire en début de vie, indiquant que les anomalies principales siègent au niveau des cellules présentatrices d'antigènes. Nous discutons plus particulièrement les données récentes sur le défaut de synthèse de l'interleukine-12 par les cellules dendritiques du nouveau-né et les possibilités de corriger ce déficit.*

La naissance a une profonde influence sur le système immunitaire puisqu'elle marque le passage de la cavité intra-utérine stérile au monde extérieur où les stimulations antigéniques sont permanentes. Dans l'environnement intra-utérin, les réponses immunes sont inhibées, ce qui permet la survie de la greffe allogénique constituée par le fœtus et l'apprentissage de la tolérance au soi. Le système immunitaire du nouveau-né est encore immature, comme en témoigne sa susceptibilité aux infections et ses réponses vaccinales suboptimales [1, 2]. C'est à Medawar que l'on doit la notion de tolérance néonatale, fondée sur l'observation de la survie d'allogreffes de peau chez des souris injectées de cellules allogéniques au cours des 48 premières heures de vie [3]. A l'heure où le développement de nouveaux vaccins applicables dès la naissance apparaît comme une priorité, il est essentiel de revoir ce concept et de préciser les bases moléculaires et cellulaires de l'immaturité immunologique du nouveau-né.

### La tolérance néonatale chez la souris : délétion clonale ou déviation immune ?

La tolérance immune induite par l'injection néonatale d'antigènes a tout d'abord été attribuée à la per-

méabilité du thymus du nouveau-né, conduisant à l'apoptose intrathymique des lymphocytes T spécifiques de ces antigènes [4]. Si ce phénomène de délétion clonale a été raisonnablement établi pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques [5], il est apparu qu'il ne s'applique pas aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> auxiliaires. Pour ces derniers, l'anomalie essentielle documentée après immunisation néonatale est un déséquilibre dans la production de cytokines. En effet, les réponses immunes du souriceau nouveau-né sont caractérisées par un déficit de la synthèse des cytokines de type Th1 (interleukine-2, interféron- $\gamma$ ) qui interviennent dans l'immunité à médiation cellulaire et une surproduction des cytokines de type Th2 (interleukine-4, interleukine-10) qui stimulent la production d'anticorps et inhibent les réponses de type Th1 [6-9]. Cette polarisation vers des réponses Th2 pourrait jouer un rôle important dans la susceptibilité du nouveau-né vis-à-vis de pathogènes intracellulaires et dans le développement précoce de l'atopie causée par les anticorps de classe IgE synthétisés sous l'effet de l'interleukine (IL)-4 et de l'IL-13.

Les causes des anomalies des réponses lymphocytaires T chez le souriceau nouveau-né sont multiples. Une charge antigénique élevée par rapport au nombre restreint de lym-

phocytes T présents dans les organes lymphoïdes à la naissance intervient sans doute puisque la réduction de cette charge permet, dans certains systèmes, de restaurer des réponses comparables à celles de l'animal adulte [10]. Parmi les autres facteurs incriminés, on retiendra la propension à l'apoptose des lymphocytes T néonataux murins, leur production préférentielle d'interleukine-4, et leur défaut d'expression du ligand de la molécule CD40 (CD154) [11, 12]. Cette dernière anomalie inhibe la capacité du nouveau-né à produire de l'IL-12, une cytokine essentielle au développement des réponses de type Th1.

La polarisation Th2 des réponses immunes chez le souriceau nouveau-né n'est pas un phénomène universel puisque des réponses des lymphocytes CD4<sup>+</sup> similaires à celle de l'animal adulte ont été obtenues après injection de certains adjuvants [2], d'IL-12 [13], d'un anticorps anti-CD40 agoniste [12], d'oligonucléotides contenant des motifs CpG [14], de vecteurs vaccinaux vivants [10], de vaccins ADN [15], ou encore de cellules dendritiques [16]. Plus récemment, il a été montré que des lymphocytes T de souriceau nouveau-né étaient capables de produire de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et de résoudre une infection pulmonaire à *Pneumocystis carinii* lorsqu'ils sont placés dans un environnement

