

Corrigé séries de TD N1 & N2, Module d'Immunogénétique

Problématique N°1:

- la première question à laquelle il faut répondre, c'est de savoir si la voie du complément déclenchée est une voie classique/lectine ou une voie alternative. Pour pouvoir répondre à cette question, il est nécessaire de procéder à une série de tests Elisa. Pour cela il est nécessaire de récupérer du sang afin de procéder à la séparation et récupération du plasma sanguin, soit par centrifugation simple ou par centrifugation sur gradient de densité (centrifugation par utilisation de Ficoll). Pour les Elisa, il est nécessaire de cibler le C4a et C2b, qui sont des médiateurs de l'inflammation présents au niveau sanguin et qui renseignent sur l'activation de la voie classique et voie des Lectines. La molécule Ba résultant du clivage du facteur B - par le facteur D - est un bon indicateur de l'activation de la voie alternative. Malgré leur importance biologique, le C3a et C5a, ne sont pas de bons marqueurs car ils sont produits par les trois voies.

Selon les résultats expérimentaux obtenus, il existe trois cas de figures :

- **1^{er} Cas** : Activation de la voie classique/Lectine
- **2^{eme} Cas** : Activation de la voie Alternative
- **3^{eme} Cas** : Activation des trois voies

Dans le **1^{er} Cas**, il est plus judicieux de cibler la molécule C2 afin d'empêcher la production des fragments C2a & C2b. la non production du fragment C2a empêche la formation de l'hetero-dimer C4b2a ou C3 convertases. la non formation de la C3 convertase est un puissant inhibiteur de la cascade du complément.

2^{eme} Cas, dans ce cas le ciblage le plus judicieux est le facteur B afin d'empêcher la production des fragments Bb & Ba. Ceci permet la non formation de l'hetero-dimer C3bBb ou C3 convertases de la voie alternative.

Dans le **3^{eme} cas** il est plus judicieux de cibler la molécule C3 afin d'empêcher sa dissociation en C3a & C3b. le C3B est le facteur commun de la C5 convertase de la voie classique/Lectines voie alternative. Ainsi son inhibition permet l'inhibition de deux types de C5 convertases.

Ce qui permet l'arrêt de la cascade du complément. Ainsi, l'inhibition d'une seule cible permet l'arrêt total d'un phénomène aussi complexe que la cascade du complément.

La cascade du complément est à l'interface de l'immunité innée et adaptative. L'arrêt de cette cascade va avoir un impact sur la réponse immunitaire innée, notamment le fait que la cascade du complément va induire de l'opsonisation qui favorise la phagocytose des pathogènes par les macrophage. Au même temps, l'un des mécanismes d'action des anticorps est indirecte. C'est-à-dire que l'action contre la cellule cible n'est pas due à l'anticorps, mais à l'activation de la cascade du complément suite à l'interaction de l'anticorps – certains isotype : IgM ou IgG-. Donc l'arrêt de la cascade de complément dans ce cas aura un impact sur l'efficacité de la réponse immunitaire humorale.

Problématique N°2:

La ponction de la moelle osseuse est formée de cellules souches hématopoïétiques, de progéniteurs, mais aussi de l'ensemble des cellules constituant la niche (cellules stromales, adipocytes...). Ainsi, lors de la mise en culture de cette ponction avec les différentes chimiokines et interleukines, ont aura :

Lot 1 : Dans ce premier lot, les cellules majoritaires récupérées sont des cellules Pro-B du stade précoce. En effet, la présence de CXCL-12 de SCF et d'IL-7 va permettre la croissance et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques dans la lignée B, mais l'absence d'IL-2, empêche la poursuite du processus de maturation. Il est important aussi de signaler que si l'observation des cellules ne se fait pas de façon rapide, aucune cellule ne restera en vie. Car l'absence d'IL-2 va précipiter la mort cellulaire.

Lot 2 : Dans ce lot, les cellules majoritaires récupérées sont des cellules Pro-B du stade précoce. La présence d'IL-4 et de CD40L n'influence pas la différenciation cellulaire à ce niveau, car les cellules ne sont pas encore des B-matures.

