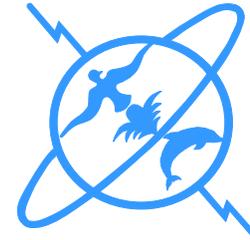


Module optionnel (M 22): **Biochimie-Immunologie**  
Élément : Immunologie

**Cours d'Immunologie**



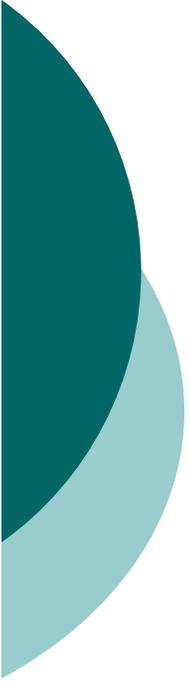
**Pr. Saaïd AMZAZI**

**I- Les Hypersensibilités**

**II- La Tolérance immunitaire et l'auto-immunité**

**III- La vaccination**

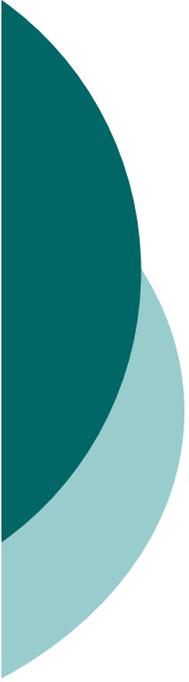
**IV- Les techniques immunologiques**



---

# 1<sup>ère</sup> séance

Les Hypersensibilités



---

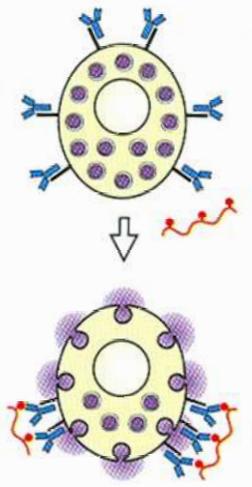
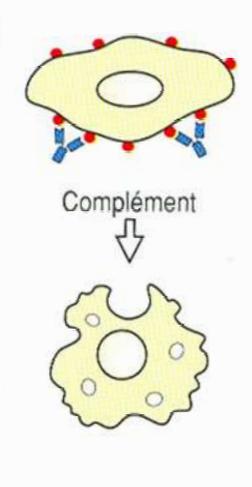
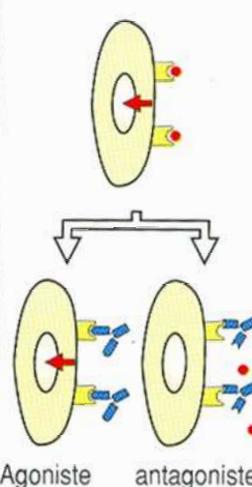
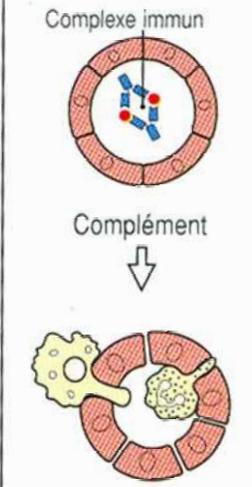
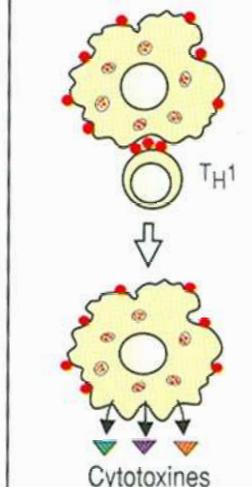
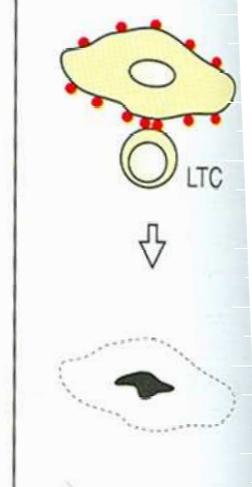
**Type I:** hypersensibilité immédiate médiée par des immunoglobulines de type E (la majorité des maladies allergiques)

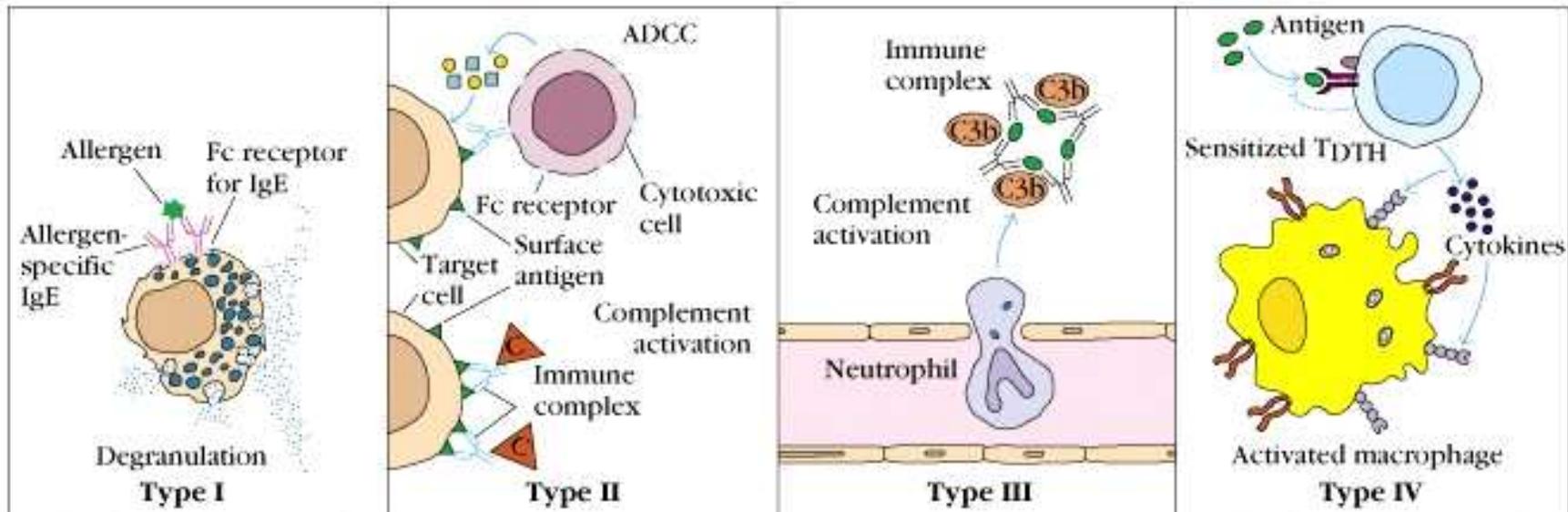
**Type II:** hypersensibilité cytotoxique dépendante des anticorps

**Type III:** hypersensibilité à complexes immuns

**Type IV:** hypersensibilité retardée à médiation cellulaire

*1945, Gell et Combs: Classification des réactions d'Hypersensibilité*

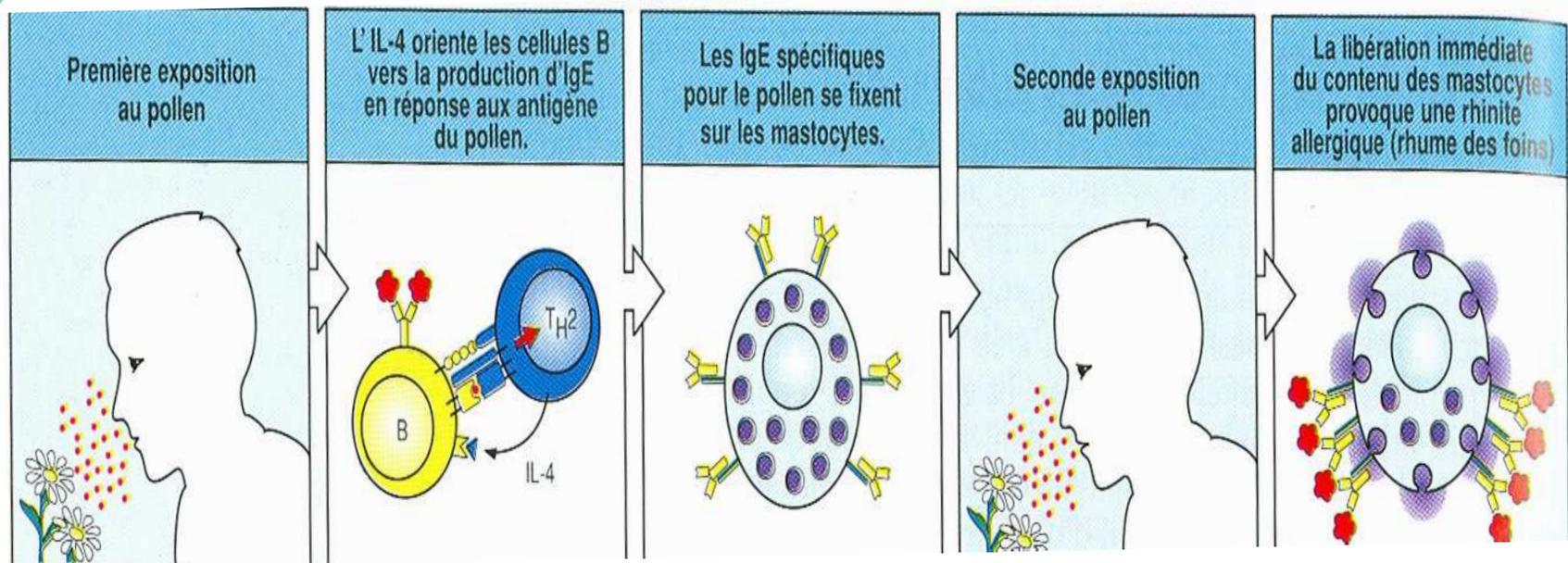
	Type I	Type II		Type III	Type IV	
Réactif immun	Anticorps IgE, Cellules T <sub>H2</sub>	Anticorps IgG		Anticorps IgG	Cellules T	
Antigène	Antigène soluble	Antigène associé aux cellules ou à la matrice	Récepteurs sur la surface cellulaire	Antigène soluble	Antigène soluble	Antigènes associé aux cellules
Mécanisme effecteur	Activation des mastocytes	Complément cellules Fc R <sup>+</sup> (phagocytes, cell. NK)	L'anticorps modifie le signal	Complément Phagocytes	Activation des macrophages	Cytotoxicité
						
Exemple de réaction d'hypersensibilité	Rhinite allergique, asthme, anaphylaxie systémique	Certaines allergies médicamenteuses (ex: pénicilline), réaction transfusionnelle, anémie hémolytique auto-immune	Maladie de Graves (agoniste) Myasthénie (antagoniste)	Maladie sérique, Lupus érythémateux disséminé	Dermite de contact, Rejet de greffe, Arthrite rhumatoïde	Dermite de contact, Rejet de greffe, Diabète sucré

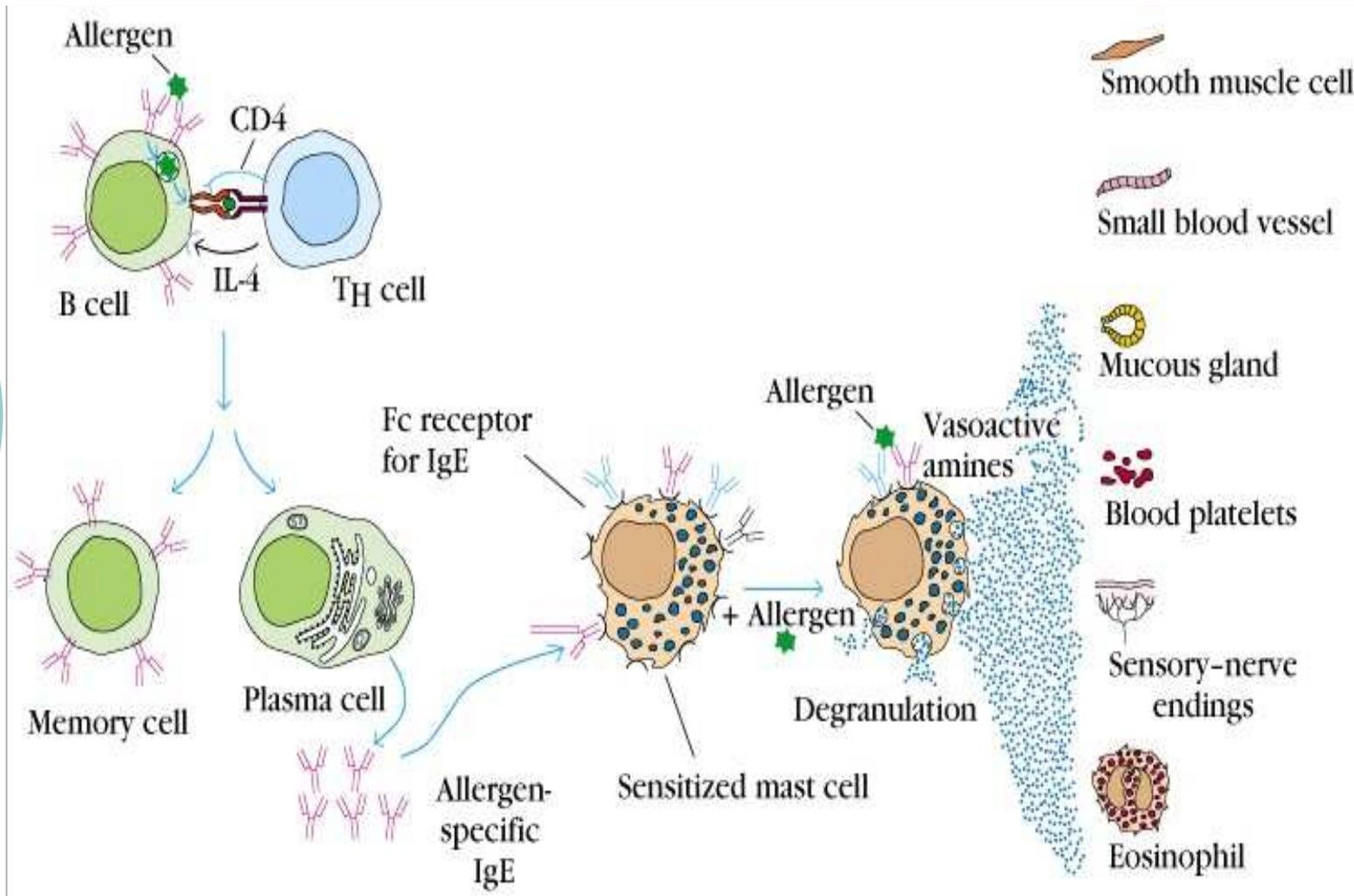


# L'HYPERSENSIBILITÉ DE TYPE I

## ÉTAPE DE SENSIBILISATION

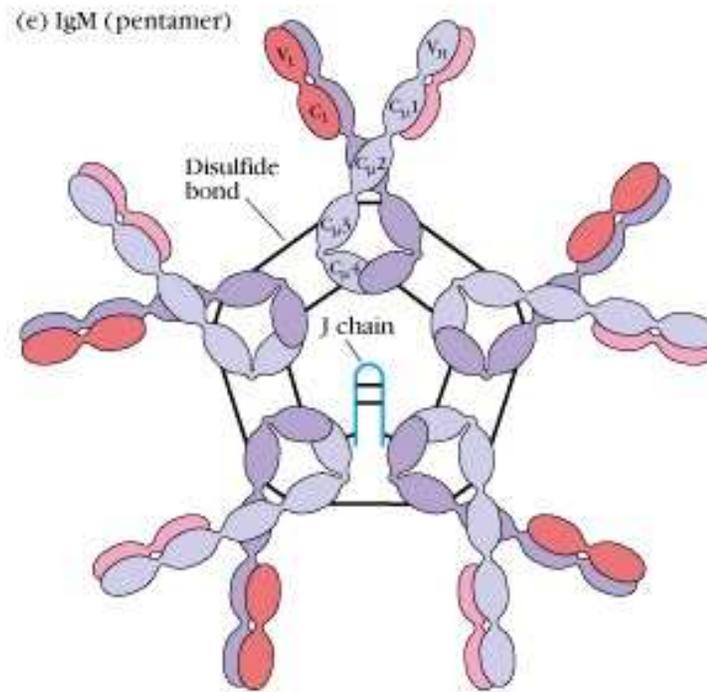
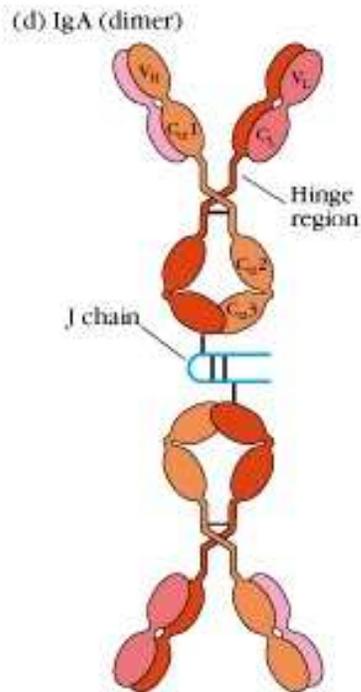
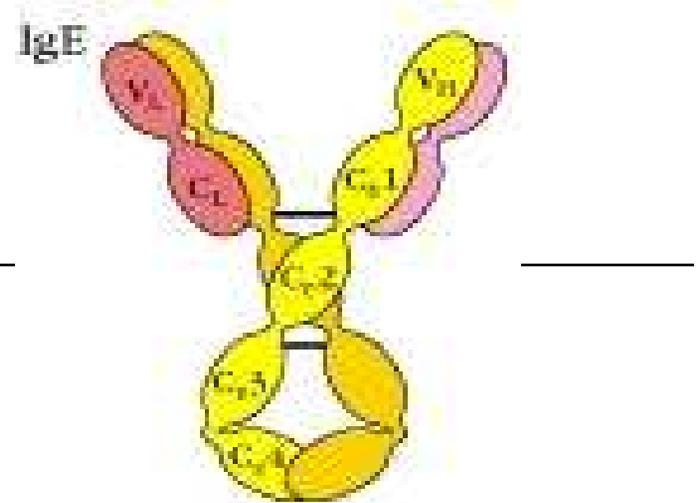
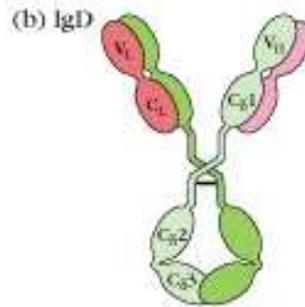
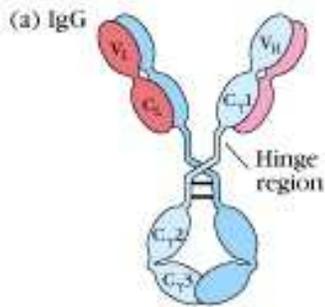
## ÉTAPE DÉCLENCHANTE





### L'Hypersensibilité immédiate est liée à:

- IgE
- La dégranulation des mastocytes qui ont fixé les IgE préalablement à l'interaction avec l'allergène
- Cellules inflammatoires recrutées sur place par les substances chimiotactiques résultant de cette dégranulation

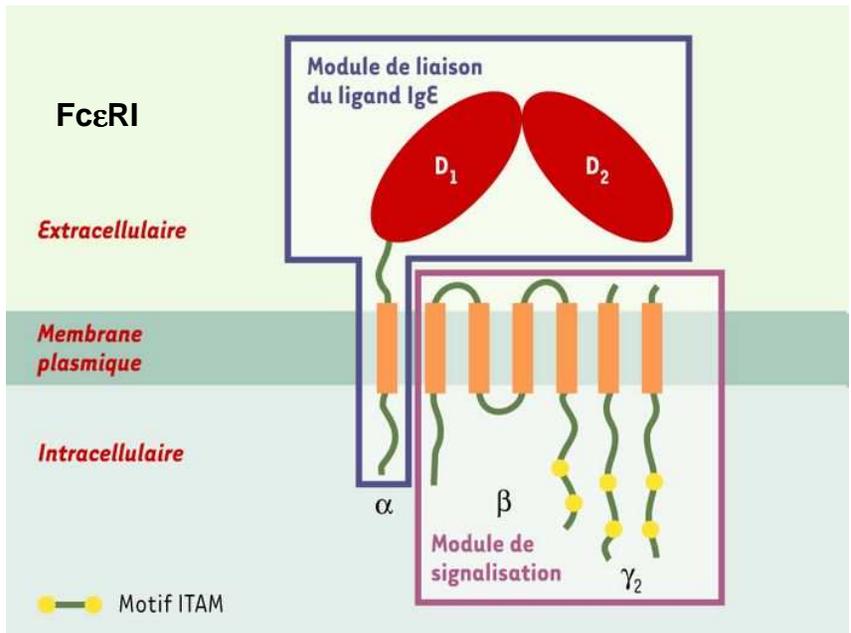
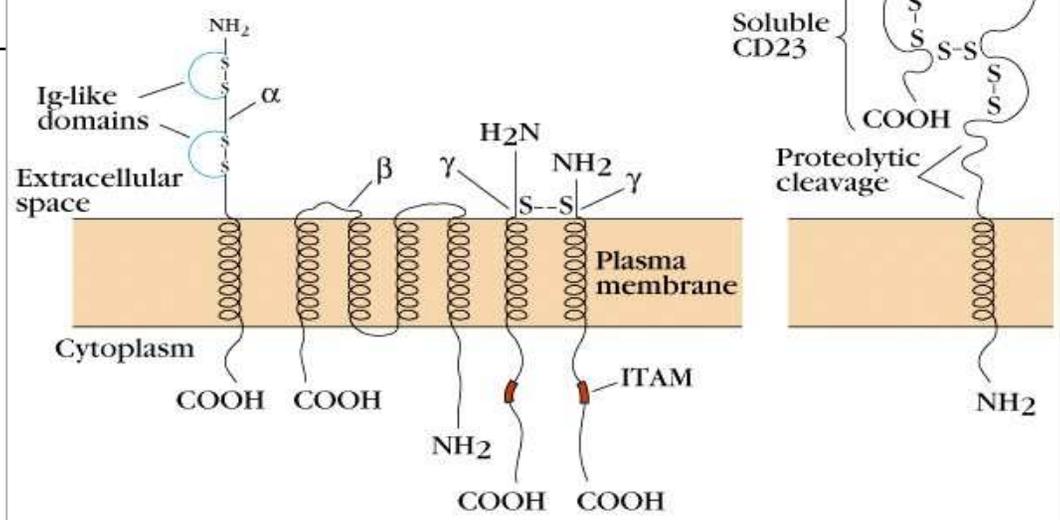


Faible concentration dans le sérum (beaucoup plus faible que les autres classes), même chez les atopiques

Demi-vie très courte (2-3 jours) **mais très longue** quand IgE fixées sur récepteurs (jusqu'à 3 mois)

## Lymphocytes B, macrophages, éosinophiles

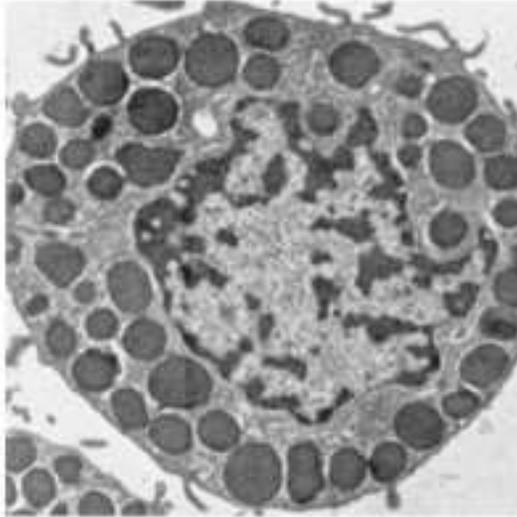
(a) FcεRI:  
High-affinity IgE receptor  
**Mastocytes et basophiles**



## Les récepteurs des IgE FcεRI et II

# Mastocyte

---



- Tissulaire, associée aux épithélias (peau, arbre respiratoire, système digestif)

Les cellules  $Fc\epsilon RI^+$  sont les acteurs de l'atopie : mastocytes et basophiles



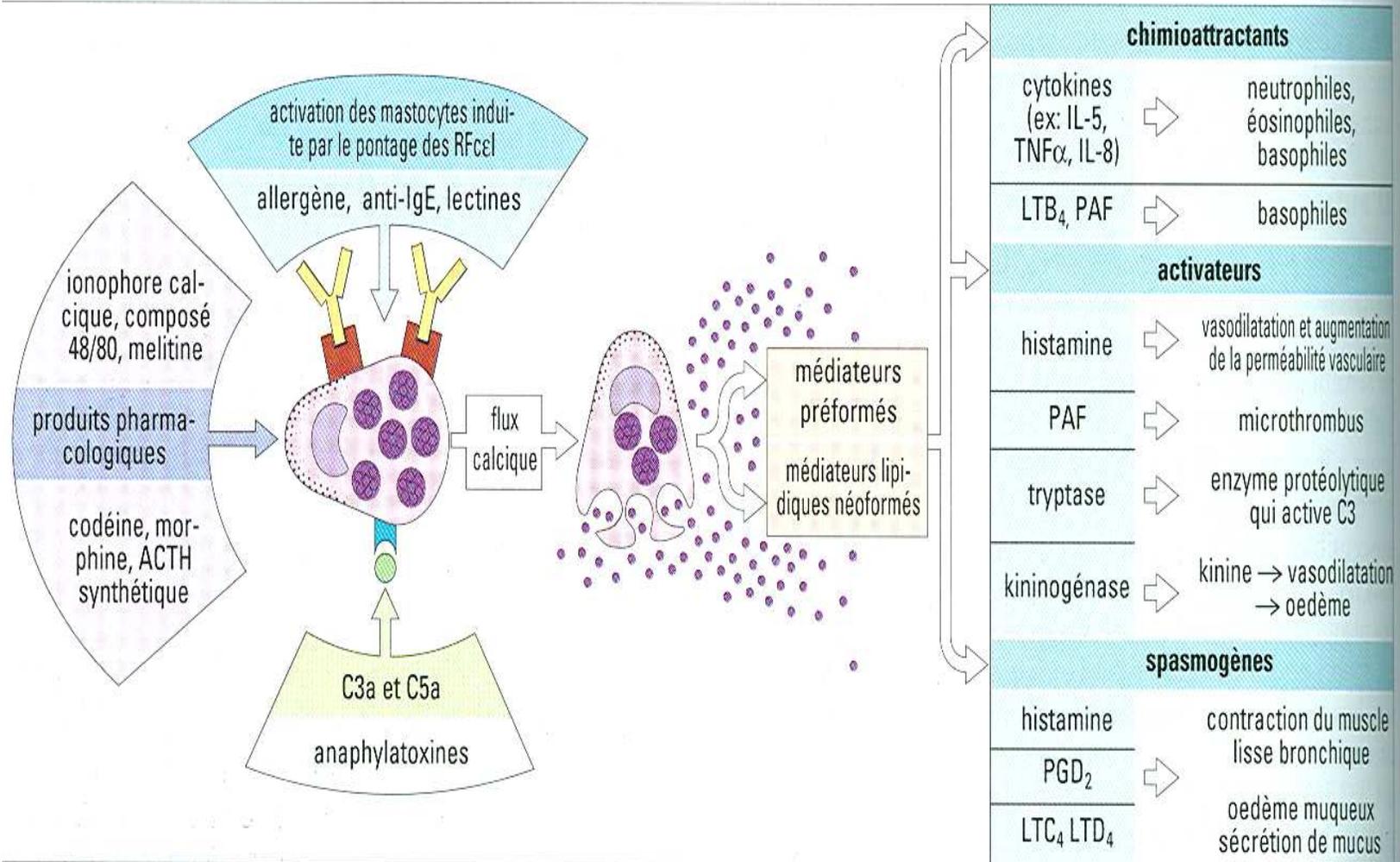
## Mécanismes de la dégranulation des mastocytes et des basophiles

---

- Mécanismes dépendants des récepteurs FcεRI (et des IgE qui y sont liées)
- Mécanismes indépendants des FcεRI
  - anaphylatoxines C3a, C4a, C5a
  - médicaments divers (ACTH synthétique, morphine, codéine, ...)
  - lectines (fraises, ...)
  - ionophores calciques



## Activation des mastocytes et effets physiologiques des médiateurs libérés par les mastocytes

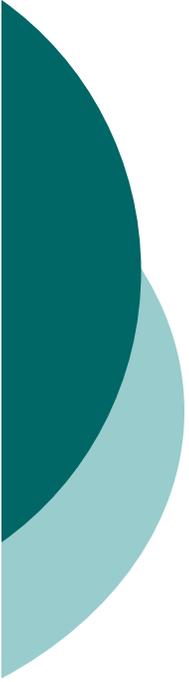




# Histamine

---

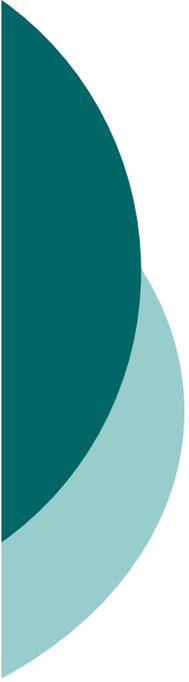
- Constituant majeur des granules (10%)
- Effet immédiat (minutes qui suivent la dégranulation)
- Trois types de récepteurs
  - **H1**: contraction musculaire lisse (intestin, bronches), sécrétion de mucus, perméabilité vasculaire accrue
  - **H2** : stimulation sécrétion acide par l'estomac
  - **H3** : modulent la transmission de neurotransmetteurs au extrémités présynaptiques



# Leukotriènes et prostaglandines

---

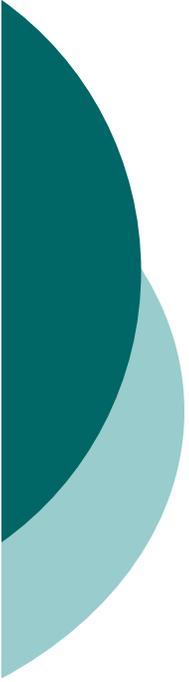
- Mêmes types d'effets que histamine (notamment  $PGD_2$ )
  - plus tardifs
  - plus prolongés
  - beaucoup plus puissants que ceux de l'histamine



# Cytokines et chimiokines

---

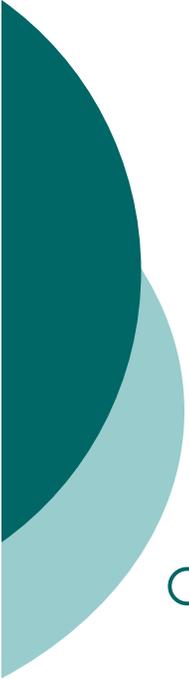
- Rôle direct : par exemple TNF- $\alpha$  des mastocytes dans le choc anaphylactique
- Rôle chimiotactique avec conséquences plus tardives
  - Éotaxine (ECF-A) et IL-5 : rôle essentiel dans le recrutement des éosinophiles
  - IL-8 : recrutement des polynucléaires
  - IL-4 : diffusion de la réponse Th2



## Exemple de phénomènes de type I

---

- Dermatite atopique
- Rhinite pollinique
- Asthme
- Choc anaphylactique



## Pourquoi synthétise-t-on des IgE?

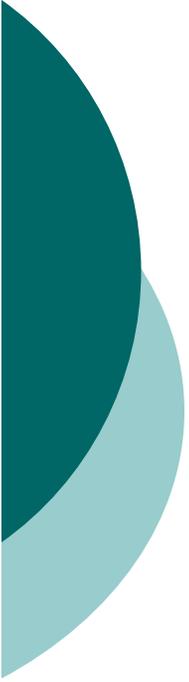
- Rôle *essentiel* de l'**IL4** et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui produisent cette cytokine : les lymphocytes T Th2
- Effet mutuellement suppresseur des réponses Th1 et Th2



# Qu'est-ce qui rend un individu atopique?

---

- Histoire familiale fréquente
  - Tendance à coder plus pour plusieurs cytokines dont IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et GM-CSF
  - Tendance à coder pour la chaîne  $\beta$  du récepteur de haute affinité pour les IgE
- Mais rôle importants de facteurs de l'environnement



## Rôle des facteurs de l'environnement

---

- Rôle protecteur de l'allaitement maternel
- Infections respiratoires
  - La moindre fréquence de certaines infections dans l'enfance (hygiène, vaccins) pourrait expliquer la plus grande fréquence de phénomènes atopiques
- La dose d'exposition aux allergènes
- L'état nutritionnel
- Pollution
  - les particules de diesel sont de puissantes inductrices des réponses de type Th2 et de l'IL-4
  - Tabac

## Balance TH1/TH2

Cytokine/function	T <sub>H</sub> 1	T <sub>H</sub> 2
-------------------	------------------	------------------

### Cytokine secretion

IL-2	+	-
IFN- $\gamma$	++	-
TNF- $\beta$	++	-
GM-CSF	++	+
IL-3	++	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-10	-	++
IL-13	-	++

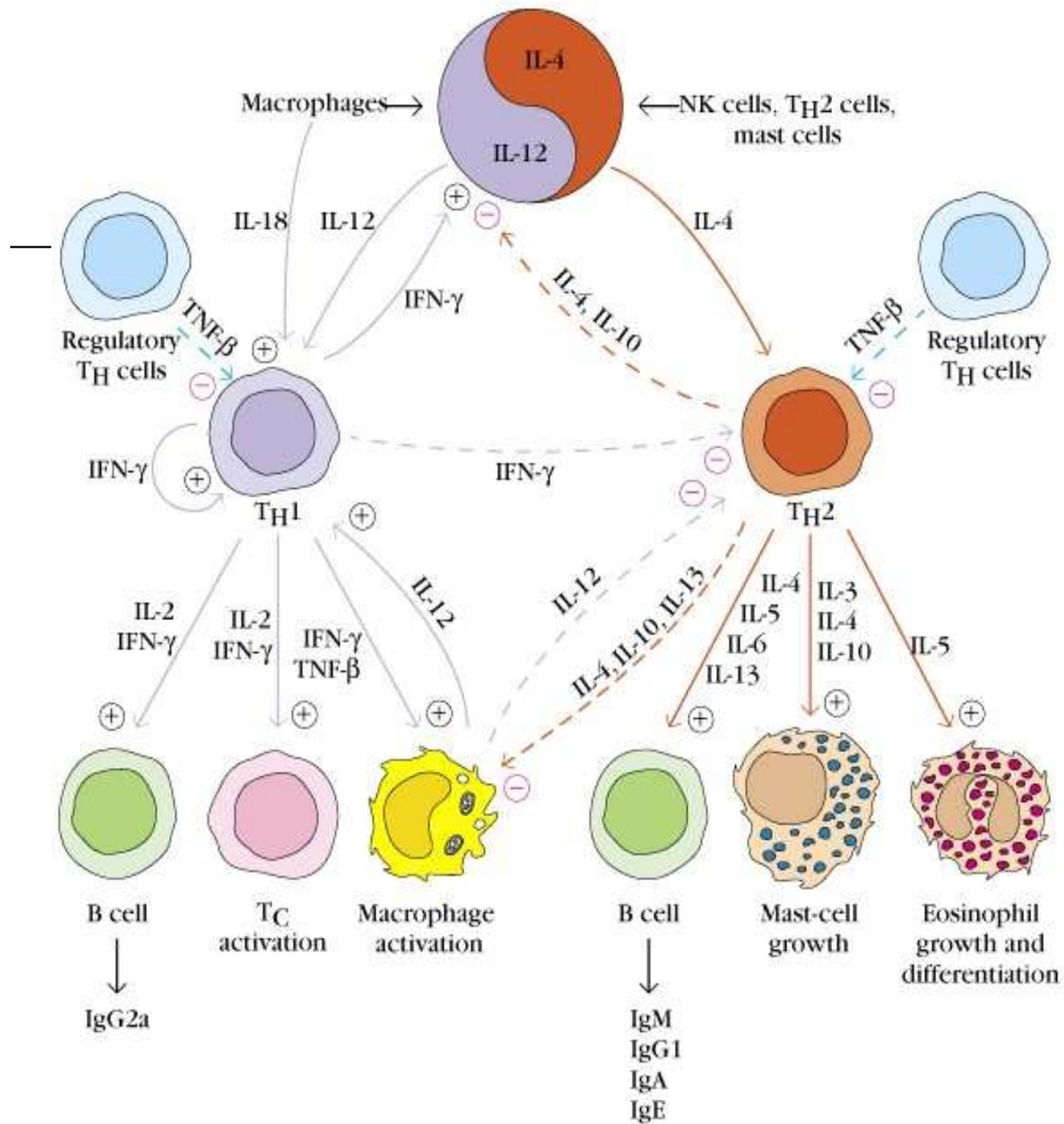
### Functions

Help for total antibody production	+	++
Help for IgE production	-	++
Help for IgG2a production	++	+
Eosinophil and mast-cell production	-	++
Macrophage activation	++	-
Delayed-type hypersensitivity	++	-
T <sub>C</sub> -cell activation	++	-