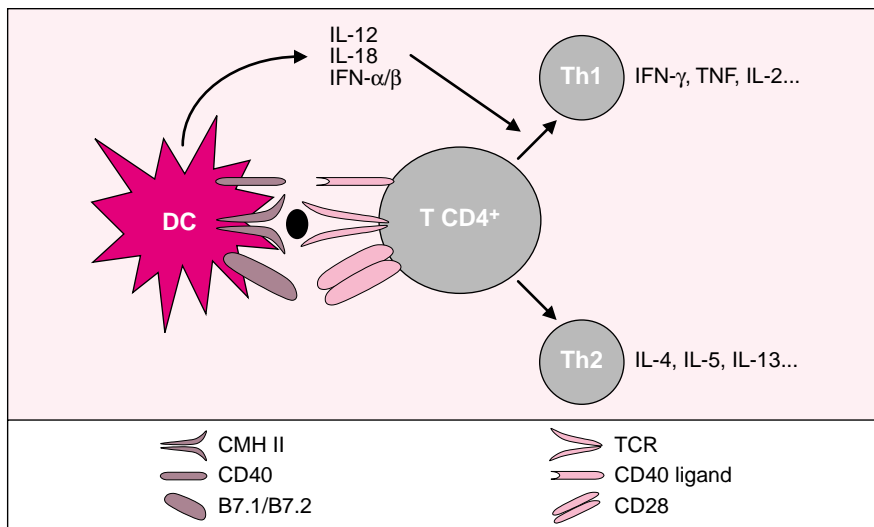


Figure 1. Les cellules dendritiques contrôlent la différenciation des lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup>. Lors d'une réponse immunitaire primaire, les cellules dendritiques présentent aux lymphocytes T auxiliaires naïfs les peptides antigéniques couplés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, (CMH-II) permettant ainsi l'engagement du récepteur de cellule T (TCR) (premier signal). L'activation des lymphocytes T naïfs requiert également la liaison de molécules co-stimulatrices à leur contre-récepteur (B7.1-B7.2/CD28, CD40/CD40L) (second signal). Les conditions de maturation des cellules dendritiques jouent un rôle crucial dans le contrôle de la polarisation Th1-Th2 des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (troisième signal). Le principal facteur régulateur est l'IL-12 mais d'autres cytokines (p. ex. les interférons de type 1 ou l'IL-18) et certaines molécules membranaires interviennent également. La production d'IL-12 par les cellules dendritiques lors de la présentation antigénique permet, via l'activation du facteur de transcription STAT4, la différenciation en cellules effectrices Th1. La différenciation en cellules Th2, est quant à elle, considérée comme une voie par défaut, c'est-à-dire lorsque la présentation antigénique s'effectue en l'absence d'IL-12.

adulte. Ce résultat suggère que la susceptibilité du nouveau-né à l'égard de ce pathogène intracellulaire ne résulte pas d'une immaturité des lymphocytes T mais plutôt d'un défaut de présentation antigénique [17].

#### Le sang du cordon ombilical : un modèle d'étude des lymphocytes T du nouveau-né humain

Les fonctions des lymphocytes T du sang de cordon ombilical ont été abondamment étudiées, en particulier depuis l'utilisation du sang de cordon pour la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. En réponse à des stimulations polyclonales, la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules mononucléées du sang de cordon est nettement inférieure à

celle de sang adulte [18], ce qui pourrait expliquer l'incidence moindre des formes sévères de la maladie du greffon contre l'hôte après greffe allogénique de ces cellules. Cette observation est à mettre en relation avec la prépondérance de lymphocytes T auxiliaires naïfs dans le sang de cordon. En effet, il semble que le phénotype des cellules T naïves CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> soit associé à l'hyperméthylation de certains sites du promoteur du gène de l'IFN- $\gamma$ , rendant celui-ci inactif [19].

Lorsque leur activation dépend, *in vitro* comme *in vivo*, de signaux délivrés par les cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques, monocytes, lymphocytes B), les lymphocytes T du nouveau-né ont une capacité de synthèse des cytokines qui est globalement réduite, bien qu'une

surproduction d'IL-4 ait été rapportée dans certains systèmes [20]. Tout comme chez le souriceau, une insuffisance relative d'expression du ligand de CD40 (CD154) pourrait intervenir dans le défaut des interactions entre lymphocytes T et cellules dendritiques [12,21]. Toutefois, il est important de réaliser que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du sang de cordon peuvent se différencier en cellules effectrices Th1 parfaitement fonctionnelles lorsqu'ils sont stimulés dans des conditions qui ne nécessitent pas l'intégrité des cellules présentatrices d'antigène [22].