Lot 3 : Dans ce lot, plusieurs types cellulaires seront récupérés, notamment les différentes sous-populations issues du processus de la maturation B. La présence de l'IL-2 permet la prolifération des cellules pro-B et l'expression du BCR par les cellules B mature. Malgré la présence du CD40L et d'autres interleukines comme l'IL-5, les cellules ne peuvent produire que des IgM. La commutation de classe n'est pas possible car les cellules n'ont pas de peptides permettant le déclenchement de la signalisation via le BCR.

Lot 4 : Les molécules de la famille B7, l'IL-4 et CD40L n'ont aucun impact sur la des cellules B. Ainsi, à ce stade, les cellules majoritaires récupérées sont des cellules Pro-B du stade précoce.

Lot 5 : Les molécules de la famille B7, l'IL-5 et CD40L et TGF-B n'ont aucun impact sur la des cellules B. Ainsi, à ce stade, les cellules majoritaires récupérées sont des cellules Pro-B du stade précoce.

Lot 6 : Dans ce lot, en plus des différentes sous-populations issues du processus de la maturation B. On observe la présence de cellules B matures plasmocytaires dont la majorité sont des plasmocytes producteurs d'IgE, sous l'action de l'IL-4. Des plasmocytes sécréteurs d'IgG1 sont aussi présents et cela grâce à l'action de l'IL-4.

Lot 7 : Dans ce lot, les cellules majoritaire produites sont des cellules B matures, productrices d'IgM et n'ayant pas subies de commutation de classe.

Lot 8 : En plus de cellules de la lignées B, il y'aura le développement des cellules de la lignée myéloïdes et plus particulièrement les progéniteurs myéloïde commun et cela sous l'action de la TPO. les cellules de la lignée B majoritaire, sont les cellules B matures sécrétrices d'IgM.

Problématique N°3:

Il existe de nombreuses techniques permettant l'identification des différents clones. La technique la plus précise pour l'identification des clones est l'utilisation des techniques de séquençage génomiques. Le séquençage permet d'identifier plusieurs types de clones. La différence se fera sur la base : nature des séquences VDJ Pour les clones ayant les mêmes segments VDJ, la différence peut être au niveau du résultat du phénomène de l'hypermutation somatique. Dans le cas où les chercheurs ne disposent pas de moyens de séquençage, deux méthodologies différentes peuvent être mises en place. La technique de biologie moléculaire permettant la comparaison des tailles de l'ADN génomique au niveau des cellules B. En effet, le réarrangement génique produit des boucles de délétions avec de tailles différentes, ce qui va avoir comme résultats des ADNs génomiques ré-arrangés avec des tailles différentes pour les clones différents. Si la taille de l'ADN génomique de la region génique reste inchangé, cela s'explique par le fait que les segments géniques sélectionnés avaient des sens de transcriptions différents et il pas de formation de boucle de délétion. Ceci peut être confirmé par l'utilisation de sondes détectant la co-localisation des SSR 23 & 12 fusionnés ensemble. Toutefois, cette technique ne permet pas de la détection des différences dues à l'hypermutation somatique. Afin de pouvoir différencier entre les des anticorps issus du meme ré-arrangement génique, mais dont les hypermutations somatiques sont différentes, il est nécessaire de procéder à des tests de compétition Antigène-Anticorps. En effet, l'hypermutation mutation somatique à pour but l'augmentation de l'affinité des anticorps produits pour l'antigène. Ainsi, les différents clones

auront des affinités légèrement différentes pour l'antigène. Cette différence d'affinité peut alors être évaluée.

Problématique N°4:

Afin d'identifier une population immunitaire, il est important de suivre les étapes suivantes :

Récupération du sang circulant

Réalisation de centrifugation sur gradient de densité par utilisation du Ficoll.

Récupération des cellules mononuclées.

Passage au cymomètre en flux avec utilisation des anticorps, Anti-CD3, anti-CD19, Anti-CD20, anti-CD56, anti-CD45RA, anti-CD117 et anti-CD34 : l'utilisation l'anti-CD3 va permettre d'éliminer de la sélection l'ensemble des cellules lymphocytaire de la lignée T. L'utilisation des anticorps anti-CD20 et CD19, va permettre aux chercheurs d'éliminer de la sélection les cellules lymphocytaires de la lignée B. l'utilisation de l'anti-CD56 va permettre aux chercheurs de caractériser les populations NK matures éventuelles.