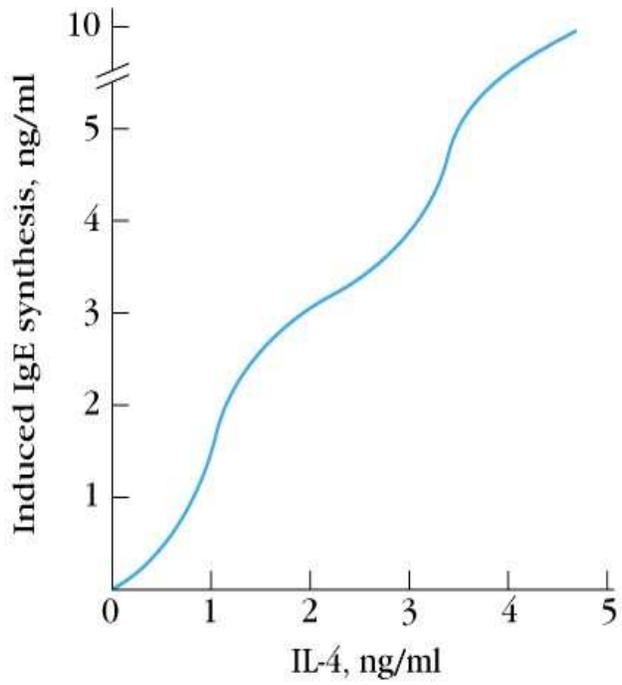
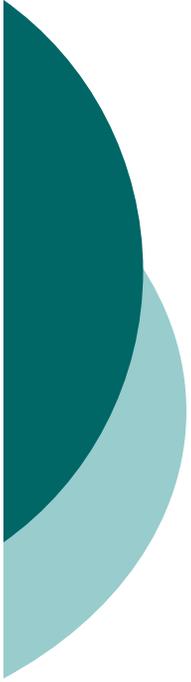


---

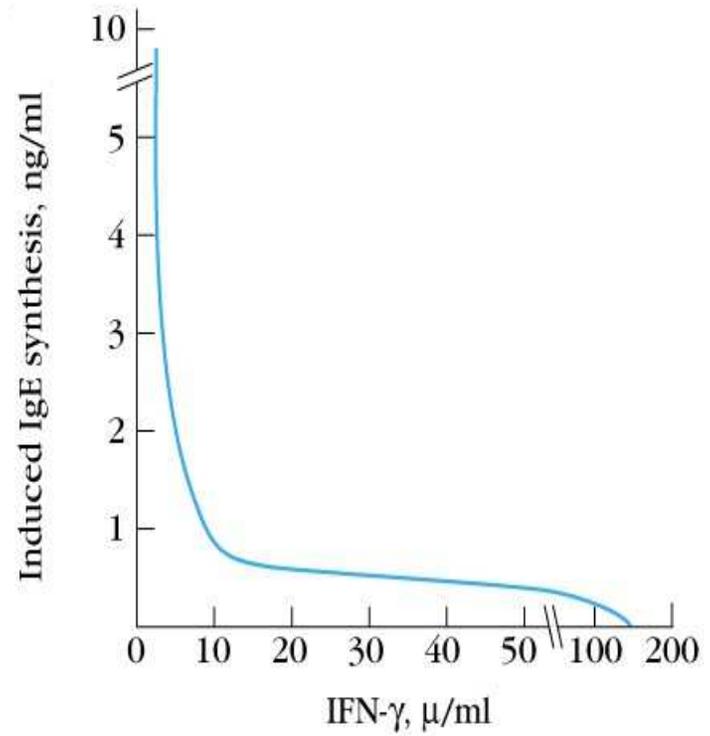
La polarisation Th1/Th2 des réponses  
dépend largement de la cellule  
présentatrice qui initie la réponse



- 
- 
- **Rôle fondamental de l'IL-4 à plusieurs niveaux**
    - synthèse d'IgE
    - différenciation des mastocytes
    - Diffusion de la réponse Th2
  - **IL-5**
    - maturation, chimiotactisme et activation des éosinophiles (phase tardive)
  - **IL-9 (différenciation des basophiles en mastocytes)**



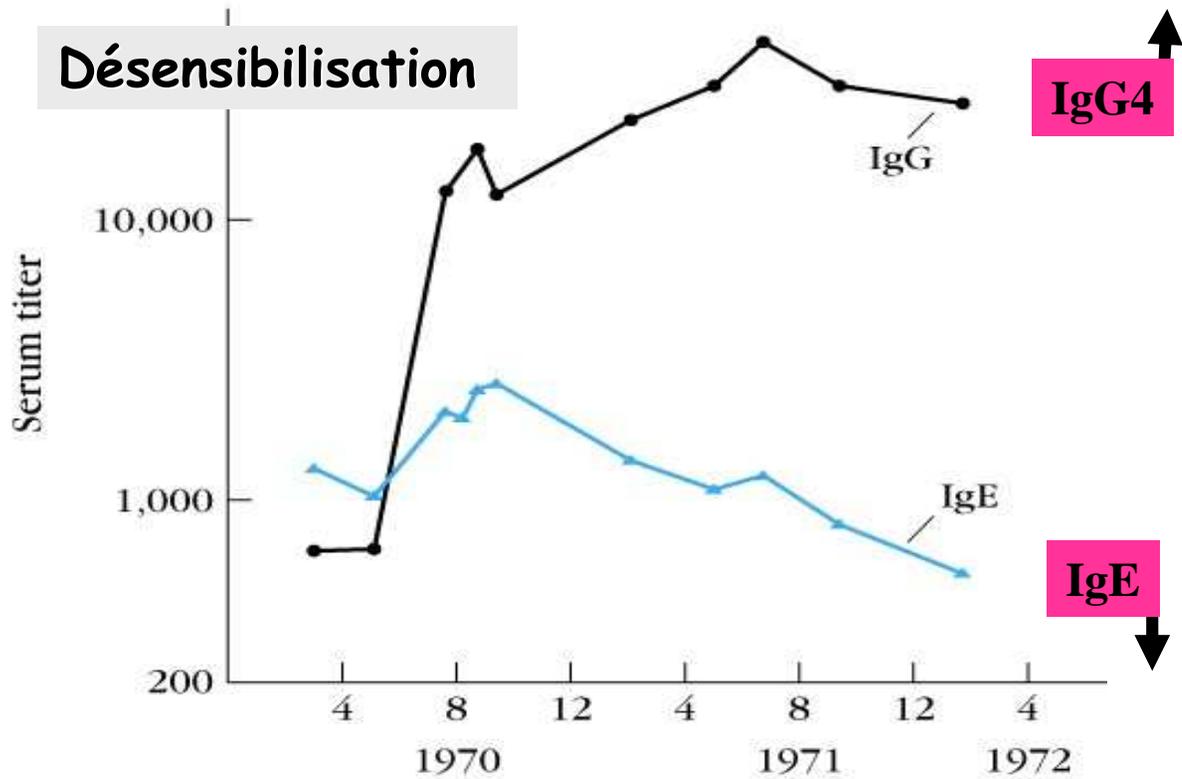
**IL4 (anti-Th 1)**



**IFN $\gamma$  (anti-Th 2)**

IL-4/IFN $\gamma$

Désensibilisation



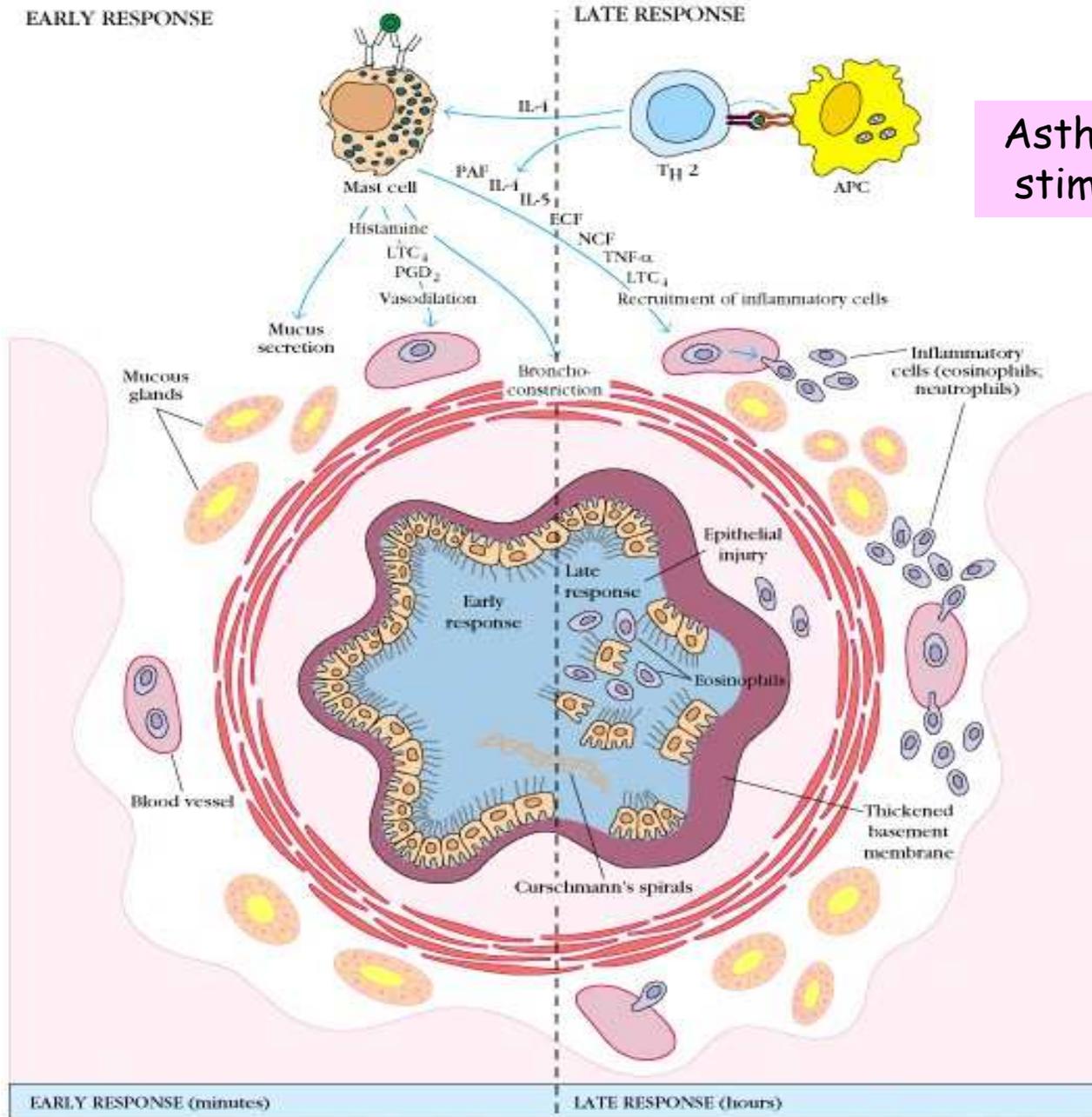
IgG4

IgE

EARLY RESPONSE

LATE RESPONSE

Asthme extrinsèque :  
stimuli allergéniques



Augmentation de la sensibilité de la trachée et des bronches à des stimuli variés qui induisent un rétrécissement diffus du calibre des voies respiratoires, dont le degré varie soit spontanément soit sous l'effet du traitement

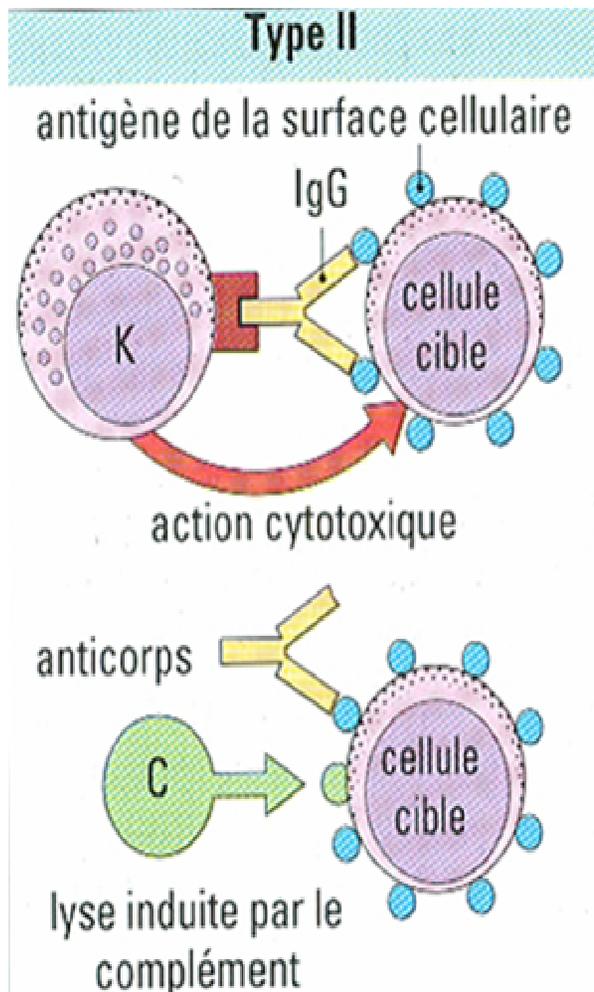
EARLY RESPONSE (minutes)

- Histamine
- PGD<sub>2</sub>
- LTC<sub>4</sub>
- Vasodilation
- Bronchoconstriction
- Mucus secretion

LATE RESPONSE (hours)

- IL-4, TNF-α, LTC<sub>4</sub>
- PAF, IL-5, ECF
- IL-4, IL-5
- Increased endothelial cell adhesion
- Leukocyte migration
- Leukocyte activation

# L'HYPERSENSIBILITÉ DE TYPE II



- Ac IgG ou IgM dirigés contre un petit nombre d'Ag

- Elle s'observent lorsqu'un anticorps se lie à un antigène cellulaire ou tissulaire

- Induit une phagocytose ou une lyse cellulaire par activation du complément ou ADCC

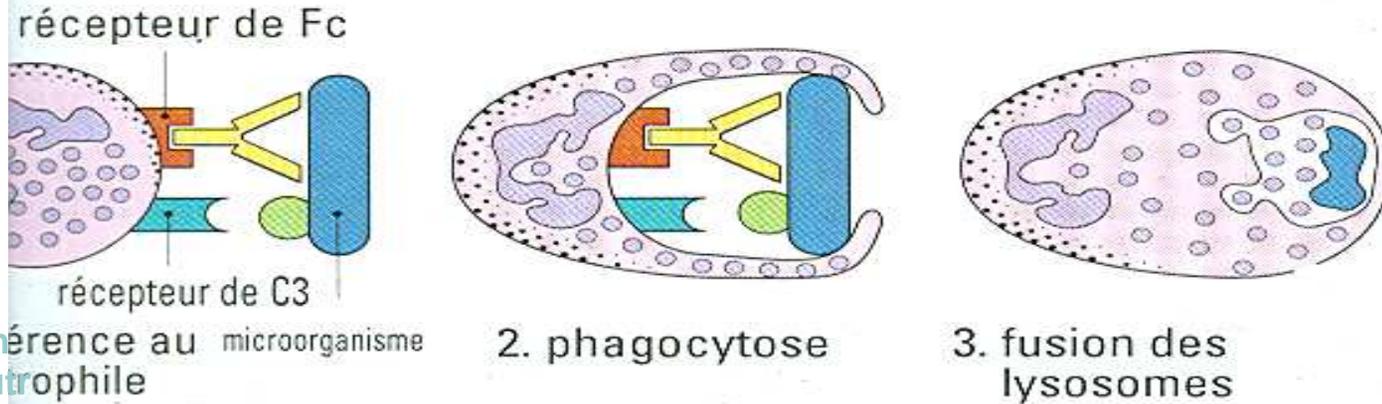
-L'hypersensibilité est la conséquence de la destruction de la cellule elle-même

Ces réactions interviennent à la suite d'alloimmunisations (alloantigènes) :

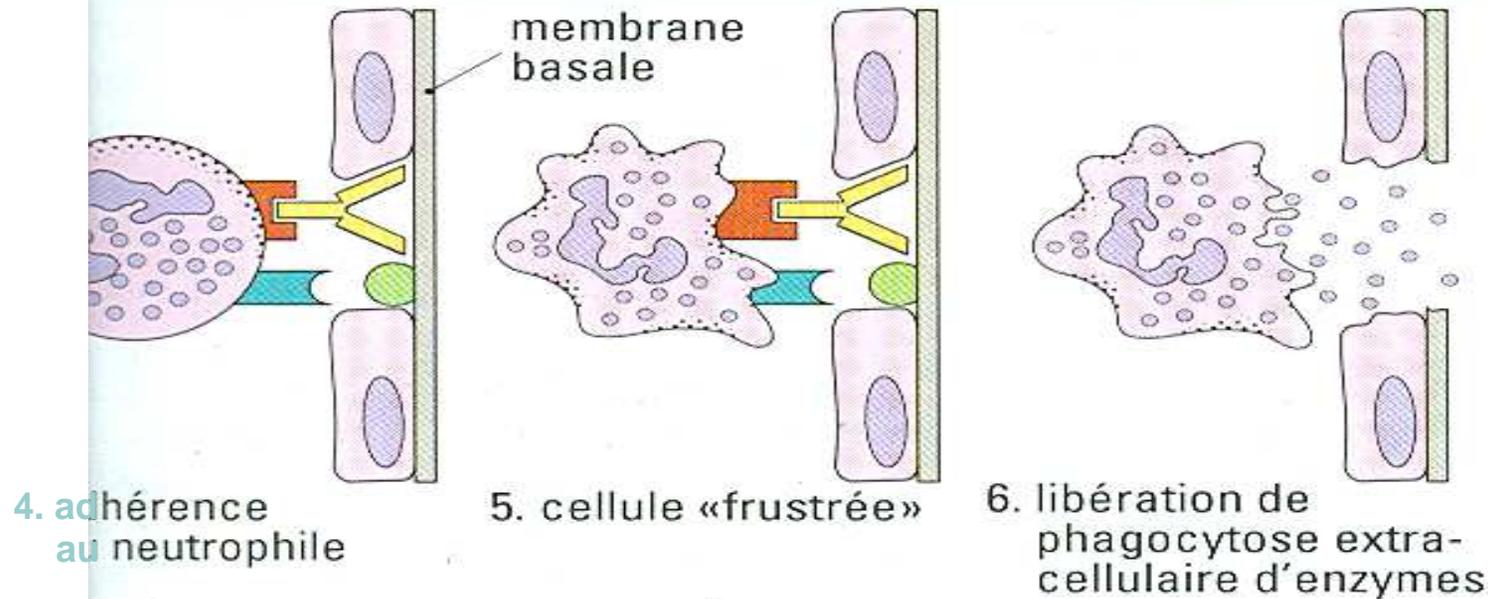
- . Ag ABO et Rhésus
- . Ag d'histocompatibilité
- . Ag de différenciation des lymphocytes
- . Ag sériques

# Mécanismes des lésions

## activité antimicrobienne normale



## réaction d'hypersensibilité de type II





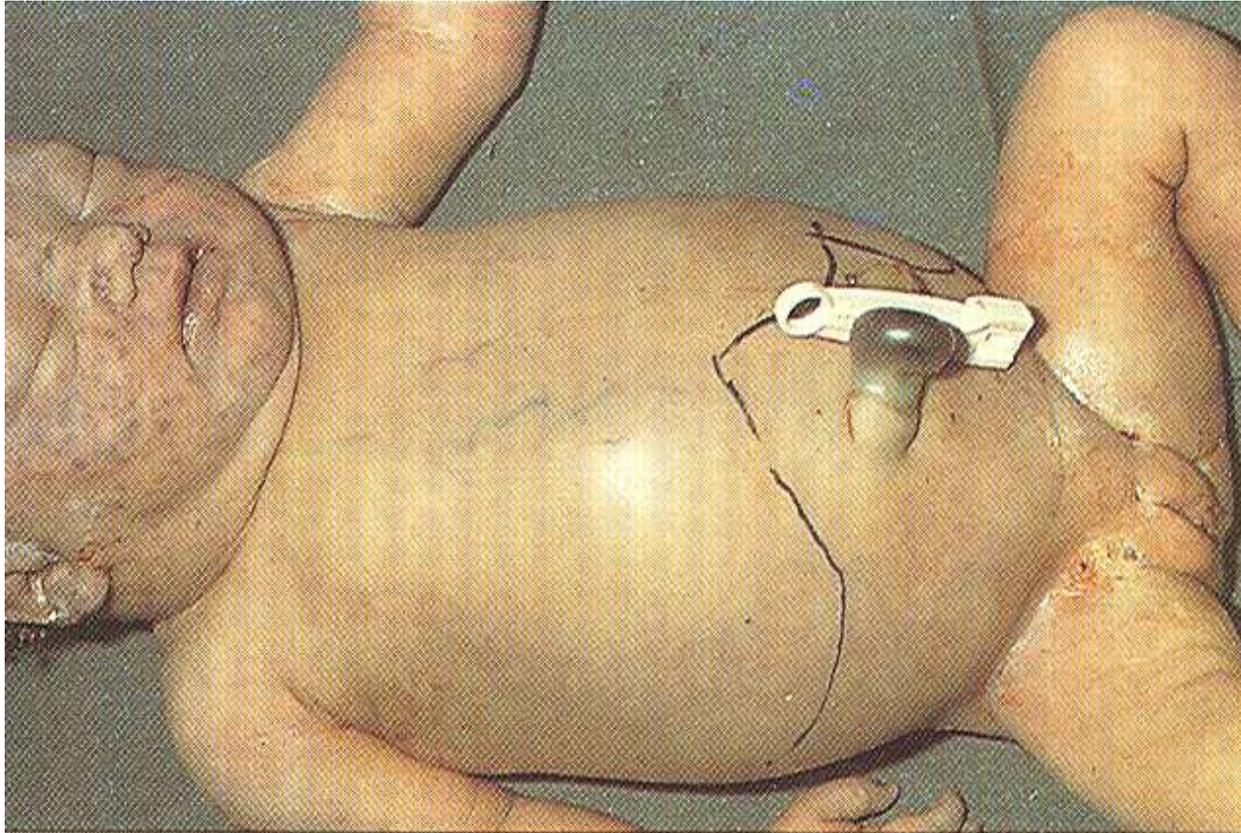
## Exemple de phénomènes de type II

---

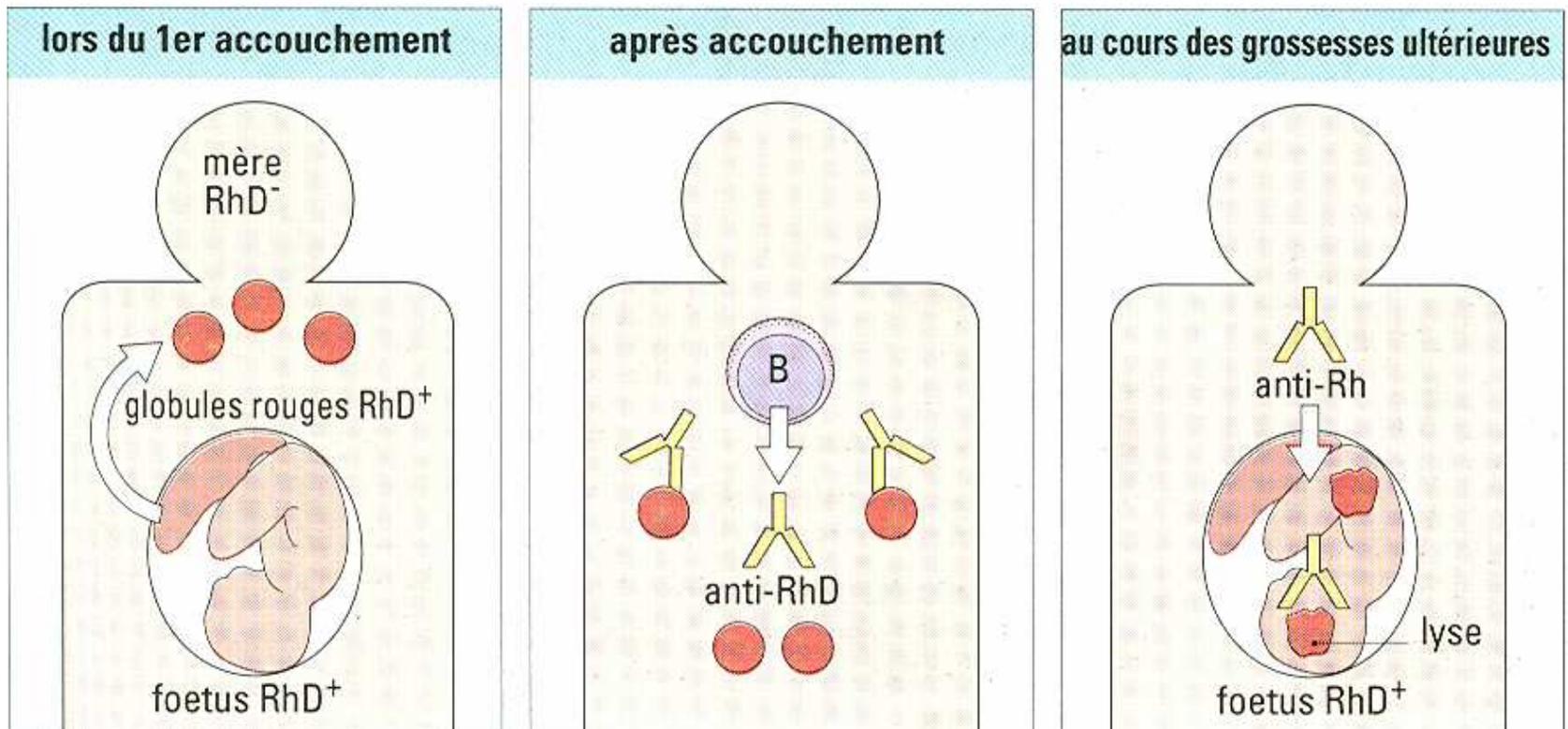
- Rejet hyperaigu des allogreffes
- Réactions transfusionnelles
- Erythroblastose foetale
- Anémies hémolytiques autoimmunes

## La maladie hémolytique du nouveau-né

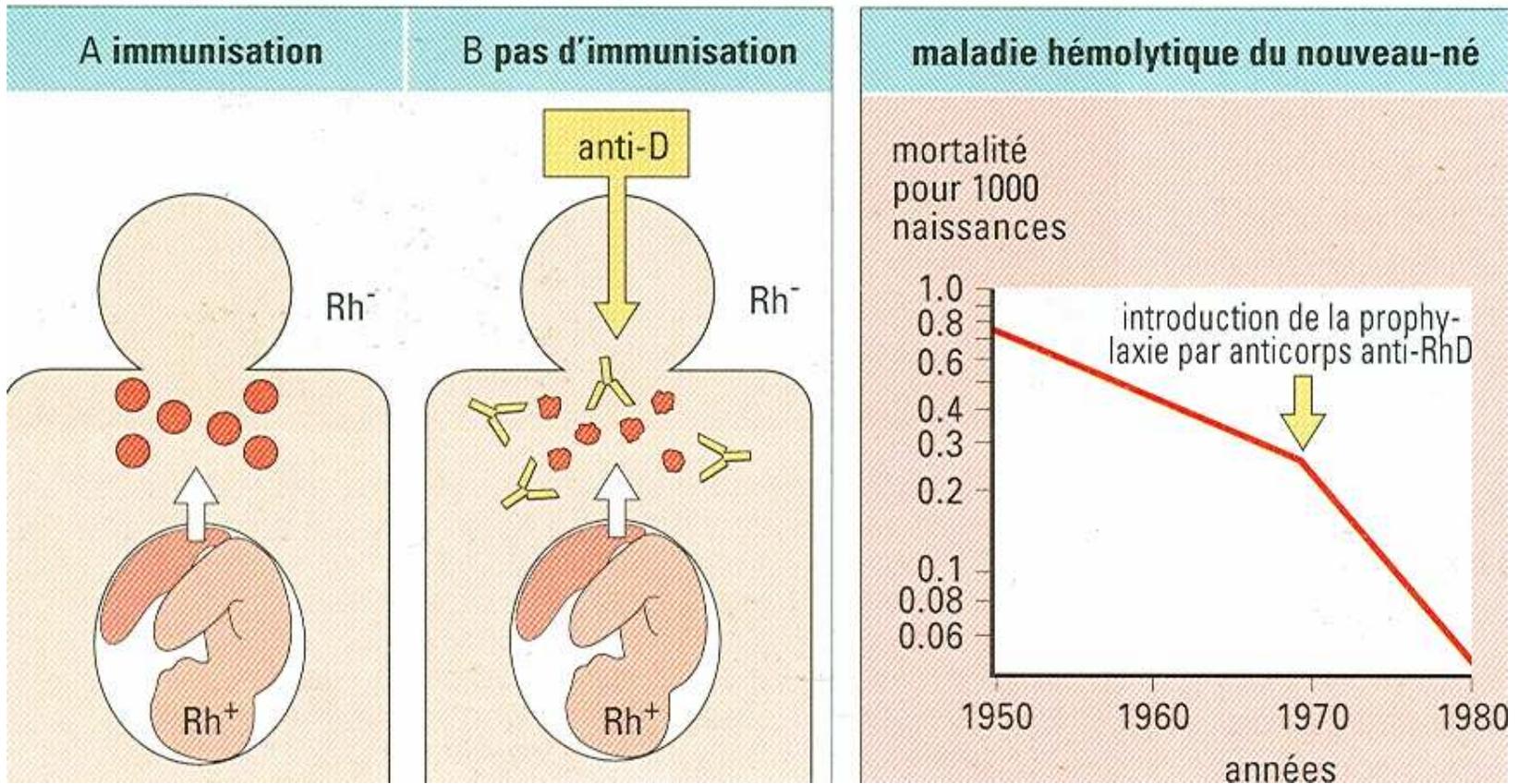
---



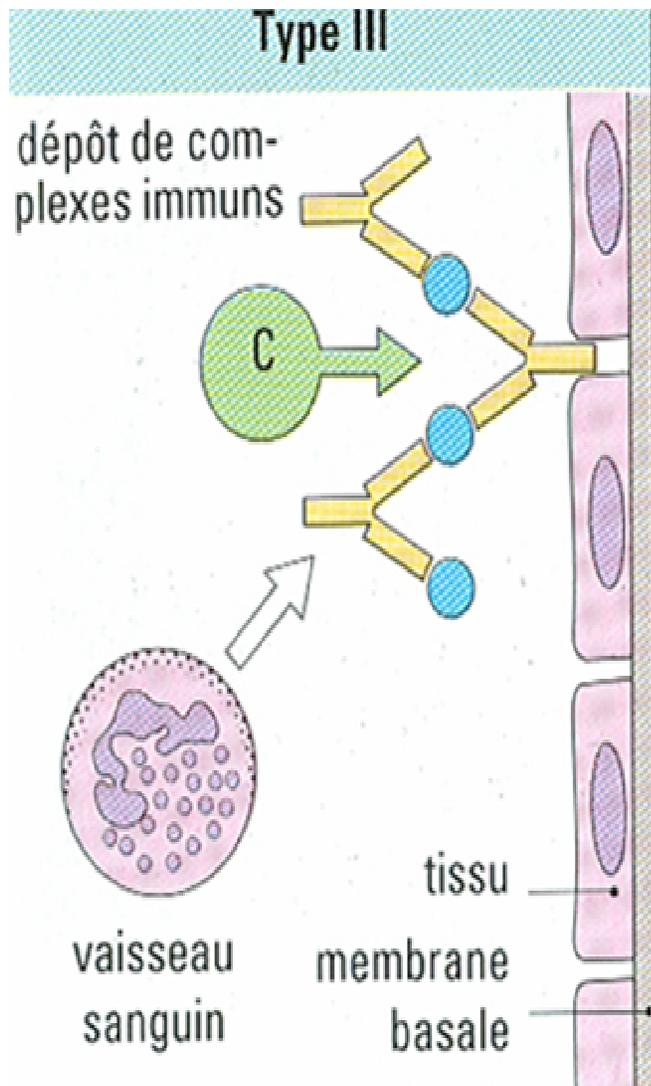
## Maladie hémolytique du nouveau-né. I



## Prophylaxie de la maladie hémolytique par incompatibilité Rhésus

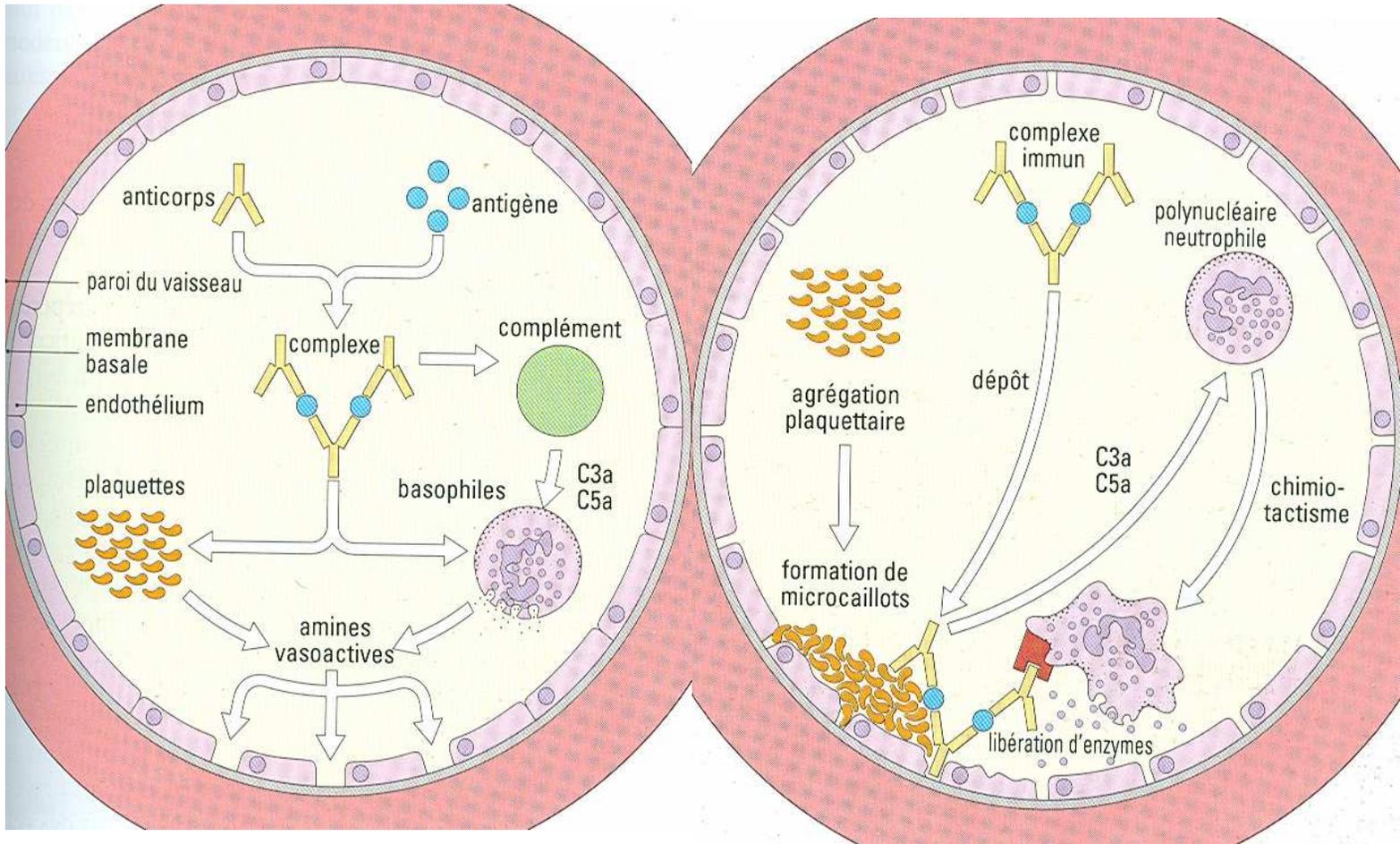


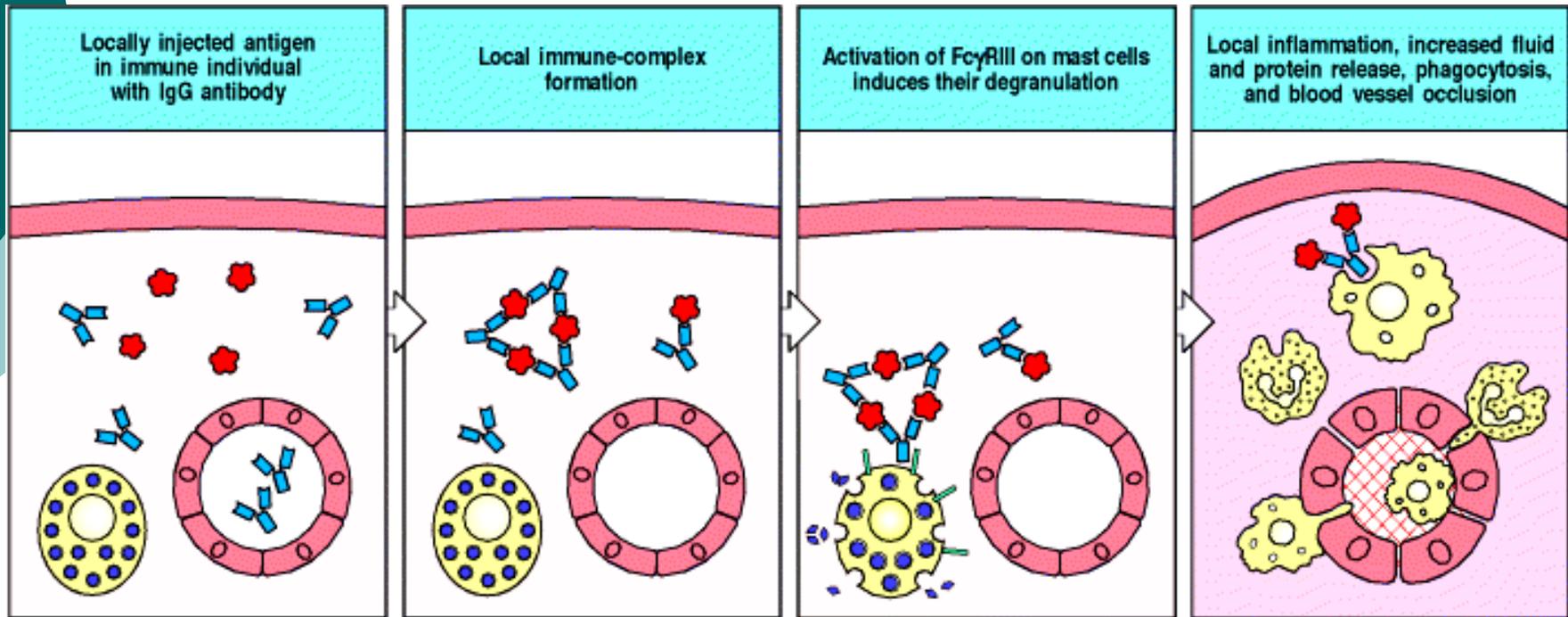
# HYPERSENSIBILITÉ DE TYPE III



- Dépôt local ou généralisé de complexes immuns
- Elles sont provoquées par des IgG et IgM, en présence du complément et des neutrophiles qui jouent un rôle essentiel dans le développement de la réaction
- La réaction d'Arthus en est un des exemples: réaction locale due à un Ag extrinsèque

