

Popular Democratic Republic of Algeria
Ministry of High Education And Scientific
Research
Abebes Laghrour University, Khenchela
Faculty of Nature and Life Science
Department of Molecular and Cellular Biology



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة عباس لغرور خنشلة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلية

Polycopié Pédagogique des Travaux Dirigés

Matière :

Immunologie

Destiné aux étudiants

Niveau

L2 Tronc Commun Sciences Biologiques

Réalisé par

Dr. Yahia Massinissa Maitre de Conférences B Université de khenchela

Année Universitaire : 2020 - 2021

Avant-propos

L'immunologie est une science d'étude du système immunitaire dans des états différents, sains et malades. Elle comprend l'étude de la façon dont le corps lutte contre les infections causées par les bactéries et les virus, et aussi le développement des interventions médicales pour traiter et prévenir ces maladies.

L'étude de l'immunologie est essentielle pour la santé et la survie des humains et des animaux. Elle est à la fine pointe de la science médicale et a mené à certains progrès clés en matière des soins de santé ces derniers temps, y compris la vaccination et l'immunothérapie du cancer. Les immunologistes mettent au point de nouveaux traitements pour certaines des principales maladies touchant l'humanité, notamment les maladies infectieuses (comme la grippe et Ebola), les maladies auto-immunes (comme le diabète de type 1) et divers cancers. Le système immunitaire est incroyablement complexe et nous avons encore beaucoup plus à découvrir sur la façon dont il fonctionne.

Le présent support décrit les systèmes d'essais les plus importants en immunologie et les méthodes conventionnelles telles que la précipitation, l'agglutination et les réactions liants le complément qui sont présentées avec des méthodes plus récentes telles que l'immunoblotting, les tests de biologie moléculaire et un certain nombre de systèmes de test pour la détection des gènes exprimés.

Semestre: 4^{ème} Semestre

U.E: Unité d'Enseignement Fondamentale 2

Matière 2: Immunologie

Objectif de l'enseignement

L'objectif de cet enseignement est de faire connaître aux étudiants le rôle de l'immunité, les systèmes de défense immunitaire, les types de réponse immunitaire et les dysfonctionnements du système immunitaire.

Connaissances préalables recommandées (*descriptif succinct des connaissances requises pour pouvoir suivre cet enseignement – Maximum 2 lignes*).

L'étudiant doit avoir des notions élémentaires sur le système immunitaire.

Contenu de la Matière

1. Introduction à l'immunologie.

- 1.1. Rôle de l'immunité
- 1.2. Rapport avec la quotidienne et grande découverte

2. Ontogénèse du système immunitaire

- 2.1. Cellules B et organes lymphoïdes
- 2.2. Cellules T
- 2.3. Education des cellules B à l'intérieur de la moelle
- 2.4. Education des cellules T à l'intérieur du thymus
- 2.5. Autres cellules (Cellules myéloïdes)

3. CMH

4. La réponse immunitaire non spécifique

- Cellules intervenantes et complément

5. La réponse immunitaire spécifique

- 5.1. Cellulaire
- 5.2. Humorale

6. Cooperation cellulaire et humorale

- 6.1. Coopération entre les différentes cellules
- 6.2. Cytokines

7. Dysfonctionnement du système immunitaire

8. Les principaux tests en immunologie

- 8.1. Agglutination
- 8.2. Immuno-précipitation
- 8.3. Immunoélectrophorèse
- 8.4. Immunofluorescence
- 8.5. Elisa Techniques

Travaux Dirigés

TD N°1: Réaction Ag-Ac (précipitation : immunodiffusion, ELISA, RIA....)

TD N°2 : Préparation de lymphocytes de monocytes à partir de sang total

TD N°3 : Séparation de lymphocytes T et B

TD N°4 : Test de lymphomicrocytotoxicité

Mode d'évaluation

Contrôle continu et Examen semestriel

Références

1. Marie-Christine Bené, Yvon Lebranchu, François Lemoine et Estelle Seillès, 2013- Immunologie fondamentale et immunopathologie. Ed. Elsevier Masson, Paris, 260p.
2. Judy Owen, Jenni Punt et Sharon Stranford, 2014- Immunologie. Ed. Sciences de la vie, 832p.
3. Abul-K Abbas et Andrew-H Lichtman, 2013- Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Ed. Elsevier Masson, Paris, 284p.

Table des matières

Présentation de la matière

Liste des figures et tableaux

Sommaire

<i>Présentation de la matière</i>	01
TD 1 : Réaction Ag-Ac (précipitation : immunodiffusion, ELISA, RIA)	04
Introduction.....	05
1.Types spécifiques de réactions antigène-anticorps	06
1.1 La précipitation	06
<i>1.1.1</i> Réaction dans des solutions	06
<i>1.1.2</i> Réactions de précipitation dans des gels.	08
2.Double immunodiffusion radiale (Méthode ouchterlony)	09
3. Électrophorèse de roquette (électrophorèse dans le gel contenant des anticorps)	10
4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	10
4.1 <i>ELISA Clq en phase solide</i>	11
5. Radio-immunoessai (test classique RIA)	12
Évaluation type TD1	13
Corrigé d'évaluation	14
TD 2 : Préparation de lymphocytes de monocytes à partir de sang total	15
Introduction	16
1. Isolement des leucocytes mononucléaires	17
1.1 Comptage de cellules dans une chambre Bürker	18
2. Observation des lymphocytes de monocytes sur microscope optique	19
2.1 Réalisation d'un frottis sanguin.....	19
2.2 La coloration	20
2.3 Les premières observations.....	21
3. Description des principales cellules sanguines de l'immunité	23
4.Résumé du cours	24
Evaluation type TD2.	26
Corrigé d'évaluation	27
TD 3 : Séparation de lymphocytes T et B	29

Introduction	30
1. Séparation de lymphocytes T et B : formation de rosettes	30
2. Protocole de séparation des lymphocytes du sang à l'aide de Ficoll.....	31
3. Protocole de Séparation de la suspension des lymphocytes du matériel de biopsie.....	32
4. Enrichissement des cellules T et B au moyen de méthodes de liaison immunologique spécifiques	32
4.1 Enrichissement à l'aide de boîtes de Pétri enrobées d'IgG antihumains.....	32
4.2 Séparation à l'aide d'une colonne de protéine A-Sepharose 6MB	33
Evaluation type TD3	34
Corrigé d'évaluation	35
TD 4 : Test de lymphomicrocytotoxicité	37
Introduction	38
1. Définition	38
2. Principe du test de micro-lymphocytotoxicité	39
2.2 Protocole Micro-LymphoCytoToxicité (LCT) Complément dépendante (« CDC»)	41
2.2 Lecture et interprétation	42
3. Domaine d'application de la lymphocytotoxicité	43
3.1 <i>Transplantation d'organe (exemple)</i>	43
Évaluation type TD4	45
Corrigé d'évaluation	46

Liste des figures

TD 01

Figure 1 : Une représentation de la réaction de précipitation.....	07
Figure 2 : Diffusion de gel par des anticorps et un seul antigène (A) et des anticorps aux antigènes 1, 2, 3, et leurs antigènes respectifs (B).....	08
Figure 3 : Double immunodiffusion radiale (Méthode ouchterlony)	09
Figure 4 : Technique d'électrophorèse de roquette	10
Figure 5 : Technique ELISA.....	11

TD 02

Figure 1 : Culot des composants du sang après centrifugation	17
Figure 2 : Étapes de réalisations d'un frottis sanguin.....	19
Figure 3 : L'observation du frottis coloré au microscope optique	20
Figure 4 : globule rouge observé par Microscope optique	21
Figure 5 : leucocytes observés par Microscope optique	21
Figure 6 : Les différentes cellule du sang observées	22

TD 03

Figure 1 : Technique de séparation de lymphocytes T et B par la formation de rosettes.....	31
---	----

TD 04

Figure 1 : Test de micro-lymphocytotoxicité.....	39
Figure 2 : principe d'incubation des Antigènes HLA	40
Figure 3 : Protocole Micro-LymphoCytoToxicité (LCT) Complément dépendante (« CDC »).....	41
Figure 4 : Visualisation des cellules sur microscope a fluorescence	42
Figure 5 : Application de la lymphocytotoxicité dans la transplantation d 'organe	43

Liste des et tableaux

Tableau 1 : Fréquence des cellules sanguines	18
---	----

Présentation de la Matière

L'immunologie est une branche de la biologie qui étudie le système immunitaire. Ce système est apparu dans les premiers stades de l'échelle évolutive et a évolué pour pouvoir faire la distinction entre le soi et le non-soi. Les défenses du corps humain contre les agents pathogènes - quelle que soit leur nature, virus, bactéries, champignons ou protozoaires, maladies auto-immunes, allergies et rejet de greffe sont tous des aspects médicaux de cette science. La synthèse et la maturation des anticorps, l'activation du système du complément, la mobilisation et la coordination des cellules de défense constituent la base et le mécanisme de cette science.

Le système immunitaire est un grand puzzle ! Les pièces sont nombreuses et l'on en découvre encore toutes les semaines. Certaines sont bien connues, d'autres moins. L'objectif est de comprendre comment elles s'agencent. Le système immunitaire est le résultat d'une longue évolution qui a abouti à une construction à la fois simple et sophistiquée dont l'objectif est de donner à un organisme vivant un système de défense efficace indispensable à la survie. L'immunologie est la science moderne qui s'intéresse au fonctionnement du système immunitaire. On attribue sa paternité à Edward JENNER qui a démontré qu'il était possible de se protéger contre la variole (1796). Depuis, grâce à ses précurseurs, l'immunologie s'est développée au point de devenir une science majeure du vivant. L'immunologie s'est intéressée pendant longtemps presque exclusivement aux mécanismes de défense anti-infectieuse mais, progressivement, on s'est rendu compte de l'importance de la réponse immunitaire dans la plupart des grandes maladies humaines, comme l'allergie, les maladies néoplasiques et surtout les maladies inflammatoires et auto-immunes. Reste à comprendre comment ce système fonctionne

1) Historique

Dès l'antiquité, on rapporte lors d'épidémie de peste, des personnes résistantes à la maladie. La première tentative d'immunisation systématique remonte au XVème siècle a été faite par les chinois lors d'une épidémie de variole. Jenner et la vaccination moderne apparaissent au XVIIIème siècle : on découvre que vaccine et variole ont des déterminants communs et une

réaction croisée. Pasteur et la microbiologie moderne étudient le cholera aviaire (atténuation de la virulence) et la rage.

Le principe de la vaccination est d'utiliser un virus atténué. Dans le cas du choléra aviaire, une souche virale avait été utilisée pour des expériences, mais après avoir laissé vieillir (et s'affaiblir) le virus, les animaux ne tombaient non seulement plus malades mais en plus résistaient à une autre souche !

2) Caractéristiques générales de la réponse immunitaire

Deux Aspects Fonctionnels:

L'immunité naturelle (innée, non spécifique), première ligne de défense qui sert à contenir l'infection et ce quelque soit la nature du pathogène.

L'immunité spécifique (acquise, adaptative), spécifique du pathogène et mémorisée.

Des effecteurs cellulaires et moléculaires :

Des leucocytes circulants (fluides biologiques: sang, lymphe,...) et résidents dans les organes lymphoïdes.

Des molécules solubles (anticorps, cytokines, complément,...).

2-1) Immunité naturelle, innée ou non spécifique : la réaction inflammatoire

Première ligne de défense.

Rapide (quelques heures 1 à 12h).

Identique quelque soit le pathogène.

Identique chez tous les individus d'une même espèce.

2-1-1) Les Barrières

a- Les barrières physiques (épithélium) : peau, cils, poils

Dans les bronches et les intestins, on a une couche épithéliale et du tissu conjonctif.

Le mucus qui a un rôle de protection des épithéliums est localisé dans les poumons, estomac, intestin, utérus,... Il est constitué (~150 µm) de mucines (glycoprotéines), acides aminés, leucocytes,...

b- Les barrières chimiques : sueur (pH 3 à 6) et suc gastrique (~pH1)

Leur mode d'action est d'empêcher la prolifération

c- Les barrières biologiques (enzymes) :

La «fièvre ».

Les sécrétions enzymatiques : larmes (lysozyme,...), salive (Amylase, Lysozyme), suc gastrique (pepsine, cathepsine, lipase,...), bile (estérases, phospholipases,...), suc pancréatique (amylase, peptidases, trypsinogène, chymotrypsinogène, carboxypeptidase,...), les bactéries commensales (intestin) et les défensines : peptides antimicrobiens, antifongiques et antiviraux synthétisées par un certain nombre de cellules épithéliales présentes dans l'intestin.