La non réaction des cellules à l'IL-15 signifie une absence d'expression du récepteur à l'IL-15 ou bien un défaut dans la transduction du signal via ce récepteur. Pour confirmer chacune de ces hypothèses, les chercheurs doivent en premier lieu réaliser un immunophénotypage de la population cellulaire (pré-NK) en ajoutant en plus des anticorps anti-CD45RA, anti-CD117 et anti-CD34, un anticorps anti-IL15R. Si les cellules sont IL-15R négatives, cela veut dire que ces cellules pré-NK ont un défaut d'expression d'IL-15R et c'est pour cette raison qu'elles sont insensibles. Dans le cas où les cellules pré-NK sont IL-15R positives, la dérégulation est due à un défaut dans la transduction du signal via ce récepteur.

Pour identifier la ou les molécules dérégulées dans cette signalisation, il est important de réaliser des western-Blot. Si aucun changement dans les niveaux d'expression n'est observé, alors la dérégulation ne se situe pas au niveau de l'expression des molécules de signalisation, mais dans le degré d'activation, c'est pour cette raison, il est nécessaire de réaliser des tests de phospho-Blot.

Les cellules NK jouent un rôle important à l'interface entre la réponse immunitaire innée et adaptative. Malgré le fait que la cible première des cellules NK est les virus et les bactéries

intracellulaire, l'absence d'expression de cellules KN mature au niveau de l'organisme ca induire une diminution de l'efficacité de l'ensemble de la réponse immunitaire et de ce fait ce groupe d'individus va développer des infections contre l'ensemble des types de pathogènes.

Problématique N°5:

Le déclenchement de la réponse immunitaire dépendante du complément peut être observé avant la reconnaissance du pathogène par les cellules myéloïdes, uniquement dans le cas où le pathogène entre dans l'organisme par voie intraveineuse. En d'autres termes, seule la voie alternative de la cascade du complément peut être activée avant l'activation des cellules de la lignée myéloïde. Les molécules du système du complément sont plasmatiques et sont absentes au niveau tissulaire. Ainsi, leur attraction vers un site tissulaire d'entrée des pathogènes sera un processus relativement long, ce qui laisse le temps aux cellules sentinelles de reconnaître le pathogène et lancer la réponse immunitaire innée. Pour la voie alternative elle est directement activée au niveau plasmatique, ceci suggère que l'hydrolyse de la C3 - qui est l'événement initiateur de la voie alternative- peut être enclenché au même moment voir plus tôt que la reconnaissance des pathogènes par les cellules de la lignée myéloïde.

L'extravasation des cellules immunitaire est un processus potentialisé lors d'un état inflammatoire. la cascade d'activation des molécules du complément permet à la fois la génération de nouvelles molécules à activité enzymatique comme le C4b, C2a, C3b, C5b ; mais aussi de petits fragments comme le C2b et C5a qui sont de forts médiateurs de l'inflammation. Ainsi, l'activation du système du complément engendre un état inflammatoire, état qui aura un impact sur le phénomène d'extravasation des cellules immunitaire.

Problématique N°6:

les voies des STATs sont impliquées de façon importante dans la production d'INF, mais aussi dans les voies de production d'interleukines, notamment d'IL-2. Dans le cas où le déficit consiste en une baisse de la signalisation via les STATs, cela va engendrer une baisse de l'activité du système immunitaire ce qui aura comme conséquence, des infections à répétition, mais aussi l'augmentation de la possibilité de développement de tumeurs. Dans le cas d'une augmentation de l'intensité de la signalisation via les STATs, cela engendre une sur-activation des cellules immunitaires notamment lymphocytes T, B et cellules dendritiques, ceci aura

comme résultat, un état inflammatoire au niveau l'organisme. état inflammatoire qui pourra être à l'origine du déclenchement de réponses auto-immunes.