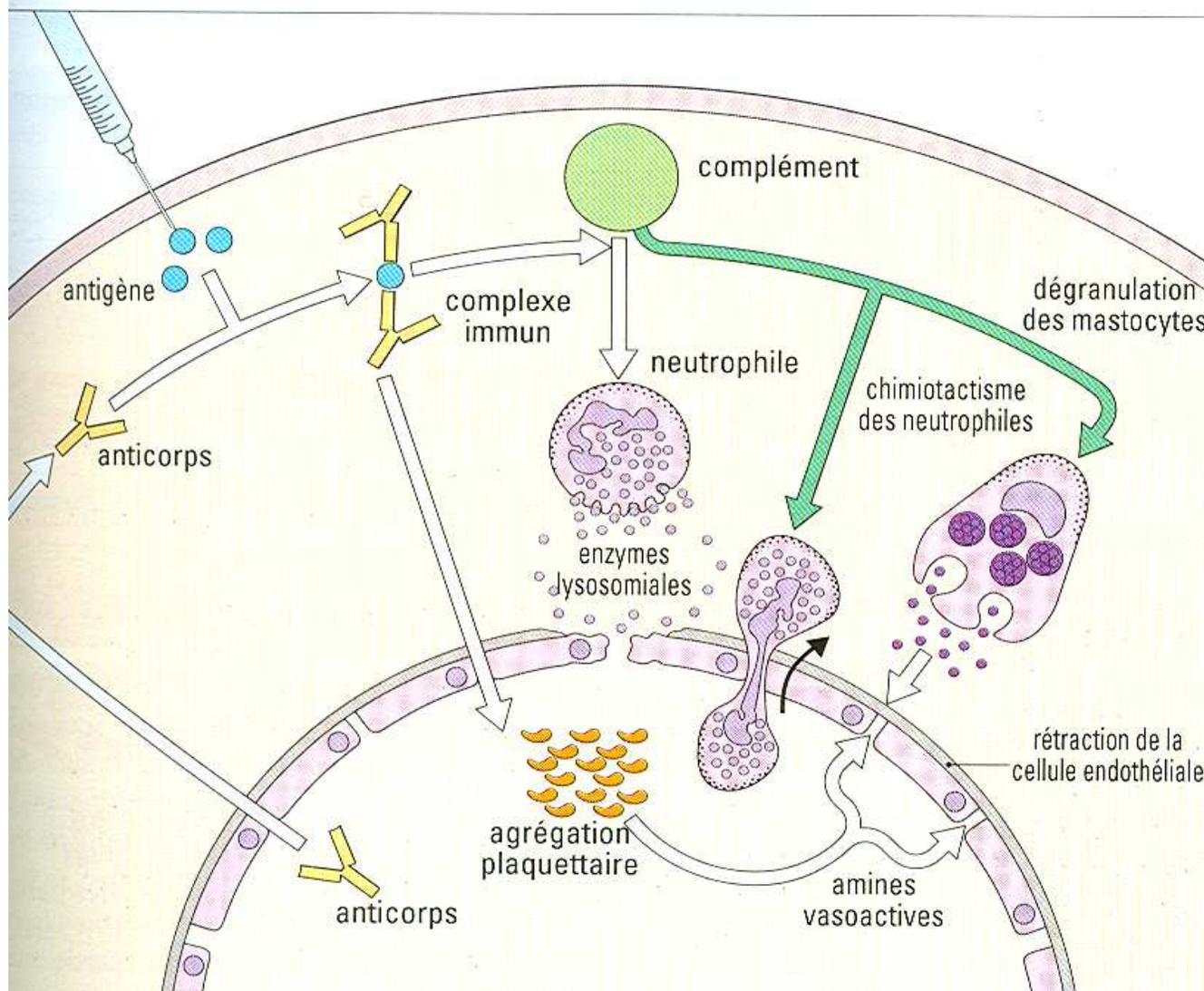
# Dépôt des complexes immuns dans la paroi des vaisseaux



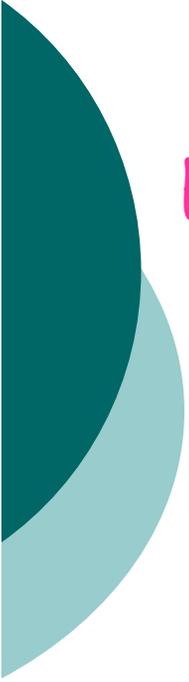


- Activation directe de cellules phagocytaires et de mastocytes
- Activation du complément (voie classique):
  - C3a, C4a, C5a : dégranulation des mastocytes et augmentation de la perméabilité vasculaire
  - C3a, C5a : chimiotactisme des neutrophiles

## La réaction d'Arthus



**Lésions tissulaires par exocytose d'enzymes des polynucléaires neutrophiles**

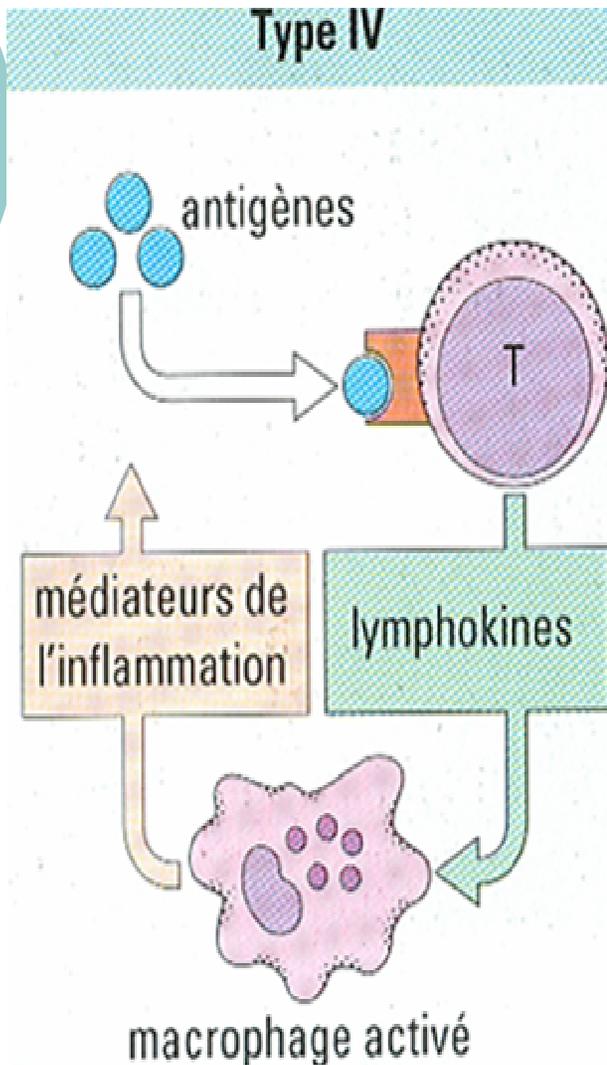


## Exemples de phénomènes de type III

---

- Formation des complexes immuns dans le sang, dissémination des complexes via la circulation et dépôt selon les caractéristiques rhéologiques des vaisseaux considérés:
  - Glomérules: **Néphrite**
  - Synoviales articulaires: **Arthrite**
  - Artères en général: **Vascularite**
  - Poumon: **Alvéolite**

## HYPERSENSIBILITÉ DE TYPE IV



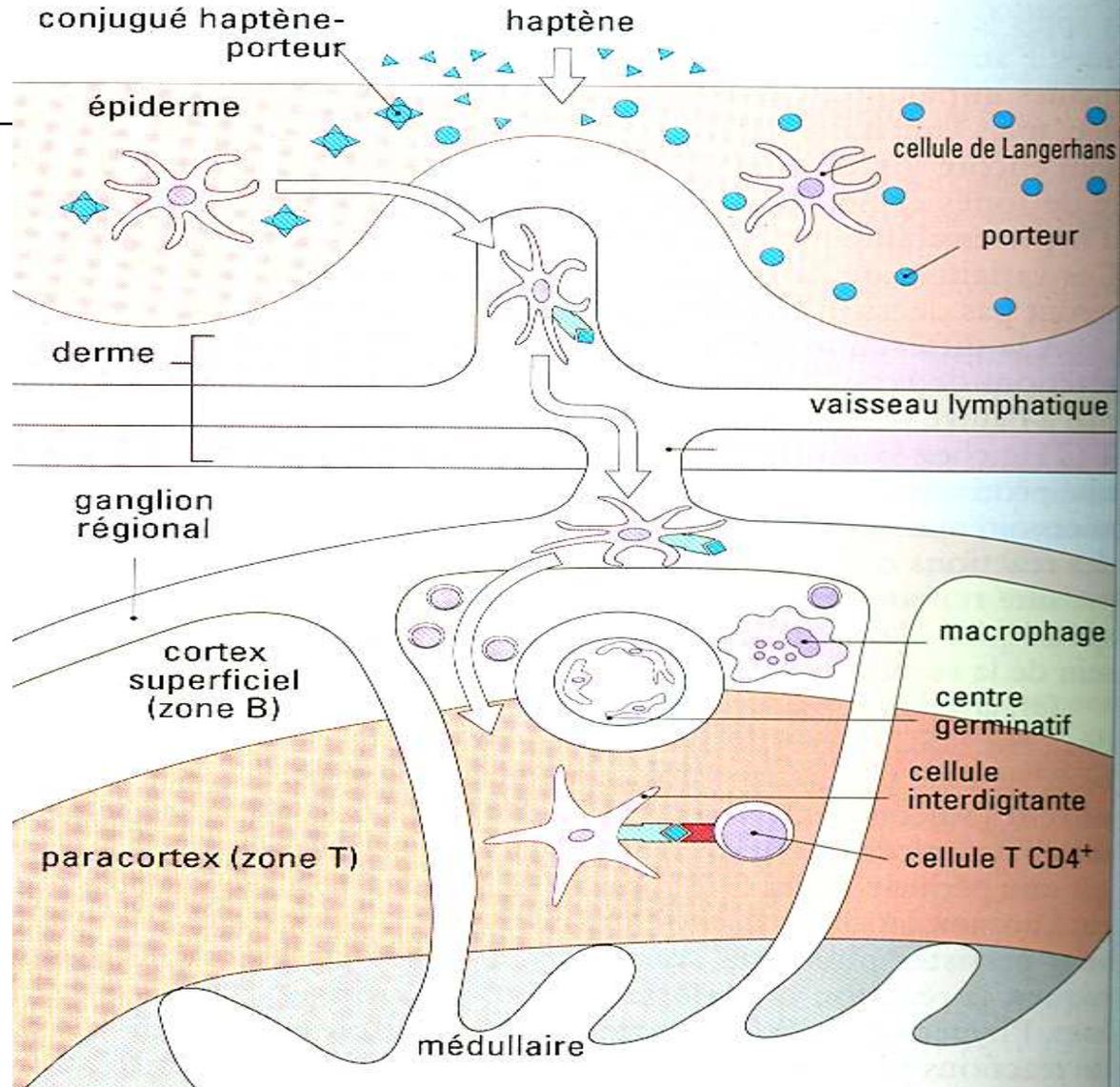
- Sont des réactions à médiation cellulaire induite par des lymphocytes T sensibilisés

- Infiltration d'un tissu par des lymphocytes T CD4+ auxiliaires de type Th1 et activation de macrophages, de lymphocytes T cytotoxiques (TCD8), de cellules NK par les cytokines des lymphocytes Th1 ; cette activation abîme l'organe infiltré

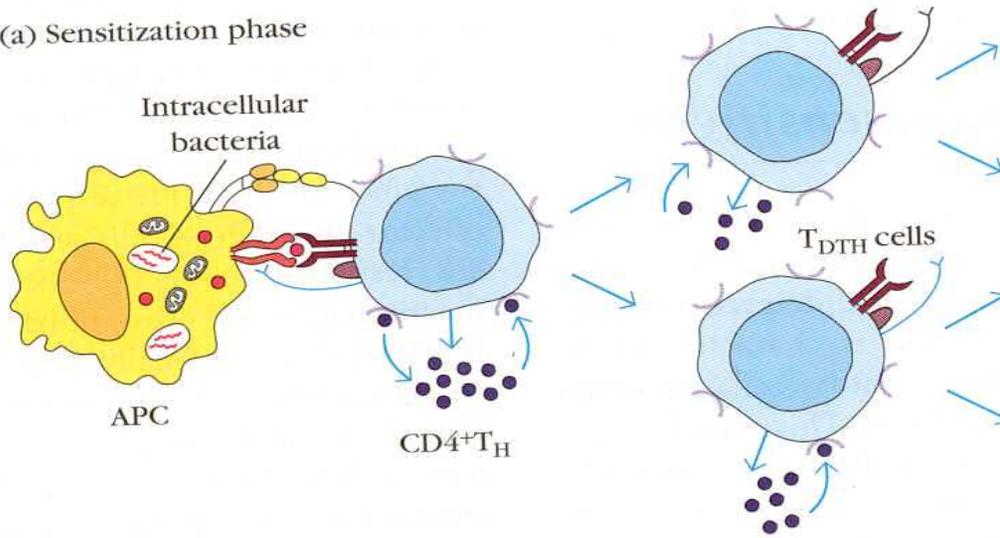
- Recrutement local de macrophages par les cytokines et chimiokines des lymphocytes T auxiliaires activés. Si ce recrutement devient chronique : formation d'un granulome (tuberculeux par ex)

- Les phénomènes de type IV sont toujours localisés dans un tissu

## Induction d'une hypersensibilité de contact



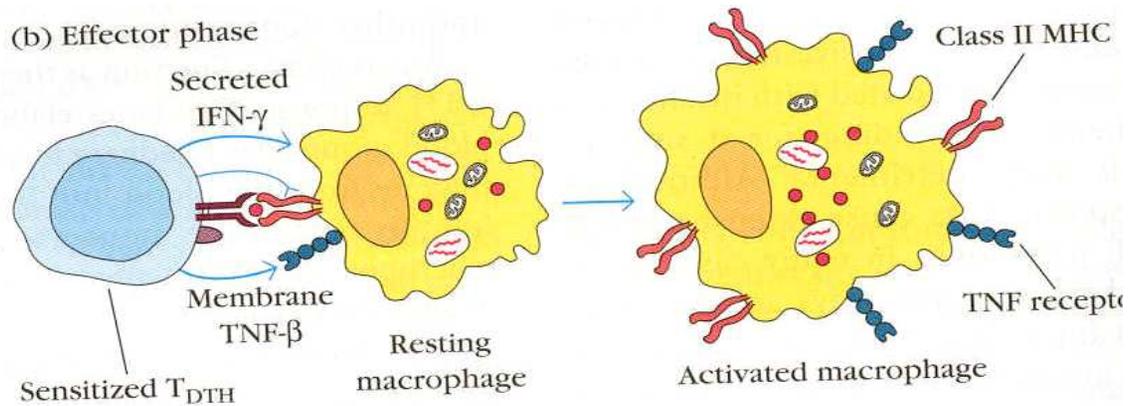
(a) Sensitization phase



Antigen-presenting cells:  
Macrophages  
Langerhans cells

T<sub>DTH</sub> cells:  
T<sub>H</sub>1 cells (generally)  
CD8<sup>+</sup> cells (occasionally)

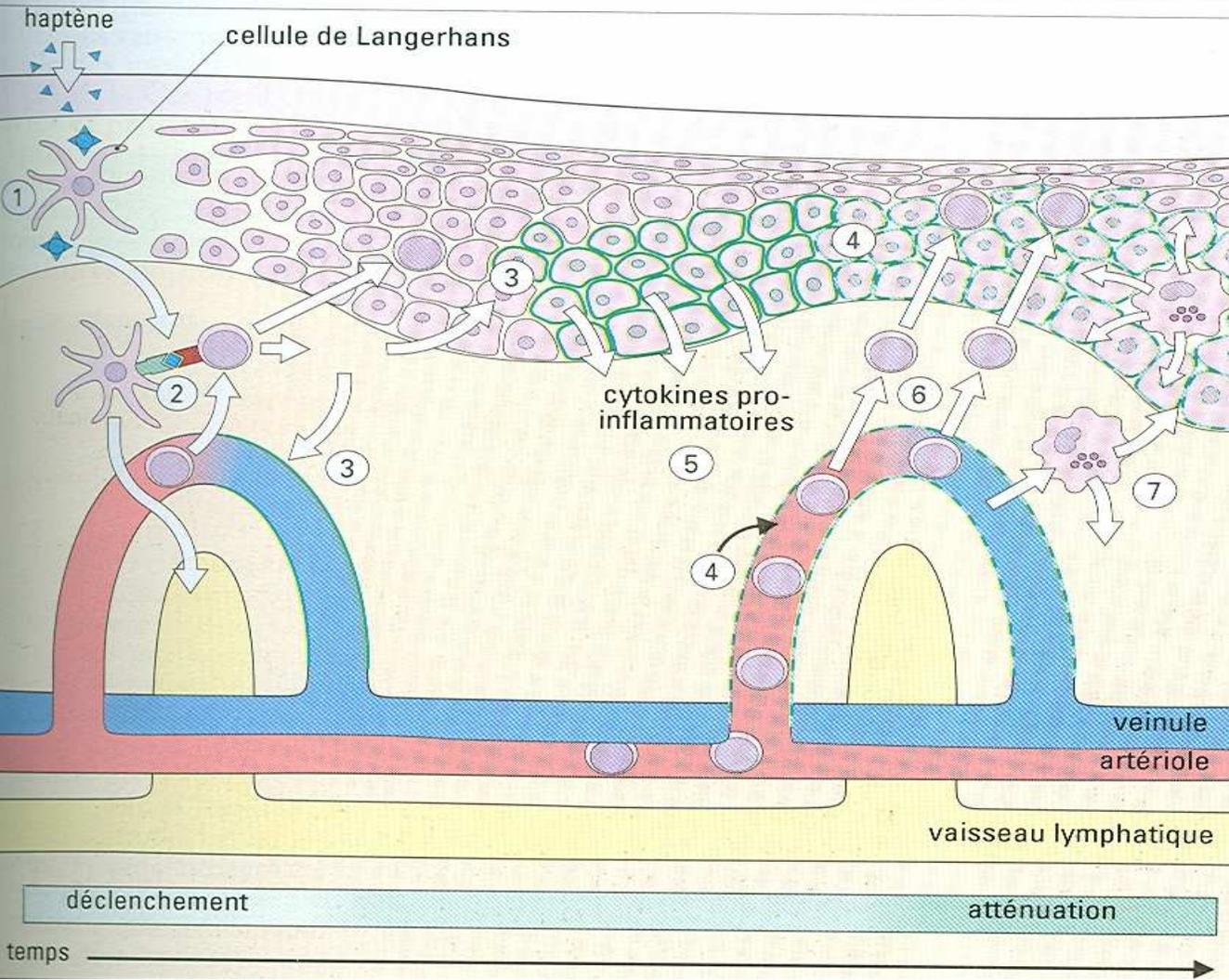
(b) Effector phase



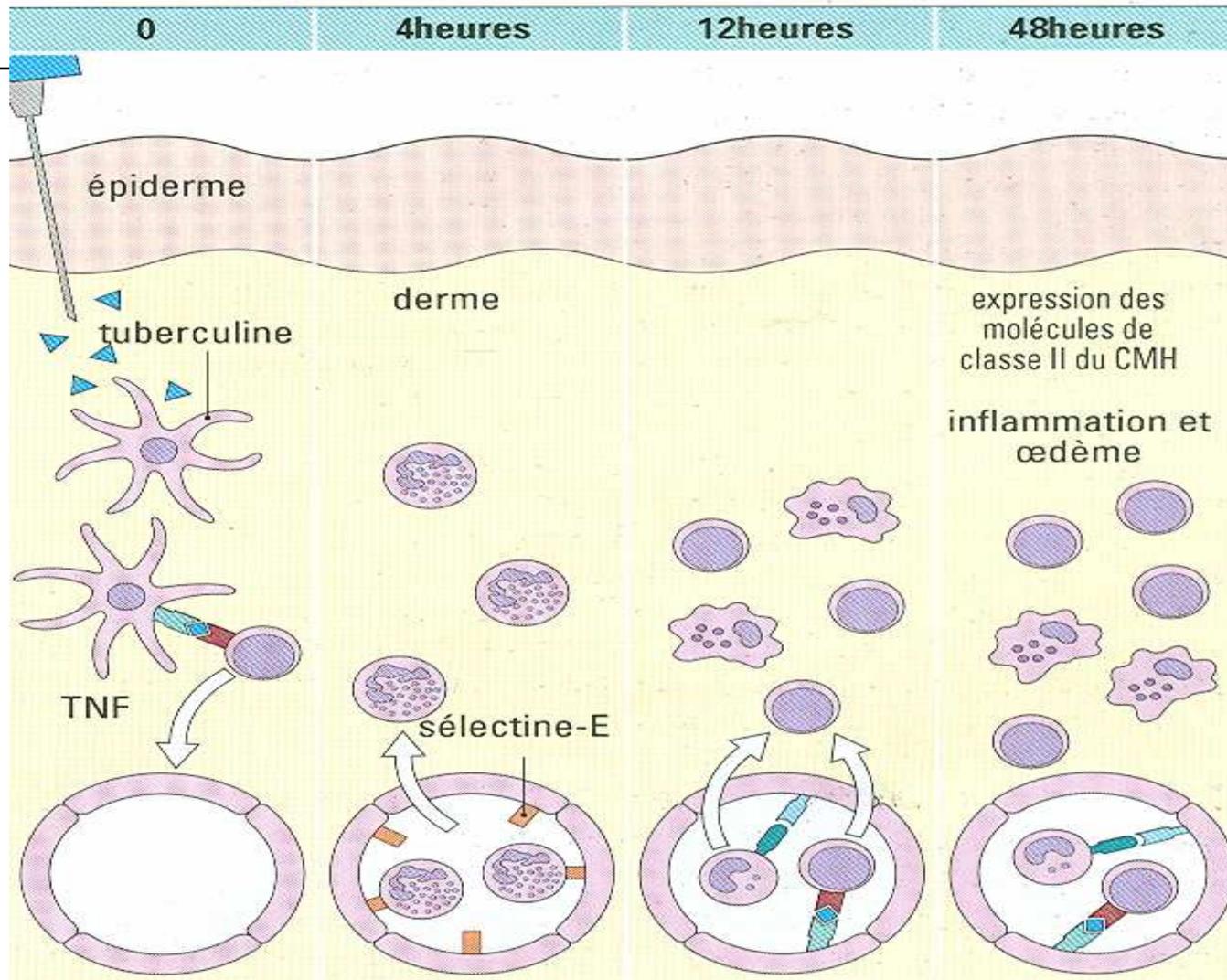
T<sub>DTH</sub> secretions:  
Cytokines: IFN-γ, TNF-β, IL-2,  
IL-3, GM-CSF  
Chemokines: IL-8, MCAF, MIF

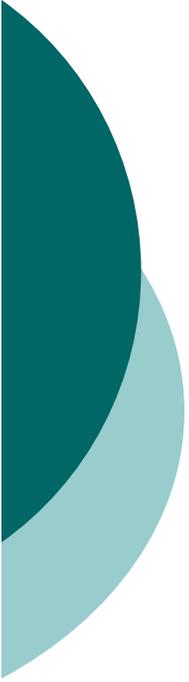
Effects of macrophage activation:  
↑ Class II MHC molecules  
↑ TNF receptors  
↑ Oxygen radicals  
↑ Nitric oxide

# Expression de l'hypersensibilité de contact



## Hypersensibilité de type tuberculinique





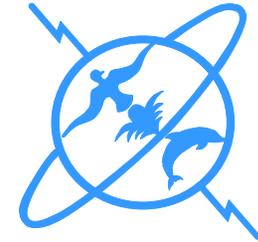
## Exemples de phénomènes de type IV

---

- Dermatite de contact
- Réponse à certaines infections, ou corps étrangers
  - Granulomes
- Rejet aigu et subaigu des greffes
- De nombreuses maladies autoimmunitaires (diabète de type I, thyroïdite, etc.)

Module optionnel (M 22): **Biochimie-Immunologie**  
Élément : Immunologie

**Cours d'Immunologie**



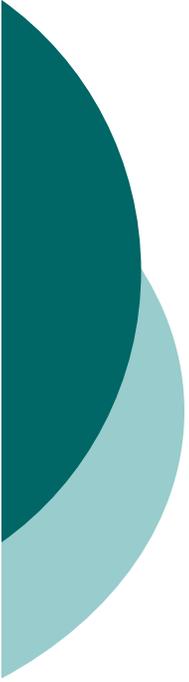
**Pr. Saaïd AMZAZI**

**I- Les Hypersensibilités**

**II- La Tolérance immunitaire et l'auto-immunité**

**III- La vaccination**

**IV- Les techniques immunologiques**



---

# 2<sup>ème</sup> séance

La tolérance immunitaire  
et l'Autoimmunité

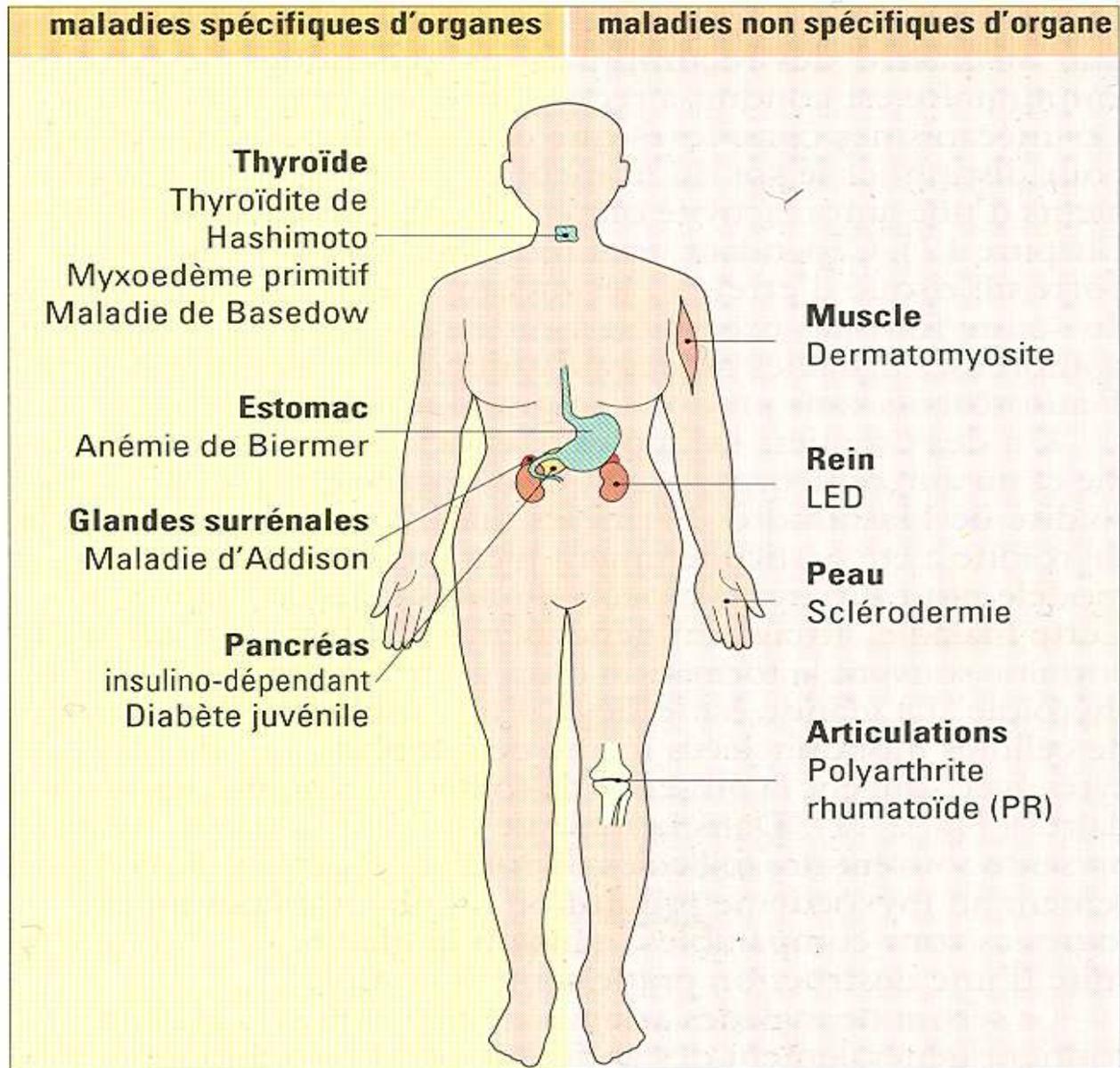
# Maladies autoimmunes

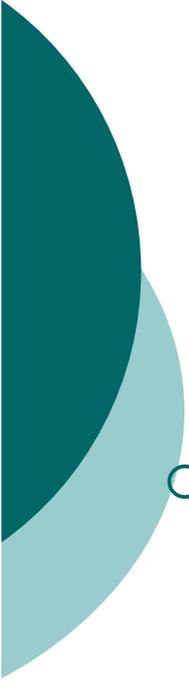
- Résultent généralement d'une interaction de l'environnement avec un contexte génétique particulier
- Selon les maladies, la part respective de l'un et de l'autre varie considérablement

## Deux grandes familles

- Maladies « systémiques » avec immunité dirigée contre de multiples antigènes ubiquistes (antigènes du noyau, du cytoplasme,...)
- Autoimmunité spécifique d'un organe

## Deux types de maladies auto-immunes





# La pathogénie de deux types de maladies autoimmunitaires est en grande partie distincte

---

- Autoimmunité spécifique d'un organe
  - Événement fortuit provoquant la rupture de tolérance, système immunitaire ~ normal
    - Infection et mimétisme moléculaire...
- Autoimmunité spécifique
  - Anomalie intrinsèque de la différenciation des lymphocytes B: les lymphocytes B immatures produisent des quantités importantes d'autoanticorps polyspécifiques et capables d'interagir avec des antigènes nucléaires



---

- Réponse secondaire des lymphocytes B autoréactifs

- Interaction avec antigènes nucléaires en périphérie**

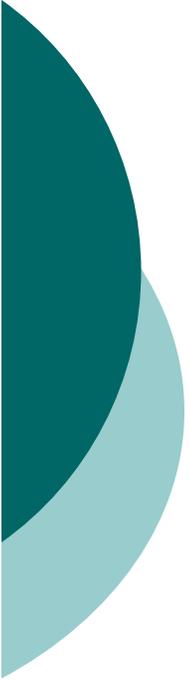
- Anomalies de l'apoptose ou défaut de clairance des cellules apoptotiques
    - Rayons UV, médicaments

- Aide des lymphocytes Th2**

- Reconnaissance de peptides provenant de protéines nucléaires

- Ces maladies résultent de la conjonction chez un même individu de multiples phénomènes:

- . défaut de sélection négative,
  - . réactivation périphérique des clones autoréactifs
  - . incapacité à contrôler l'inflammation provoquée par les complexes immuns ou les autoanticorps



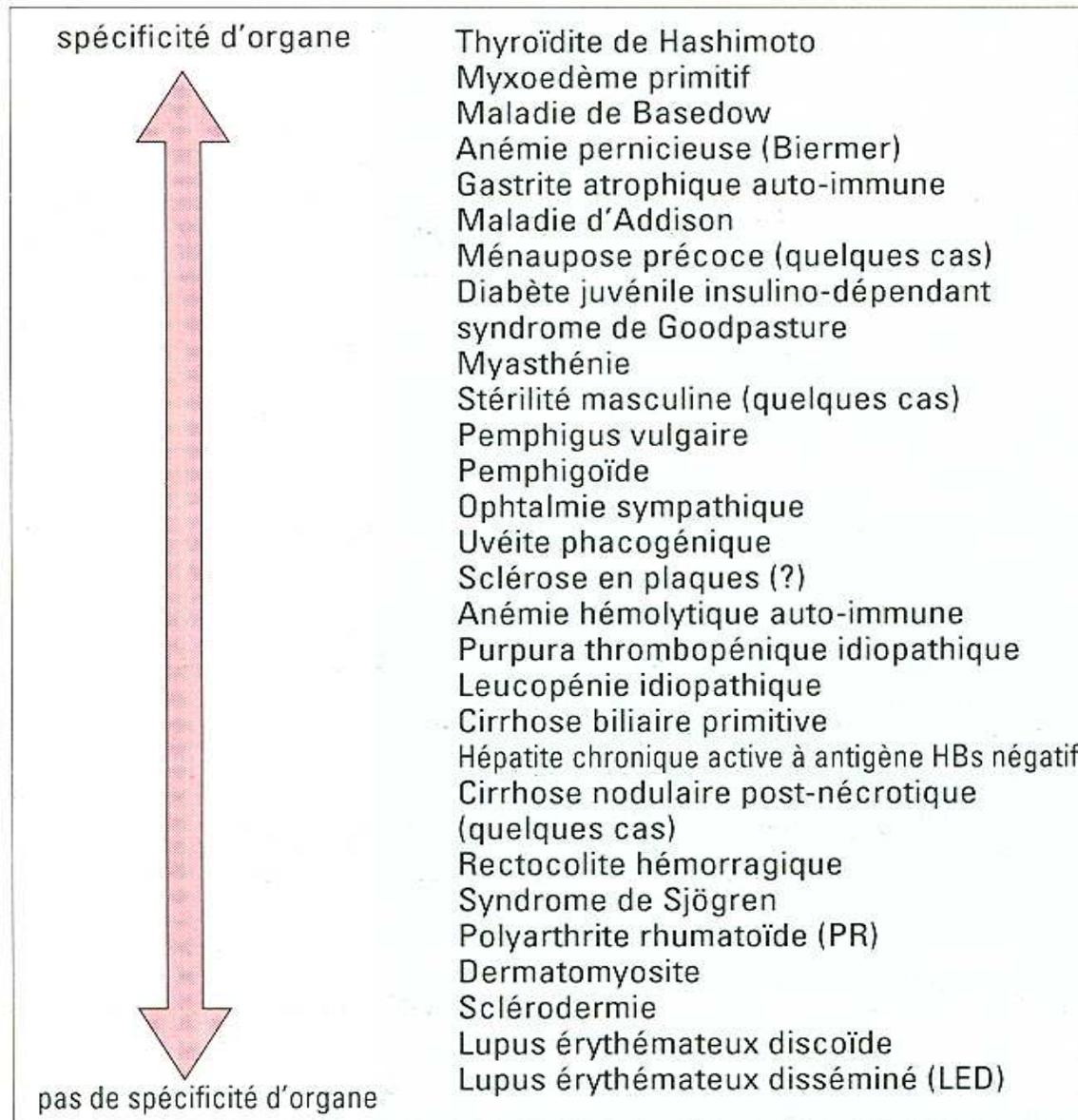
# Nature des événements déclenchants

---

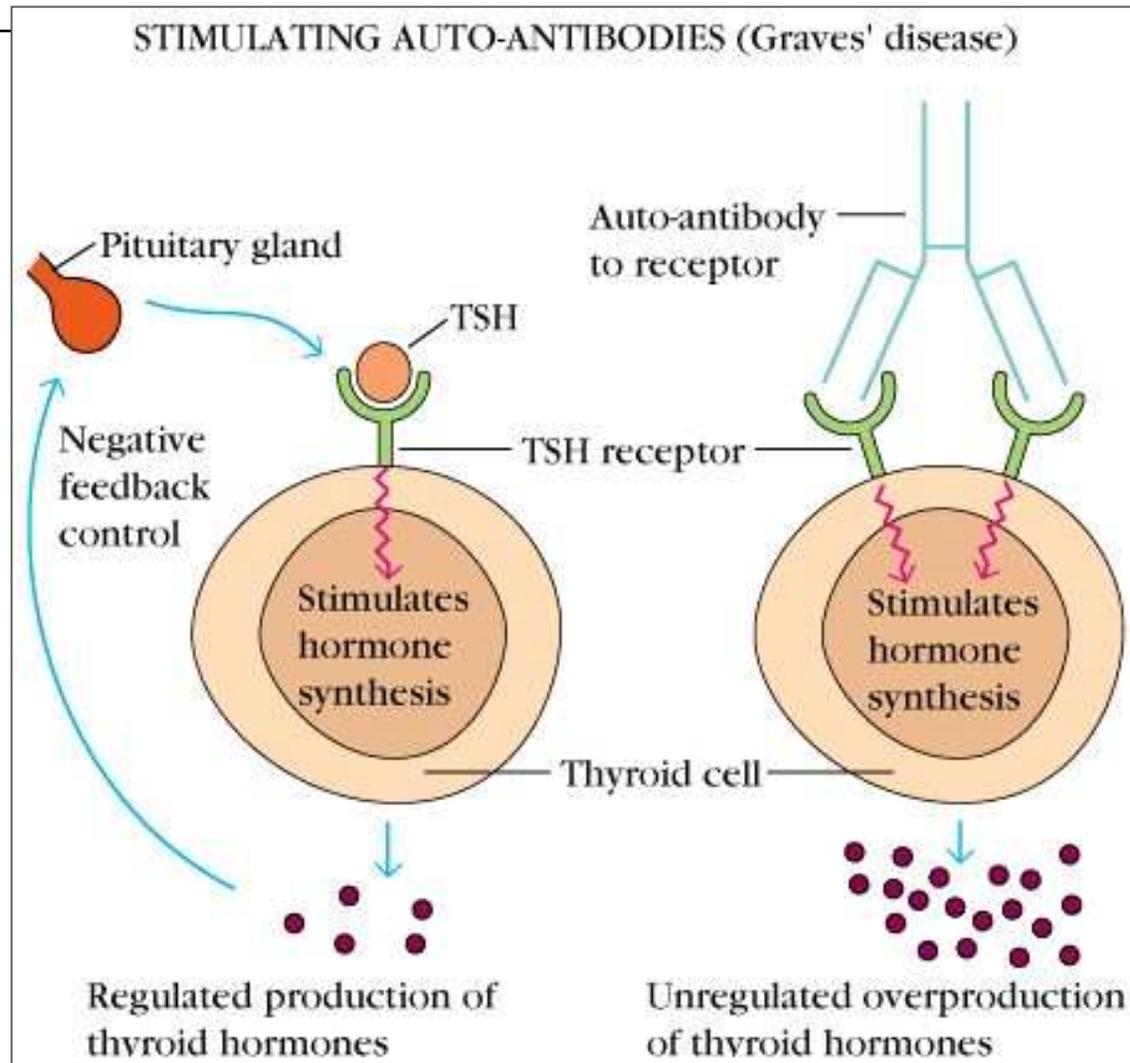
- Médicament
- Soleil
- Infection
- ...