2-1-2) Les effecteurs cellulaires.

a- Les Polynucléaires ou granulocytes : basophiles (colorés en bleu) pour la phagocytose, éosinophiles (granules colorés par l'éosine) par des sécrétions, les neutrophiles (pas de coloration) par excrétion de granules. Ce sont des effecteurs de l'immunité innée.

b- Les phagocytes (macrophages)

Cellules résidentes dans les tissus (portes d'entrée des pathogènes) :

Poumons : Macrophages alvéolaires.

Rate : Macrophages spléniques.

Foie : Cellules de Kupffer.

Cerveau : Cellules microgliales

Liquide synovial.

Ils ont un rôle majeur pour l'immunité innée, mais sont aussi un relais pour la réponse spécifique. Une fois activés leur membrane a un développement important

c- Les cellules NK

Une fois activées, elles sécrètent des effecteurs solubles (Interféron γ) et lysent les cellules infectées par un virus et les cellules cancéreuses.

Les cellules immunitaires oscillent entre un état de repos (quiescent) et un état activé.

L'activation implique :

une prolifération qui conduit à n cellules filles identiques.

une différenciation en cellules ayant une fonction effectrice donnée :

Par exemple : un macrophage activé qui exerce une fonction de sécrétion mais aussi une activité de phagocytose.

TD 1

*Réaction Ag-Ac (précipitation
: immunodiffusion, ELISA,
RIA)*

TD N°1: Réaction Ag-Ac (précipitation: immunodiffusion, ELISA, RIA)

Introduction

La réaction entre les antigènes (Ag) et les anticorps (Ac) implique des sites de liaison complémentaires sur l'Ac et sur les molécules Ag. Les sites sur la molécule d'Ag qui se combinent avec le site de liaison d'un Ac sont appelés épitopes. De la même manière que le site de liaison est déterminé par différents segments sur les régions variables des chaînes lourdes et légères qui viennent à proximité en raison du pliage de ces régions, les épitopes sont également formés par des segments discontinus d'une molécule d'Ag. Des études cristallographiques ont défini les épitopes de protéines comme de grandes zones, impliquant généralement 15 à 22 acides aminés situés sur plusieurs boucles de surface. Certains sous-ensembles d'acides aminés dans l'épitope sont susceptibles de contribuer à la majeure partie de l'énergie de liaison avec l'Ac, tandis que les résidus environnants fournissent un complément structural qui peut jouer un rôle stabilisateur lorsque Ag et Ac interagissent.

Les réactions antigène-anticorps sont améliorées en laboratoire pour les rendre observables, dans le but de tirer des conclusions pratique.

A la fin de cette section, l'étudiant doit être capable de décrire les différents types des réactions antigène-anticorps, de discuter les facteurs qui les influencent et d'utiliser ces connaissances pour effectuer des tests de laboratoire de manière à obtenir des résultats corrects.

1.Types spécifiques de réactions antigène-anticorps

Les réactions Ag–Ac peuvent être révélées par une variété d'expressions physiques, selon la nature de l'Ag et les conditions entourant la réaction.

1.2 La précipitation

Les complexes immunitaires se forment en raison de l'interaction entre des anticorps et des antigènes moléculaires. Dans la précipitation immunitaire, l'antigène est dilué par diffusion dans un échantillon dont la concentration en anticorps est connue jusqu'au point de précipitation, c'est-à-dire jusqu'à ce que le rapport antigène/anticorps atteigne la zone d'équivalence.

1.1.1 Réaction dans des solutions. Cette réaction de précipitation se produit lorsque les antigènes et les anti- corps solubles sont mélangés. Comme dans le cas de l'agglutination, la précipitation des complexes antigène-anticorps se produit lorsque les molécules d'anticorps divalents croisent les molécules d'antigènes multivalents pour former un réseau. Lorsqu'il atteint une certaine taille, ce complexe antigène-anticorps perd sa solubilité et se précipite hors de la solution. Le phénomène de précipitation est appelé réaction de précipitation. [Rodgers RP , 1994]

La figure 1 décrit une réaction de précipitation quantitative. Lorsque des concentrations croissantes d'antigène sont ajoutées à une série de tubes qui contiennent une concentration constante d'anticorps, des quantités variables de précipité se forment. Le poids du précipité dans chaque tube peut être déterminé par diverses méthodes. Si la quantité de précipité est reportée par rapport à la quantité d'antigène ajoutée, une courbe de précipitation comme celle de la figure 1 est obtenu.

On observe trois zones importantes sous la courbe illustrée dans figure 1 : (1) la zone d'excès d'anticorps, (2) la zone d'équivalence et (3) la zone d'excès d'antigène. Dans la zone d'équivalence, la proportion d'antigène par rapport aux anticorps est optimale pour une précipitation maximale ; dans les zones d'excès d'anticorps ou d'excès d'antigène, les

proportions des réactifs ne conduisent pas à une réticulation efficace et à la formation de précipité.

Il convient de souligner que les zones de la courbe de précipitation sont basées sur la quantité de composés antigéniques-anticorps précipités. Cependant, les zones d'antigène ou d'excès d'anti-corps peuvent contenir des complexes antigène-anticorps solubles, en particulier la zone d'excès d'antigène où une quantité minimale de précipité est formée, mais de grandes quantités de complexes antigène-anticorps sont présentes dans le surnageant. Ainsi, la quantité de précipité formé dépend des proportions des antigènes réactifs et des anticorps : la proportion correcte des réactions entraîne la formation maximale de précipité ; l'excès d'antigène (ou d'anticorps) entraîne des complexes solubles (**figure 1**).

Dans les laboratoires cliniques, les néphélomètres sont utilisés pour mesurer la quantité de diffusion de la lumière causée par les complexes antigènes-anticorps en solution. Ils sont également utilisés pour déterminer les niveaux de plusieurs protéines du plasma sanguin, y compris le complément. La technique est appelée néphélométrie et a largement remplacé l'immunodiffusion radiale. Alors que la néphélométrie et l'immunodiffusion radiale mesurent la formation de complexes immunitaires, la première mesure les complexes immunitaires solubles, tandis que la seconde mesure. [Camper SA. (1987)]

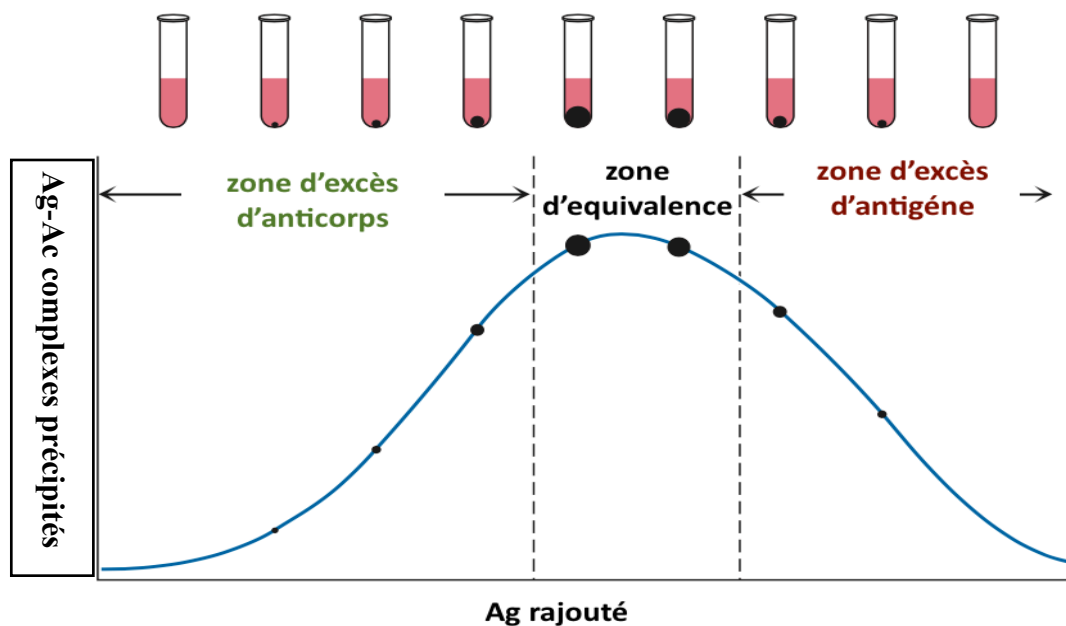


Figure 1 : Une représentation de la réaction de précipitation. [Camper SA. (1987)]

1.1.2 Réactions de précipitation dans des gels.

Les réactions de précipitation entre les antigènes solubles et les anticorps peuvent avoir lieu non seulement en solution, mais aussi dans les milieux semi-solides tels que les gels d'agar. Lorsque l'antigène et les anticorps solubles sont placés dans des puits coupés dans le gel (figure 2 A), les réactifs se diffusent dans le gel et forment des gradients de concentration, avec les concentrations les plus élevées et les plus proches des puits. Quelque part entre les deux puits, l'antigène réactif et les anticorps seront présents à des proportions optimales pour la formation d'un précipité.

Si le puits d'anticorps contient des anticorps 1, 2 et 3 spécifiques pour les antigènes 1, 2 et 3, respectivement, et si les antigènes 1, 2 et 3, sont placés dans l'antigène bien diffus à des taux différents (avec des taux de diffusion de $1 > 2 > 3$), alors trois lignes de précipitation distinctes se formeront. Ces trois lignes de précipitation se forment parce que les anti-1, les anti-2 et les anti-3, qui se diffusent au même rythme, réagissent indépendamment avec les antigènes 1, 2 et 3, respectivement, pour former trois zones d'équivalence et donc trois lignes de précipitation (figure 2 B). Différents taux de diffusion des anticorps, et des anticorps et des antigènes, résultent de différences dans la concentration, la taille moléculaire, ou la forme (**figure 2**). [Mayforth RD. 1993]

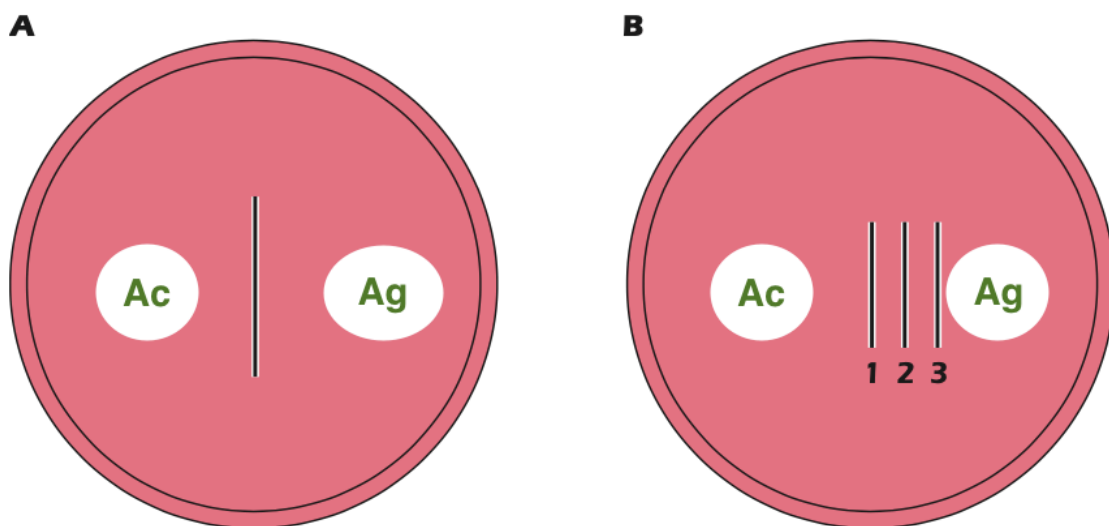


Figure 2 : Diffusion de gel par des anticorps et un seul antigène (A) et des anticorps aux antigènes 1, 2, 3, et leurs antigènes respectifs (B).

2. Double immunodiffusion radiale (Méthode ouchterlony)

Dans ce test, l'antigène et l'anticorps se diffusent radialement dans le gel aqueux d'agarose. Des bandes visibles de précipitations se forment aux endroits où l'antigène et l'anticorps se rencontrent. Cette méthode est une moyenne très efficace de tester l'identité des antigènes inconnus en fonction de la symétrie des régimes de précipitations. L'identité de deux antisérums (par rapport à l'antigène inconnu) se produit lorsque les deux bandes de précipitation fusionnent pour former une seule ligne. Les bandes se croisent quand il y a non identité, et un soi-disant un spur se forme en identité partielle (**figure 3**).