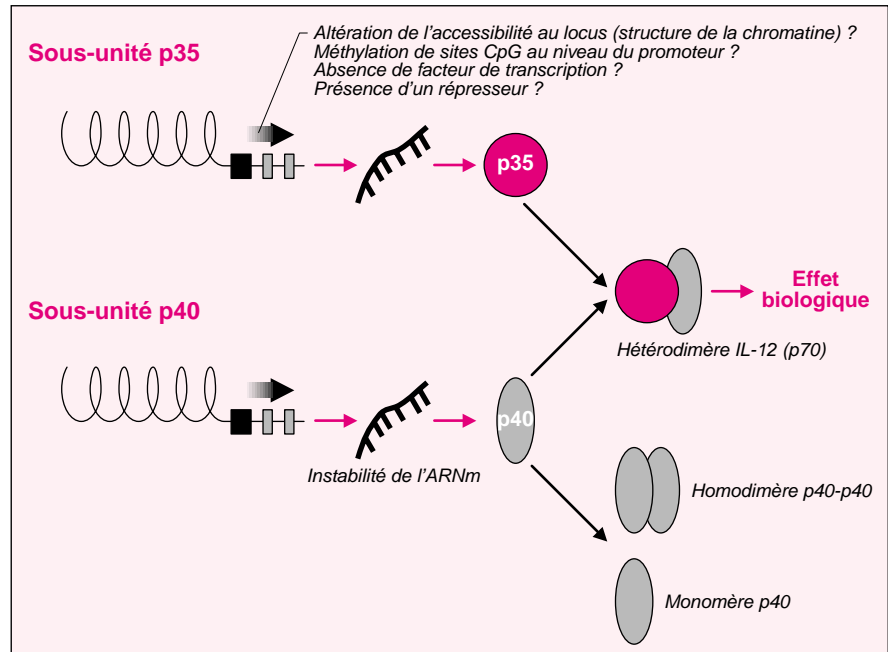
#### L'immaturité des cellules dendritiques : clé de l'immunodéficience néonatale ?

Les données résumées ci-dessus conduisent à s'interroger sur les fonctions des cellules présentatrices d'antigènes chez le nouveau-né. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux cellules dendritiques car ce sont les seules cellules capables de déclencher une réponse immunitaire primaire. Le potentiel immunostimulateur de ces cellules est lié à leur expression membranaire intense des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) qui contiennent les peptides antigéniques, ainsi que des molécules «costimulatrices» de la famille B7 qui délivrent des signaux d'activation essentiels à l'activation des lymphocytes T naïfs. De plus, les cellules dendritiques représentent une source majeure d'interleukine-12, cytokine qui joue un rôle déterminant dans la différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> de type Th1 (figure 1). Présentes dans les tissus non-lymphoïdes dans un état dit « immature », les cellules dendritiques doivent subir un phénomène de maturation pour acquérir leurs propriétés immunostimulantes. Cette maturation est induite par des produits microbiens et des cytokines sécrétées au cours des réactions inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumorale. Ces signaux d'alerte déclenchent également, en synergie avec des chimiokines, la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques où

elles établissent les contacts avec les lymphocytes T.

Le sang du cordon ombilical contient des cellules dendritiques dont la capacité à activer les lymphocytes T est moindre que celle des cellules dendritiques à l'âge adulte [23]. Afin de caractériser le défaut des cellules du nouveau-né, nous avons appliqué au sang de cordon une méthode permettant d'obtenir des quantités importantes de cellules dendritiques à partir de monocytes incubés en présence d'IL-4 et de GM-CSF [24]. Les cellules obtenues se distinguent d'abord des cellules dendritiques d'adulte par une expression membranaire plus faible des molécules HLA de classe II et de deux molécules co-stimulatrices importantes: B7.1 (CD80) et CD40. Cela confirme l'immatunité phénotypique des cellules présentatrices d'antigènes du nouveau-né [23].