# Tolérance immunitaire et autoimmunité

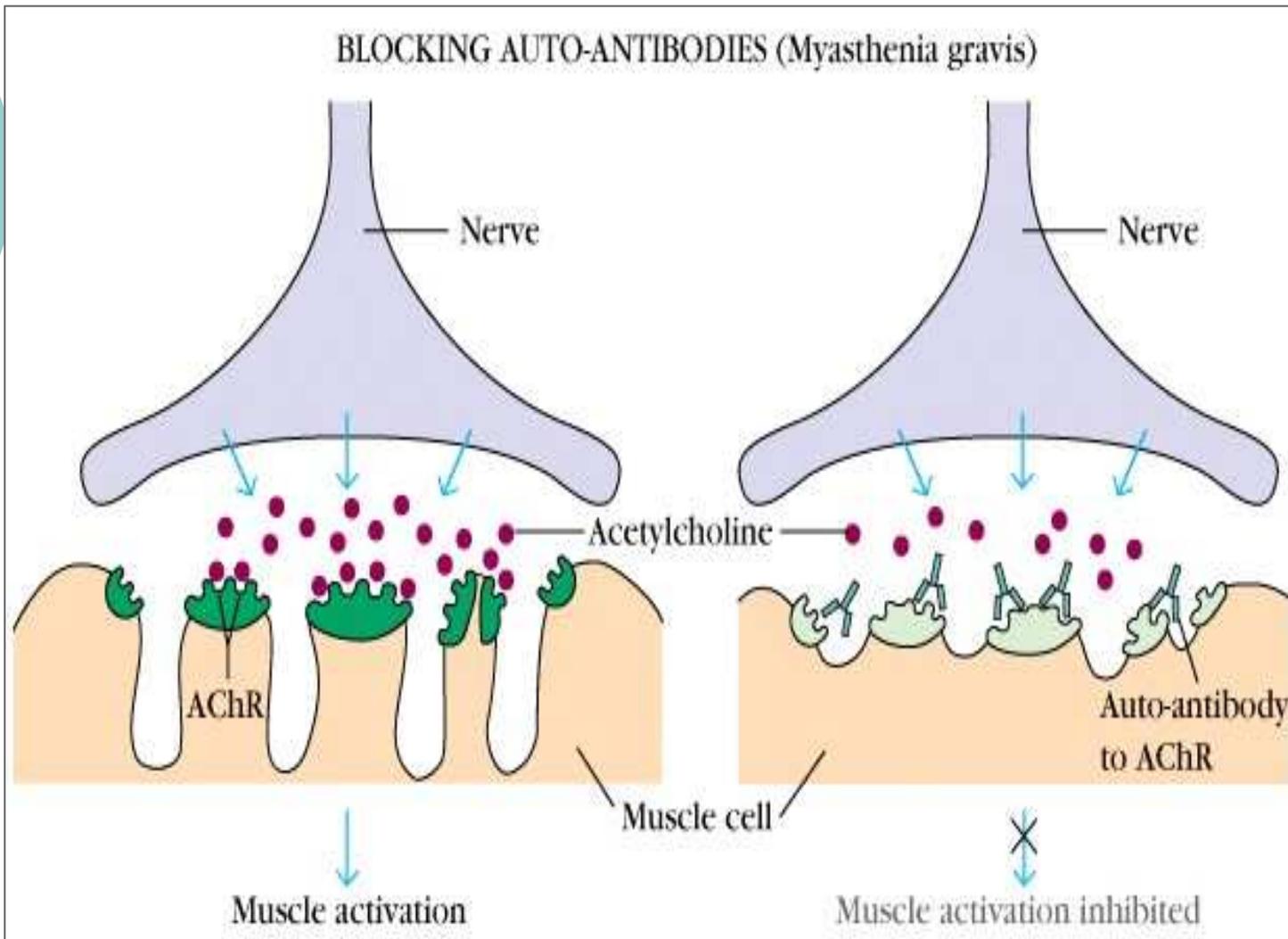
## Eventail des maladies auto-immunes



# Thyroidite autoimmune de type 3 (Basedow) avec autoanticorps anti-récepteurs de la TSH et hyperthyroïdie



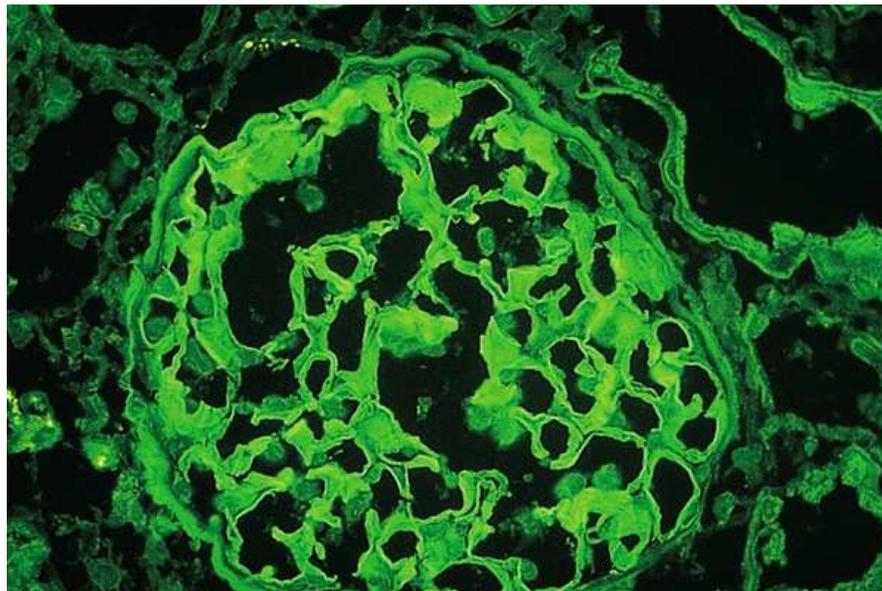
# Myasthénie grave: Anticorps anti-récepteurs de l'acétylcholine



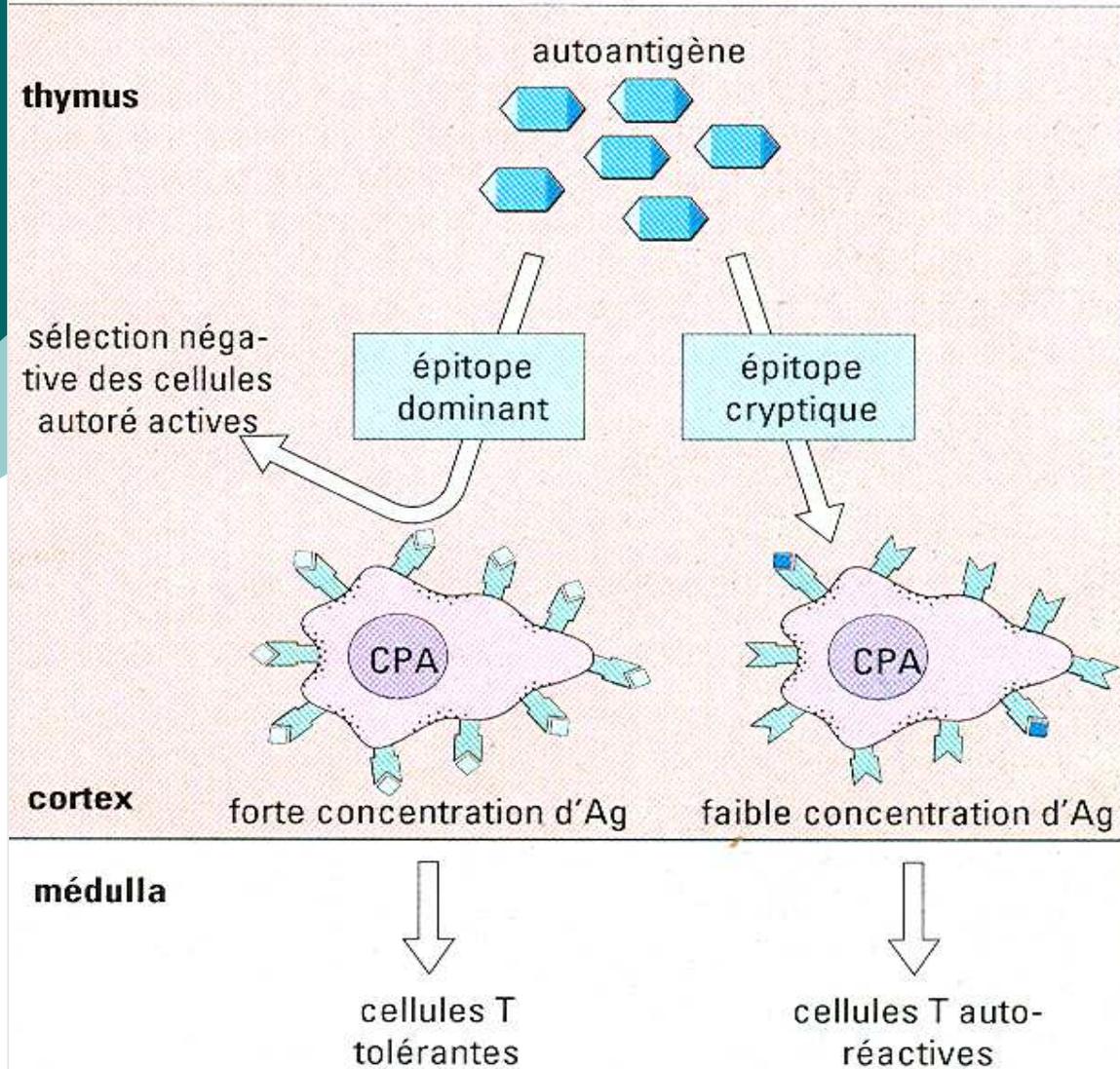
## La maladie de Goodpasture

---

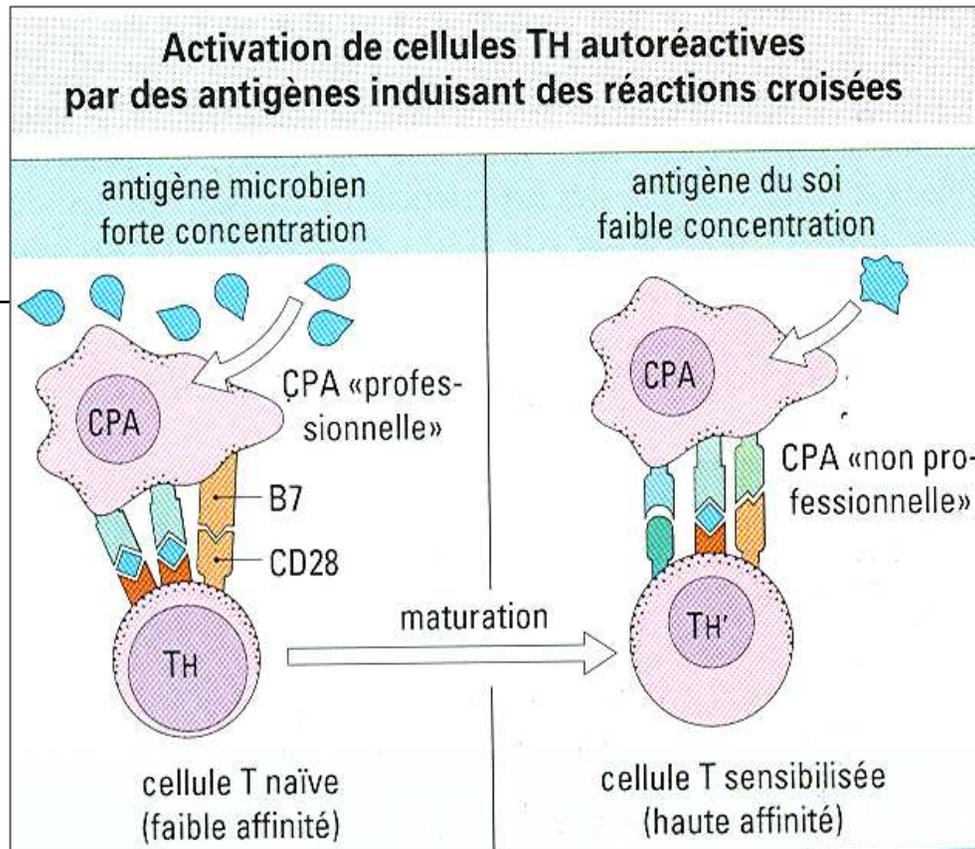
- Autoanticorps dirigés contre un antigène présent dans la membrane basale des glomérules et du poumon
- La fixation de l'anticorps sur l'antigène se fait au sein du tissu lui-même (rein et poumon)



## Les peptides du soi peu accessibles n'induisent pas de tolérance T

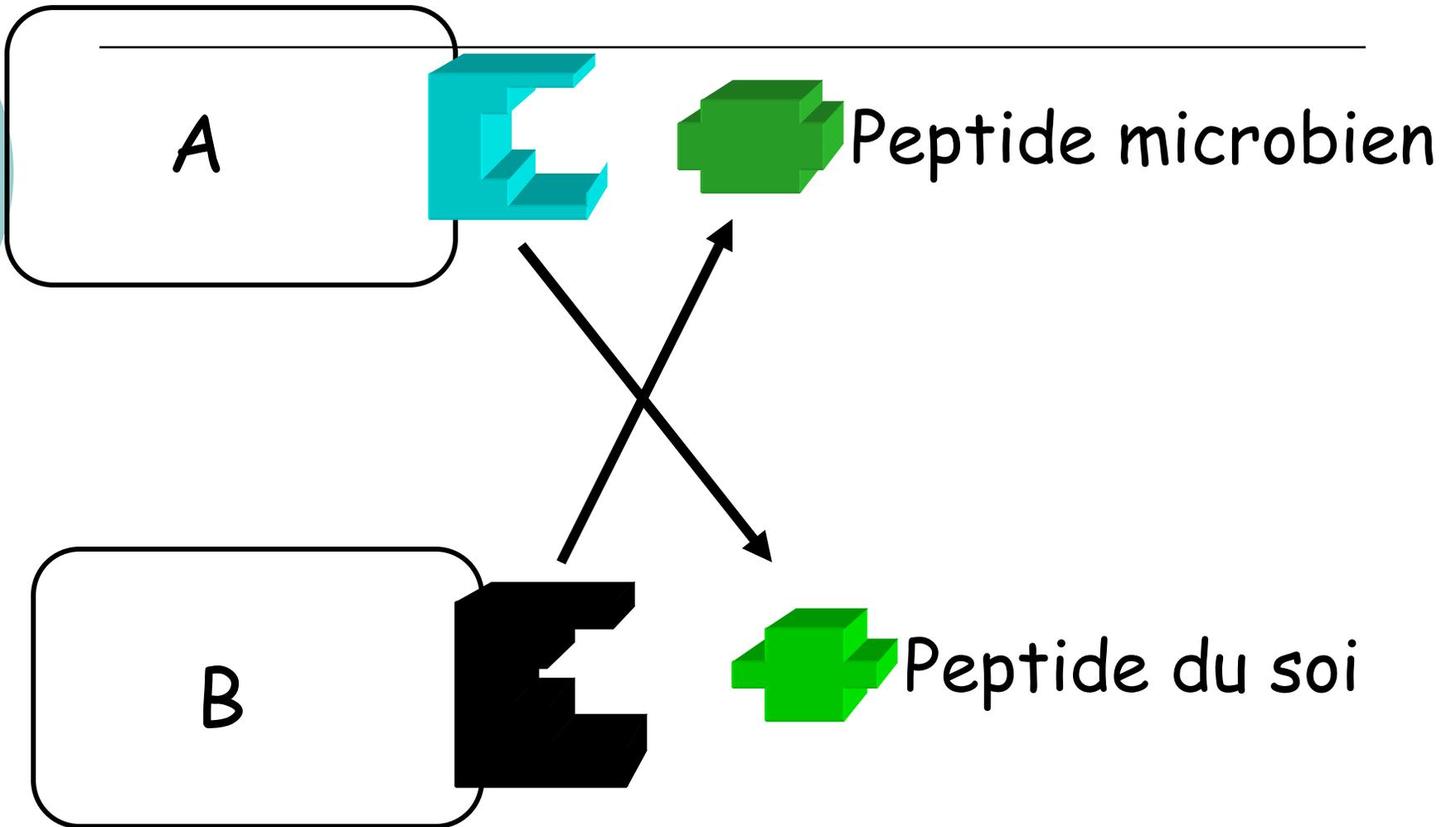


Les peptides du soi présentés en forte concentration par les CPA (**dominants**), provoquent la délétion ou l'anergie des clones T autoréactifs en développement, de sorte que seule une population T tolérante quitte le thymus. Au contraire, les épitopes qui sont peu exprimés par les CPA (**cryptiques**), ne permettent pas de détruire les cellules T autoréactives au sein du thymus.

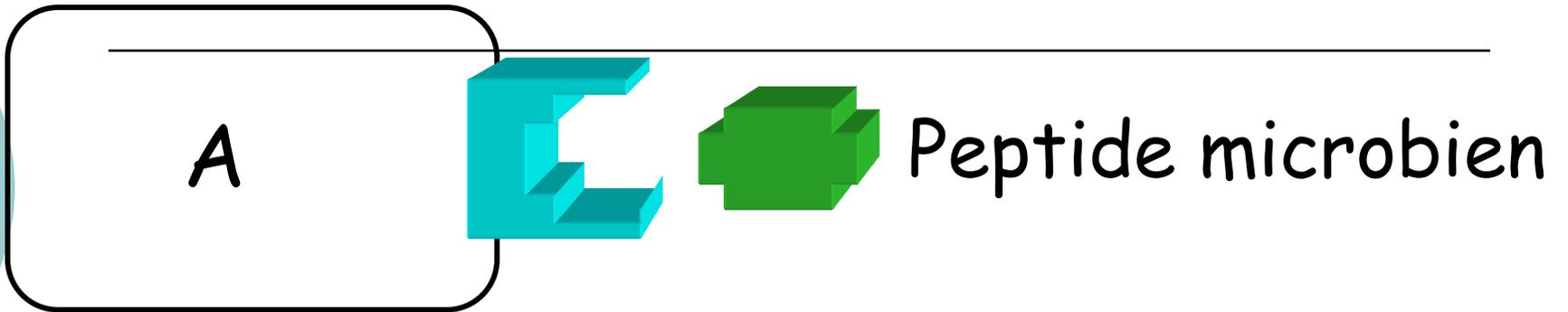


L'incapacité des cellules TH naïves à reconnaître l'autoantigène du fait d'une concentration ou d'une affinité trop faible, peut être contournée par un antigène bactérien induisant une réaction croisée, ce qui permet une sensibilisation des TH par une CPA professionnelle exprimant B7. Cette sensibilisation augmente l'expression des molécules accessoires LFA-1,...permettant aux TH sensibilisées de réagir avec 1 CPA non professionnelles en l'absence de tout signal de costimulation, telle qu'une cellule épithéliale présentant des peptides du soi.

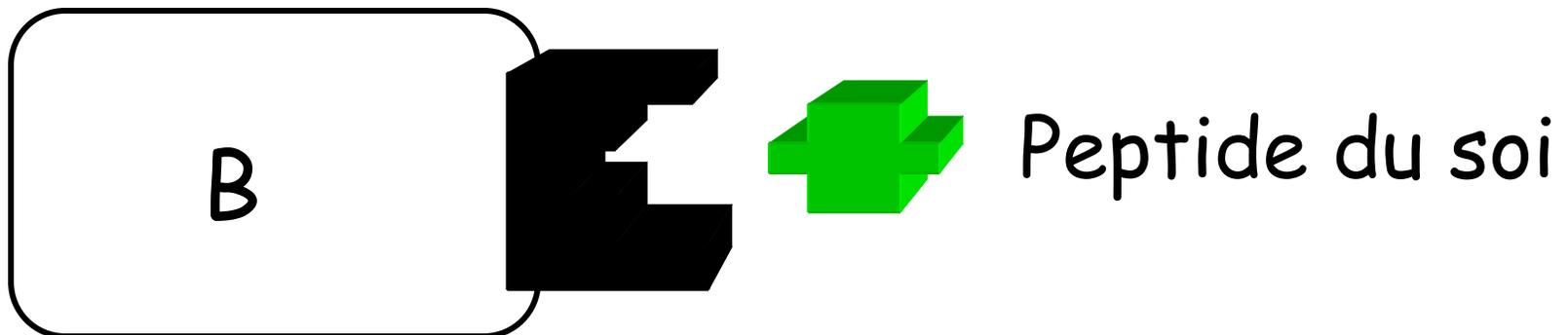
# Réactivité croisée



# Réactivité croisée



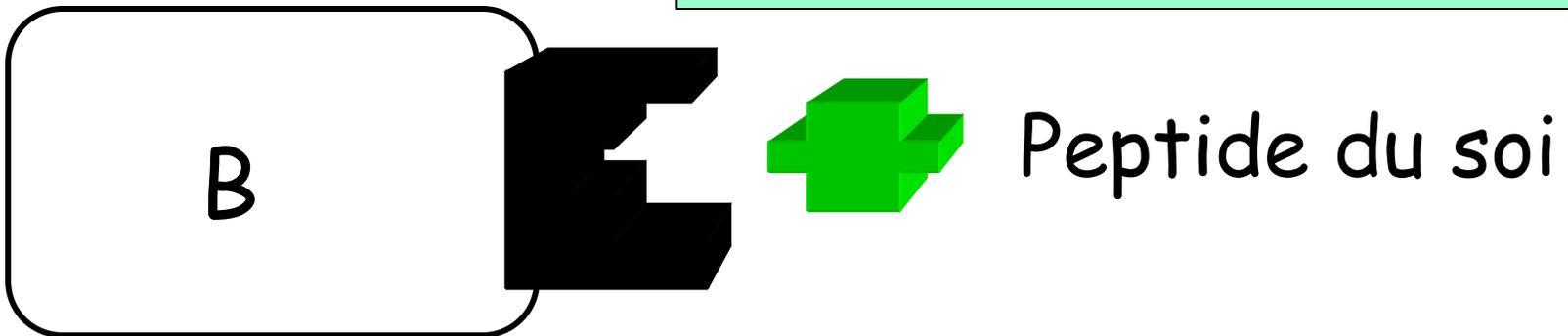
Trop d'affinité pour le soi : à éliminer



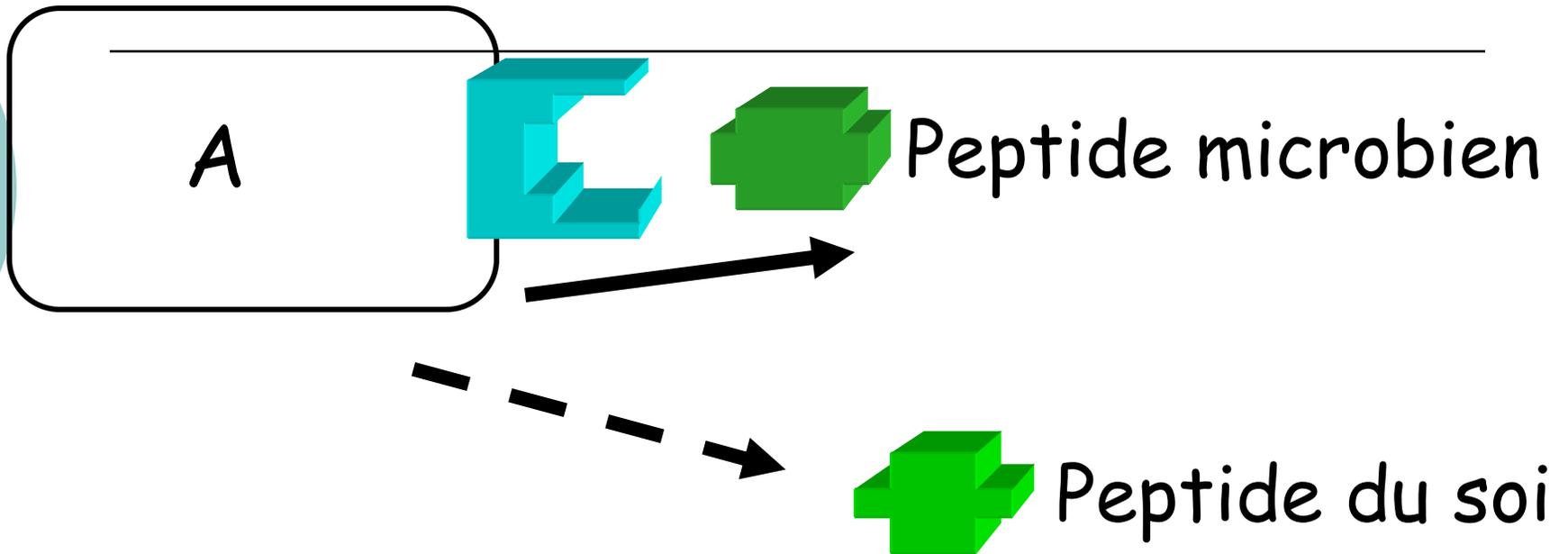
# Réactivité croisée



Affinité modérée pour le soi mais excellente affinité pour un peptide microbien : à conserver!



# Réactivité croisée

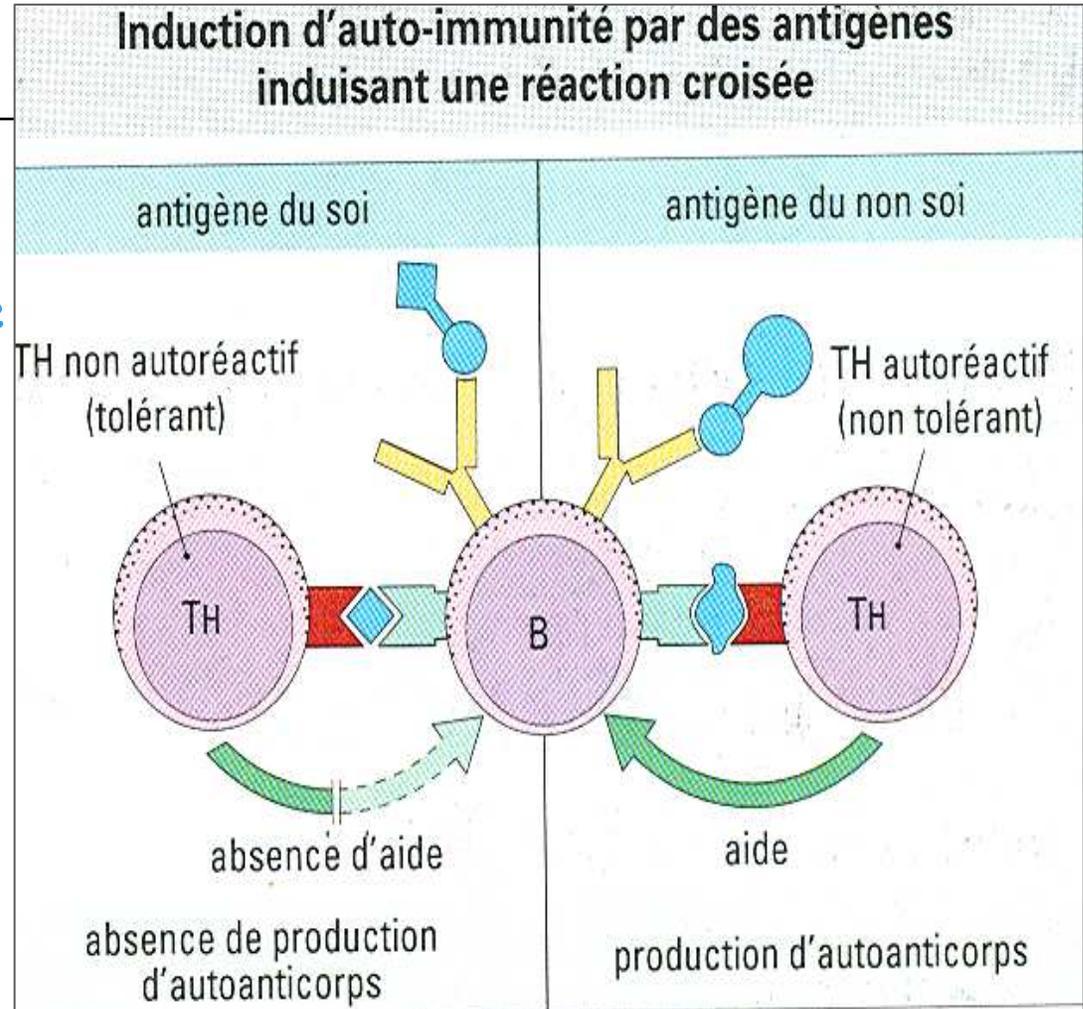


En cas d'infection ultérieure par ce microbe, l'activation du clone A pourra révéler une certaine réactivité contre le soi

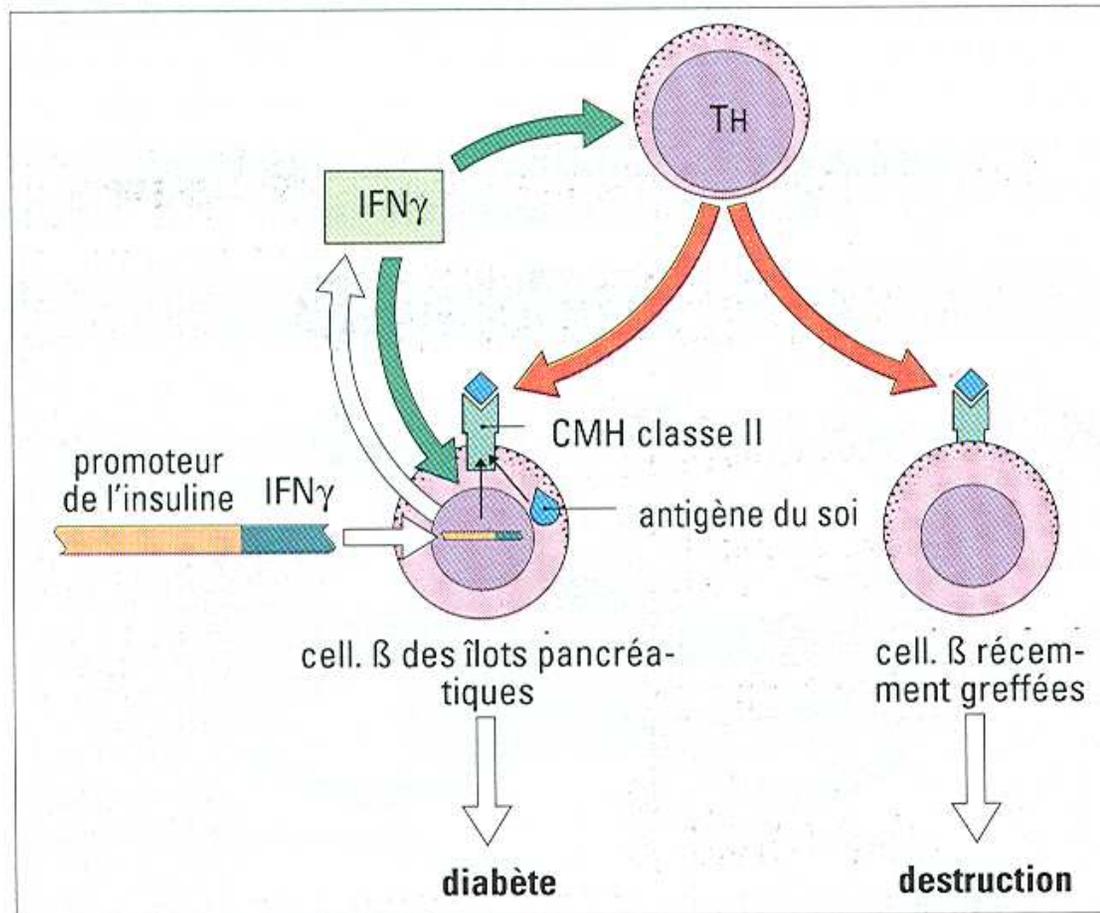
☑ **Théorie du *mimétisme moléculaire***

La cellule B reconnaît un épitope commun entre un antigène du soi et un antigène exogène.

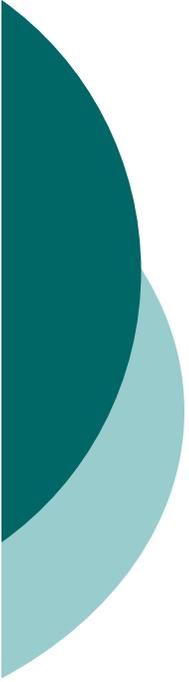
A l'état normal, LB présente l'antigène du soi sans avoir d'aide de TH autoréactives car fonctionnellement inactivées. Mais LB peut présenter un antigène du non soi présentant une réaction croisée avec le soi aux cellules TH autoréactives, ce qui va stimuler la différenciation des LB en cellules productrices d'autoanticorps



## Auto-immunité par dérégulation des cytokines



Si on introduit un transgène de l'IFN $\gamma$  dans les cellules pancréatiques, on augmente la production de cette cytokine qui provoque l'augmentation de l'expression des molécules de classe II du CMH et **active les cellules T autoréactives capable de reconnaître les antigènes du soi portées par les cellules  $\beta$**  et induire leur destruction.