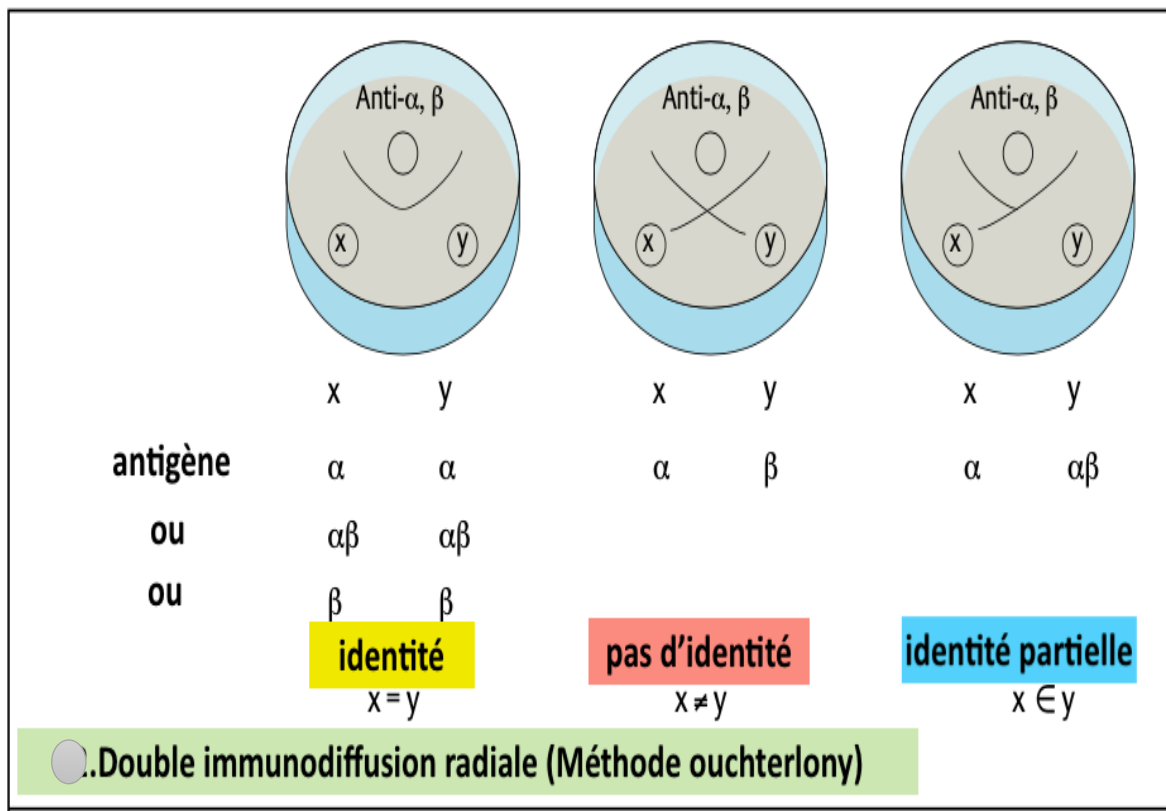


Figure 3 : Double immunodiffusion radiale (Méthode ouchterlony) [Mayforth RD. 1993]

3. Électrophorèse de roquette (électrophorèse dans le gel contenant des anticorps)

Dans cette technique, les antigènes migrent à travers un gel contenant un anticorps vers une anode. Cela conduit à la formation de longs précipités (roquette) en forme de fusée qui peuvent être visualisés par coloration. Cette méthode permet de quantifier la concentration d'antigène en comparant l'échantillon d'essai à un étalon mesuré simultanément.

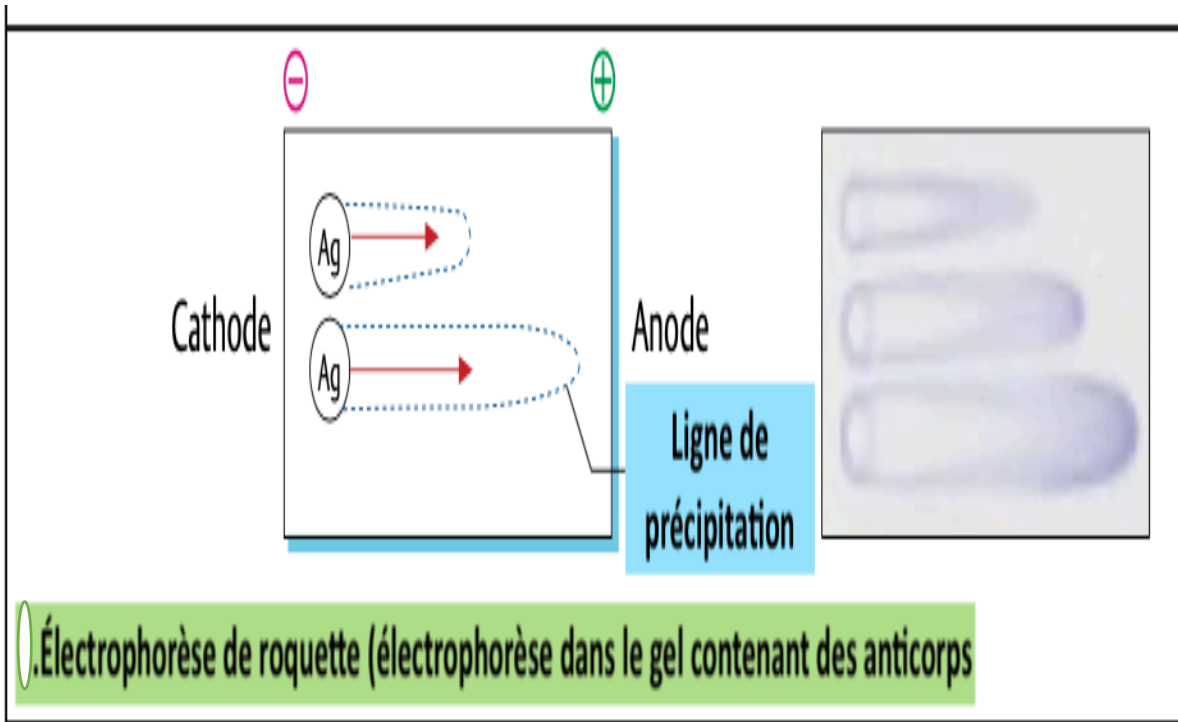


Figure 4 : Technique d'électrophorèse de roquette [Mayforth RD. 1993]

4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) est la technique basée sur la visualisation de l'antigène de liaison ou d'anticorps par une enzyme liée qui convertit un substrat incolore en une réaction colorée.

Le test immuno-enzymatique est une méthode analytique quantitative où l'un des partenaires réactifs porte un marqueur enzymatique. L'antigène ou l'anticorps peuvent être marqués.

Dans le cas discuté, un support solide (en général une plaque « microlitre ») est recouvert avec l'antigène reconnu par l'anticorps recherché. Si le matériel à analyser (par exemple du sérum)

contient ces anticorps, il se lie à l'antigène. Dans une deuxième étape du test, un anticorps secondaire (par exemple des fragments Fab d'anticorps de mouton contre des IgG humaines), marqué par une enzyme, se lie aux anticorps recherchés. Puis l'enzyme transforme un substrat non coloré en un substrat coloré. À l'aide d'une courbe de calibrage obtenue avec un réactif standard, la concentration d'anticorps correspondant à la quantité de substrat coloré produite peut être calculée.

Lors de la détection d'un antigène par « sandwich » ELISA, un anticorps reconnaissant *V antigène recherché* est fixé au support solide. La quantité de l'antigène contenue dans l'échantillon analysé est déterminée par l'ajout d'un anticorps secondaire qui, en fixant l'antigène, complète la formation d'un « sandwich ». [Gibson G, 2004]

4.1 ELISA C1q en phase solide

Cette technique utilise des bandes en polystyrène recouvertes de C1q de façon covalente. Les complexes immuns (CI) circulant présents dans l'échantillon se lient à C1q. La détection des complexes immuns se fait à l'aide d'un anticorps anti-IgG humain marqué par une enzyme. Après l'ajout du substrat, un réactif coloré est produit, dont la quantité est proportionnelle à la concentration de complexes immuns circulants (figure 5).

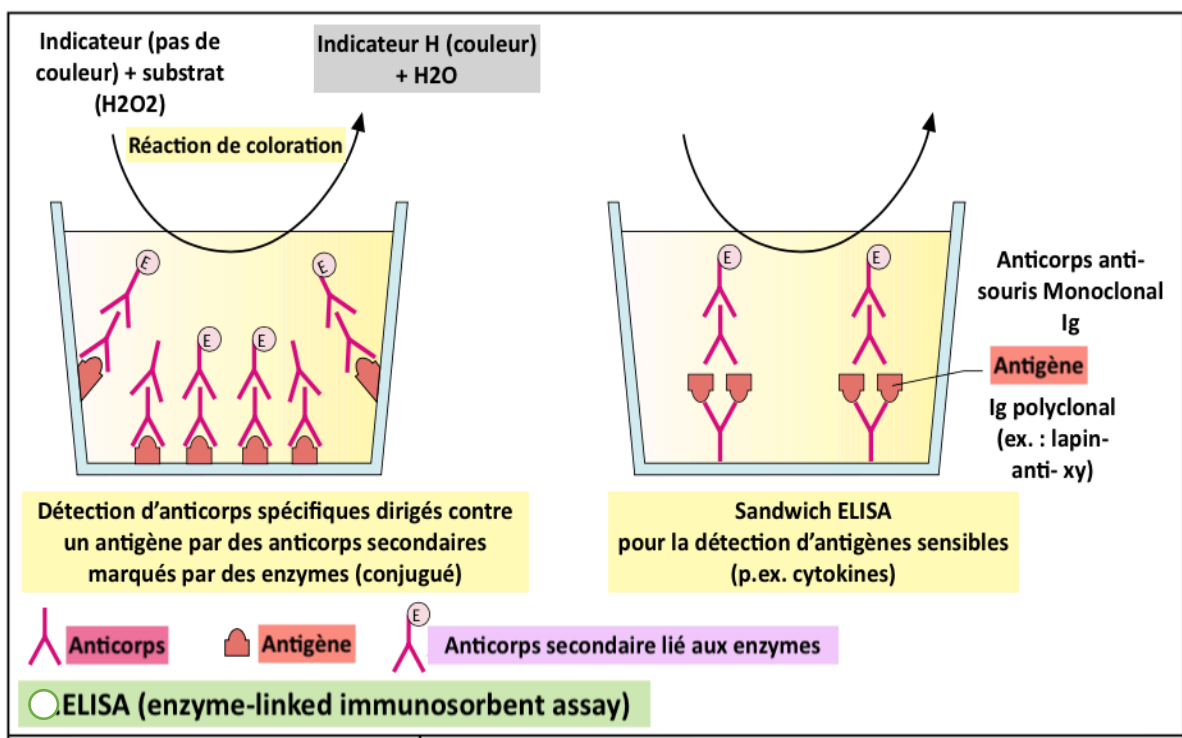


Figure 5 : Technique ELISA [Gerd-Ruedige ., et al 1998]

5. Radio-immunoessai (test classique RIA)

Une méthode développée en 1977 par le lauréat du prix Nobel R.S. Yalow pour la mesure extrêmement sensible et spécifique de toute protéine par la compétition d'un analyte (antigène non étiqueté) dans un échantillon de sérum, avec le même antigène, étiqueté radioactivement (^{125}I), pour une quantité fixe d'anticorps in vitro. Si le taux sérique de l'analyte est faible, le précipité indiquera un taux de radioactivité élevé et vice versa. L'RIA a de nombreuses utilisations, y compris le dépistage des virus dans les banques de sang, la mesure des concentrations d'hormones, de cytokines, de chimiokines, de neurotransmetteurs, de détection de médicaments, etc. La mesure de la radioactivité est effectuée à l'aide d'un compteur à scintillation gamma.

Le radio-immunoessai (ou RIA) classique repose sur le principe d'une liaison compétitive. Dans le cas représenté, l'antigène reconnu par l'anticorps recherché est fixé à la phase solide. Les anticorps dans l'échantillon analysé et les anticorps radio-marqués ajoutés entrent en compétition pour les déterminants antigéniques disponibles ; les anticorps libres sont ensuite éliminés par un lavage. Plus il y a d'anticorps dans le sérum, moins les anticorps radiomarqués peuvent lier l'antigène. Une concentration élevée d'anticorps dans le sérum donne donc signal radioactif faible et vice versa. [Channing-Rodgers .1994]

Evaluation type:

1- Un test ELISA est conçu pour tester la présence d'anticorps sériques pour une nouvelle souche de bactéries pathogènes qui est en cours de développement. Initialement, un anticorps monoclonal spécifique pour un seul épitope de l'organisme qui a été utilisé à la fois pour sensibiliser les puits de la plaque ELISA et comme l'enzyme- marqué pour la détection d'anticorps dans un sandwich classique ELISA. Le test ELISA n'a pas pu détecter l'antigène malgré l'utilisation d'un large éventail de concentrations d'anticorps. Quelle est la cause la plus probable de ce problème ?

- A) L'antigène utilisé dans l'essai est trop gros.
- B) L'anticorps a une faible affinité pour l'antigène.
- C) L'anticorps monoclonal utilisé pour sensibiliser les puits bloque l'accès à l'épitope; ainsi, lorsque le même anticorps est marqué enzyme, il ne peut pas se lier à l'antigène.
- D) L'anticorps enzymatique utilisé aurait dû être un isotype différent de l'anticorps sensibilisant.
- E) L'anticorps monoclonal utilisé est probablement instable.