Le défaut majeur des cellules dendritiques du nouveau-né a été identifié lors de l'analyse de leur production de cytokines. En effet, nous avons observé que ces cellules stimulées par des produits microbiens sont incapables de synthétiser l'IL-12, molécule dont nous avons déjà mentionné le rôle important dans la différenciation des lymphocytes Th1. La forme bioactive de l'IL-12 (p70) est un hétérodimère composé de deux chaînes (p40 et p35) codées par deux gènes distincts. Nous avons pu attribuer le déficit de production d'IL-12 par les cellules dendritiques du nouveau-né à une absence de transcription du gène codant pour la sous-unité p35 [24]. Ce phénomène a été observé après différents types de stimulation: endotoxine bactérienne, Poly I:C (ARN bicaténaire synthétique analogue à l'ARN viral) ou engagement du CD40 membranaire [29]. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ce déficit sont en cours d'étude (figure 2). Il pourrait s'agir d'une mauvaise activation de certains facteurs de transcription ou d'une inaccessibilité du promoteur du gène à ces facteurs, par exemple suite à des particularités de la structure chromatinienne en début de vie. En outre, il a été montré qu'il existe une instabilité de l'ARNm de la sous-unité p40 dans les cellules mononucléées du



**Figure 2. Le contrôle de l'expression de l'IL-12 chez le nouveau-né s'effectue à différents niveaux.** L'IL-12 est une cytokine composée de deux sous-unités distinctes, p35 et p40 reliées par des ponts disulfures. Seul l'hétérodimère p35-p40 (p70) exerce un effet agoniste sur les cellules exprimant le récepteur de l'IL-12. La sous-unité p40 est produite en large excès et est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme de monomères ou de dimères pouvant jouer un rôle antagoniste. Les cellules mononucléées du sang de cordon ombilical présentent une instabilité de l'ARNm de la sous-unité p40 [25]. D'autre part, la transcription du gène de la sous-unité p35 est perturbée dans les cellules dendritiques (DC) du nouveau-né [24]. Les causes de ce défaut sont encore inconnues: les hypothèses indiquées sur la figure sont en cours d'étude.

sang de cordon, ce qui pourrait également intervenir dans le déficit en IL-12 [25].

Il apparaît donc que des produits permettant de corriger ce défaut de synthèse d'IL-12, pourraient être utilisés en tant qu'adjuvants vaccinaux susceptibles de protéger le nourrisson. D'ores et déjà, nous avons démontré que l'IFN- $\gamma$  permet de restaurer la transcription du gène codant pour la sous-unité p35 dans les cellules dendritiques du nouveau-né et d'induire ainsi la sécrétion d'IL-12 bioactive.

#### Les réponses des lymphocytes T aux vaccins administrés à la naissance

Nous savons peu de choses des réponses immunes à médiation cel-

lulaire induites par la vaccination chez le nouveau-né humain. En raison de la forte incidence de certaines maladies infectieuses au cours des premiers mois de vie et conformément aux recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé, certains vaccins sont administrés à la naissance dans les pays tropicaux. Il s'agit du bacille de Calmette et Guérin (BCG), du vaccin oral contre la poliomyélite et du vaccin contre l'hépatite B. Des travaux menés en Gambie nous ont permis de mieux caractériser les réponses des lymphocytes auxiliaires CD4<sup>+</sup> à ces vaccins. En dépit d'une forte réponse humorale, les nouveau-nés présentent un défaut de production d'IFN- $\gamma$  en réponse au vaccin oral contre la poliomyélite. En revanche, le vaccin

BCG induit une production importante d'IFN- $\gamma$  chez le nouveau-né, comparable à celle qui est observée chez des nourrissons âgés de 4 mois [26]. En réponse à une stimulation *in vitro* par des antigènes mycobactériens solubles, la production d'IFN- $\gamma$  s'est avérée exclusivement dépendante des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [27]. Le nombre des cellules productrices d'IFN- $\gamma$  ainsi que le profil de cytokines produites par des clones CD4<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes mycobactériens étaient comparables chez des enfants immunisés à la naissance et des adultes immuns. Il apparaît donc que le BCG présente des propriétés particulières qui permettent une stimulation efficace du système immunitaire du nouveau-né. La caractérisation des mécanismes moléculaires de l'action du BCG sur le système immunitaire du nouveau-né pourrait donc ouvrir la voie à l'élaboration de nouveaux adjuvants permettant l'induction de réponses immunes à médiation cellulaire dès la naissance. Nous testons actuellement l'hypothèse selon laquelle le BCG corrigerait le défaut de synthèse d'IL-12 par les cellules dendritiques du nouveau-né, soit par un effet direct sur ces cellules, soit indirectement en stimulant la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  spécifiques d'antigènes mycobactériens (figure 3). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  représentent une