# La superposition de deux systèmes fonctionnellement très différents...

---

## Immunité *Innée*

- Cellules dendritiques
- Macrophages
- Polynucléaires

## Immunité *adaptative*

- Lymphocytes T
- Lymphocytes B

# Immunité naturelle

Un jeu fixe de récepteurs invariants  
à des molécules microbiennes

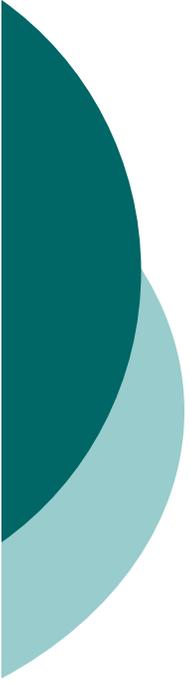


Gram<sup>-</sup> Lipopolysaccharide (LPS)

Gram<sup>+</sup> Peptidoglycans  
Acide lipotéichoïque

Champignons Mannans

Perception intrinsèque de ce qui est  
microbien, voire de ce qui est hostile...

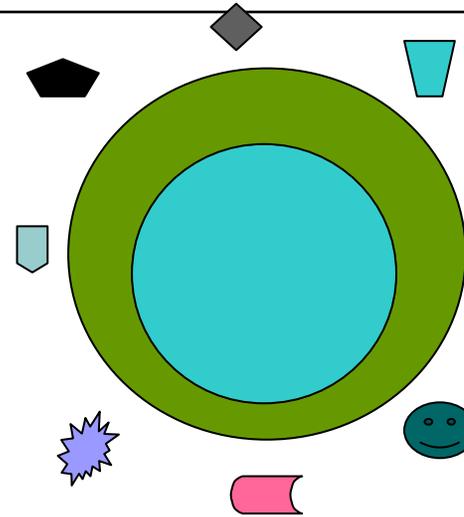


---

La tolérance intrinsèque au soi de l'immunité naturelle a été acquise après des centaines de millions d'années d'évolution qui ont sélectionné des récepteurs reconnaissant des produits microbiens et non des produits du soi ...

# Immunité naturelle

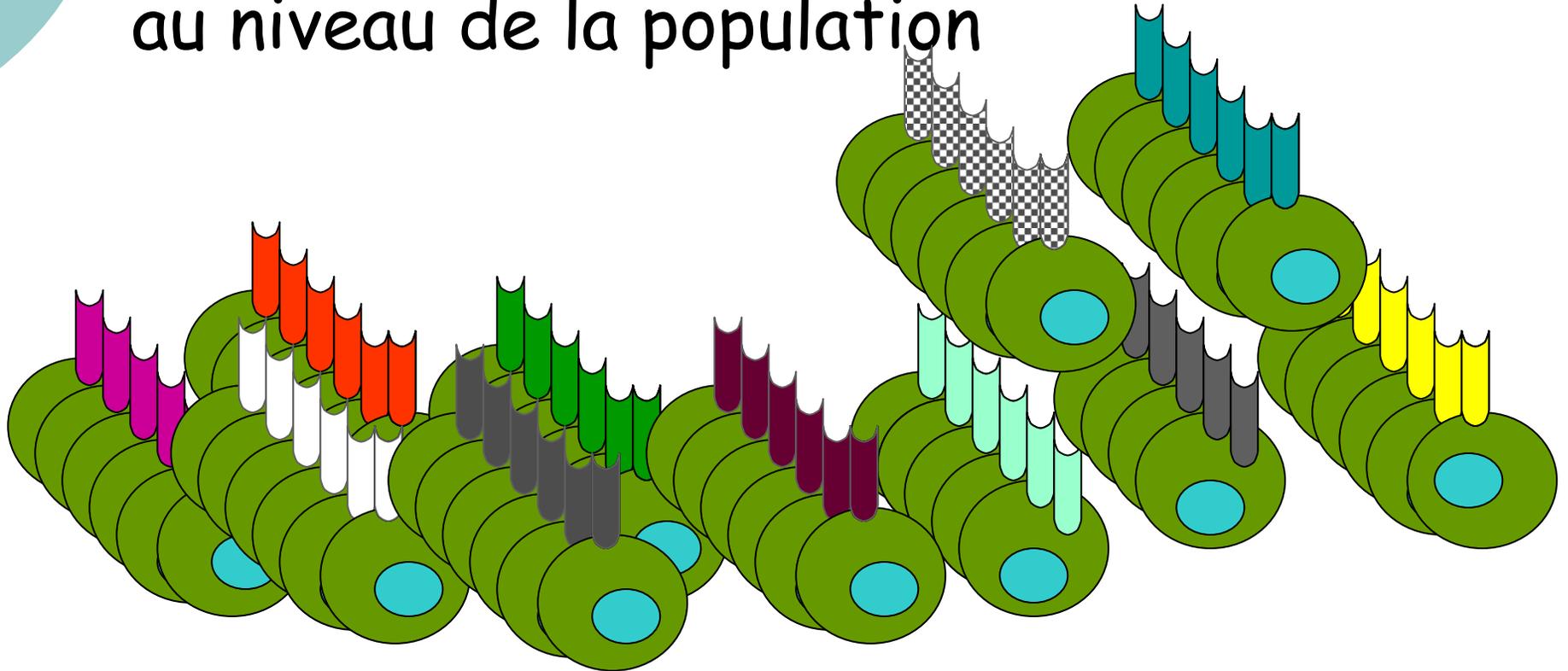
## Limitations



- Répertoire antimicrobien limité
- Pas d'*adaptation* aux mutations microbiennes
- Pas de perception des microbes intracellulaires

# Immunité adaptative

- *Un seul* récepteur de structure donnée sur chaque cellule (et sur ses cellules-filles).
- Une *multitude* de récepteurs différents au niveau de la population





« Le » récepteur spécialisé des  
cellules de l'immunité adaptative

---

TCR : T cell receptor

BCR : B cell receptor

Son ligand : *l'antigène*



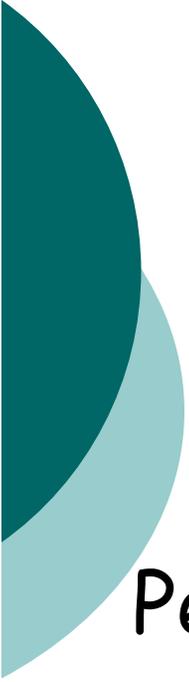
# Immunité adaptative

---

## Avantages

Fait face à la diversité des microbes et à leurs mutations par la génération aléatoire et continue de nouveaux récepteurs

Perception *analytique* de séquences peptidiques mais pas de perception intrinsèque de ce qui est microbien ou pas, hostile ou non



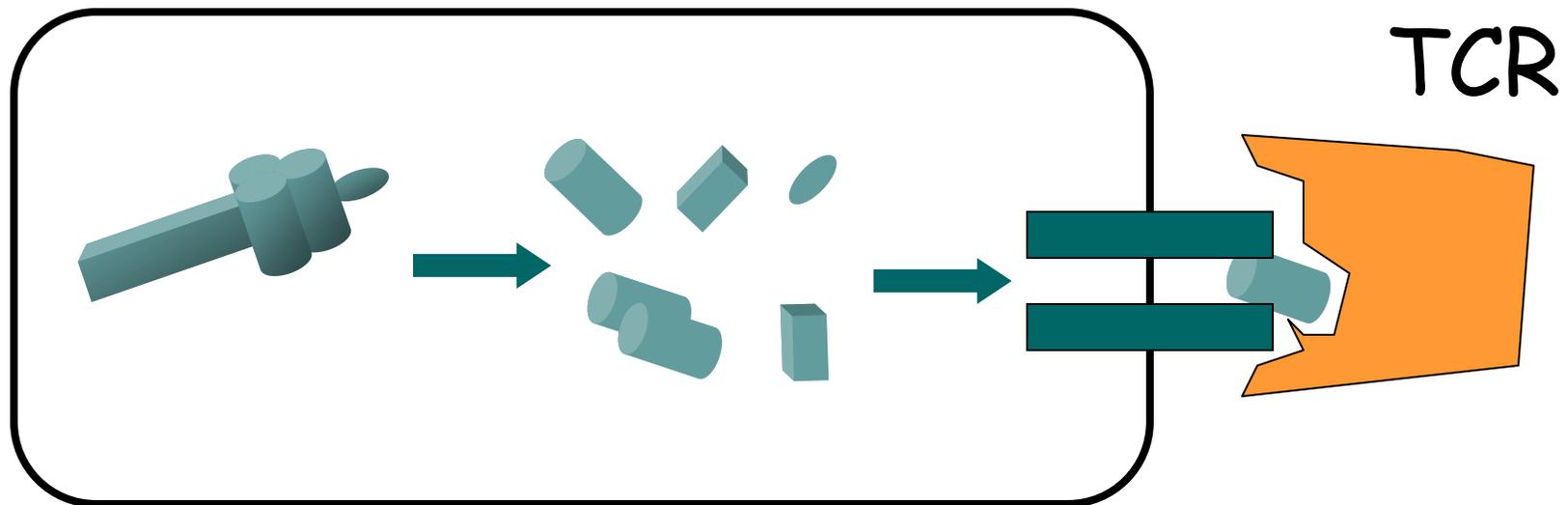
# *Immunité adaptative*

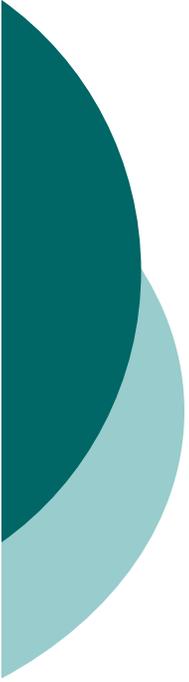
---

## Avantages

Perçoit les microbes intracellulaires grâce au système *d'échantillonnage et de présentation* par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Toute protéine *présente* dans la cellule est *découpée* en peptides dont certains sont « chargés » sur des molécules présentatrices et « présentés » au TCR des lymphocytes T

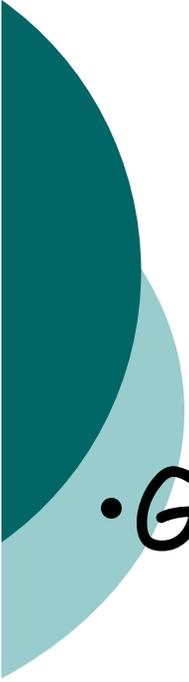




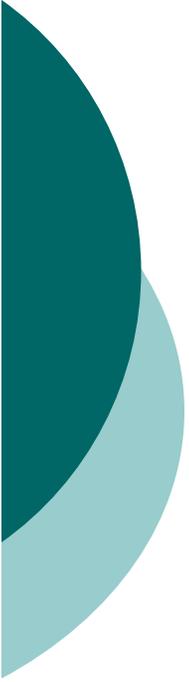
---

Ce système d'échantillonnage ne discrimine pas les protéines selon leur contexte

Accès égal au système d'échantillonnage pour les protéines du soi et les protéines étrangères

- 
- 
- Génération aléatoire de récepteurs
    - Système d'échantillonnage  
« universel »

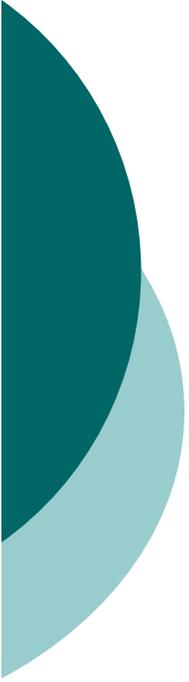
Ces deux avantages de l'immunité adaptative ont un prix...



---

...la *perception* permanente de  
multiples signaux

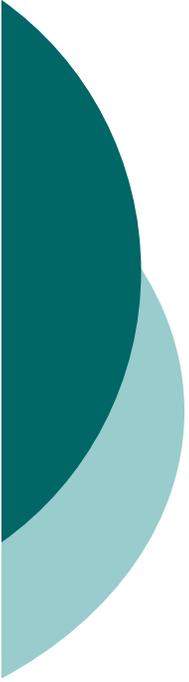
dont certains sont  
*inopportuns ! !!!!!*



---

Quels sont les signaux *opportuns*?  
(auxquels il faut répondre)

Les signaux associés à des  
agents étrangers hostiles

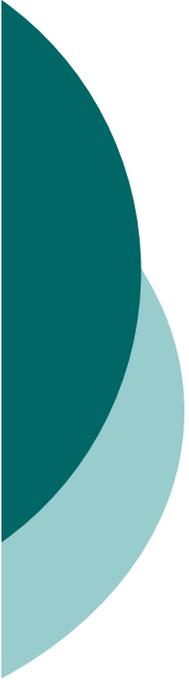


## Quels sont les signaux *inopportuns*? (auxquels il faut être *tolérant*)

---

Les signaux associés à des agents étrangers non hostiles:

- Fœtus
- Protéines alimentaires
- Particules inertes dans l'air inspiré
- **Organe greffé, sain et fonctionnel**



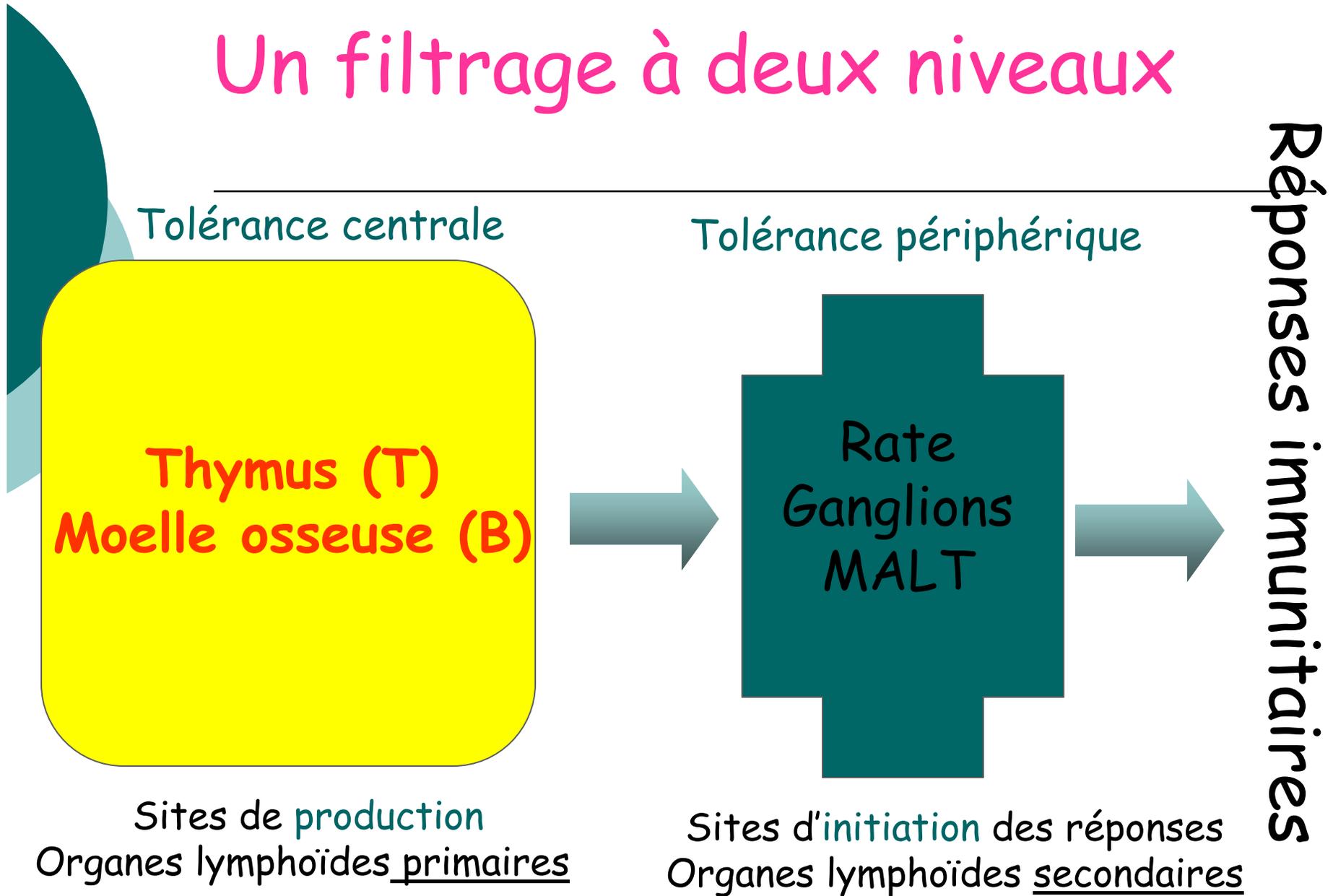
Quels sont les signaux *inopportuns*?  
(auxquels il faut être *tolérant*)

---

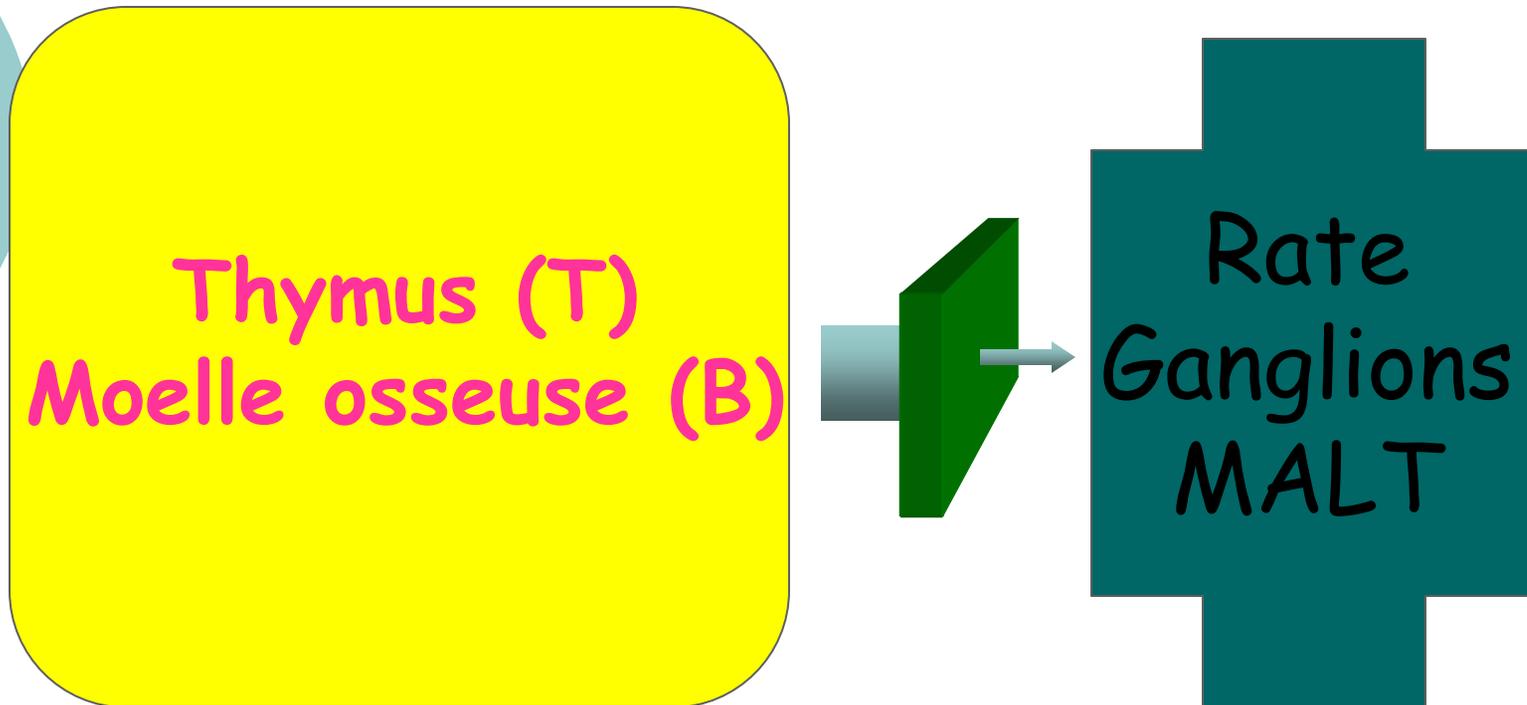
La multitude de signaux  
« de l'intérieur »  
*les signaux du soi*

...d'où la nécessité de mettre en place un  
système *actif* de *filtrage* des signaux

# Un filtrage à deux niveaux

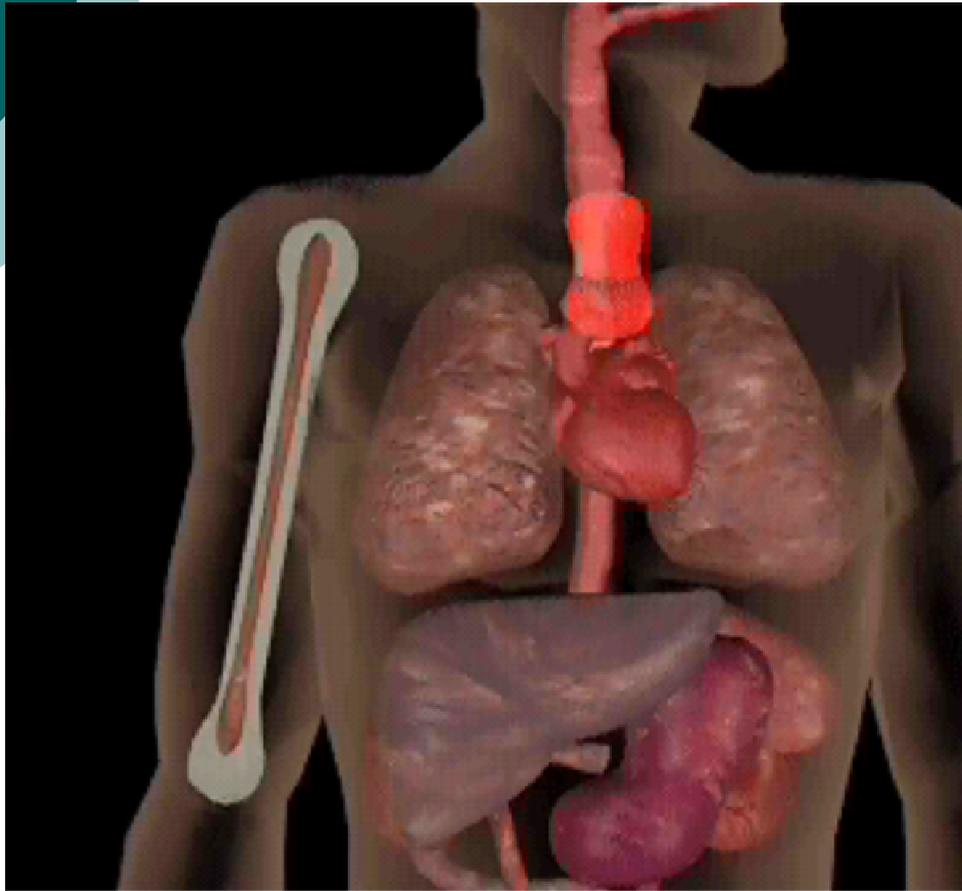


# Tolérance centrale



Éliminer dès leur élaboration des lymphocytes dont le récepteur peut percevoir des signaux inopportuns

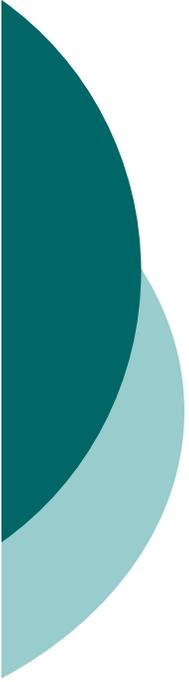
# Tolérance *centrale* dans le thymus



Physiquement *isolé*  
des signaux  
extérieurs



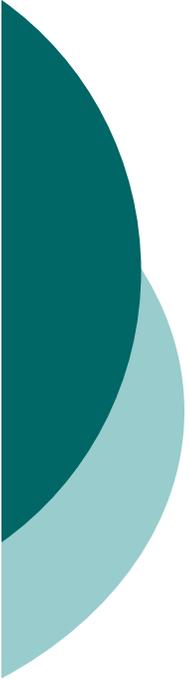
Espace de  
filtrage des  
signaux du soi



---

☑ une élimination par apoptose des lymphocytes T potentiellement autoréactifs prend place dans le thymus...

Des anomalies de l'apoptose peuvent entraîner une rupture de la tolérance au soi!



S'il y a filtrage, il doit y avoir des signaux du soi dans le thymus...

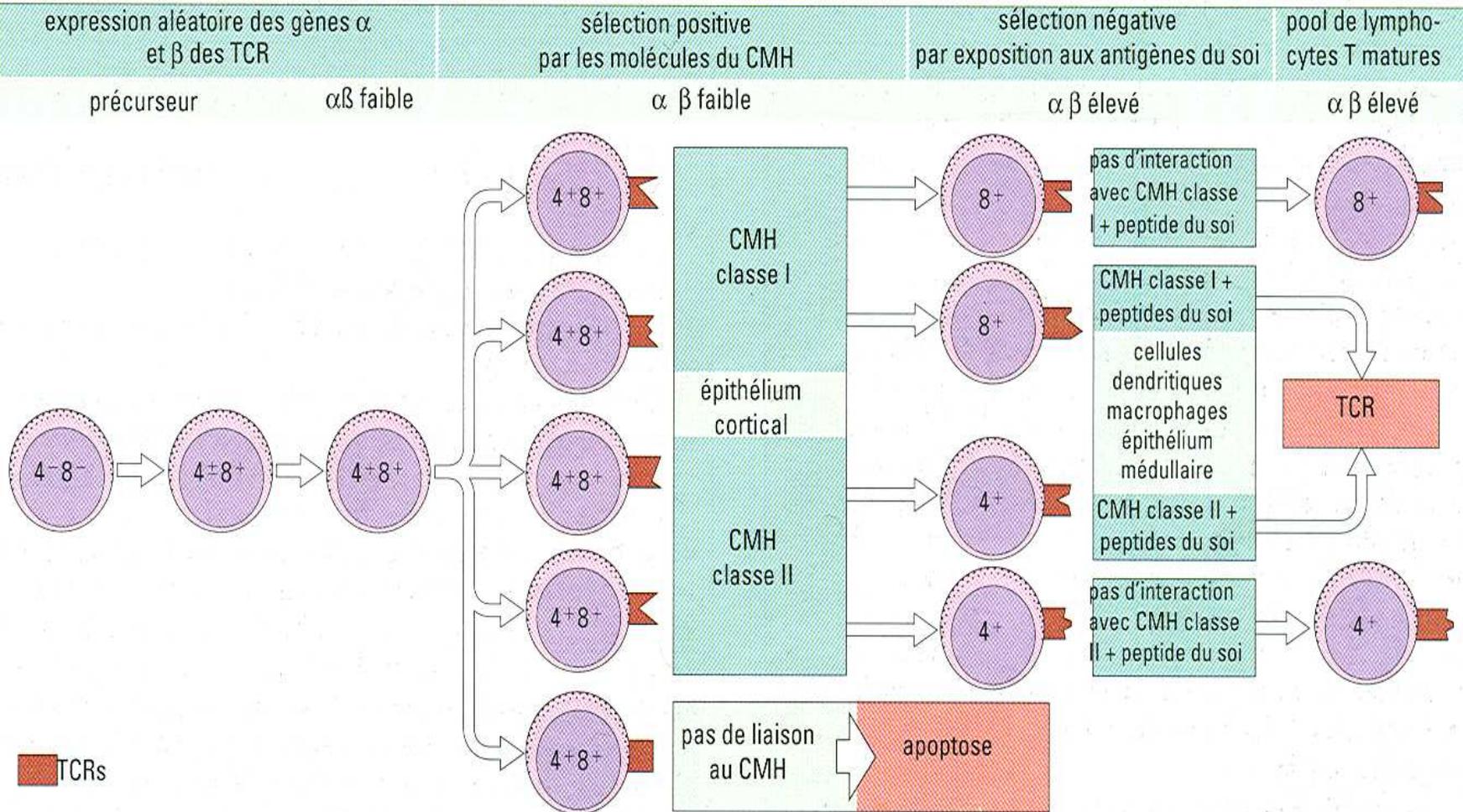
---

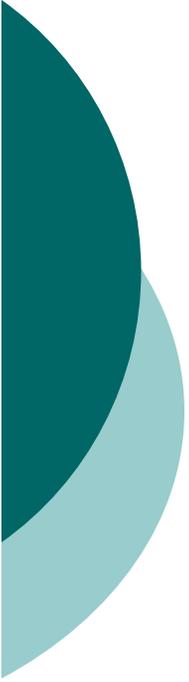
☑ des cellules du thymus expriment un large échantillon des protéines du soi et les présentent aux lymphocytes en cours de différenciation

- 
- 
- Le thymus reste fonctionnel chez l'adulte même à un âge avancé
  - Production continue de « nouveaux » lymphocytes T qui partent vers les organes lymphoïdes secondaires ( $5 \times 10^7$ /jour!)

Des anomalies fonctionnelles du thymus liées au vieillissement ou à des tumeurs peuvent entraîner une rupture de tolérance

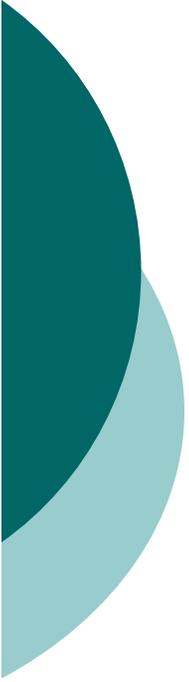
## Différenciation intrathymique des cellules T





*Tous* les lymphocytes T  
autoréactifs sont-ils éliminés  
dans le thymus ??

Pourquoi laisser passer des  
lymphocytes T *autoréactifs*  
*?????*



---

De même, chez les sujets **sains**, existence de lymphocytes T dirigés contre de multiples déterminants **du soi** (la myéloperoxydase thyroïdienne, le collagène, les récepteurs de l'acétylcholine, etc.)

**Comment un lymphocyte T potentiellement autoréactif peut-il ne pas déclencher de réponse?**

***Tolérance périphérique***

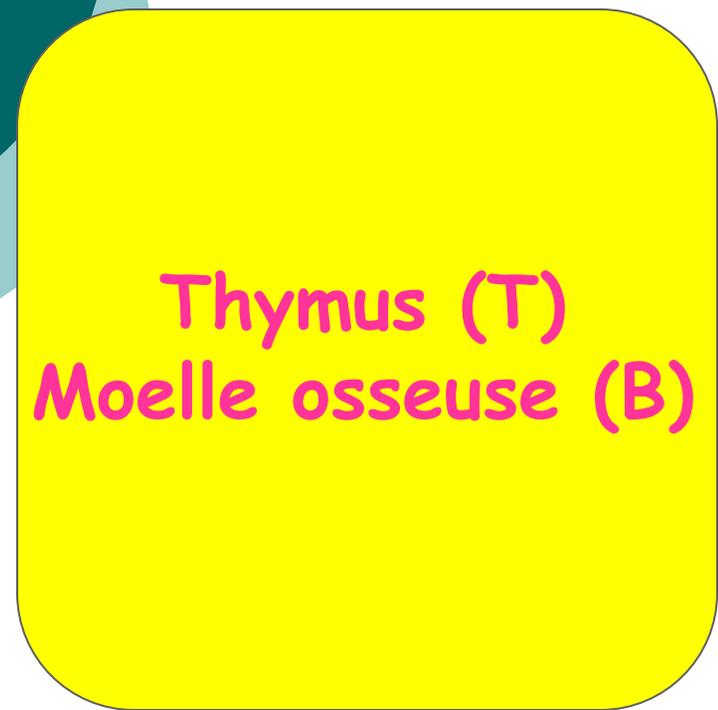


## *Tolérance périphérique*

---

- Pour *certaines* signaux du soi
- Pour *tous* les signaux *étrangers non hostiles* (qui n'ont pas été exprimés dans le thymus)