2- Lequel des énoncés suivants est nécessaire pour assurer l'intégrité et la stabilité des molécules d'immunoglobulines, mais n'est pas associé aux interactions entre les antigènes et les anticorps ?

- A) liaisons covalentes
- B) Forces van der Waals
- C) forces hydrophobes
- D) Forces électrostatiques
- (E) un ajustement très serré entre un épitope et l'anticorps

Solution :

R1)-

. Dans un sandwich ELISA, un anticorps (souvent monoclonal) utilisé pour enrober les puits ELISA va se lier à l'épitope pour lequel il est spécifique. Dans l'exemple donné, le même anti-corps monoclonal spécifique à l'épitope est utilisé comme anticorps de détection marqué par une enzyme. Le monoclonal sensibilisant bloque l'accès à l'épitope par l'anticorps monoclonal marqué par enzyme ; par conséquent, il ne se lie pas.

R2)-

. Aucune liaison covalente n'est impliquée dans l'interaction entre l'anticorps et l'antigène. Les forces de liaison sont relativement faibles et comprennent les forces van der Waals, les forces hydrophobes et les forces électrostatiques. Un ajustement très serré entre un épitope et l'anticorps est nécessaire

TD N°2

Préparation de lymphocytes de monocytes à partir de sang total

Introduction

Le sang est un liquide corporel spécialisé qui est composé de quatre composants : le plasma, les globules blancs (leucocytes), les globules rouges (érythrocytes) et les plaquettes (thrombocytes). Contrairement aux globules rouges et aux plaquettes, tous les globules blancs sont nucléés et peuvent être classés par leur structure de noyau comme des cellules mononucléaires ou polynucléaires. Les globules blancs ont un rôle important dans l'immunité pour protéger le corps contre les maladies infectieuses et les envahisseurs étrangers cimentant leur utilité pour les études immunologiques. Ainsi que l'isolement des cellules mononucléaires et polynucléaires du sang sert de point de départ pour un large spectre d'études immunologiques. Les lymphocytes et les monocytes sont les deux principales catégories de globules blancs mononucléaires avec un noyau lobé dans le système immunitaire dont ils jouent des rôles importants dans la défense contre l'infection, le cancer et d'autres envahisseurs étrangers. Les lymphocytes comprennent les cellules tueuses naturelles (NK), les cellules T (thymus) et les cellules B (dérivées de la moelle osseuse) et sont les principaux types des cellules présentes dans le système lymphatique. [Mac Lennan et al., 1993]

Chez les humains, les lymphocytes constituent la majorité de la population de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) (70 à 90 % de la population de PBMC), suivis des monocytes (10 à 30 % de la population de PBMC) et un faible pourcentage de cellules dendritiques (1 à 2 % de la population de PBMC). Les PCBM sont importants pour les études immunologiques et les applications cliniques comme le diagnostic et le traitement des maladies. Certaines applications clés des TBP comprennent l'évaluation de la réponse immunitaire, l'identification des biomarqueurs, la mise au point de vaccins et l'immunothérapie du cancer.

Les Premières méthodes d'isolement Avec la centrifugation, les érythrocytes agrégés et granulés en raison de leur densité accrue, tandis que les leucocytes sont restés en solution. Cependant, la récupération des leucocytes était moins que désirée parce que les cellules peuvent être piégées et sédimentées avec les érythrocytes agrégés.

. Dans ce TD nous allons connaître comment examiner de plus près certaines populations de globules blancs. En utilisant la cytométrie de flux qui est une technique commune pour l'analyse des cellules dans les laboratoires cliniques. Pour effectuer cette analyse, nous devons d'abord séparer les différents types de leucocytes les uns des autres en utilisant les caractéristiques uniques des cellules. Nous isolerons les lymphocytes T, les monocytes et les lymphocytes B.

4. Isolement des leucocytes mononucléaires

Dans les transfusions sanguines, il est important que le sang ne contienne pas de globules blancs. Ceux-ci sont séparés du sang par filtration et les cellules recueillies sont appelées matériau de filtre (anciennement connu sous le nom de couche de Buffy, qui est séparé par centrifugation). Vous pouvez ainsi obtenir des cellules mononucléaires par centrifugation à gradient de densité sur Ficoll-Paque (densité = 1,078). Les différences de densité séparent les lymphocytes des autres cellules sanguines. Après la centrifugation, trois ou quatre fractions sont visibles : [Channing-Rodgers .1994]

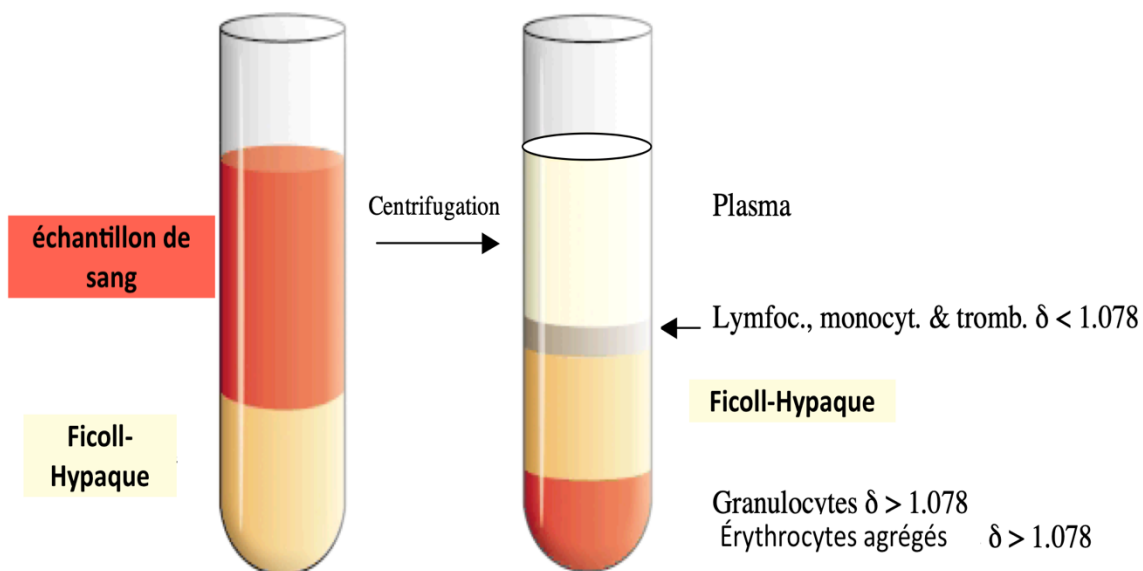


Figure 01 : Culot des composants du sang après centrifugation . [Mayforth RD. 1993]

4.1 Comptage de cellules dans une chambre Bürker

- La proportion des cellules viables peut être déterminée en tachant les cellules avec du bleu de trypan. Les cellules viables ne seront pas tachées alors que les cellules mortes deviendront bleues. Les cellules doivent être comptées en 3-4 minutes ou les cellules viables prendront également la couleur.
- Les chambres Bürker et les couvercles doivent être correctement nettoyés dans l'eau et l'alcool. Le couvercle est fixé à la vitre en humidifiant les bords de la vitre. Diluer les cellules en bleu trypan et laisser glisser la suspension sous le couvercle, dans l'une des chambres. Une suspension cellulaire abondante doit être séchée à l'aide d'un Kleenex.
- Chaque champ de la chambre de comptage est divisé en 9 carrés séparés par des lignes triples et un tel champ (carré A) contient 0,1 µl. Le carré A est ensuite divisé en 16 parties, carrés B (voir figure ci-dessous). Lors du comptage des cellules dans un carré A, toutes les cellules qui touchent la droite et le bord supérieur doivent être incluses tandis que les cellules sur la gauche et la ligne du bas doivent être exclues. Comptez au moins une centaine de cellules (parfois vous devrez compter plus d'un carré A) et utilisez la moyenne pour déterminer la concentration des cellules. [Channing-Rodgers .1994]

Type cellulaire	Cellules/mm ³	%
Globules rouges	5.0 x 10⁶	
Plaquettes	2.5 x 10⁵	
Leucocytes	7.3 x 10³	
Neutrophiles		50-70
Lymphocytes		20-40
Monocytes		1-6
Eosinophiles		1-3
Basophiles		<1

Tableau 1 : Fréquence des cellules sanguines [Channing-Rodgers .1994]

5. Observation des lymphocytes de monocytes sur microscope optique

5.1 Réalisation d'un frottis sanguin

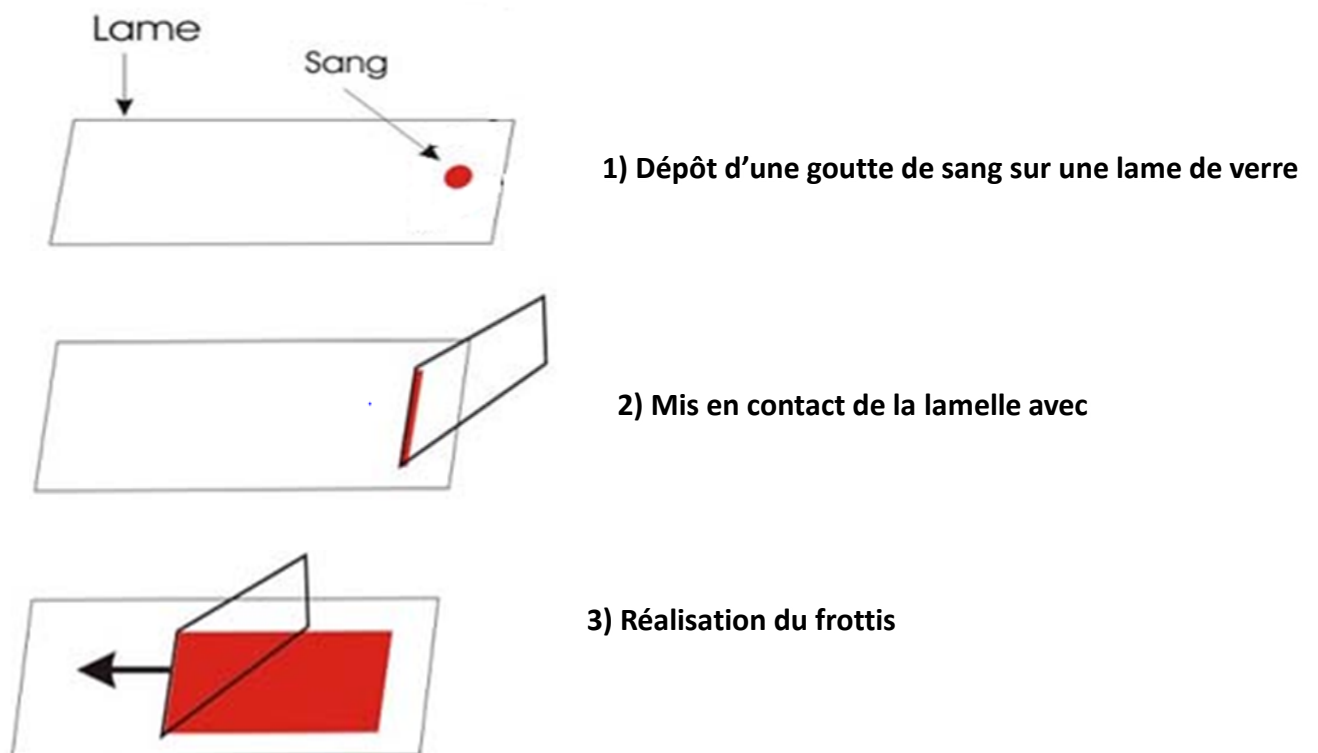


Figure 2 : Étapes de réalisations d'un frottis sanguin

5.2 La coloration

A- 2.2.1 la coloration de May-Grünwald

- Éosine (colorant acide) colore les granulations des éosinophiles et certains granulations des neutrophiles (en rose orangé).
- Bleu de méthylène (colorant basique) colore l'ADN des noyaux, les ARN du cytoplasme (ribosomes) et les granulations des basophiles (en bleu foncé).

B – 2.2.2 la coloration Giemsa

- azurs de méthylène colore les granulations azurophiles des plaquettes et les granulations primaires des neutrophiles (en mauve).
- Eosine (acide) colore les granulations éosinophiles (en rose orangé).