sous-population particulière de lymphocytes T qui reconnaissent de nombreux antigènes libérés par des microbes ou des cellules stressées. Or, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont relativement abondants chez le nouveau-né et pourraient jouer un rôle particulièrement important en début de vie, non seulement en assurant une défense de première ligne mais aussi en facilitant l'émergence de réponses Th1 efficaces *via* leurs effets sur les cellules dendritiques.

### Conclusions : vers de nouvelles stratégies d'immunisation néonatale?

Les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé indiquent que chaque année environ 2,5 millions de nourrissons âgés de 1 à 12 mois décèdent de maladies infectieuses. L'immunisation précoce des nourrissons représente la seule stratégie possible pour corriger cette situation désastreuse. Idéalement, une dose de vaccin administrée à la naissance devrait induire une protection de longue durée [2]. La réponse au BCG indique que cet objectif n'est pas utopique. Chez la souris, les stratégies de vaccination néonatale les plus prometteuses reposent sur l'utilisation de vaccins à ADN ou d'oligonucléotides contenant des motifs CpG. Il convient à présent de s'assu-

rer de l'absence de toxicité de ces produits chez l'homme. Nos propres recherches visent à identifier de nouveaux adjuvants ciblant les cellules dendritiques du nouveau-né, sur la base d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables du défaut de production d'IL-12 en début de vie ■

### Remerciements

Ce travail a bénéficié du soutien du Fonds national de la recherche scientifique (Belgique), du Centre de recherche interuniversitaire en vaccinologie créé par GlaxoSmith Kline Biologicals et la région wallonne, d'une action de recherche concertée de la communauté Wallonie-Bruxelles, et du projet NEO-VAC de la commission européenne.

### RÉFÉRENCES

1. Wilson CB. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. *J Pediatr* 1986; 108: 1-12.
2. Siegrist CA. Vaccination in the neonatal period and early infancy. *Int Rev Immunol* 2000; 19: 195-219.
3. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172: 603-6.
4. Nossal GJ, Pike BL. Functional clonal deletion in immunological tolerance to major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3844-7.
5. Feng HM, Glasebrook AL, Engers HD, Louis JA. Clonal analysis of T cell unresponsiveness to alloantigens induced by neonatal injection of F1 spleen cells into parental mice. *J Immunol* 1983; 131: 2165-9.
6. Powell TJ, Streilein JW. Neonatal tolerance induction by class II alloantigens activates IL-4-secreting, tolerogen-responsive T cells. *J Immunol* 1990; 144: 854-9.
7. Schurmans S, Heusser CH, Qin HY, et al. *In vivo* effects of anti-IL-4 monoclonal antibody on neonatal induction of tolerance and on an associated autoimmune syndrome. *J Immunol* 1990; 145: 2465-73.
8. Abramowicz D, Doutrelepon JM, Lambert P, Bruyns C, Goldman M. Increased expression of Ia antigens on B cells after neonatal induction of lymphoid chimerism in mice: role of interleukin 4. *Eur J Immunol* 1990; 20: 469-76.