# Tolérance périphérique



Sites de production  
Organes lymphoïdes primaires

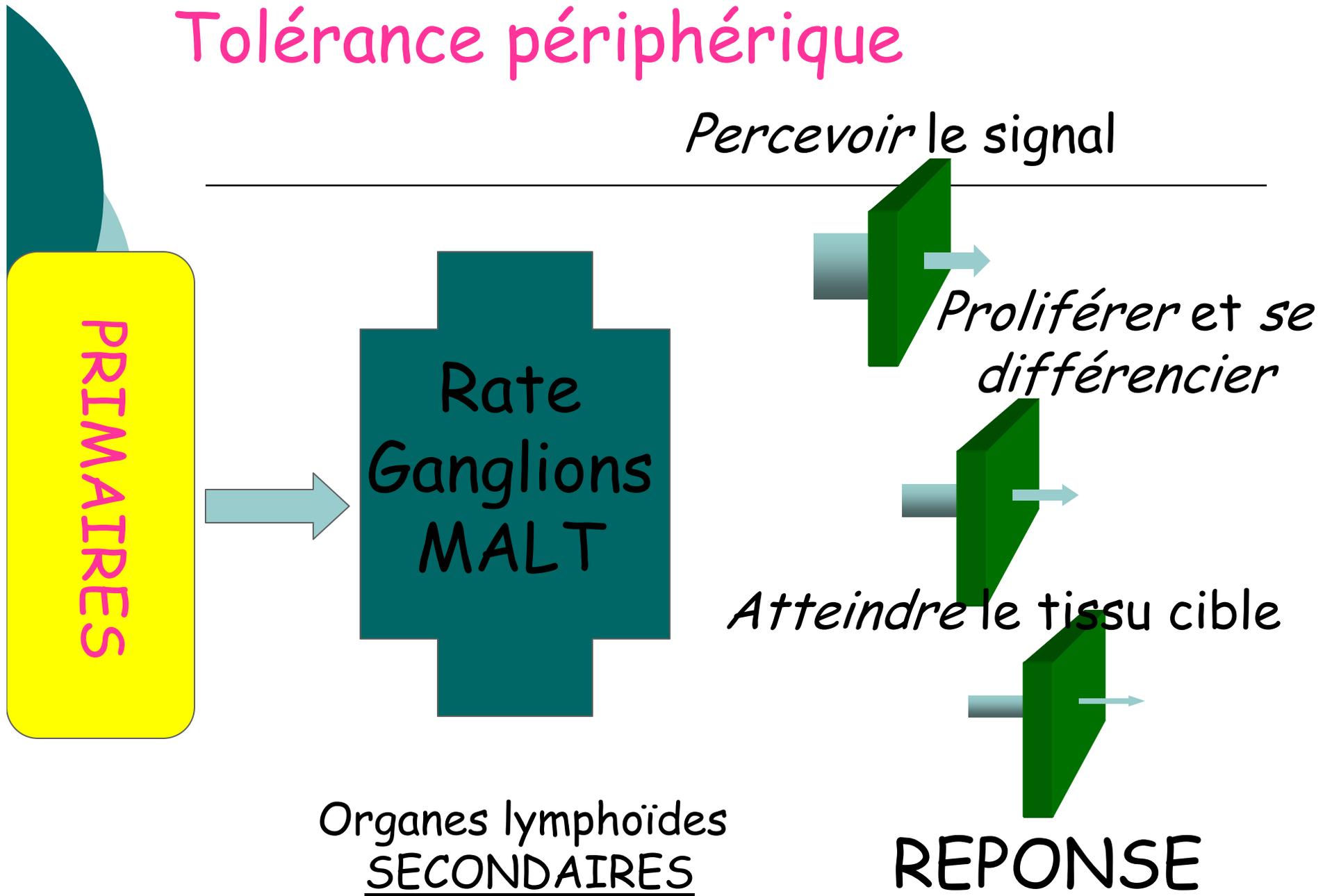


Sites d'initiation des réponses  
Organes lymphoïdes secondaires



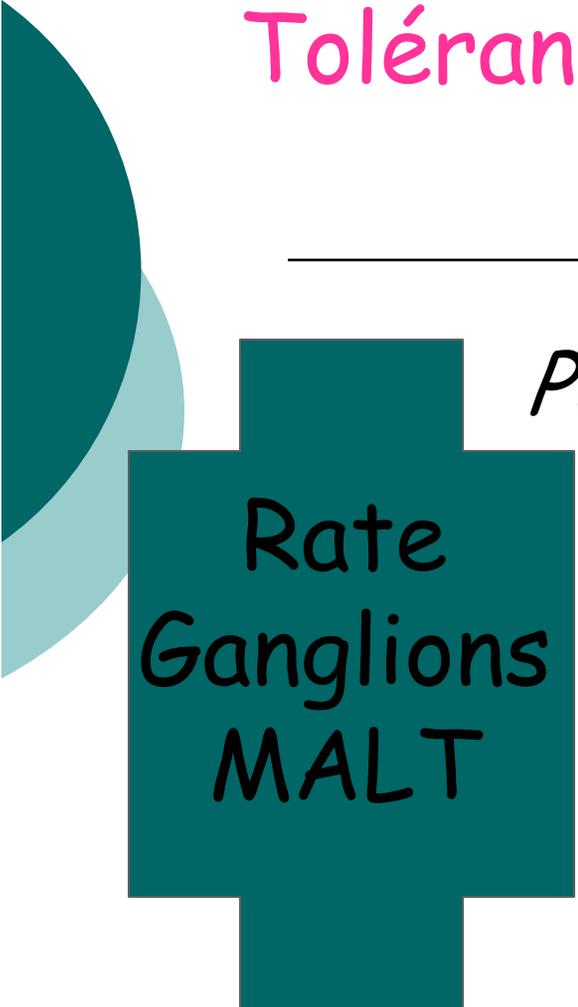
Réponses immunitaires

# Tolérance périphérique



# Tolérance périphérique

---



Rate  
Ganglions  
MALT

Organes lymphoïdes  
SECONDAIRES

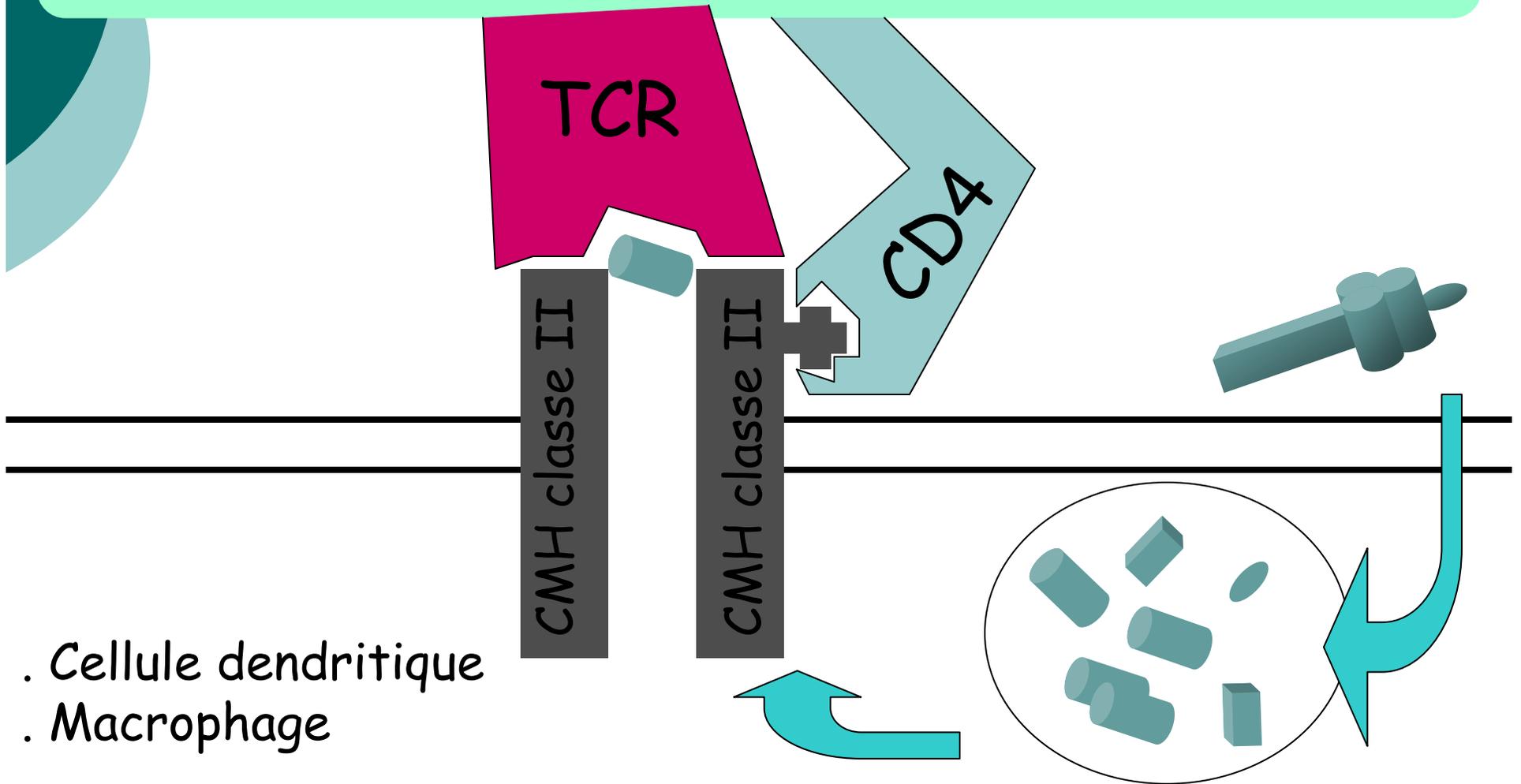
*Percevoir le signal*



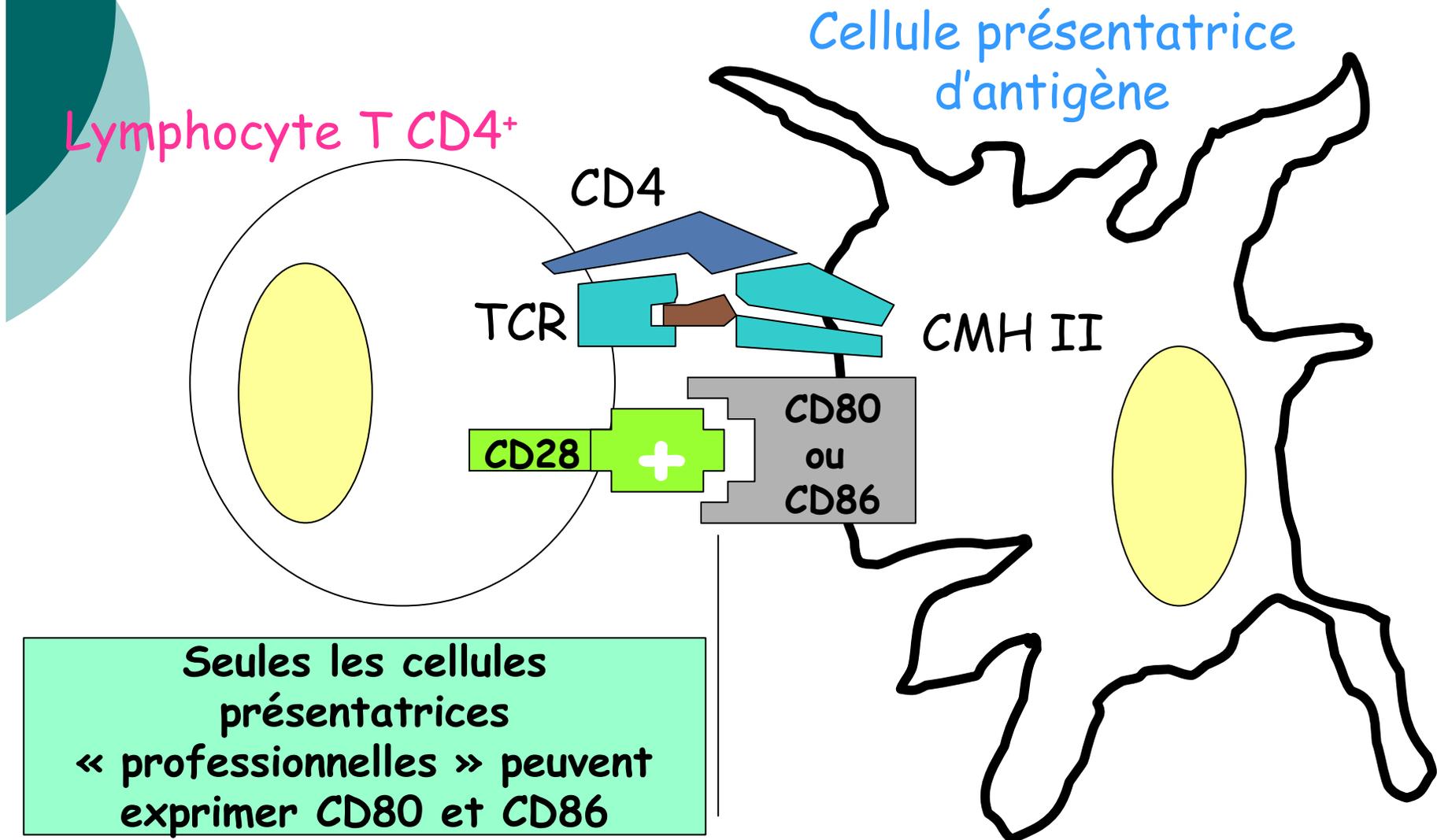
*Perception du signal par le  
lymphocyte T auxiliaire  
CD4<sup>+</sup>*

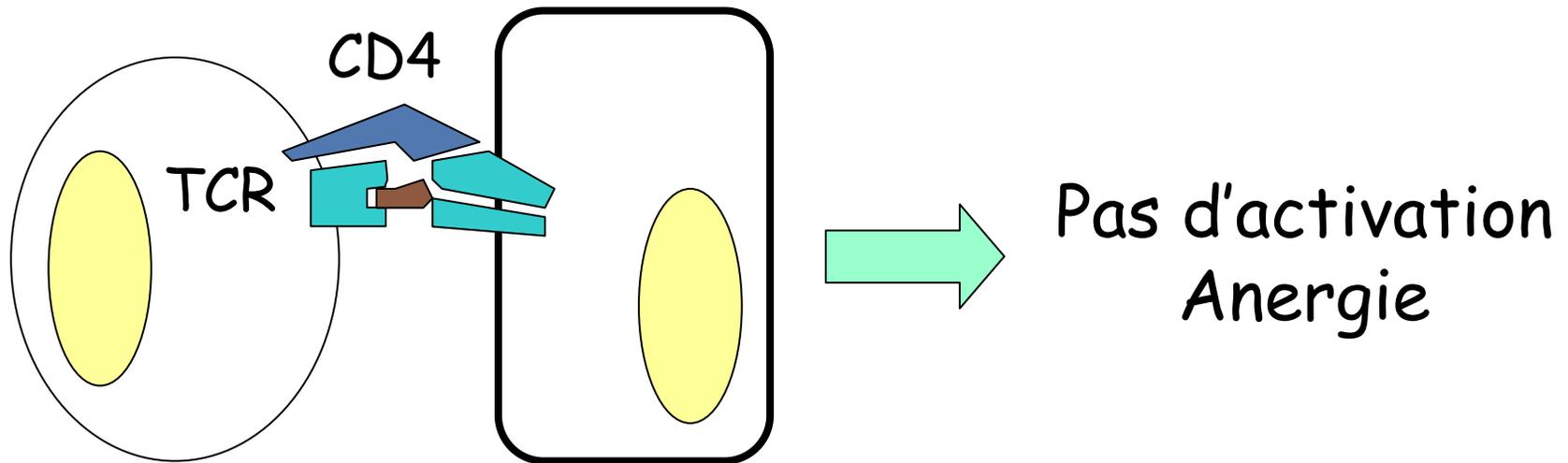
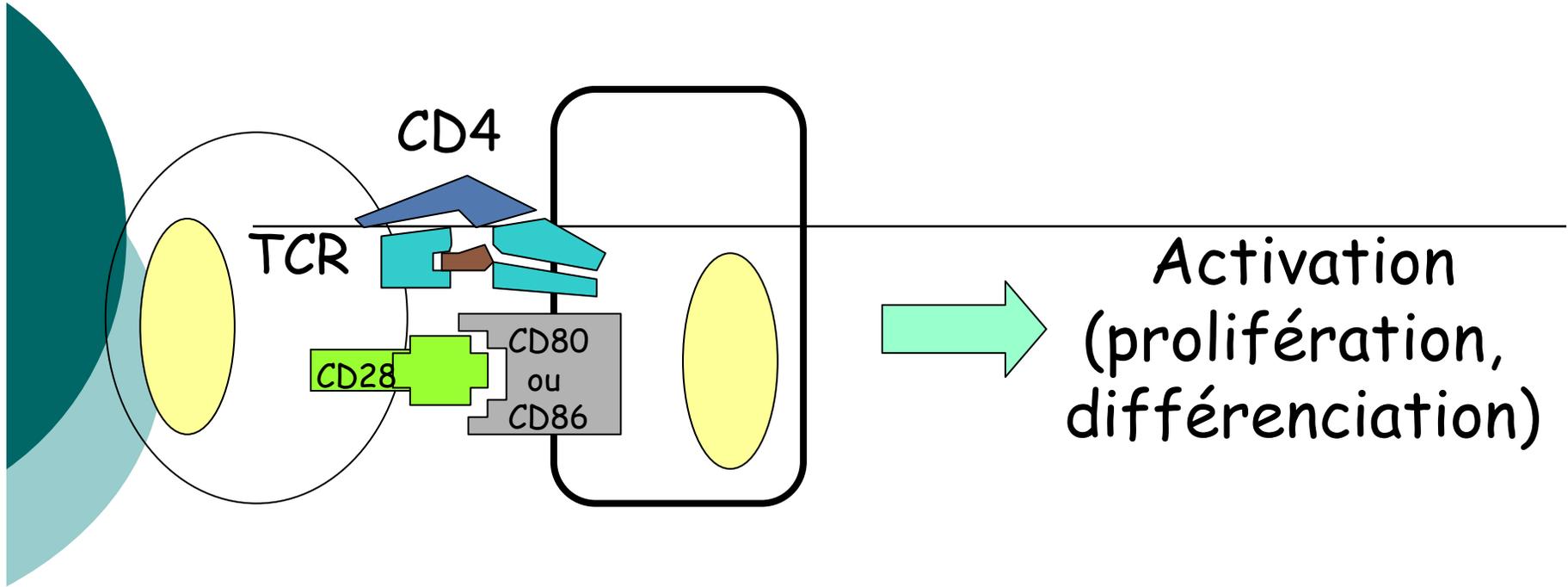
*Présentation par une  
molécule de classe II du  
CMH*

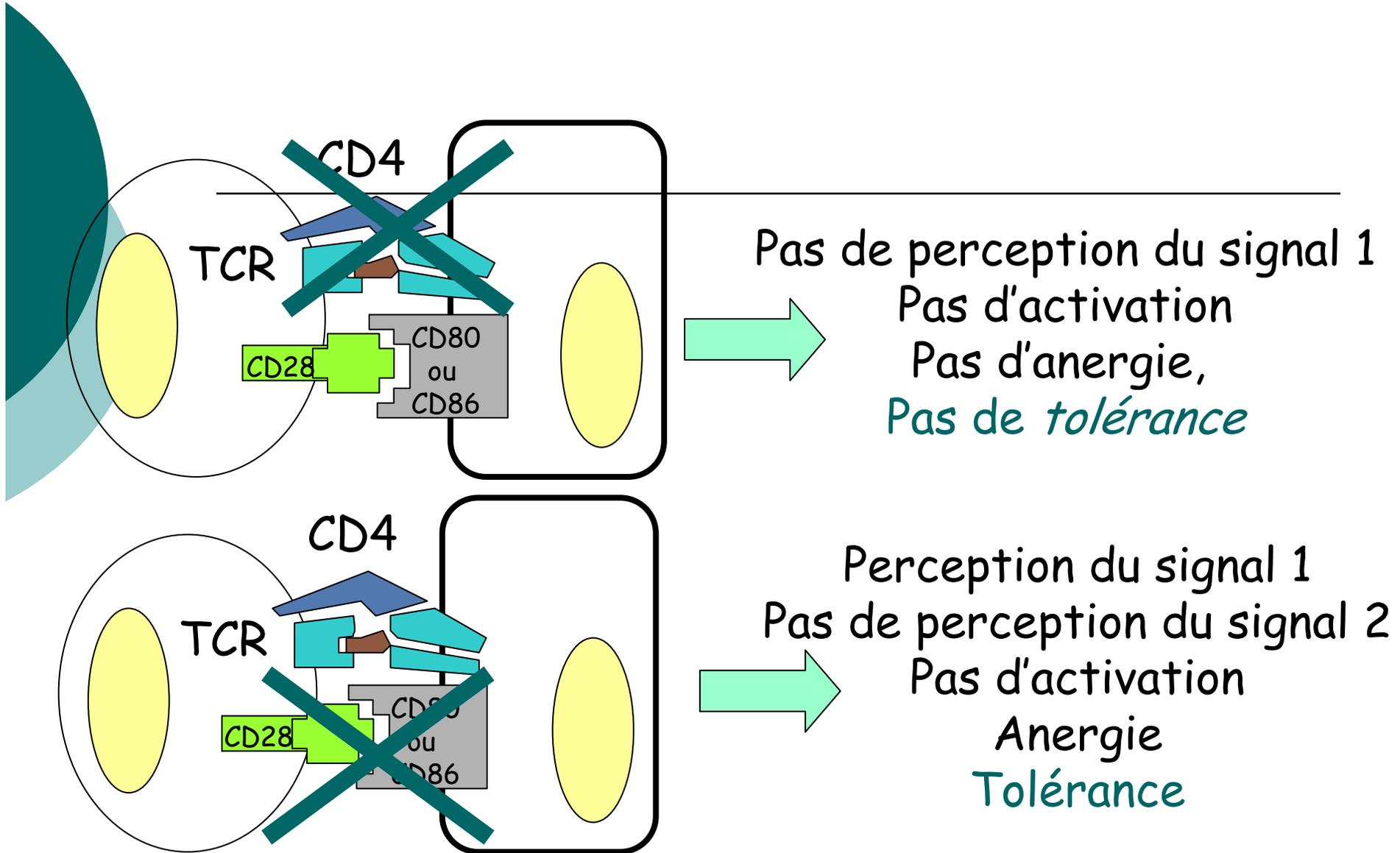
# Perception des antigènes par les lymphocytes auxiliaires CD4+

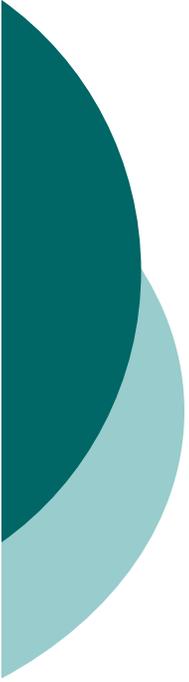


Outre le signal de l'antigène lui-même, les cellules dendritiques ont délivré aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, un autre signal que les cellules épithéliales n'ont pu fournir...









---

Les cellules « répondeuses » sont vivantes mais  
ne répondent plus :

elles sont *anergiques*

*Une tolérance s'est installée*

*elle est spécifique du signal qui l'a induite*



## La cellule dendritique *décide* de la tolérance ou de la non tolérance

---

- Faible niveau d'expression de CD80/CD86
  - ☑ carence du second signal
  - ☑ tolérance
- Haut niveau d'expression de CD80/CD86
  - ☑ second signal puissant
  - ☑ pas de tolérance



# La tolérance immunitaire

---

- La nature du problème
  - Les lymphocytes T et les lymphocytes B perçoivent constamment des signaux antigéniques auxquels il serait inopportun de répondre
  - Un système de filtrage actif des signaux doit donc être mis en place.
  - L'effet de ce filtrage, c'est la *tolérance immunitaire*



# La tolérance immunitaire

---

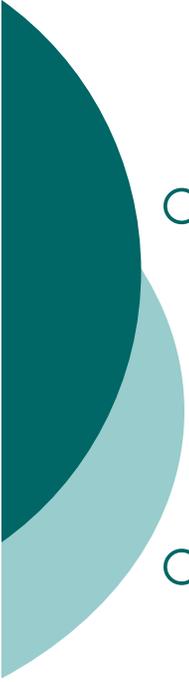
- La tolérance centrale
  - C'est dans les organes lymphoïdes primaires que la plus grande partie des lymphocytes capables de percevoir le soi (autoréactifs) sont éliminés par apoptose
  - Ces organes doivent donc posséder un échantillon des signaux du soi
    - **Générés** localement (thymus)
    - **Importés** de la périphérie (moelle osseuse)



# La tolérance immunitaire

---

- La tolérance périphérique
  - Une fraction de lymphocytes autoréactifs échappe au filtrage des organes lymphoïdes primaires et contribue à la compétence du répertoire
  - Le filtrage périphérique des signaux prévient leur réponse inopportune contre le soi : c'est la tolérance périphérique
  - Elle est aussi essentielle pour le filtrage des signaux exogènes non hostiles (qui ne sont pas présents dans le thymus)

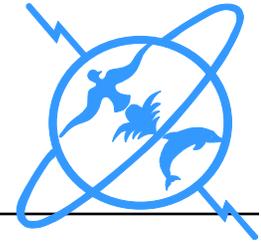


## La tolérance immunitaire

- Les cellules présentatrices d'antigène (et en particulier les cellules dendritiques) jouent un rôle fondamental dans le maintien ou la rupture de la tolérance périphérique
- L'état d'activation de ces dernières et en particulier leur niveau d'expression des molécules CD80 et CD86 (pourvoyeuses du signal 2) en est le facteur déterminant.
- Une meilleure compréhension des interactions cellulaires et moléculaires entre les « deux » systèmes immunitaires sera la base de nouveaux traitements induisant sélectivement la tolérance ou la non tolérance à un antigène donné

Module optionnel (M 22): **Biochimie-Immunologie**  
Élément : Immunologie

**Cours d'Immunologie**



---

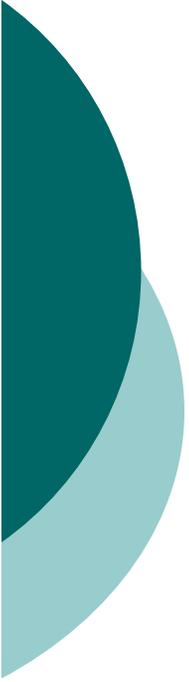
**Pr. Saaïd AMZAZI**

**I- Les Hypersensibilités**

**II- La Tolérance immunitaire et l'auto-immunité**

**III- La vaccination**

**IV- Les techniques immunologiques**



---

# 3<sup>ème</sup> séance

La vaccination

# Histoire de la vaccination

---

- 3000 AvJC: Les anciens Egyptiens reniflaient des croûtes sèches de plaies (variole ?) pour se protéger.
- 1500 AvJC: cette même pratique se rencontrait en Chine
- 1500 AvJC: Les anciens Turcs se protégeaient contre la variole par inoculation de l'écoulement provenant des pustules infectées (mortalité élevée !)

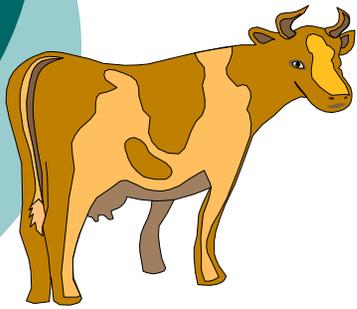
# Histoire de la vaccination

- 1720: Lady Mary Wortley Montagu promotion du principe de l'inoculation de la variole en Angleterre
- 1796: "Vaccination" contre la variole (Jenner)



# Edward JENNER: 1796

Injection à un homme du liquide provenant d'une lésion d'une  
personne atteinte de la variole de la vache



Vaccins vivants



Protection contre la variole humaine

*1980*

Eradication de la variole  
(dernier cas : en 1977 en Somalie)

*1983*

Déclaration officielle par l'OMS d'eradiction  
de la variole

# Louis Pasteur: 1885

---

Vaccin contre la rage: **Vaccins vivants atténués**



Injection de virus de la rage  
au petit Joseph Meister  
(mordu par un chien enragé)

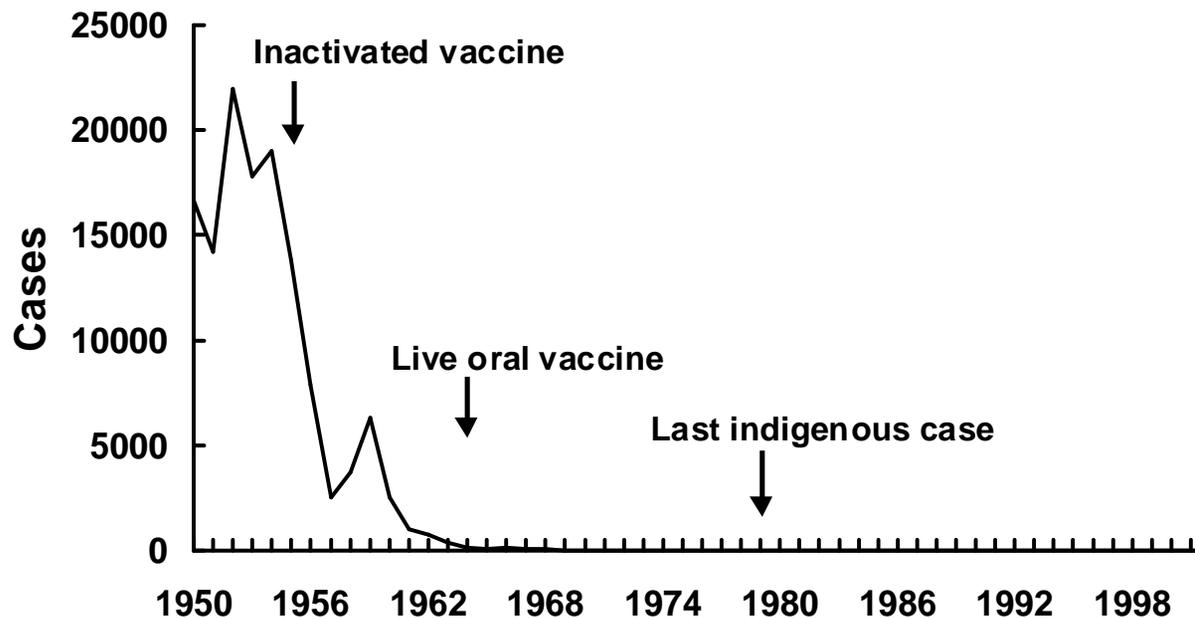


**Protection**

J. Salk (1955) and A. Sabin (1960)

## Vaccin contre Polio: Vaccins inactivés et atténués

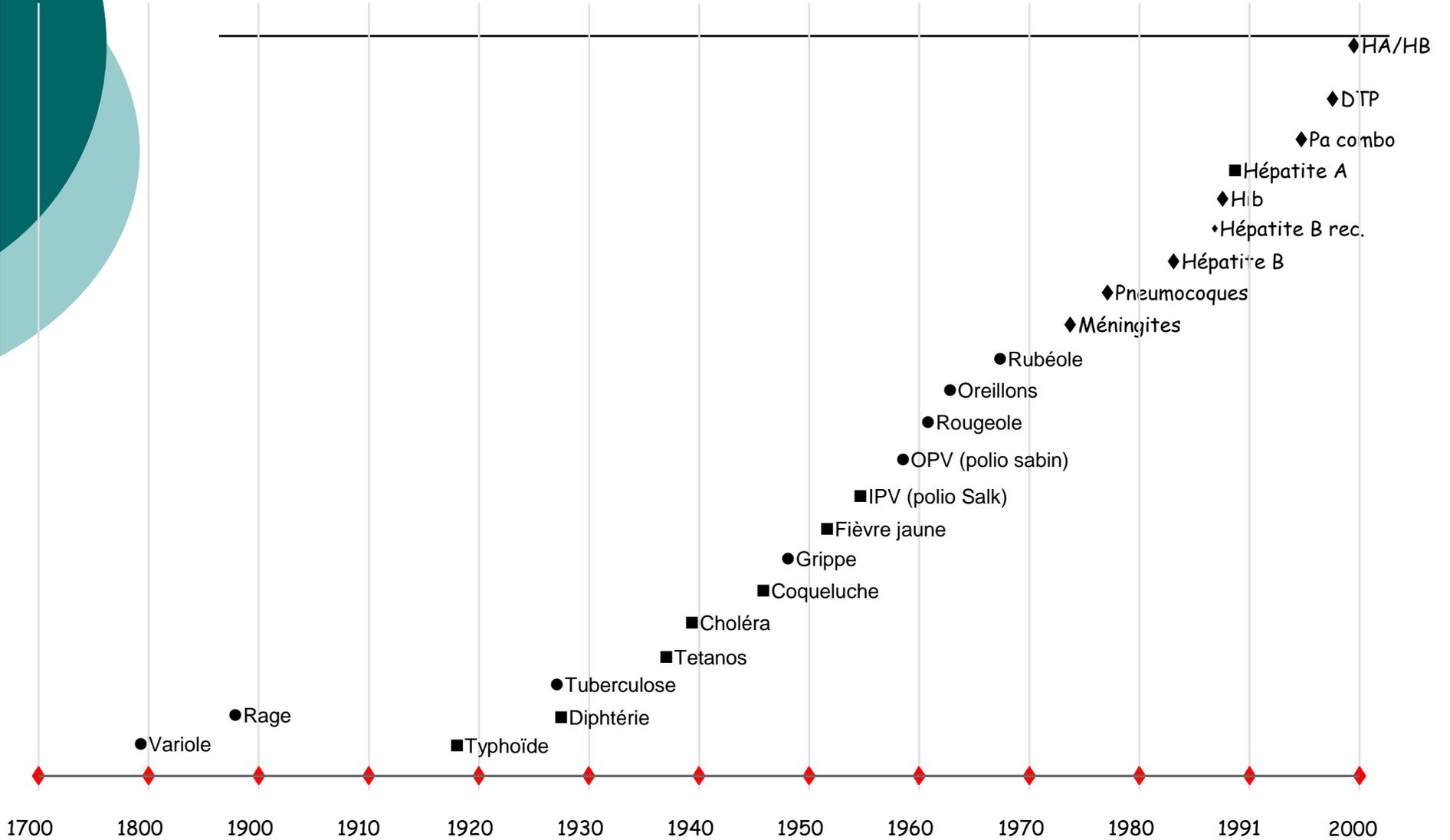
### **Poliomyelitis—United States, 1950-2002**



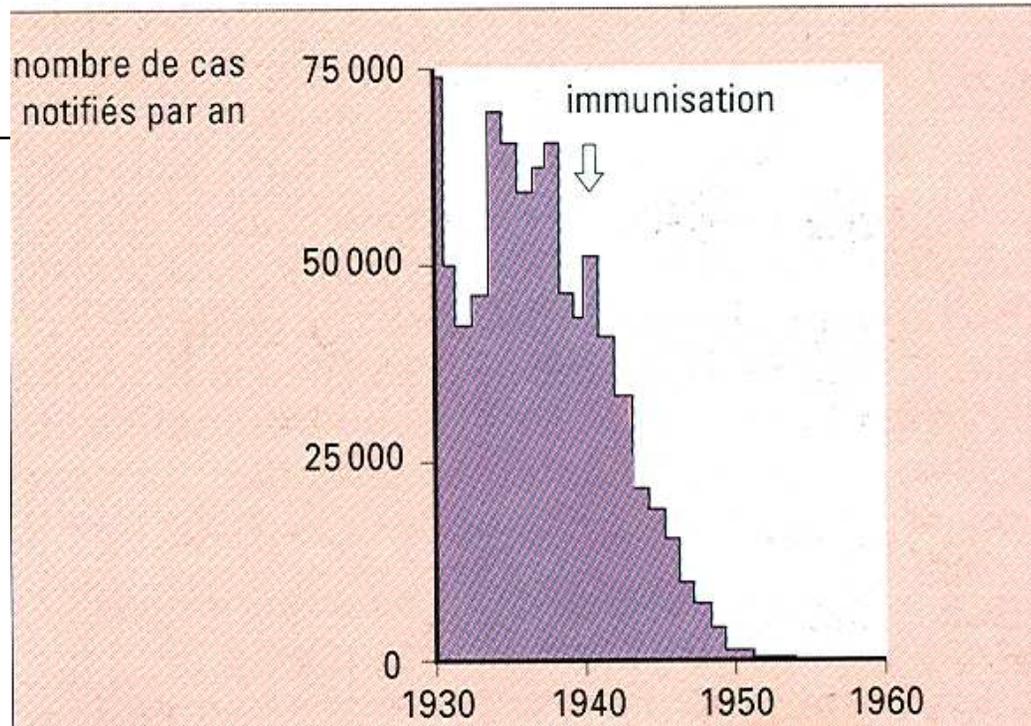
Entre 1840 et les années 1950s, la Polio était une épidémie mondiale.



- Vaccins vivants atténués
- Vaccins tués/inactivés
- ◆ Vaccins sous-unitaires purifiés
- ◆ Vaccins recombinants

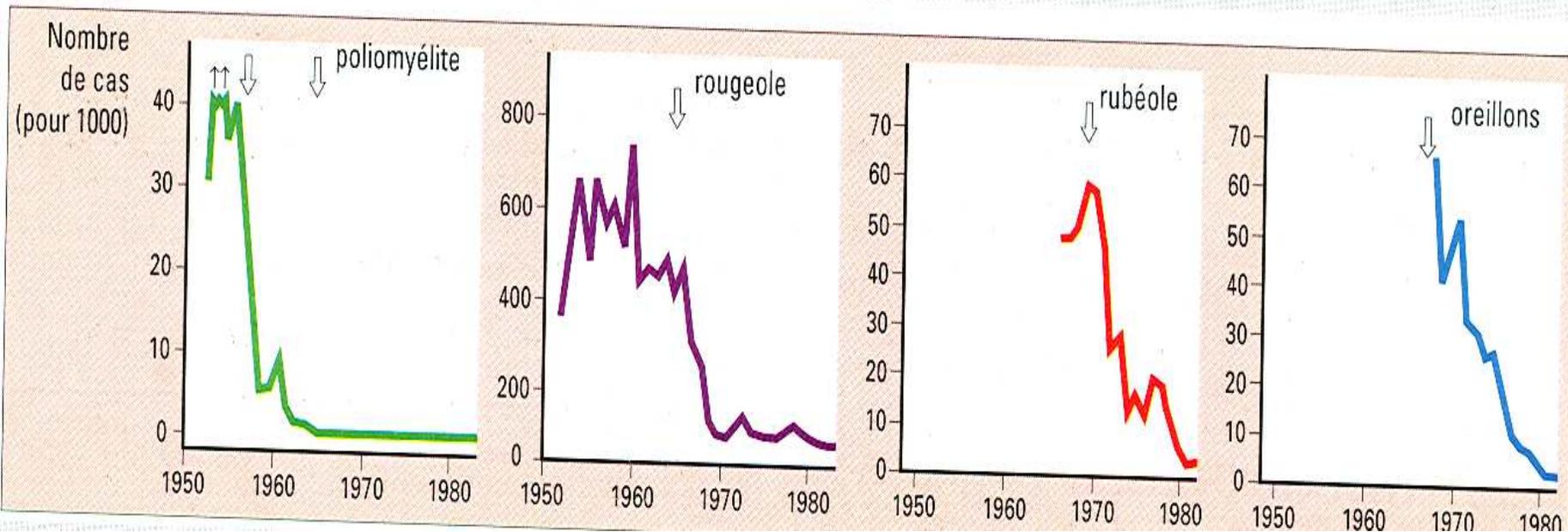


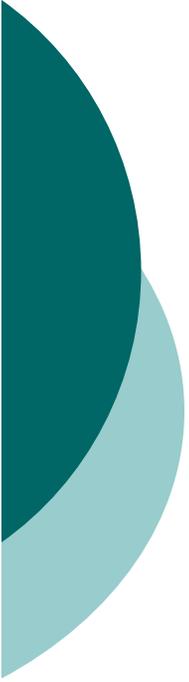
## Effacité de l'immunisation contre la diphtérie



**La Vaccination est l'application la plus remarquable des principes immunologiques à la santé humaine**

## Effets des vaccinations sur l'incidence des maladies virales





---

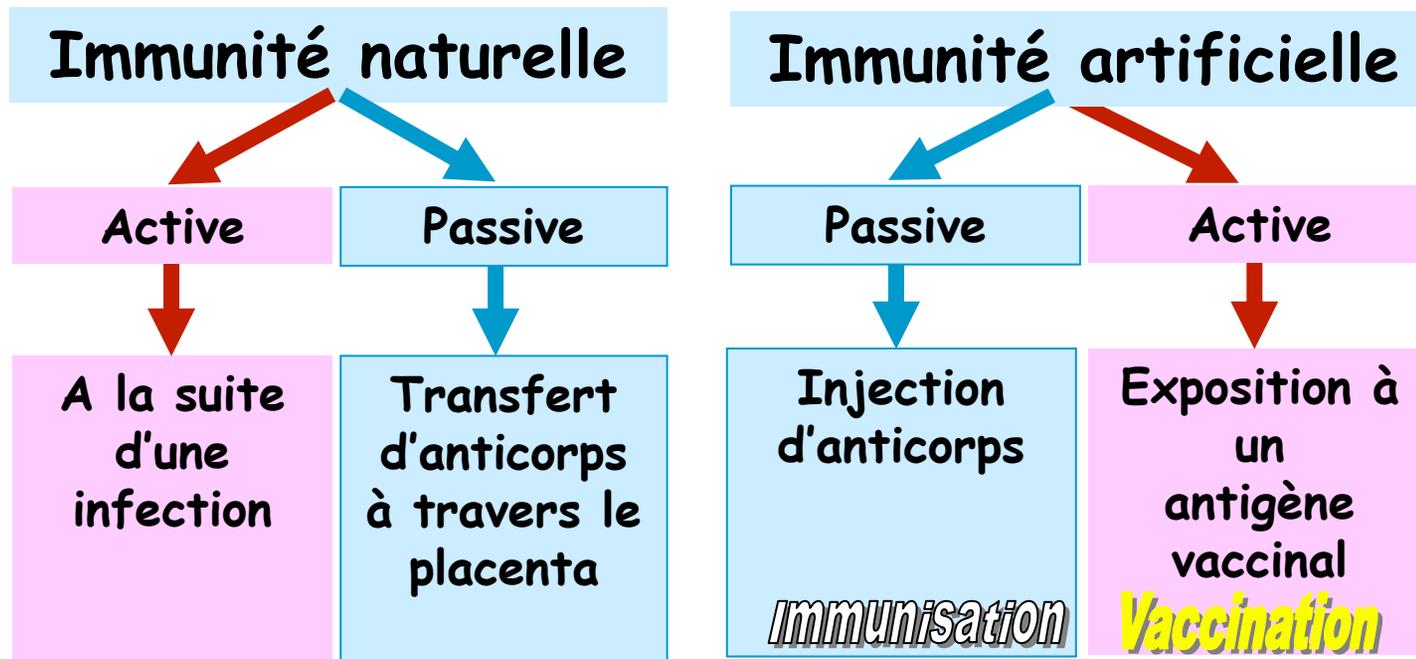
L'immunité passive = administration d'Ac  
(lorsque la toxine tétanique est déjà libérée  
dans la circulation, dans le cas de la rage...