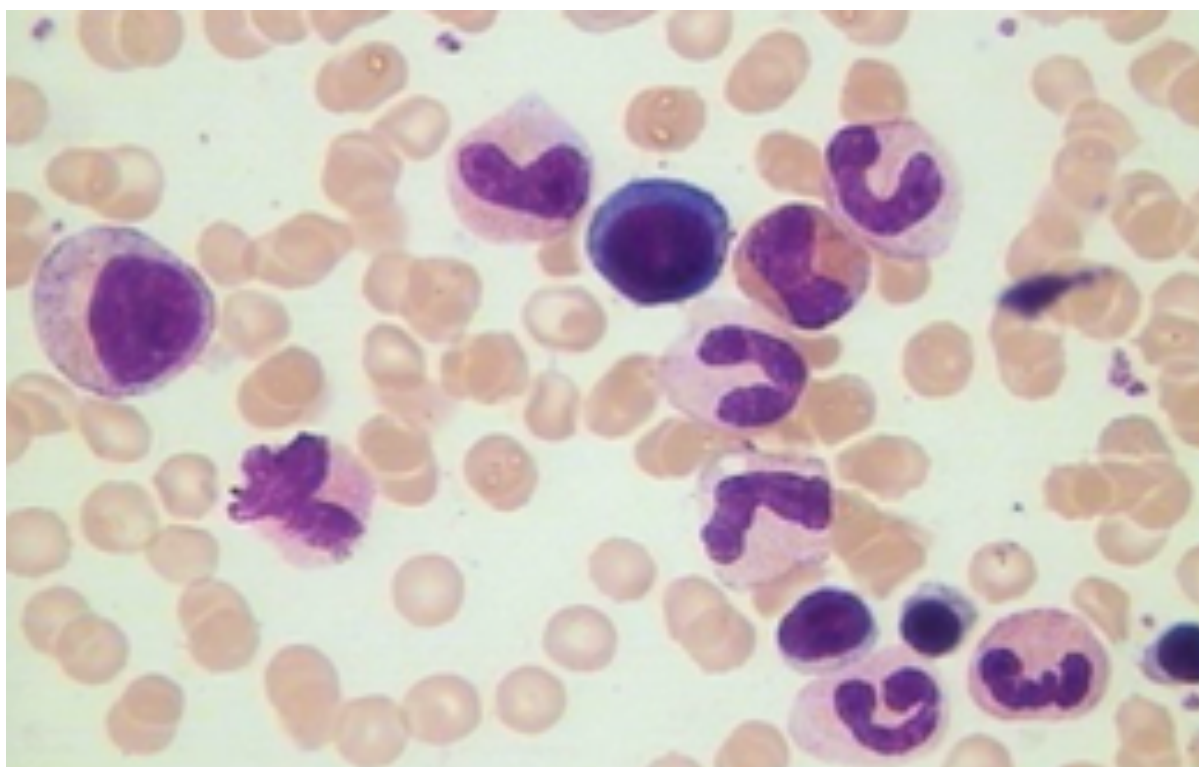


Figure 3: L'observation du frottis coloré au microscope optique .[Channing-Rodgers .1994]

2.3 Les premières observations:

- Présence de très nombreuses cellules de forme arrondie, de couleur rose avec un centre légèrement plus clair, dépourvues de noyaux : ce sont des hématies.



Figure 04: globule rouge observé par Microscope optique

- Présence en quantité moindre de cellules plus grosses, avec un noyau violet : ce sont des leucocytes



Figure 05 : leucocytes observés par Microscope optique

Les cellules sanguines sont fabriquées dans la moelle osseuse à partir de cellules souches. Le sang passe à travers la moelle osseuse et récupère les cellules sanguines entièrement développées pour la circulation dans le sang.



Cellules souches formant du sang

cellules souches myéloïdes

Cellules souches lymphoïdes

Divers précurseurs ou cellules de Blast

Cellules blastiques

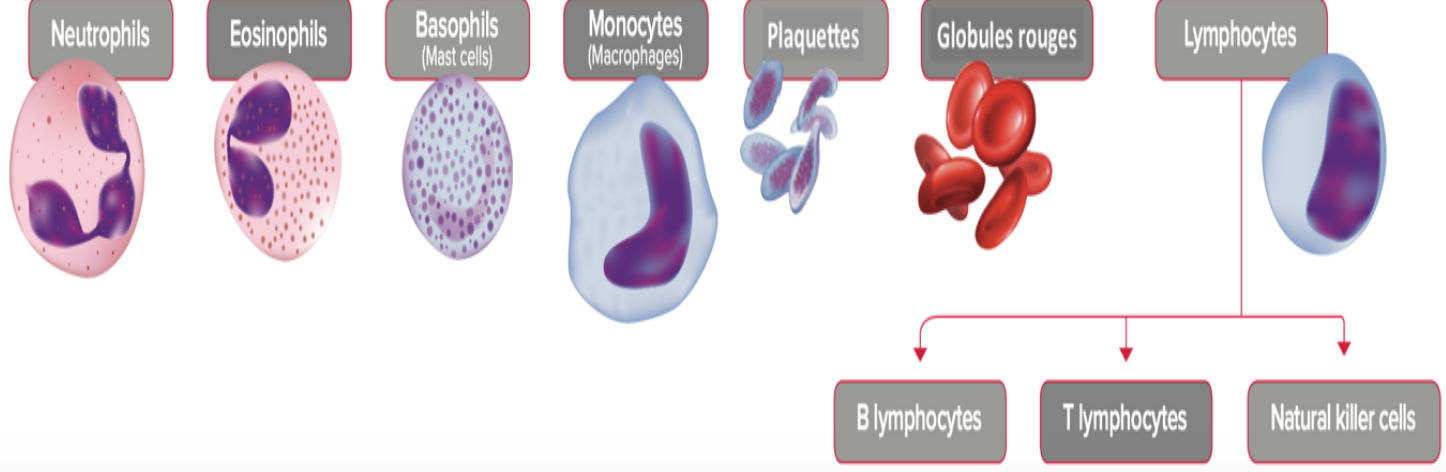


Figure 6: Les différentes cellules du sang observées

3. Description des principales cellules sanguines de l'immunité

Monocyte : 15 à 25 μm Les monocytes sont des leucocytes de la famille des agranulocytes qui évoluent en macrophages ou cellules dendritiques. Ce sont les plus grandes cellules circulant dans le sang. Rondes ou ovales, elles mesurent entre 15 et 25 μm et atteignent jusqu'à 40 micromètres de diamètre. Elles possèdent des sites récepteurs spécifiques aux immunoglobulines et aux protéines du complément au niveau de la membrane plasmique

Macrophage : 30 à 60 μm , Ils proviennent de la différenciation des monocytes. Les monocytes et les macrophages sont des phagocytes (cellules capables de phagocytose). Ils participent à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique, mais sont capables de participer à l'immunité adaptative via le phénomène d'opsonisation.

Mastocyte : 15 à 25 μm , Se caractérise par la présence dans son cytoplasme de très nombreuses granulations contenant des médiateurs chimiques comme la sérotonine, l'histamine.

Granulocyte Eosinophile : 12 à 14 μm Leur rôle essentiel est de s'attaquer aux parasites de l'organisme en déversant leurs granules qui contiennent des enzymes destinées à les détruire.

Ils ont un noyau bilobé ou trilobé, un cytoplasme contenant de grandes granulations.

Granulocyte Neutrophile : 6 à 20 μm Les polynucléaires neutrophiles sont les plus nombreux dans le sang. Ils ont un rôle principal dans la phagocytose et sont attirés sur le lieu de l'infection par les chimiokines libérées par les macrophages et les autres cellules présentes.

Granulocyte Basophile : 12 à 14 μm Les polynucléaires basophiles sont les moins nombreux et jouent un rôle essentiel dans l'allergie.

Ils ont un noyau plurilobé et un cytoplasme contenant de grandes granulations.

Lymphocyte : 6 à 15 μm Les lymphocytes sont des leucocytes qui ont un rôle majeur dans le système immunitaire. En termes de structure et de fonction, on distingue deux lignées lymphocytaires différentes : les lymphocytes B et T.

4. Résumé du cours

- La fonction physiologique du système immunitaire est de protéger les individus contre les infections.
- L'immunité naturelle est la première ligne de défense,

assurée par des cellules et des molécules qui sont toujours présentes et prêtes à éliminer les agents infectieux. L'immunité adaptative est la forme d'immunité qui est stimulée par les microbes, elle présente une forte spécificité pour les substances étrangères, et répond de manière plus efficace aux expositions successives à un microbe.

- Les lymphocytes sont les cellules de l'immunité adaptative, et les seules cellules possédant des récepteurs d'antigène distribués de manière clonale.
- L'immunité adaptative se subdivise en immunité humorale, dans laquelle les anticorps neutralisent et éliminent les microbes et les toxines extracellulaires, et en immunité cellulaire, dans laquelle les lymphocytes T éliminent les microbes intracellulaires.
- Les réponses de l'immunité adaptative se décomposent en phases consécutives : reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes, activation des lymphocytes afin qu'ils prolifèrent et se différencient en cellules effectrices et cellules mémoire, élimination des microbes, déclin de la réponse immunitaire et mémoire à long terme.

■ Il existe différentes populations de lymphocytes assurant des fonctions distinctes, et qui peuvent être distinguées par l'expression de molécules membranaires particulières.

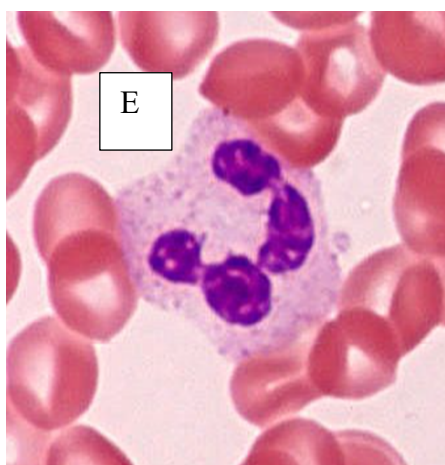
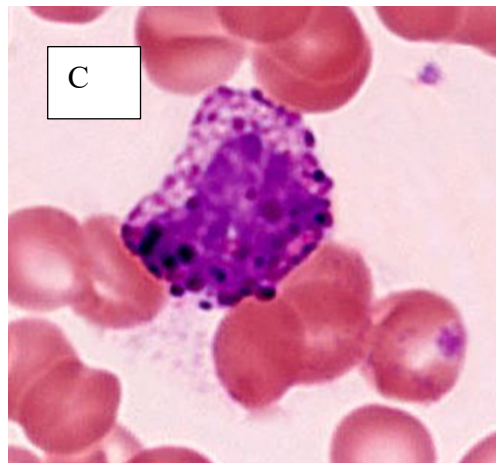
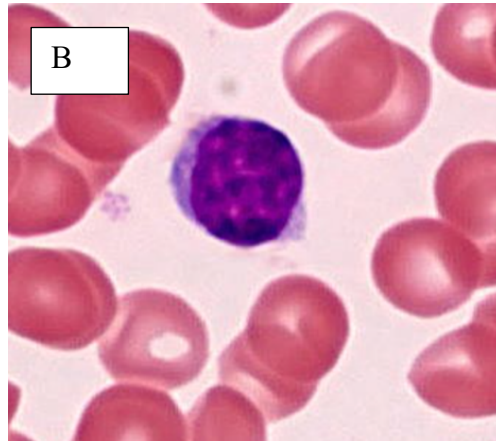
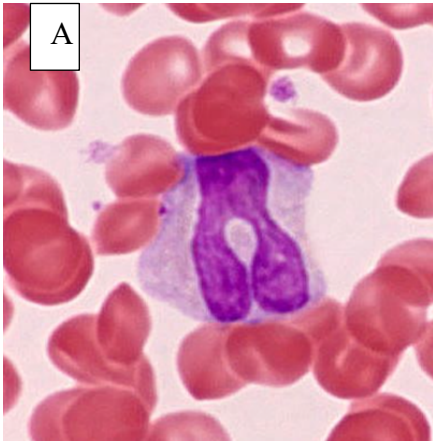
■ Les lymphocytes B sont les seules cellules qui produisent des anticorps. Les lymphocytes B expriment des anticorps membranaires qui reconnaissent les antigènes, et les lymphocytes B effecteurs sécrètent des anticorps qui neutralisent et éliminent l'antigène.

■ Les lymphocytes T reconnaissent des fragments peptidiques d'antigènes protéiques présentés sur d'autres cellules. Les lymphocytes T auxiliaires activent les phagocytes pour qu'ils détruisent les microbes ingérés et activent les lymphocytes B pour qu'ils produisent des anticorps. Les lymphocytes T cytotoxiques tuent les cellules infectées hébergeant des microbes dans leur cytoplasme.

- Les APC capturent les antigènes des microbes qui pénètrent à travers les épithéliums, concentrent ces antigènes dans les organes lymphoïdes, et présentent ces antigènes afin qu'ils soient reconnus par les lymphocytes T.
- Les lymphocytes et les APC sont organisés dans les organes lymphoïdes périphériques, où les réponses immunitaires sont amorcées et développées.
- Les lymphocytes naïfs circulent à travers les organes lymphoïdes périphériques à la recherche d'antigènes étrangers. Les lymphocytes T effecteurs migrent vers les foyers infectieux périphériques, où leur fonction est d'éliminer les agents infectieux. Les lymphocytes B effecteurs restent dans les organes lymphoïdes et la moelle osseuse, où ils sécrètent des anticorps qui gagnent la circulation sanguine, trouvent et éliminent les microbes.