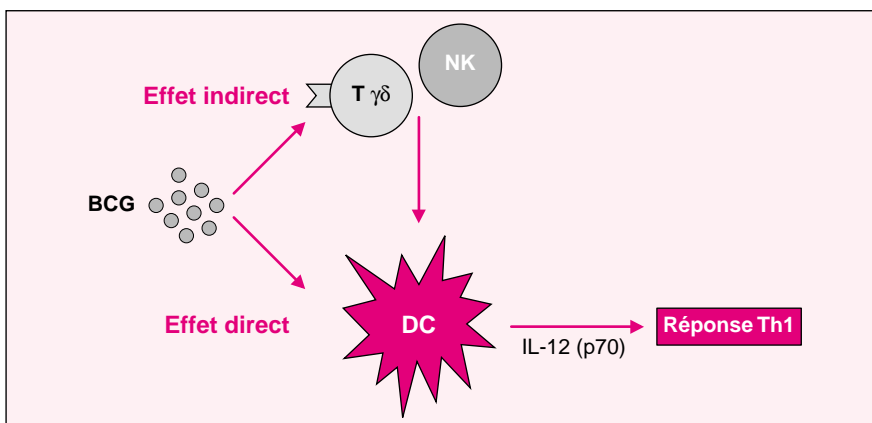


Figure 3. Induction de réponse Th1 chez le nouveau-né par le BCG. Le BCG permettrait le développement de réponses Th1 chez le nouveau-né en induisant la maturation des cellules dendritiques (DC) et la synthèse d'IL-12, soit par action directe sur ces cellules, soit en stimulant la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  spécifiques d'antigènes mycobactériens et/ou les cellules tueuses naturelles (NK).

## RÉFÉRENCES

9. Barrios C, Brawand P, Berney M, *et al*. Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. *Eur J Immunol* 1996 ; 26: 1489-96.
10. Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 1996; 271: 1726-8.
11. Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today* 1999; 20: 330-5.
12. Flamand V, Donckier V, Demoor FX, *et al*. CD40 ligation prevents neonatal induction of transplantation tolerance. *J Immunol* 1998; 160: 4666-9.
13. Donckier V, Flamand V, Desalle F, *et al*. IL-12 prevents neonatal induction of transplantation tolerance in mice. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1426-30.
14. Kovarik J, Bozzotti P, Love-Homan L, *et al*. CpG oligodeoxynucleotides can circumvent the Th2 polarization of neonatal responses to vaccines but may fail to fully redirect Th2 responses established by neonatal priming. *J Immunol* 1999; 162: 1611-7.
15. Martinez X, Brandt C, Saddallah F, *et al*. DNA immunization circumvents deficient induction of T helper type 1 and cytotoxic T lymphocyte responses in neonates and during early life. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8726-31.
16. Ridge JP, Fuchs EJ F, Matzinger P. Neonatal Tolerance Revisited: Turning on Newborn T Cells with Dendritic Cells. *Science* 1996; 271: 1723-6.
17. Qureshi MH, Garvy BA. Neonatal T cells in an adult lung environment are competent to resolve *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Immunol* 2001; 166: 5704-11.
18. Wilson CB, Westall J, Johnston L, *et al*. Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *J Clin Invest* 1986; 77: 860-7.
19. Melvin AJ, McGurn ME, Bort SJ, Gibson C, Lewis DB. Hypomethylation of the interferon-gamma gene correlates with its expression by primary T-lineage cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 426-30.
20. Hassan J, Reen DJ. Cord blood CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T cells achieve a lower magnitude of activation when compared with their adult counterparts. *Immunology* 1997; 90: 397-401.
21. Durandy A, De Saint B, Lisowska-Gros-pierre B, *et al*. Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns. *J Immunol* 1995; 154: 1560-8.
22. Delespesse G, Yang LP, Ohshima Y, *et al*. Maturation of human neonatal CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes into Th1/Th2 effectors. *Vaccine* 1998; 16: 1415-9.
23. Hunt DW, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE. Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* 1994; 84: 4333-43.
24. Goriely S, Vincart B, Stordeur P, *et al*. Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J Immunol* 2001; 166: 2141-6.
25. Lee SM, Suen Y, Chang L, *et al*. Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon-gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells. *Blood* 1996; 88: 945-54.
26. Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, *et al*. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccination. *J Immunol* 1999; 163: 2249-55.
27. Vekemans J, Amedei A, Ota MO, *et al*. Neonatal bacillus Calmette-Guérin vaccination induces adult-like IFN-gamma production by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1531-5.

**Stanislas Goriely**  
**Dominique De Wit**  
**Véronique Flamand**  
**Michel Goldman**

*Laboratoire d'immunologie expérimentale, Campus Erasme, Université libre de Bruxelles, 808 route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgique.*

**Johan Vekemans**

*Laboratoire d'immunologie expérimentale, Campus Erasme, Université Libre de Bruxelles, 808, route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgique et Medical Research Council Laboratories, PO Box 273, Banjul, The Gambia, West Africa.*

**Arnaud Marchant**

*Medical Research Council Laboratories, PO Box 273, Banjul, The Gambia, West Africa. Human Immunology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, Headington, Oxford OX3 9DU, Royaume-Uni.*

**TIRÉS À PART**

M. Goldman.