Immunothérapie non spécifique = stimuler le  
SI par les cytokines dans certaines situations

L'immunité active = **vaccination**

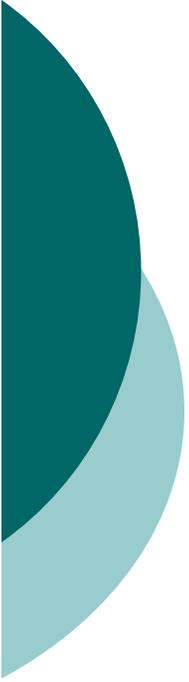
# La vaccination

## Immunité passive et active



## Immunisation passive

maladie	source d'anticorps	indication
diphtérie tétanos	} homme, cheval	prophylaxie, traitement
varicelle-zona	homme	traitement chez les immunodéprimés
gangrène gazeuse botulisme morsure de serpent piqûre de scorpion	cheval	} traitement après exposition
rage	homme	traitement après exposition (plus vaccin)
hépatite A	homme	thérapeutique
hépatite B rougeole	} pool d'immunoglobulines humaines	prophylactique (voyage) traitement après exposition



L'induction d'une réponse immunitaire spécifique et de lymphocytes à mémoire reconnaissant les antigènes d'un agent pathogène, sont les objectifs de la vaccination

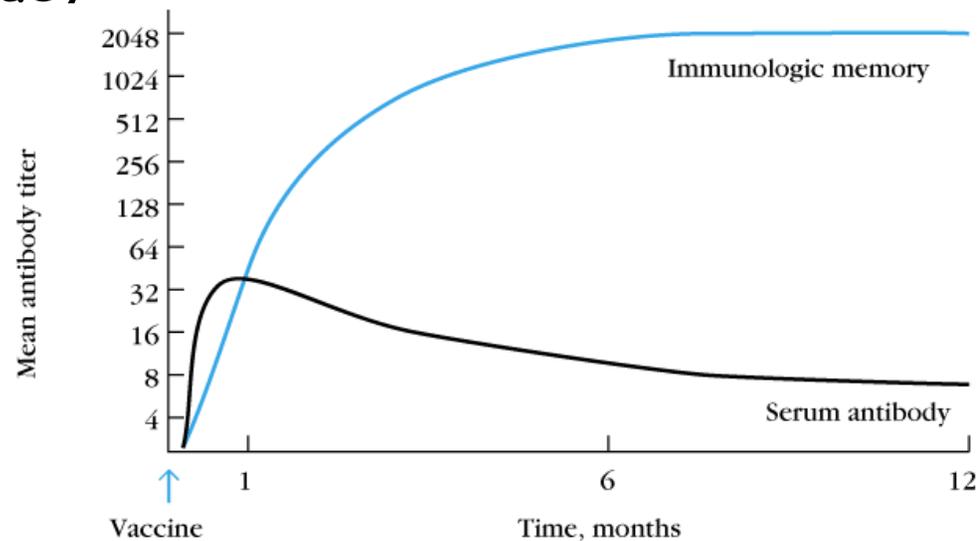
De très nombreuses préparations antigéniques sont utilisées dans les vaccins, depuis les microorganismes entiers jusqu'aux sous unités peptidiques ou osidiques

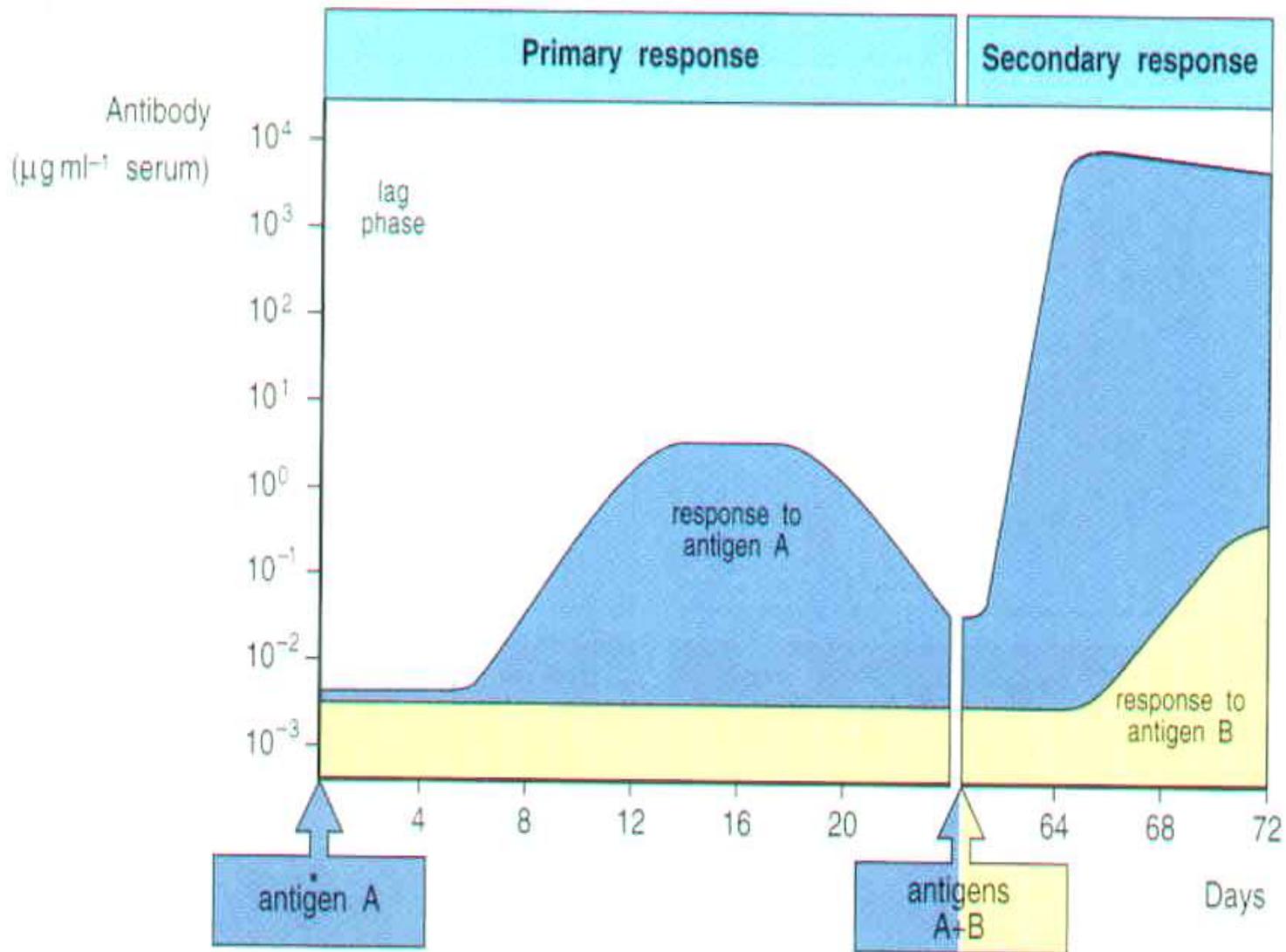
○ Assurer le développement d'une mémoire immunitaire durable

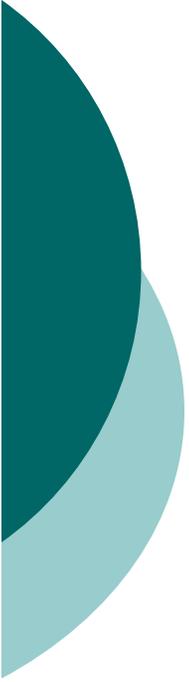
○ Mémoire

---

- Plus grande fréquence de cellules répondeuses
- Réponse intrinsèquement plus efficace
  - B : sécrétion d'anticorps de forte affinité
  - T : différenciation plus rapide en lymphocytes T cytotoxiques (mémoire Th1+mémoire CD8 cytotoxique)



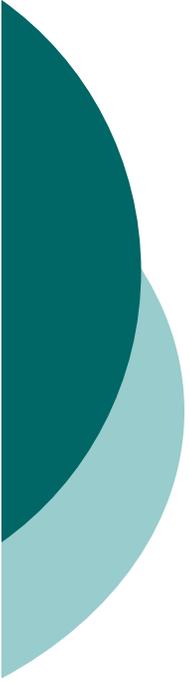




La vaccination met donc en jeu l'immunité adaptative spécifique et l'art de la vaccination consiste à produire à partir des agents pathogènes, des préparations antigéniques qui sont :

- . Sans danger
- . Efficaces, induisant une immunité protectrice
- . D'un prix abordable pour les populations auxquelles elles sont destinées

Ces objectifs ont été atteints pour certaines maladies et pas pour d'autres...



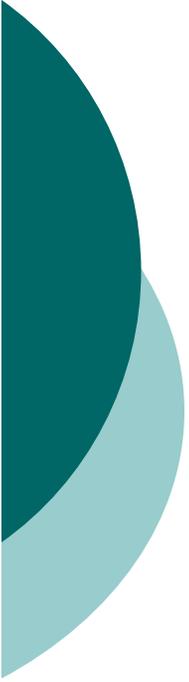
# Plusieurs types de vaccins

---

- Microorganisme entier
  - Tué
  - Vivant atténué
  - Vivant
- Macromolécule (protéine ou polysaccharide)
  - Purifiée
  - Synthétique

## Les principales préparations antigéniques

type d'antigène		exemples de vaccins
micro-organismes vivants	naturel	vaccine (variole) bacille (TB : historique)
	atténués	*polio (vaccin oral Sabin), *rougeole, *oreillons, *rubéole, fièvre jaune 17D varicelle-zona (herpès virus humain 3) *BCG (pour la tuberculose)
micro-organismes intacts mais inactivés	virus	*polio (Salk), rage, grippe, hépatite A, typhus
	bactéries	*coqueluche, typhoïde, choléra, peste
sous-unités	polyosides capsulaires	pneumocoque méningocoque <i>Hæmophilus influenzae</i>
	Ag. de surface	*hépatite B
anatoxines		*tétanos, *diphtérie
produits d'ADN recombinants	gènes clonés et exprimés	*hépatite B (levure)
	gènes exprimés dans des vecteurs	expérimental
	ADN nu	expérimental
anti-idiotypes		expérimental
* courants dans la plupart des pays		

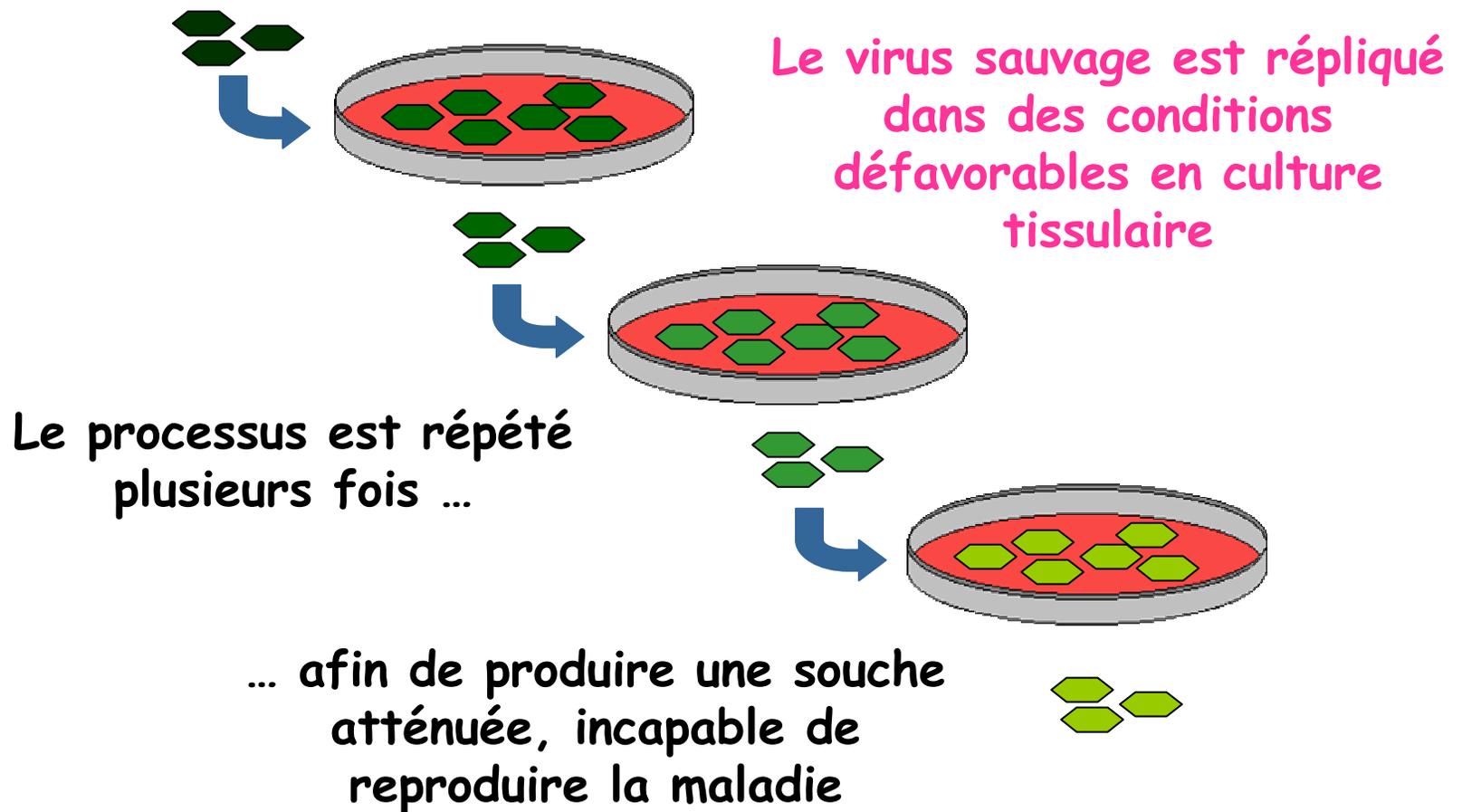
- 
- 
- **Les vaccins vivants naturels** sont très rarement utilisés en vaccination de masse. Les problèmes de sécurité peuvent être considérables

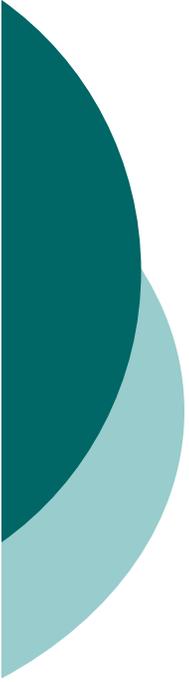
## Vaccins vivants de virulence atténuée

	maladie	remarques
virus	polio	réversion possible des types 2 et 3
	rougeole	vaccin inactivé utilisable
	oreillons	efficacité 80 %
	rubéole	actuellement administré aux 2 sexes
	fièvre jaune	stable depuis 1937
	varicelle-zona	surtout dans les leucémies
	hépatite A	vaccin tué disponible
bactéries	tuberculose	stable depuis 1921 ; induit aussi une protection partielle dans la lèpre

Il est plus facile d'atténuer des virus  
que des bactéries

# Vaccins vivants atténués



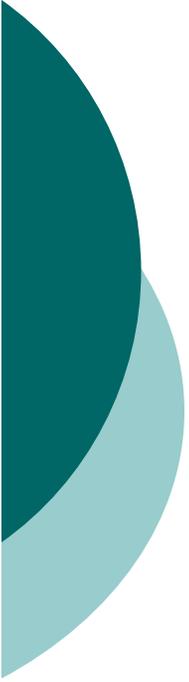


---

L'atténuation de la virulence correspond à des séries de mutations purement au hasard induites par des conditions de culture défavorables et constamment sélectionnées sur la base de la perte de la virulence avec conservation des antigènes

C'est un procédé long et aléatoire

Le nombre de mutations peut atteindre 57 , voir plus

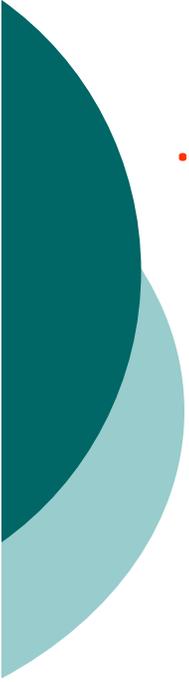


Les vaccins vivants atténués sont généralement plus efficaces que les vaccins tués

---

### Avantages:

- Forme atténuée de virus ou de la bactérie sauvage (proche d'une infection naturelle)
- Ne cause pas la maladie mais induit une immunité protectrice
- Induction plus rapide d'une protection
- Réplication efficace
- Réponse immune similaire à l'infection naturelle
- Habituellement efficace avec une seule dose (titres anticorps peuvent persister)



....mais ils peuvent être dangereux

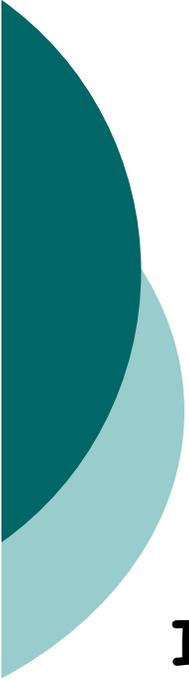
---

## Inconvénients

- Peut garder une certaine pathogénicité
- Risques de réversion vers une souche virulente ou autres modifications génétiques
- Contamination possible des cultures par des agents indésirables
- Instable (stockage et transport difficile)

## Vaccins inactivés (organismes entiers)

	maladie	remarques
virus	polio	préférée dans les pays scandinaves; sans danger chez les immunodéprimés
	rage	utilisable en traitement après morsure avec ou sans sérothérapie
	grippe	spécifique de souche
	hépatite A	vaccin atténué disponible
bactéries	coqueluche	risque d'encéphalite (discuté)
	typhoïde	induit environ 70 % de protection
	choléra	protection douteuse; peut être associée à la sous-unité B de la toxine
	peste	protection de courte durée
	fièvre Q	bonne protection



# Vaccins inactivés

## **Avantages**

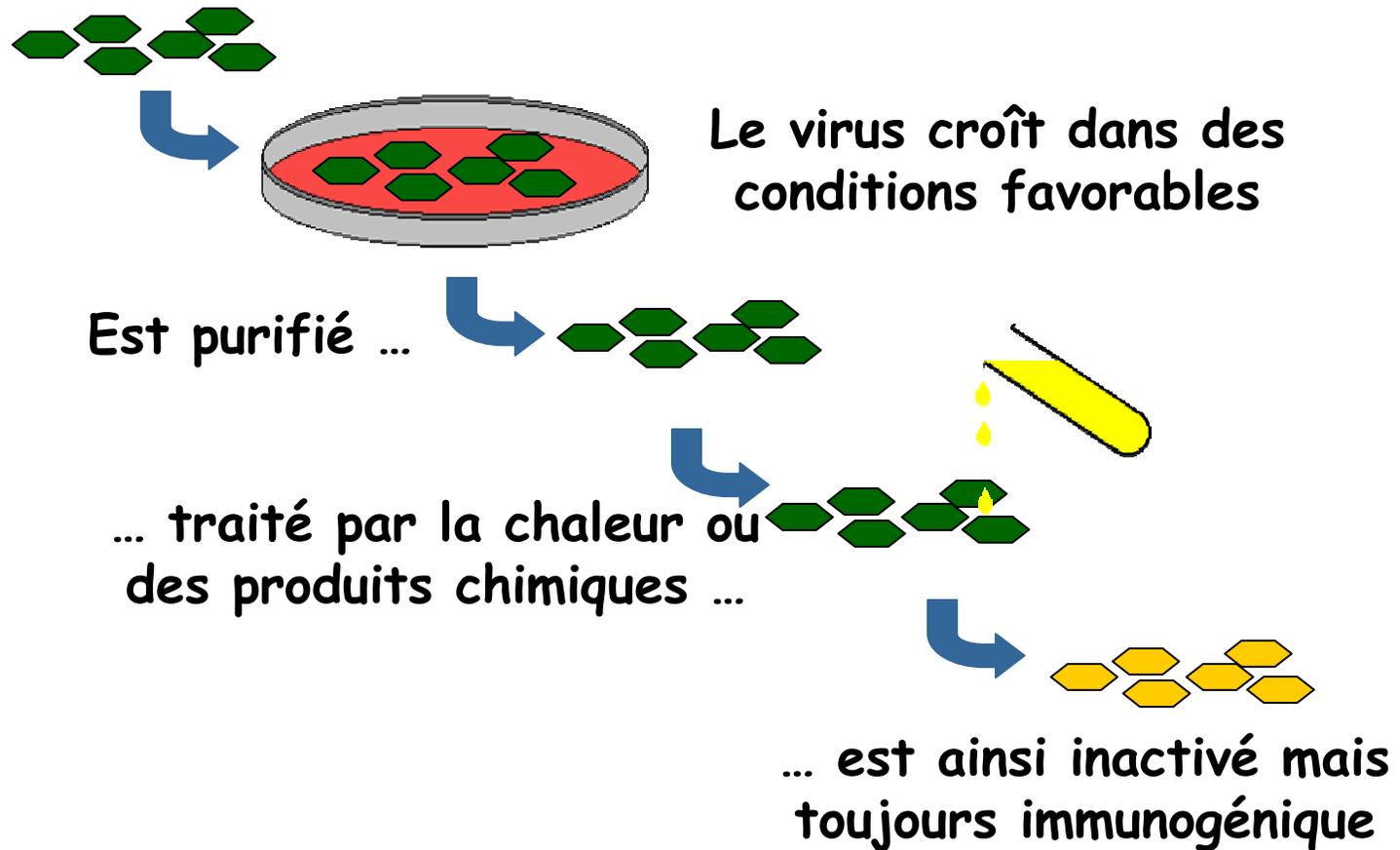
---

- Ne peuvent plus se répliquer
- Interférence minimale avec les anticorps circulants

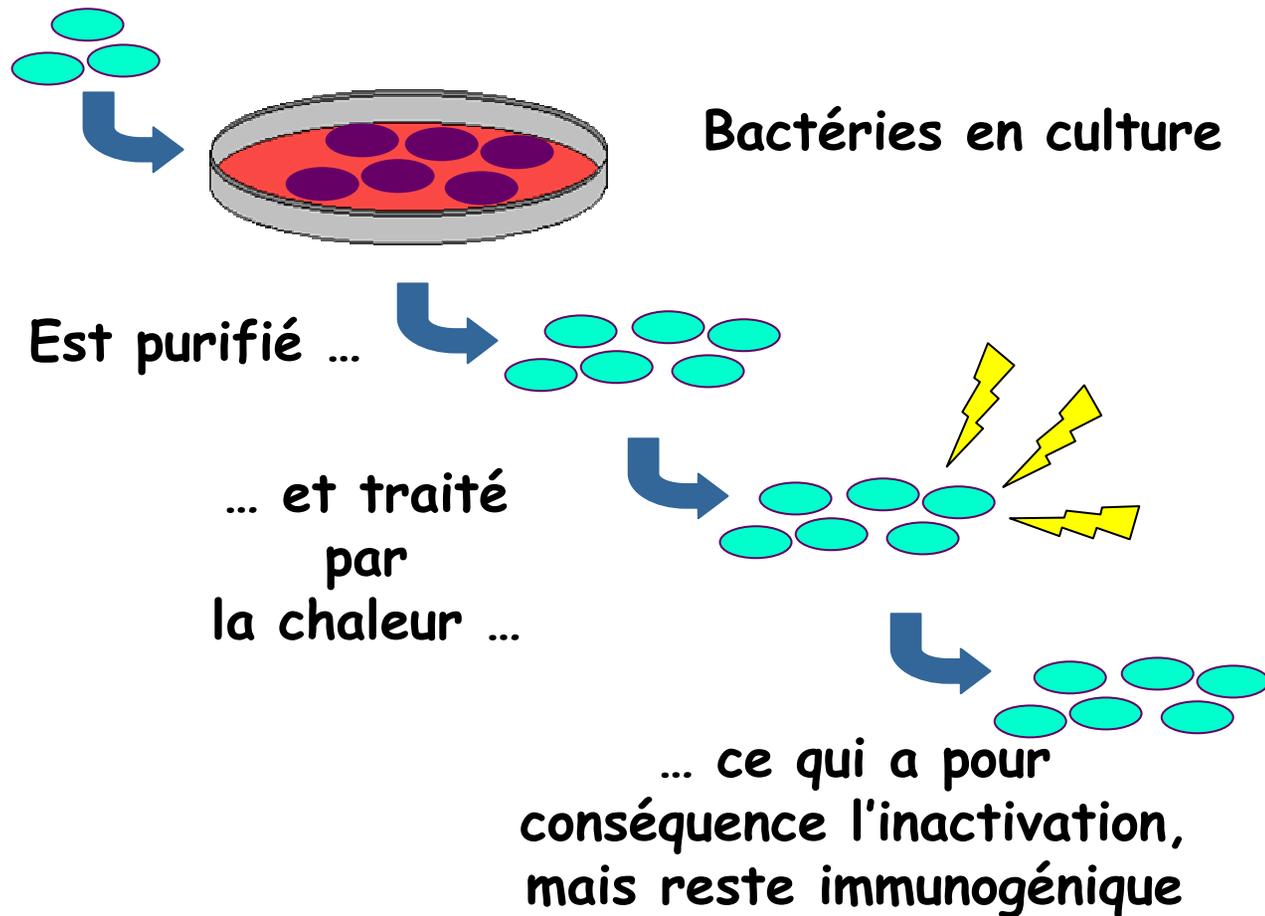
## **Inconvénients**

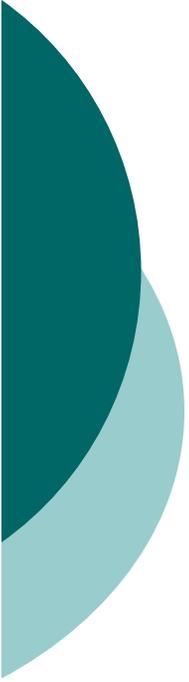
- Inactivation complète à contrôler
- Généralement pas aussi efficace que les vaccins vivants
- Requier généralement 3-5 doses (car pas de réplication) - revaccination nécessaire
- Titres anticorps diminuent avec le temps
- Présence d'adjuvant

# Vaccins viraux tués, inactivés



# Vaccins bactériens inactivés





# Méthodes classiques d'inactivation

---

- Physique
  - Chaleur
  - Ultra-violet
- Chimique
  - Formaldéhyde
  - Beta-propriolactone

## Vaccins à base de toxine

microorganismes	vaccins	remarques
<i>Clostridium tetani</i>	toxine inactivée (formaldéhyde)	3 doses, précipité dans l'alum, rappel tous les 10 ans
<i>Corynebacterium diphtheriæ</i>		habituellement associé au vaccin tétanique
<i>Vibrio cholerae</i>	toxine, sous-unité B	parfois associé avec des vibrions tués
<i>Clostridium perfringens</i>	toxine inactivée (formaldéhyde)	agneaux nouveaux-nés

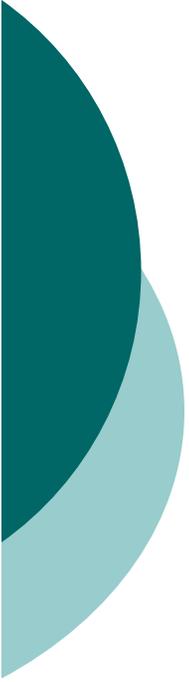
Ce sont des exotoxines inactivées.

Il n'existe pas de vaccins contre les nombreuses exotoxines des staphylocoques ni de streptocoques, ni contre les endotoxines bactériennes telles que le LPS.

## Vaccins constitués de sous-unités microbiennes

	microorganismes	remarques
bactéries	<i>Neisseria meningitidis</i>	efficace pour les groupes A et C ; non immunogène pour le groupe B
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	84 sérotypes dont 23 inclus dans le vaccin
	<i>Hæmophilus influenzae B</i>	les vaccins polysidiques nécessitent d'être conjugués à une protéine porteuse
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	pas très efficace
	<i>Escherichia coli</i>	utilisation vétérinaire
virus	virus B de l'hépatite	protection > 95 %

- Généralement mieux tolérés que les vaccins constitués par des microorganismes entiers (vivants ou tués)
- Une macromolécule donnée, antigénique pour les lymphocytes B ne fournira pas nécessairement de bons peptides antigéniques pour les lymphocytes T
  - Pas d'aide adéquate de la réponse humorale
  - Pas de réponse à médiation cellulaire



# Vaccins polysaccharidiques

---

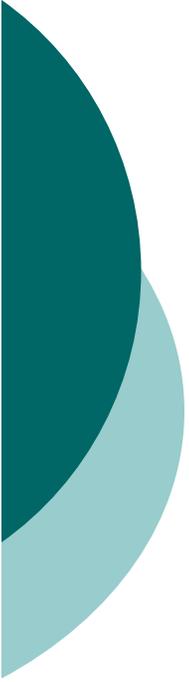
- Certains polysaccharides ont une telle affinité pour le BCR qu'ils peuvent activer le lymphocyte B en l'absence d'aide des lymphocytes T : on parle d'antigènes thymo-indépendants

## Polysaccharide pure

- Pneumocoques
- Meningocoques
- *Salmonella Typhi*

## Polysaccharide conjugué

- *Haemophilus influenzae* type b
- Pneumocoques



# EFFICACITE DES VACCINS

---

- . Induire une forme de réponse immunitaire protectrice (Humorale et cellulaire)
- . Être stable à la conservation
- . Être suffisamment immunogène

## Principales maladies pour lesquelles aucun vaccin n'est disponible

	maladie	problèmes
virus	VIH	variation antigénique; immuno-suppression ?
	virus herpès	risque de réactivation ? (pas avec varicelle-zona)
	adénovirus, rhinovirus	multiples sérotypes
bactérie	staphylocoque streptocoque de groupe A	] vaccins anciens inefficaces (antibiothérapie préférable)
	<i>Mycobacterium lepræ</i>	
	<i>Treponema pallidum</i> (syphilis)	effecteurs immunitaires inconnus
	<i>Chlamydia</i>	vaccins anciens inefficaces
levures	Candida Pneumocystis	] effecteurs immunitaires inconnus
protozoaires	paludisme	variations antigéniques (essais encourageants)
	trypanosomiase : maladie du sommeil maladie de Chagas leishmaniose	variations antigéniques extrêmes immunopathologie ; auto-immunité essais encourageants
	schistosomiase onchocercose	(essais chez l'animal encourageants) effecteurs immunitaires inconnus

## APPROCHES VACCINALES CONTRE LE VIH



protéine recombinante  
(gp 120)



peptides de synthèse  
(V3)



ADN nu



vecteurs vivants  
recombinants  
(virus, bactérie)



virus inactivé



virus atténué



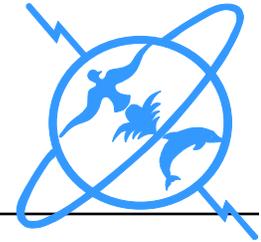
# Effet de certains adjuvants

---

- Adjuvant : préparation qui administrée en même temps qu'un antigène, accroît la réponse immunitaire à ce dernier
- **Deux types de propriétés**
  - Physicochimiques : augmentent la dispersion de l'antigène et retardent sa dégradation
    - Sels minéraux (hydroxyde d'alumine), substances tensio-actives (huileuses)
  - Immunostimulantes
    - Produits de parois microbiennes qui vont stimuler les récepteurs de l'immunité naturelle sur les cellules présentatrices d'antigènes

Module optionnel (M 22): **Biochimie-Immunologie**  
Élément : Immunologie

**Cours d'Immunologie**



---

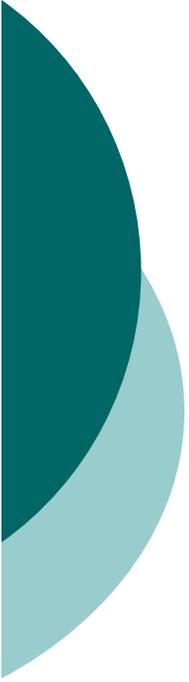
**Pr. Saaïd AMZAZI**

**I- Les Hypersensibilités**

**II- La Tolérance immunitaire et l'auto-immunité**

**III- La vaccination**

**IV- Les techniques immunologiques**



---

# 4<sup>ème</sup> séance

Les techniques immunologiques

# Les Anticorps monoclonaux

Kholer et Milstein, 1975

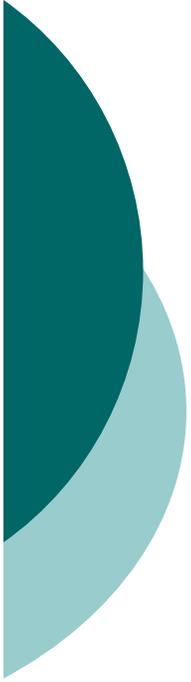
---

Les anticorps monoclonaux sont utilisés pour diagnostiquer et traiter diverses maladies.

Ils sont produits naturellement par le corps ou artificiellement à partir du clonage d'une cellule unique contre un antigène spécifique.

C'est pourquoi ils s'appellent «monoclonaux». Ceci signifie que chaque anticorps produit par cette cellule est exactement identique, même spécificité et de structures homogènes (clones) .

Cette cellule, qui est responsable de la fabrication de ces clones, est appelée hybridome. Celle-ci est créée par la fusion de deux cellules, afin de combiner leurs caractéristiques distinctes.



---

Une de ces cellules est une cellule productrice et sécrétrice d'anticorps, qui ne se multiplie pas in-vitro (Lymphoblaste); obtenue à partir de la rate d'une souris, et l'autre est une cellule de tumeur appelée cellule myélomateuse immortelle (myélome lymphoïde), qui a la capacité de se multiplier à l'infini in-vitro dans un milieu de culture.

Les cellules tumorales peuvent donner à une cellule normale la capacité de se développer indéfiniment. Ceci signifie que les cellules hybridomes se multiplient plus rapidement que les cellules normales du corps productrices d'anticorps, et les cellules hybridomes individuelles produisent des anticorps spécifiques pendant une période de temps indéfinie.



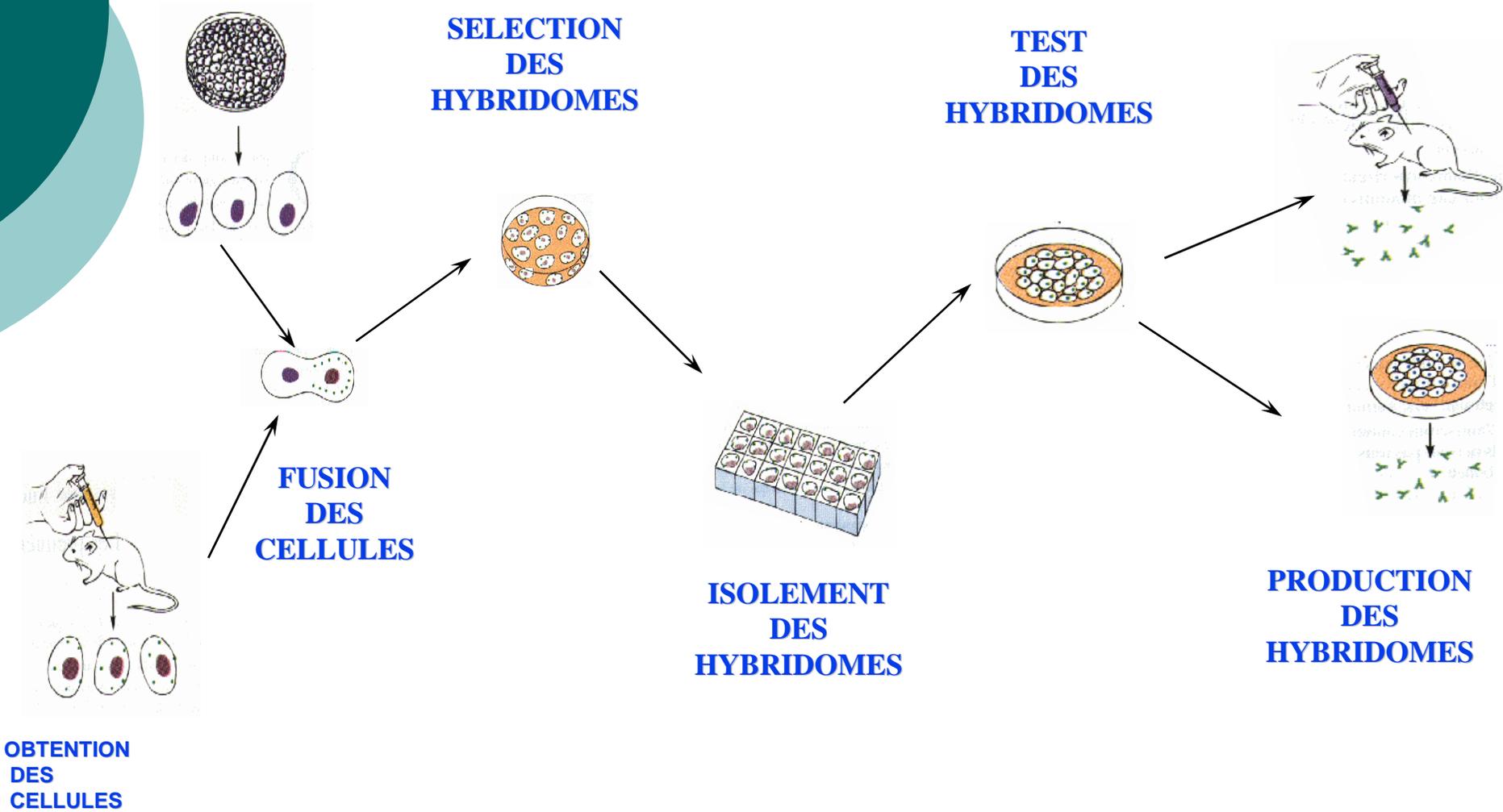
---

On met à profit le déficit enzymatique du myélome en HGPRT (hypoxantine guanosine phosphoribosyl transférase) afin de sélectionner les hybridomes et détruire les cellules de myélome après la fusion.