Évaluation type :

- 1) Identifier les leucocytes suivants :
- 2) Expliquer leur fonctions dans le système immunitaire



Réponses

A) Monocyte

Les monocytes sont de gros globules blancs, ayant pour fonction de détruire certains types de virus et bactéries afin de protéger l'organisme contre le développement d'une infection. "Les monocytes sont spécialisés dans le nettoyage des cellules vieillissantes

B) Lymphocyte

Les lymphocytes sont un type de globules blancs qui exercent une fonction immunitaire majeure dans la défense de l'organisme face à l'agression par des agents microbiens extérieurs. Ils sont produits dans la moelle osseuse et circulent dans le sang et les vaisseaux lymphatiques. Il existe plusieurs types de lymphocytes, dont deux principaux, les B et les T,

C) Basophile

Les basophiles apparaissent dans de nombreux types spécifiques de réactions inflammatoires, en particulier celles qui provoquent des symptômes allergiques. Les basophiles contiennent de l'héparine anticoagulante qui empêche le sang de coaguler trop rapidement. Ils contiennent également l'histamine vasodilatateur, qui favorise le flux sanguin vers les tissus. Ils peuvent être trouvés en nombres inhabituellement élevés sur des sites d'infection à l'exoparasite, par exemple des tiques. Ils apparaissent également dans les tissus où des réactions allergiques se produisent et contribuent probablement à la gravité de ces réactions. Les basophiles ont des récepteurs protéiques sur leur surface cellulaire qui lient très étroitement les anticorps IgE. C'est l'anticorps IgE lié qui confère une réponse sélective de ces cellules à des substances de l'environnement, par exemple des protéines de pollen. Des études récentes chez la souris suggèrent que les basophiles peuvent également réguler le comportement des cellules T et médier l'ampleur de la réponse immunitaire secondaire.

D) Éosinophile

Les éosinophiles sont des granulocytes (globules blancs qui contiennent des granules dans leur cytoplasme) dérivés de la même cellule-souche que les monocytes-macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les basophiles. Ils sont une composante du système immunitaire inné. Les éosinophiles ont diverses fonctions, dont les suivantes

- *Défense contre les infections parasitaires*
- *Défense contre certaines bactéries intracellulaires*
- *Modulation des réactions d'hypersensibilité immédiate*

Les éosinophiles sont particulièrement importants dans la défense contre les infections parasitaires. Cependant, bien que l'éosinophilie accompagne généralement les helminthiases et que les éosinophiles soient toxiques pour les helminthes in vitro, il n'y a pas de preuve directe qu'ils tuent les parasites in vivo.

Les éosinophiles, bien qu'ils puissent phagocyter, sont moins efficaces que les neutrophiles pour détruire les bactéries intracellulaires.

Les éosinophiles peuvent moduler les réactions d'hypersensibilité immédiate, en dégradant ou en inactivant des médiateurs libérés par les mastocytes, tels que l'histamine, les leucotriènes (qui peuvent entraîner une vasoconstriction et une bronchoconstriction), les lysophospholipides et l'héparine.

E) Neutrophile

Les polynucléaires neutrophiles ont pour fonction principale de lutter spécifiquement contre les bactéries par phagocytose et bactéricidie, grâce à leur capacité de migration dans les tissus vers le lieu de l'infection.

TD N°3

Séparation de lymphocytes

T et B

Introduction

Deux populations distinctes de lymphocytes ont été identifiées : les lymphocytes T, qui dépendent du thymus, et les lymphocytes B, observés pour la première fois dans la bourse Fabricus des oiseaux. Les mammifères n'ont pas une structure équivalente, et les opinions divergent quant à la similitude de ces cellules entre les espèces. Chez les humains, les théories actuelles disent que les lymphocytes B se différencient dans le foie fœtal et dans la moelle osseuse des adultes. Les cellules T et B humaines sont le plus facilement obtenues soit à partir de sang périphérique ou de biopsie des tissus lymphoïdes (ganglions lymphatiques, rate, patches de peyer de l'intestin, amygdales, et adénoïdes).

Pour isoler des lymphocytes T et B à partir de matériel clinique cela nécessite trois étapes : séparation du sang ou d'autres tissus, enrichissement pour les cellules B ou T, et enfin le maintien des cultures primaires. Il peut être nécessaire de réaliser plusieurs étapes d'enrichissement pour obtenir une pureté supérieure à 90%. Ces méthodes seront décrites à leur tour.

1. Séparation de lymphocytes T et B : formation de rosettes

Les lymphocytes T expriment des molécules d'adhésion comme les CD2. Cet antigène interagit avec LFA-3 (CD58) à la surface d'érythrocytes de mouton. Un traitement enzymatique à la neuraminidase ou au 2-aminoéthyl-isothio-uronium-bromide (AET) rend la molécule d'adhésion sur les érythrocytes plus accessible à l'interaction avec les lymphocytes T. Cela permet la formation de rosettes composées d'une cellule T avec plusieurs érythrocytes de mouton. Les cellules formant des rosettes peuvent être isolées par centrifugation dans un gradient de Ficoll. Suite à une lyse hypotonique des érythrocytes, on obtient des lymphocytes T d'une pureté d'environ 95 p.100.

Les cellules ne formant pas de rosettes (majoritairement des lymphocytes B et des monocytes) flottent au-dessus de la couche de **Ficoll** et peuvent être récupérées. [**Hudson et al ., 1980**]

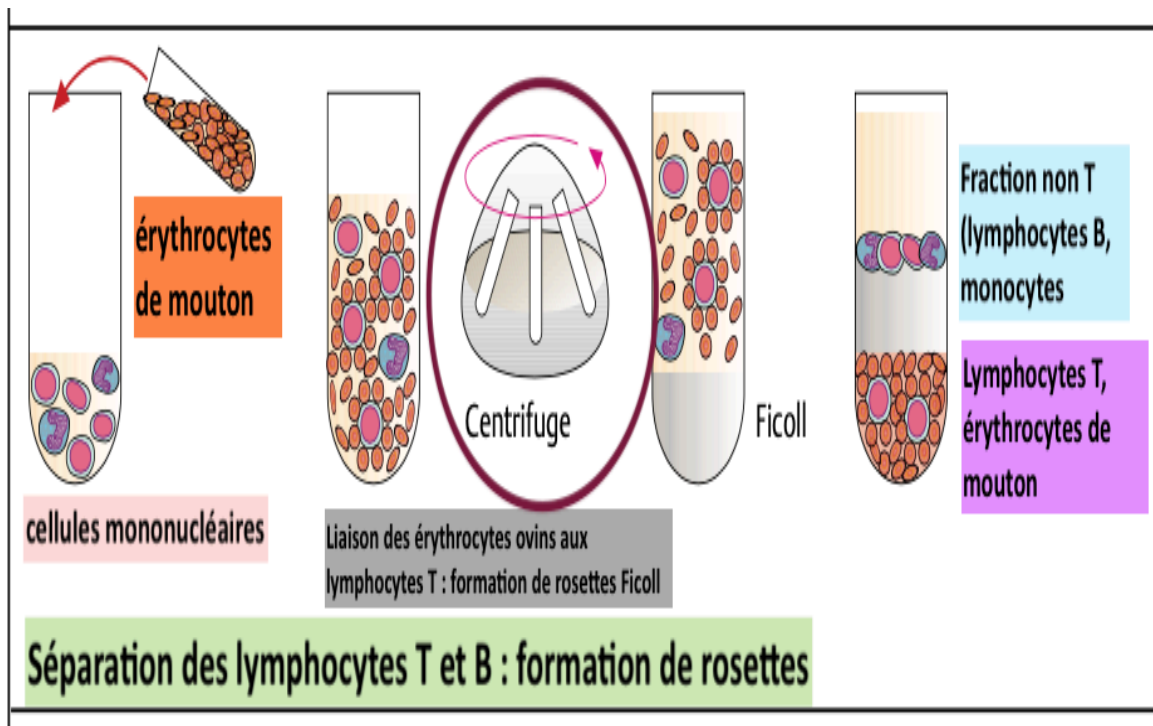


Figure 1 : Technique de séparation de lymphocytes T et B par la formation de rosettes [Mayforth RD. 1993]

2. Protocole de séparation des lymphocytes du sang à l'aide de Ficoll

Des produits commerciaux comme les mélanges de ficoll-paque sont disponibles pour séparer les populations de cellules mononucléaires humaines contaminées par des RBR et des granulocytes.

1. Prélever du sang dans des tubes contenant 10 I.tg/ml d'héparine sans agent de conservation.
2. Diluer le sang 1 :2 dans un milieu sans sérum.
3. Appliquer soigneusement le sang dilué sur le Ficoll-paque à l'aide d'une Pipette Pasteur pour produire une interface propre entre les deux couches. Pour obtenir un rendement maximum, il est conseillé de conserver la proportion de sang à Ficoll dans un rapport de 1:3. si de petits volumes de sang sont séparés, un tube de centrifugation de 11-mL est utilisé avec 3 ml de sang superposé sur 7 ml de Ficoll-paque.
4. Centrifuger à 2000 tpm pendant 25 min à température ambiante.
5. Recueillir la fraction mononucléaire opaque blanche de l'interface entre le diluant et le Ficoll-paque, et ajouter au moins 5 vol de sérum-milieu libre. Centrifuger à 1500 tr/min pendant 10 min. Répéter l'opération deux fois de plus

pour éliminer le Ficoll-paque, qui peut être toxique pour les cellules cultivées.

6. Compter les lymphocytes à l'aide de l'exclusion et de la culture bleu Trypan dans l'IMPR contenant 10 % de SCA

3. Protocole de Séparation de la suspension des lymphocytes du matériel de biopsie

1. Prélever le matériel de biopsie de manière stérile.
2. Laver tout sang contaminant à l'aide d'un tampon de phosphate stérile saline (PBS). Si la matière est ajoutée à ce point.
3. Retirer la graisse de surface, puis couper le tissu en petits morceaux. Pour un diamètre d'environ 1 mm. *Deux scalpels stériles sont utilisés pour cette opération,* et assurez-vous que le tissu est coupé et non déchiré.
4. Pour préparer une suspension cellulaire, deux méthodes peuvent être utilisées : dans des poches stériles avec un petit volume de milieu. Agiter pour 10s puis recueillir la suspension par le filtre de gaze stérile, (b) appuyez sur le tissu mou avec une pointe de pipette contre un tamis stérile, et recueillir la suspension cellulaire résultante.
5. Si la suspension cellulaire est fortement contaminée par le sang, elle peut être séparée des lymphocytes par centrifugation de densité à l'aide de Ficoll-paque
6. Compter les lymphocytes à l'aide de l'exclusion et de la culture bleu Trypan dans le RPM1 contenant 10 % de SVF. **[Ghetie et al., 1980]**

4. Enrichissement des cellules T et B au moyen de méthodes de liaison immunologique spécifiques

Les cellules lymphoïdes sont séparées les unes des autres en exploitant les différences dans les molécules qui sont exprimées sur la surface ; par exemple, les molécules d'immunoglobuline, d'histocompatibilité ou les antigènes du groupe sanguin, et aussi les récepteurs membranaires des cellules. Des immunoadsorbants composés d'un anticorps spécifique couplé à une certaine forme de matrice, soit des macro perles (colonne) ou du plastique, sont utilisés. **[Hudson et al., 1980]**

- 4.1 Enrichissement à l'aide de boîtes de Pétri enrobées d'IgG antihumains

1. Verser 4 ml d'IgG antihumains à 1 % dans une boîte de Pétri stérile et laisser reposer pendant 1 h à 4 °C.
2. Rincer deux fois la boîte de Pétri enduite avec du PBS.