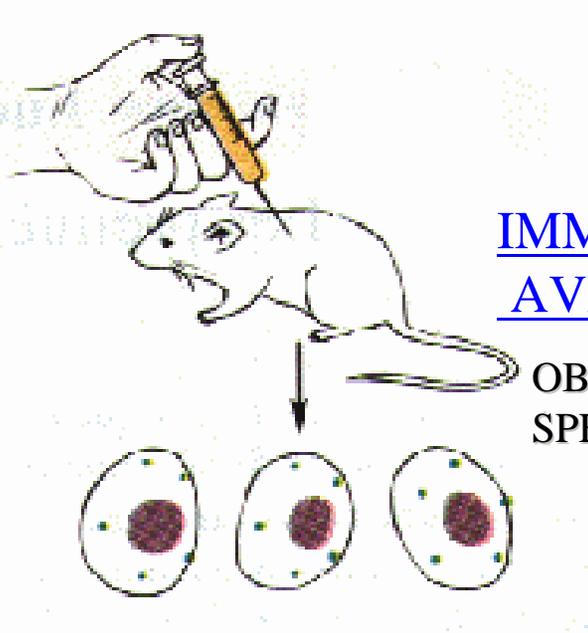
Cet enzyme intervient dans la synthèse d'ADN et ARN par la voie exogène. L'addition de l'Aminoptérine (dans HAT) bloque la voie endogène. En l'absence de l'enzyme, les cellules myélomateuses meurent, alors que les hybridomes non déficitaires en cet enzyme apporté par les lymphoblastes B peuvent utiliser l'Hypoxantine et la Thymidine dans la voie exogène afin de synthétiser l'ADN et l'ARN nécessaires à la vie des cellules d'hybridome.

Les hybridomes formés seront alors triés en fonction de leur production d'Ac et ceux produits avec des spécificités désirés seront clonés.

# DÉROULEMENT DE LA PRODUCTION DES HYBRIDOMES

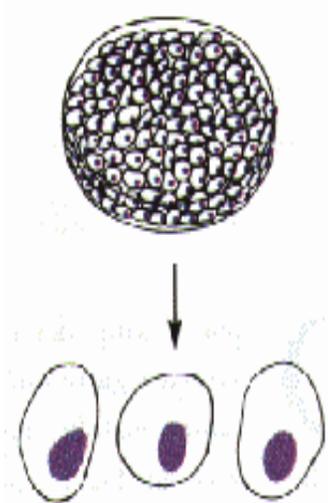


# OBTENTION DES CELLULES



IMMUNISATION DE LA SOURIS  
AVEC L'ANTIGÈNE ÉTUDIÉ

OBTENTION DES LYMPHOCYTES  
SPECIFIQUES

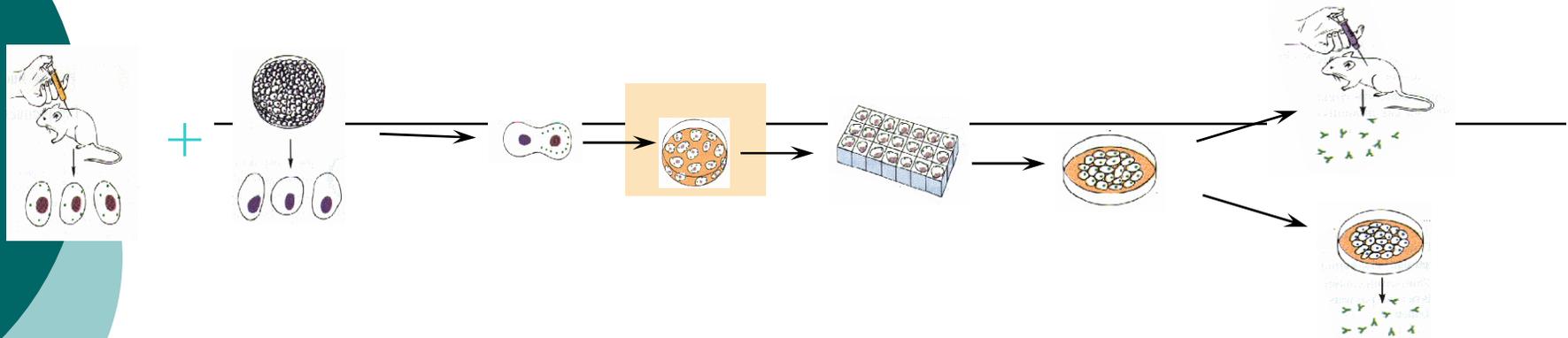


UTILISATION DE  
CELLULES MYELOMATEUSES HGPRT-

OBTENTION DES CELLULES IMMORTELLLES



# FUSION DES CELLULES



Par méthode chimique

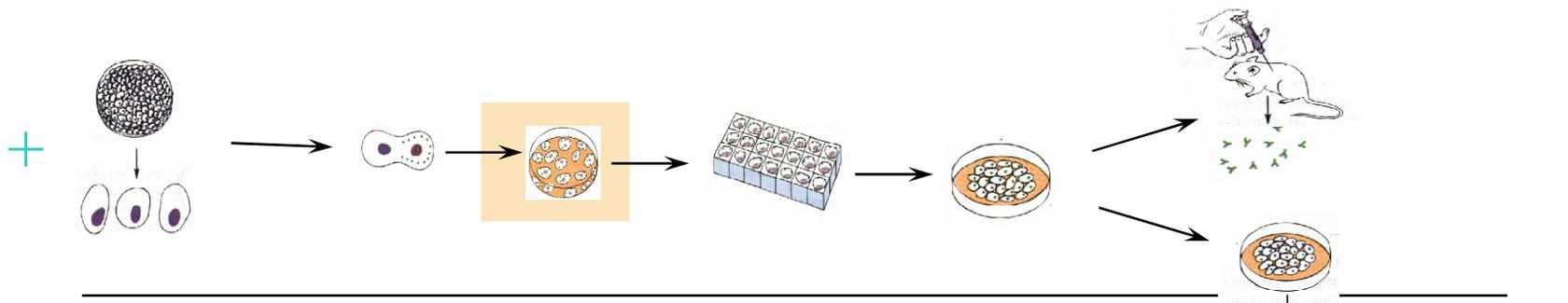
**FUSION DES MEMBRANES  
CELLULAIRES AVEC DU PEG (poly éthylène glycol)**

Par méthode physique

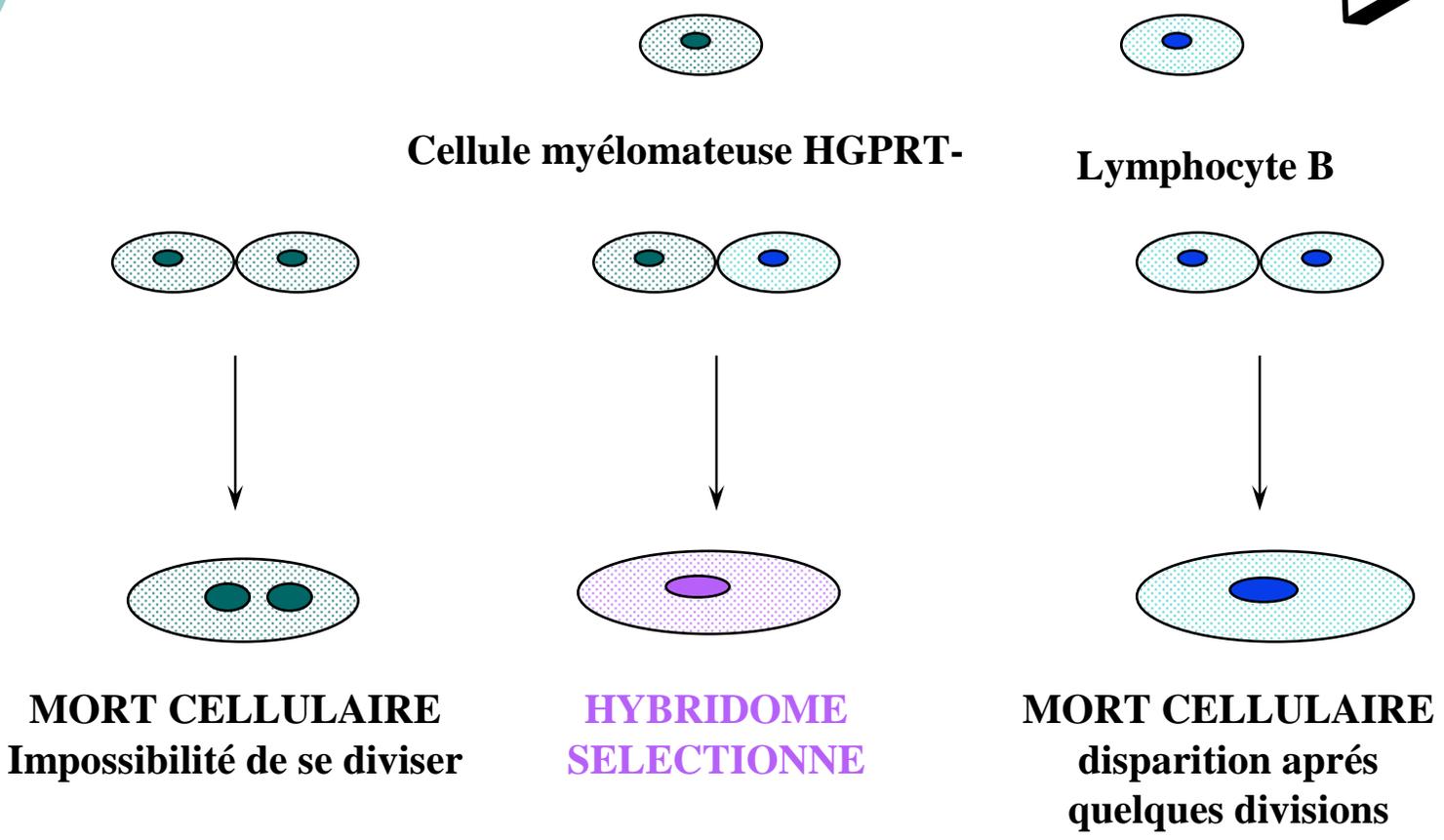
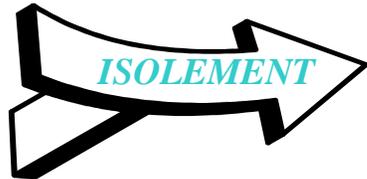
**FUSION DES MEMBRANES CELLULAIRES  
PAR ELECTROPORATION**

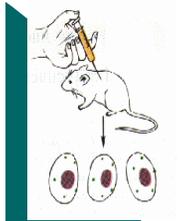


SELECTION  
DES  
HYBRIDOMES

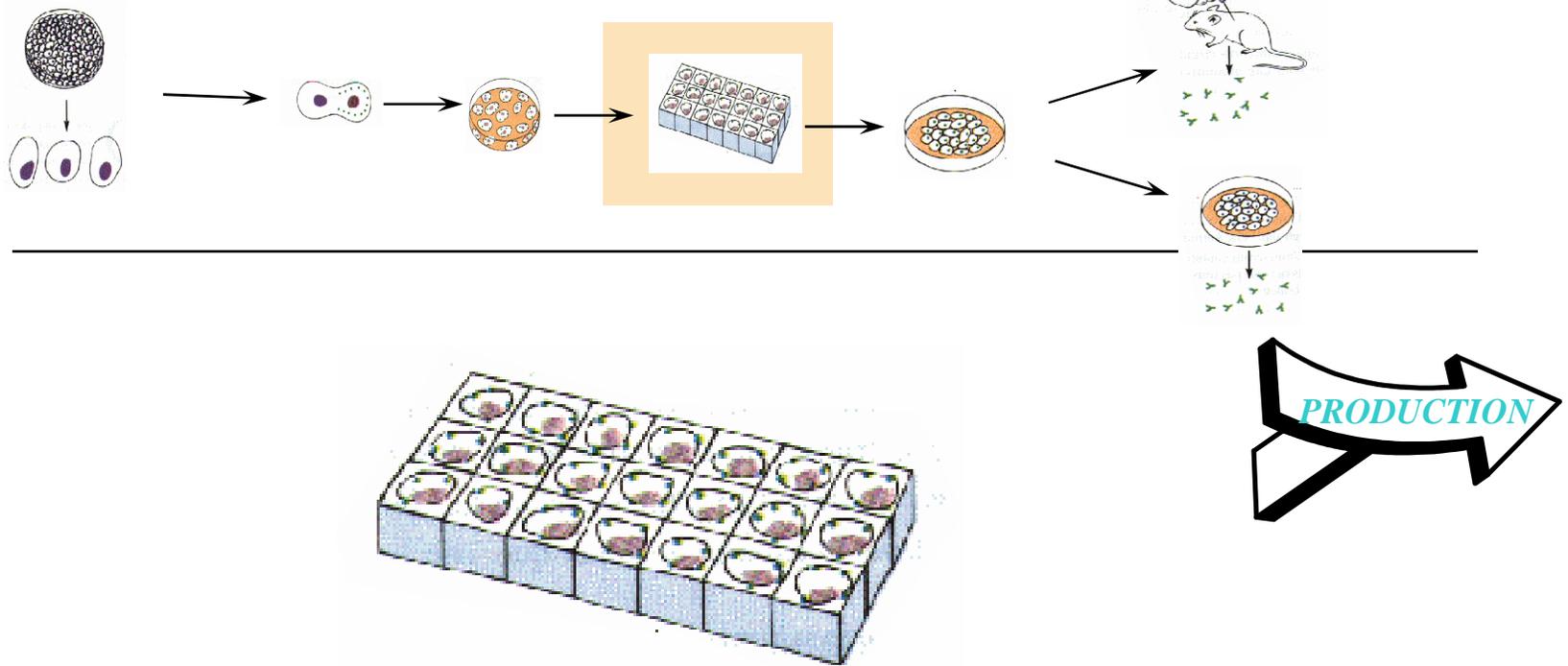


Culture sur milieu HAT  
Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine





+

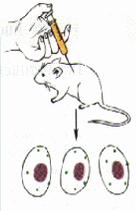


T  
E  
S  
T  
  
D  
E  
S  
  
H  
Y  
B  
R  
I  
D  
O  
M  
E  
S

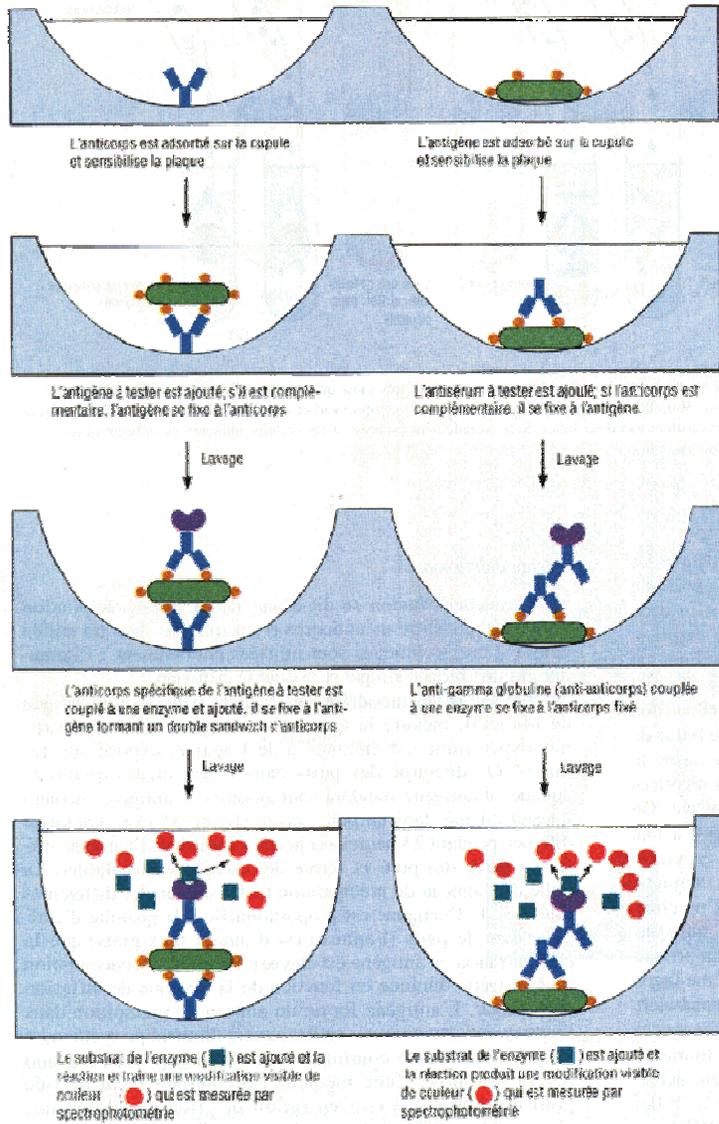
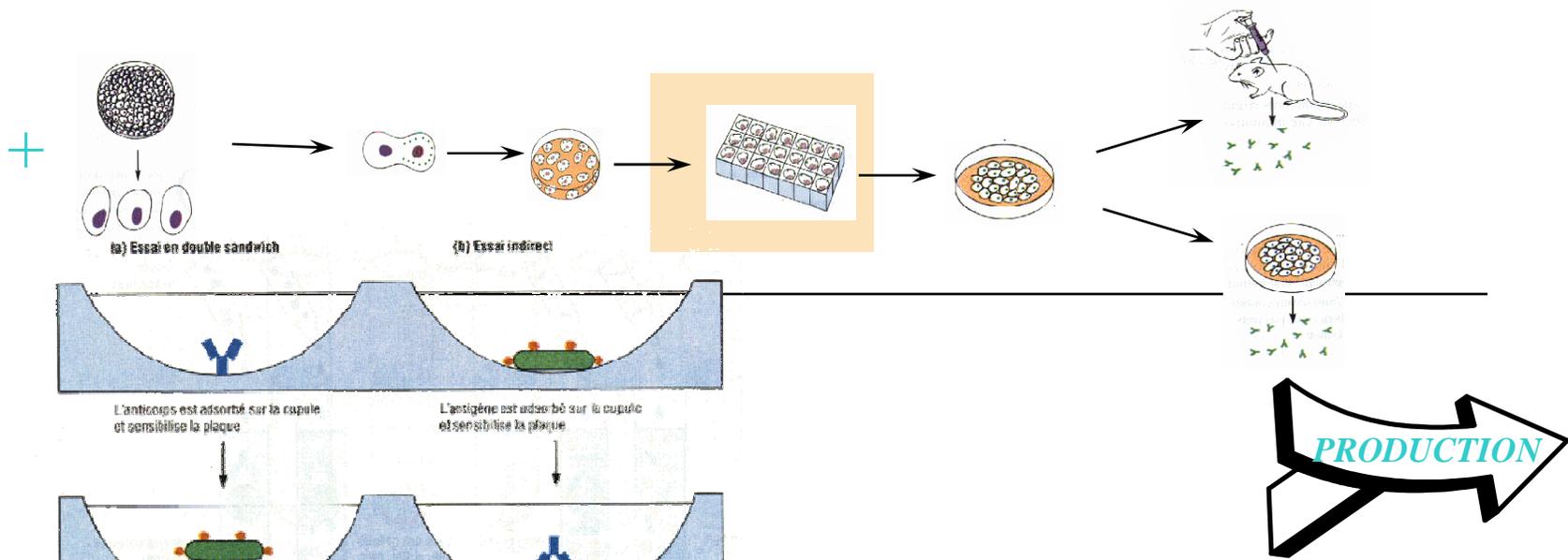
## TEST SUR LE SURNAGEANT DE CHAQUE PUIT

- DE LA PRESENCE DES ANTICORPS MONOCLONAUX PAR LA METHODE ELISA
- DU TYPE D'ANTICORPS PRODUIT PAR DES METHODES D'IMMUNOPRECIPITATION

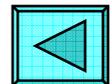




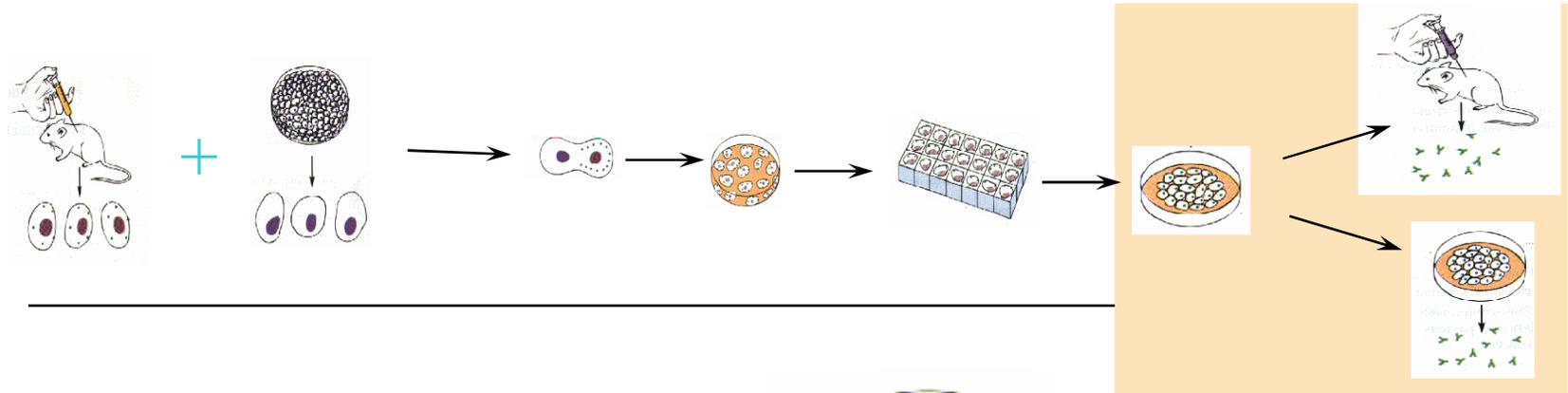
**E  
L  
I  
S  
A**



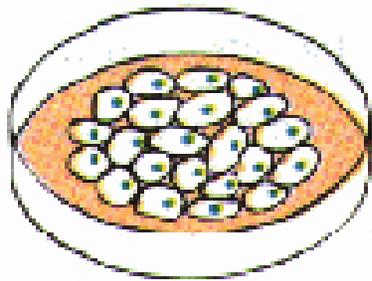
**TEST SUR LE SURNAGEANT DE CHAQUE PUIT DE LA PRESENCE DES ANTICORPS MONOCLONAUX PAR LA METHODE ELISA**



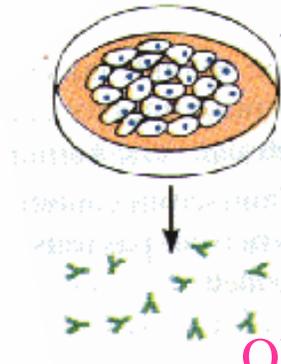
**PRODUCTION DES ACM**



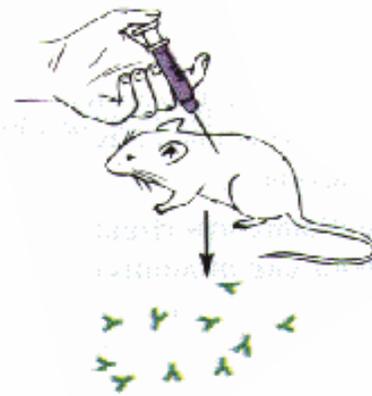
**Amplification des hybridomes**



**CONSERVATION DES HYBRIDOMES**



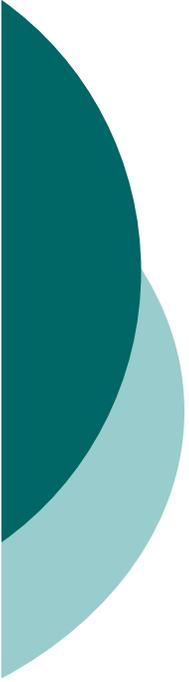
**OBTENTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX**



**Production dans les liquides d'ascites**

**Production par cultures cellulaires**





# La cytométrie en flux:

## Applications

---

- Classification des cellules hématopoïétiques par leur phénotype membranaire et dénombrement des sous populations cellulaires grâce aux Ac monoclonaux marqués à la fluorescence
- Cycle cellulaire: analyse du contenu en ADN permettant l'étude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire
- Caryotype en flux
- Tri des chromosomes (cartographie des gènes)
- Activité enzymatique cellulaire
- Taux anormaux d'ADN dans les tumeurs
- Diagnostic différentiel des désordres immunitaires...

# La cytométrie en flux

Technique d'analyse multiparamétrique sur plusieurs milliers de cellules isolées

Mesures simultanées de caractéristiques physiques et biologiques

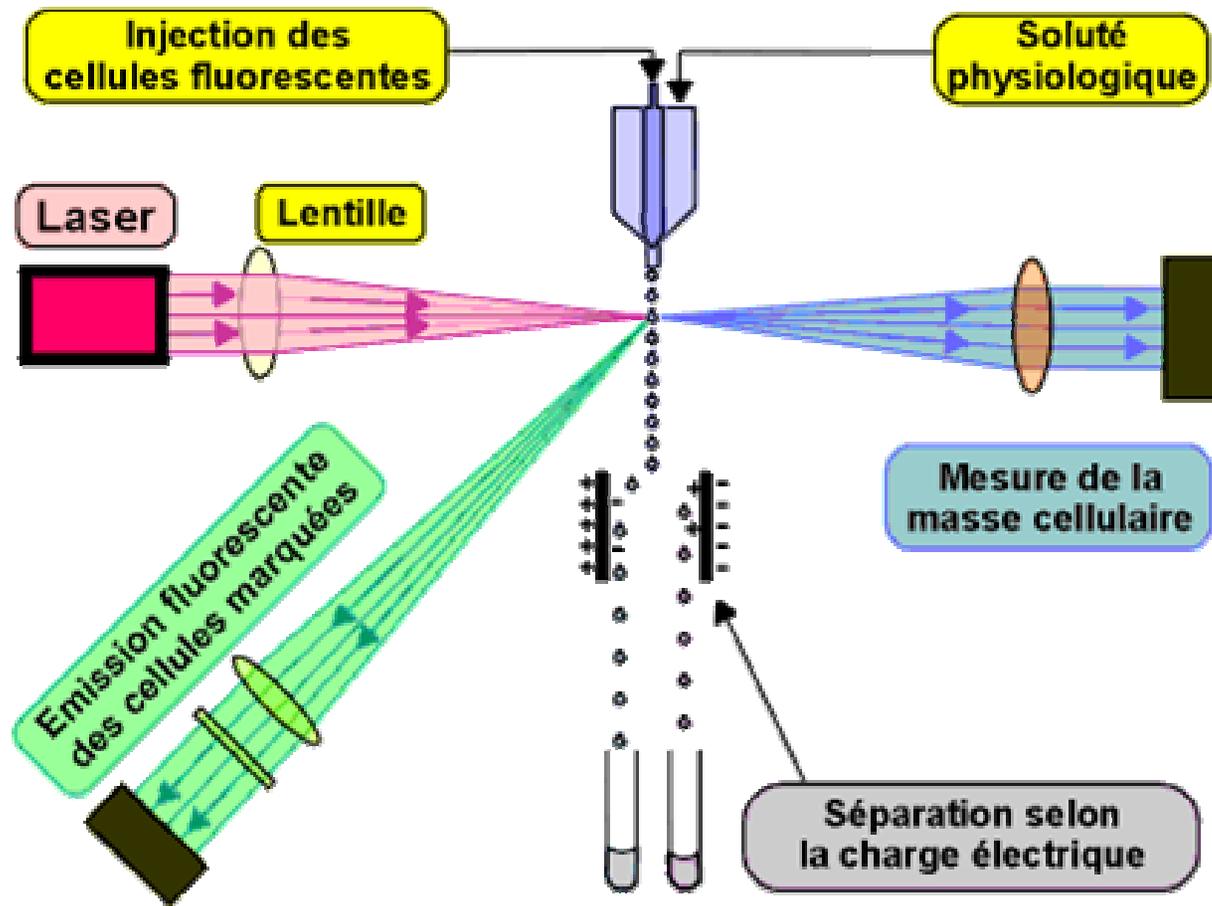
Les cellules en traversant un **faisceau laser d'Argon**, elles diffractent la lumière. L'intensité de la lumière diffractée dans l'axe est proportionnelle à la taille de la cellule (**FSC : forward scatter**) et à sa granulosité (contenu cytoplasmique) (**SSC : side scatter**).

Les signaux détectés par le système optique sont amplifiés, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques. Elles sont analysées grâce à l'unité informatique du cytofluorimètre.

Les cellules sont alors visualisées sous forme de point. C'est le cytogramme: nuage de signaux punctiformes

On peut distinguer alors différentes populations cellulaires et de tracer le contour de la population à étudier en excluant d'une part les débris sur les critères de petite taille (FSC) et petite granularité (SSC). **La zone d'intérêt ainsi délimitée (appelée fenêtre ou région) est la population cellulaire homogène traduite en plot ou en histogramme**

# Cytométrie en flux





# Étude des cellules de l'immunité

---

Les lymphocytes peuvent être caractérisés par des marquages à l'aide d'Ac monoclonaux comme les anti-CD4, -CD8, -CD3, -CD2, -CD19

La densité d'expression de ces marqueurs peut aider à identifier des stades de maturation différents.

Dans le SIDA, la cytométrie en flux est une méthode de choix pour étudier ce syndrome immunodéficitaire caractérisé par une lymphopénie avec diminution du nombre des TCD4+ et augmentation des CD8+ aux stades initiaux.

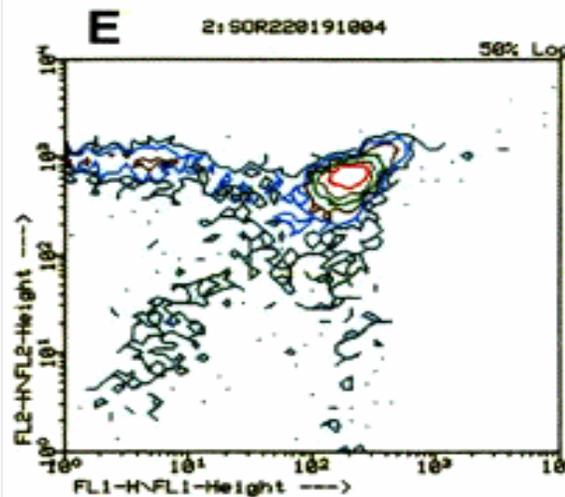
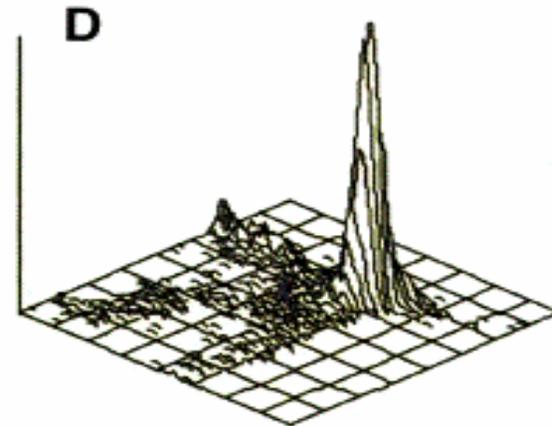
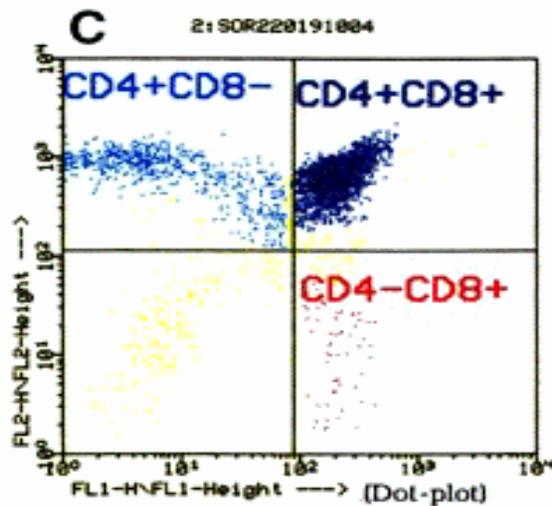
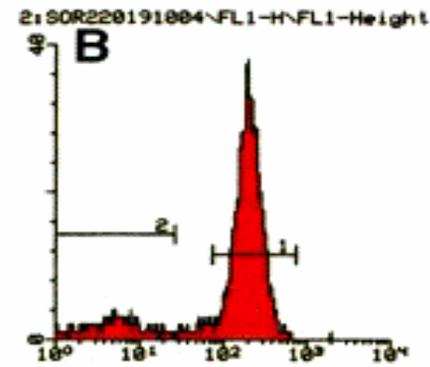
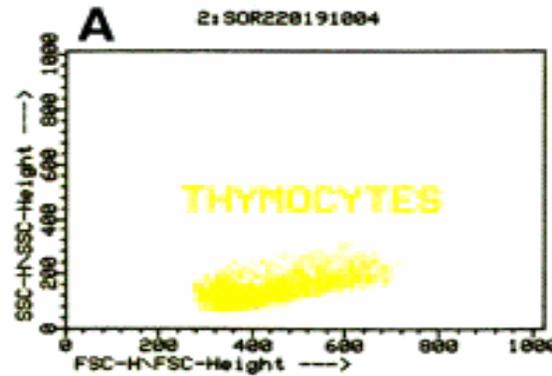
La coloration des cellules par l'acridine orange (ADN/ fluorescence verte et ARN/rouge) permet par exemple de différencier lymphocytes et monocytes en fonction du contenu en ARN.

L'emploi d'un double marquage peut définir 4 populations de cellules:

2 simples +

1 double +

1 double -



**DIFFERENTES REPRESENTATIONS  
D'UNE POPULATION DE  
THYMOCYTES EN CYTOMETRIE**

**A/** diagramme FSC/SSC : la population de thymocytes se situe dans le nuage de points (Dot)

**B/** histogramme fluorescence : le segment 1 représente la population des thymocytes marqués, l'intensité de fluorescence est représentée par une échelle logarithmique.

**C/** représentation FL1/FL2 : répartition des thymocytes après double marquage CD8-FITC et CD4-PE, donnant 17% de thymocytes CD4+CD8-, 3% de thymocytes CD4-CD8+, 75,5% de thymocytes CD4+CD8+, 4,5% de thymocytes CD4-CD8-.

**D/** représentation en trois dimensions de FL1/FL2.

**E/** représentation en contour trois dimensions de FL1/FL2.



**TABLEAU : Exemples de fluorochromes  
utilisés en cytométrie**

---

	<b>EXCITATION <math>\lambda</math> nm</b>	<b>EMISSION <math>\lambda</math> nm</b>
<b>FITC</b>	<b>495</b>	<b>520</b>
<b>Phycoérythrine R</b>	<b>495</b>	<b>576</b>
<b>Allophycocyanine</b>	<b>650</b>	<b>660</b>
<b>Rouge Texas</b>	<b>596</b>	<b>620</b>
<b>Iodure de Propidium</b>	<b>540</b>	<b>625</b>
<b>Bromure d'Ethidium</b>	<b>518</b>	<b>605</b>
<b>Hoechst 33342</b>	<b>340</b>	<b>450</b>
<b>Acridine Orange</b>	<b>492</b>	<b>530</b>