3. Ajouter des cellules IO8 (maximum) dans 4 ml de milieu de croissance contenant 5 % de SVF.
4. Incuber pendant 1 h à 4 °C.
5. Agiter doucement le plat plusieurs fois pendant l'incubation, mais garder le sur niveau.
6. Retirer le milieu contenant les T cells non adhérentes à l'aide d'une pipet Pasteur stérile
7. Rincer délicatement le plat avec un milieu de croissance contenant 5 % de SVF et jeter
8. Ajouter 4 ml de milieu frais, et aspirer vigoureusement pour obtenir l'adhérent de Cellules B.
9. Compter les différents lymphocyte dans la suspensions en utilisant le Trypan Blue et les préparer à la culture. **[Hayao et al ., 1983]**

4.2 Séparation à l'aide d'une colonne de protéine A-Sepharose 6MB

La protéine A se lie à la portion Fc de l'IgG et, lorsqu'elle est couplée à la Sepharose 6MB, elle sera adsorbée par des cellules qui ont été enduites d'un anticorps IgG spécifique. Les cellules immobilisées sont ensuite libérées en ajoutant un excès d'IgG soluble, qui déplace les cellules enrobées d'anticorps de la colonne Protéine A-Sepharose 6MB

1. Prélever 10⁸ml des cellules d'une culture lymphocytaire séparée et les traiter avec un anticorps pan B ou pan T (20 µg/10⁷ cellules/mL) à 4°C pendant 30 min.
2. Laver les cellules trois fois avec du RPM1 contenant 10 % de sérum de veau fœtal. Spin down et suspendre dans 0.25 mL du même milieu.
3. Pipeter les cellules traitées dans une petite colonne en plastique (0,5 cm de diamètre) contenant 1,5 mL de protéine A-Sepharose 6 Mo, fermer la colonne et incuber à une température ambiante pendant 20 min.
4. Ajouter un milieu de 20 mL à un débit d'environ 2,5 mL/min pour éliminer les cellules non liées.
5. Ajouter ensuite 2 mL d'IgG pour chien (20 mg/mL), fermer la colonne et incuber à 37 °C pendant 60 min.
6. Éluer les cellules en ajoutant 3 mL d'IgG de chien (20 mg/mL) suivi de 15 mL de tampon, les deux à 37 °C. Environ 60 % des cellules liées sont récupérées. **[Hayao et al ., 1983]**

Évaluation type

- *Question rédactionnelle de 30 minutes*

A- Quel est le rôle des lymphocytes T dans le développement des réponses immunitaires à médiation humorale ?

B-Décrire brièvement les grandes étapes de la maturation thymique des lymphocytes T ?

C- Le Thymus joue un rôle important dans l'immunité concernant la maturité des lymphocytes T . Comment évolue-t-il au cours de la vie de l'organisme ?

D- C'est dans le thymus que s'effectue l'étape centrale de la maturation des lymphocytes T . Cet organe régressant au cours de la vie, le nombre de lymphocytes T matures diminue-t-il?

E- Quelle est la durée de vie des lymphocytes T ?

Corrigé de l'évaluation

A)-

- Nécessité des *LyT CD4+ helper (Th)* uniquement dans l'activation des cellules *B* activées par *Ag protéiques (= Ag thymodépendant)*
- - La liaison de ces *Ag* à l'*Ig* de surface (*BCR*) n'est pas suffisante pour induire un signal d'activation efficace des *LyB* naïfs.
- - Nécessité de la mise en jeu d'interactions moléculaires entre les *LyB* et les cellules *Th* : l'interaction *CD40/CD40L* apporte un deuxième signal activateur = signaux de compétence
- - Nécessité également de signaux de progression : apportés par les cytokines sécrétées par les cellules *Th*, telle l'*IL-4* sécrétée par les cellules *Th2* qui favorise la prolifération des cellules *B* activées.
- - Suite à l'établissement du conjugué *T-B*, formation des centres germinatifs
- - Dans les centres germinatifs, les *Th* interviennent dans la commutation de classe via l'interaction *CD40/CD40L*: cf. Syndrome d'hyper-IgM lié à l'*X*

o La commutation de classe correspond au réarrangement par recombinaison génétique de la chaîne lourde des Ig, au cours duquel l'unité (VDJ) s'associe à un nouveau segment génique C (« constant »).

Le type segment génique C mobilisé est influencé par le type de cytokines sécrétées par les cellules Th, et détermine la nature de l'isotype des anticorps sécrétés.

Sécrétion d'anticorps d'isotypes autres que l'IgM et donc de propriétés fonctionnelles différentes mais de spécificité antigénique identique.

B)-

Prolifération de thymocytes dans la région sous capsulaire.

Le Réarrangement des gènes du récepteur T et expression des molécules de surface CD3, CD4 et CD8 dans la région sous corticale. Élimination des thymocytes n'aboutissant pas à un réarrangement productif des gènes du récepteur T.

la Sélection positive : sélection des thymocytes capables de reconnaître l'antigène en association avec les molécules du CMH exprimées par les cellules épithéliales thymiques au niveau de la région corticale. Modulation de l'expression d'un des co-récepteurs CD4 ou CD8. Élimination des thymocytes incapables d'une telle reconnaissance.

La Sélection négative : élimination des thymocytes reconnaissant des peptides du soi présentés par les molécules du CMH exprimées par les cellules dérivées de la moelle osseuse dans la région cortico-médullaire.

La Sortie du thymus de cellules T naïves CD4+ ou CD8+

C)-

Il involue classiquement après la puberté et se fibrose mais sans disparaître totalement puisqu'une greffe de moelle osseuse permet de reconstituer aussi des réponses T : des cellules immatures qui terminent leur éducation dans le thymus. On parle aussi de thymus métaplasique(s) qui serai(en)t une(des) petites formations thymiques ectopiques.

D)-

Non, le thymus diminue effectivement de taille, mais il reste fonctionnel toute la vie, et le nombre de lymphocytes reste extrêmement stable et régulé.

E)-

On n'en sait rien de façon précise. Certains modèles animaux d'immunisation avec un antigène parfaitement synthétique que les animaux n'ont aucune chance de rencontrer dans leur environnement suggèrent que des cellules sensibilisées (mémoire) peuvent persister plusieurs années.

TD N°4

Test de lymphomicrocytotoxicité

Introduction

Le test de la lymphocytotoxicité se base sur la diversité de système CMH.

Le CMH détermine la compatibilité entre donneur et receveur dans le cadre de greffes.

La caractéristique majeure du CMH est son extrême diversité (gènes les plus polymorphes de l'espèce humaine).

- 2 classes : I A-B-C II DR-DQ-DP •

Co-dominants

- Chez l'homme il est présent sur les leucocytes (HLA: Human Leucocyte Antigen).
- Le polymorphisme conduit à une variabilité interindividuelle très importante.

1. Définition

Le test de lymphocytotoxicité consiste, dans un premier temps, à incuber les lymphocytes avec le sérum inactivé du malade, puis à ajouter le complément. La mort cellulaire sera évaluée par le dosage du bleu de trypan dans le milieu, colorant qui ne pénètre que dans les cellules mortes.

Test de micro-lymphocytotoxicité

Lymphocytes à typer + Ac monospécifique + complément -> lyse ?
--

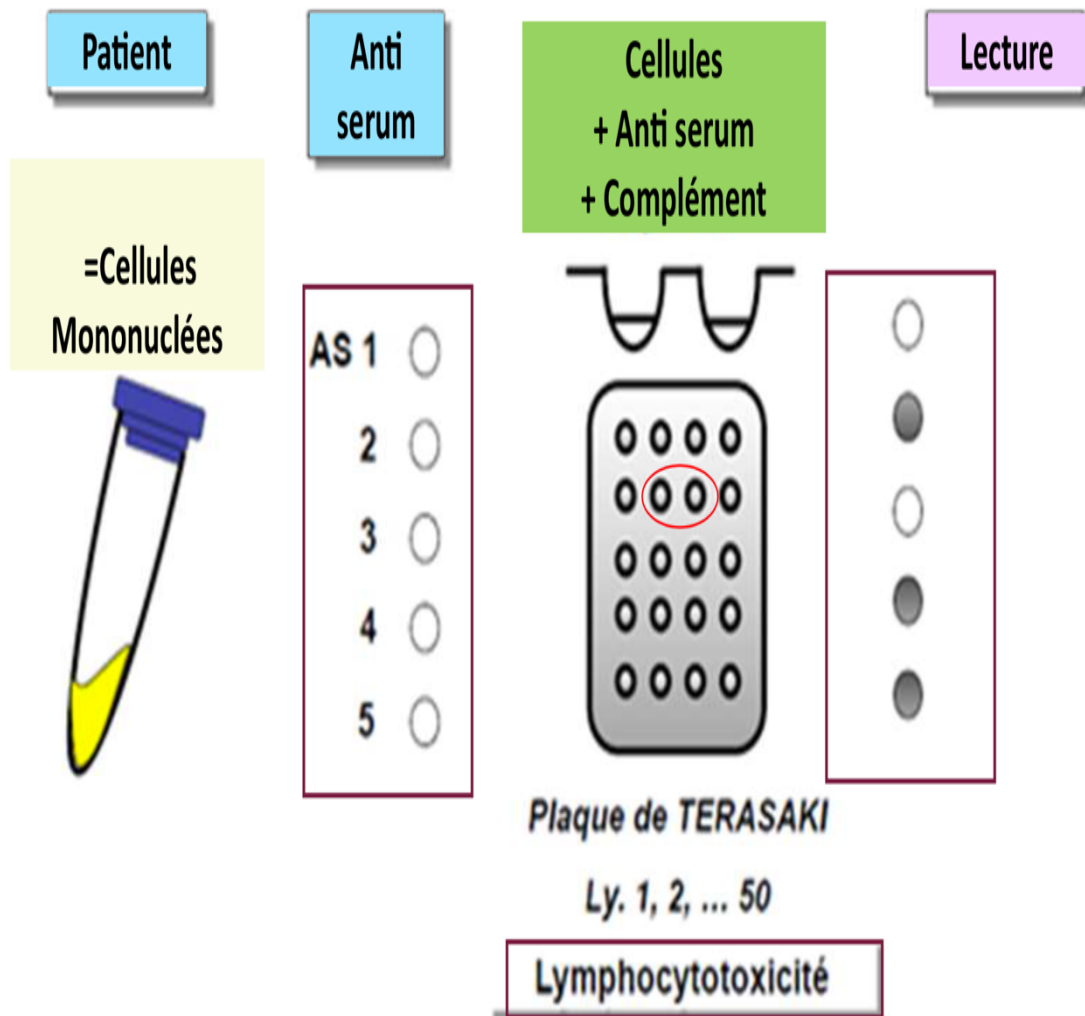


Figure 1 : Test de micro-lymphocytotoxicité

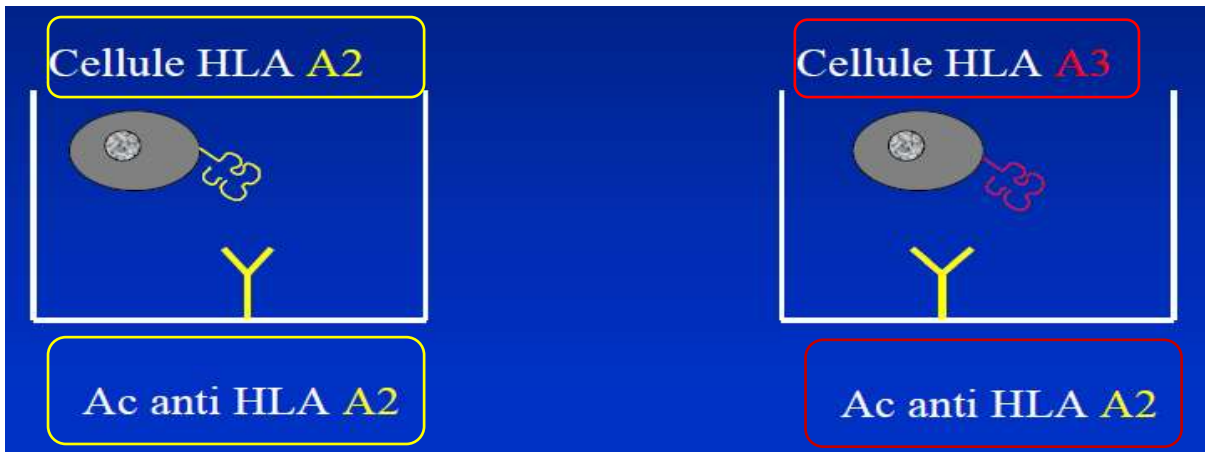
2. Principe du test de micro-lymphocytotoxicité

Pour déterminer la spécificité des anticorps Anti-HLA on incube des antigènes HLA de spécificité connue en présence de complément avec le sérum d'un sujet à étudier.

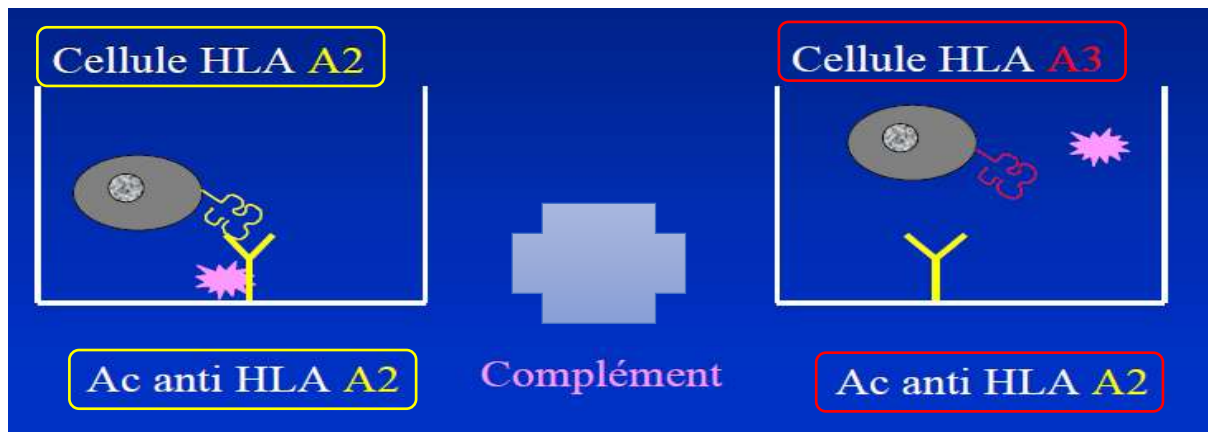
Après addition du sérum ; il se produit, en cas de concordance des spécificités de l'antigène HLA et des anticorps HLA, une lyse des lymphocytes par le complément.

Celle-ci est rendue visible à l'aide d'un colorant Le nombre de lymphocytes lysés ou non sont évalués à l'aide d'un microscope à contraste de phase inverse ou à l'aide d'un microscope à fluorescence inverse.

Principe 1



Principe 2



Principe 3

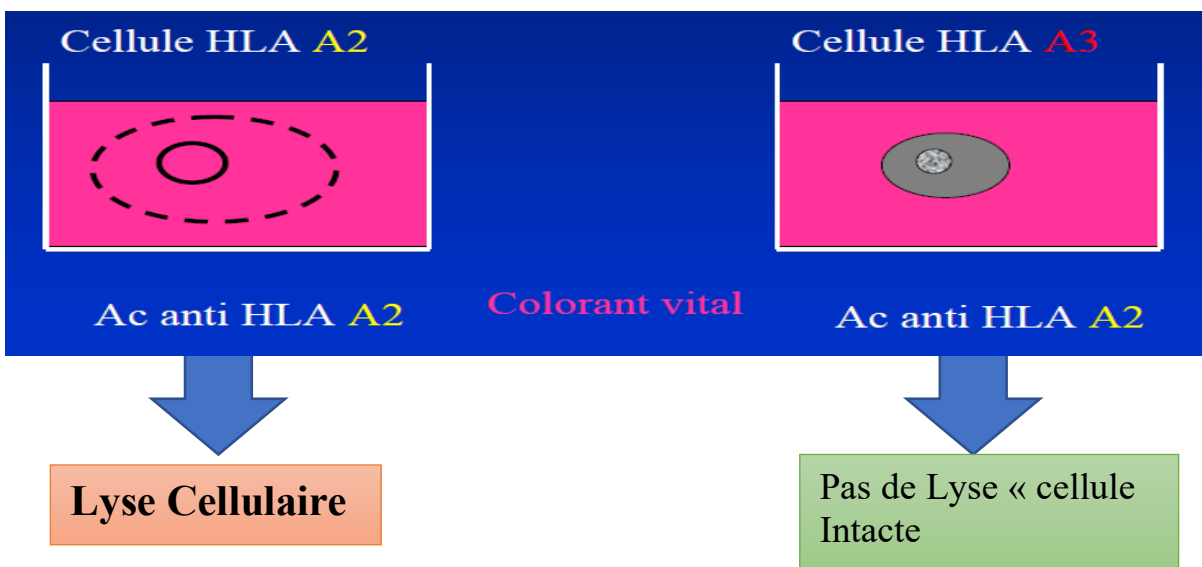


Figure 2 : principe d'incubation des Antigènes HLA

Remarques concernant l'utilisation des réactifs:

Le témoin HLA-positif et le témoin HLA-négatif sont utilisés comme réactifs témoins anti-HLA positifs et négatifs pour le diagnostic in vitro d'origine humaine.

Les anticorps HLA d'origine humaine le sont lors du test de micro-lymphocytotoxicité dépendant du complément.

2.1 Protocole Micro-LymphoCytoToxicité (LCT) Complément dépendante (« CDC »)

1. Isolement des cellules mononuclées à partir du sang total par Ficoll.
2. Contrôle de la viabilité et ajustement de la concentration cellulaire.
3. Dépôt des CMN en plaques de Takasaki (chaque puits contenant des AC anti HLA de spécificité connue).
4. Ajout de complément.
5. Ajout de colorant vital.

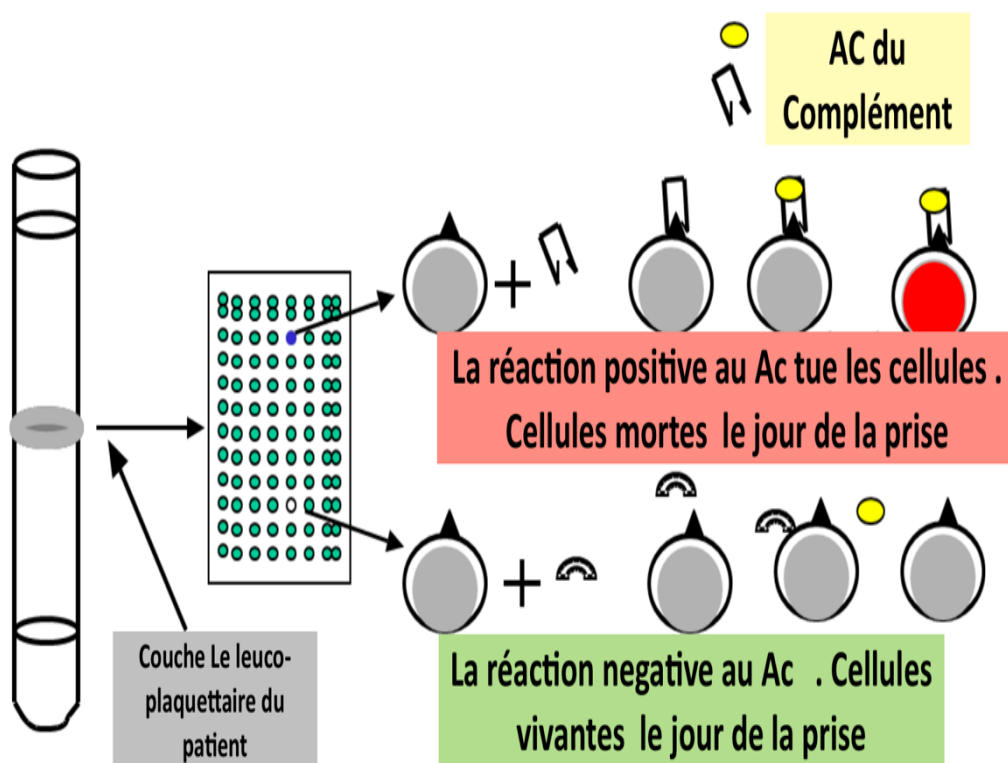


Figure 3 : Protocole Micro-LymphoCytoToxicité (LCT) Complément dépendante (« CDC »)

2.2 Lecture et interprétation

La lyse cellulaire doit se produire dans les puits pour lesquels l'antigène de surface présent sur les lymphocytes à tester et les anticorps présents dans les antisérums correspondent.

En utilisant le microscope à fluorescence

Les cellules vivantes apparaissent d'un vert fluorescent alors que les cellules mortes apparaissent d'un rouge fluorescent.

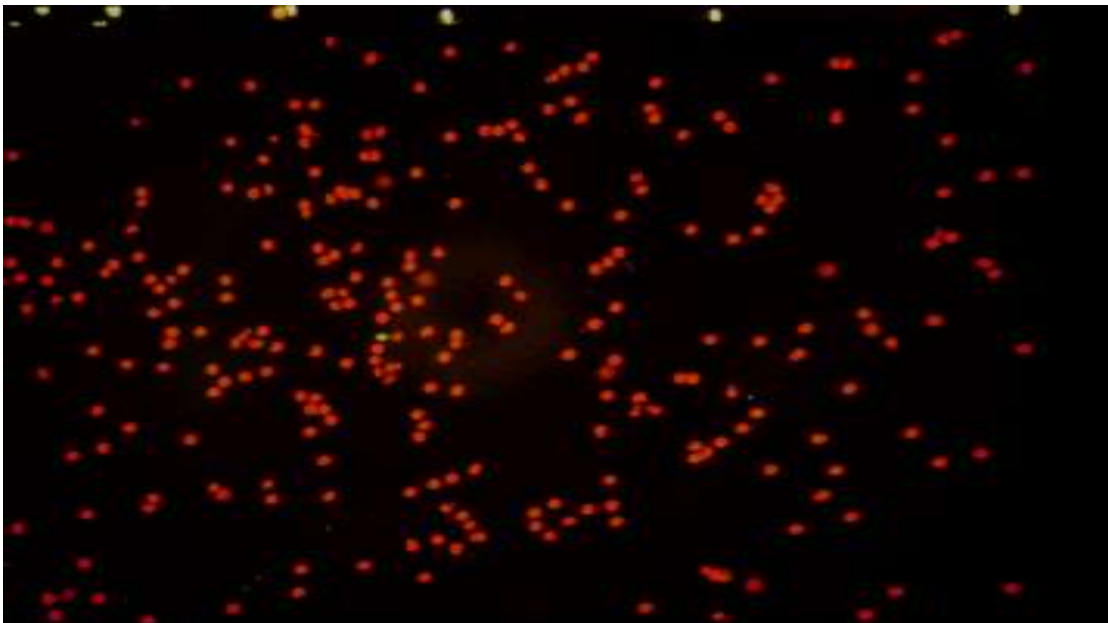
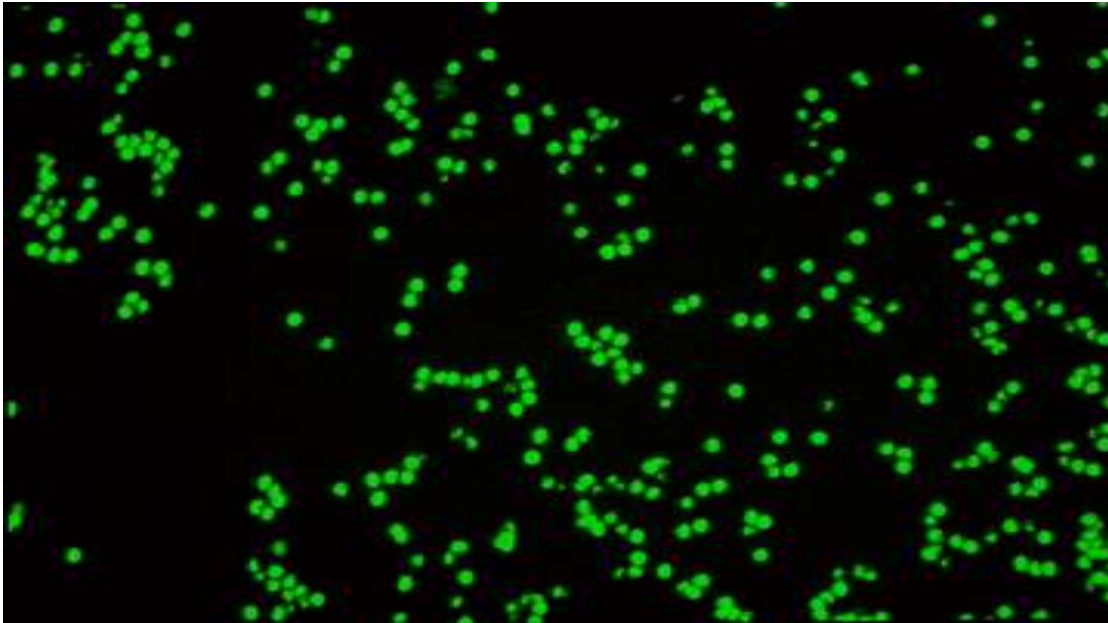


Figure 4 : Visualisation des cellules sur microscope a fluorescence

3. Domaine d'application de la lymphocytotoxicité

On utilise le test de lymphocytotoxicité dans :

- Grossesse
- transfusion
- Transplantation
- Absorption sur plaquettes

3.1 Transplantation d'organe (exemple)

La capacité de déterminer si les donneurs et les receveurs d'organes sont compatibles dépend de la capacité d'évaluer la réactivité du système immunitaire du receveur par rapport aux cellules du donneur. L'activité cytotoxique entre le sérum et les cellules in vitro a été décrite au début des années 1960, mais c'est à la fin de 1964 que Paul Terasaki et John McClelland ont décrit une méthode pour les essais de cytotoxicité des microgouttelettes. Ces essais de «microcytotoxicité» comportaient une série d'étapes pour la purification des lymphocytes du sang périphérique par centrifugation et des protocoles d'adhésion sélective des cellules et ont donné lieu à des suspensions de lymphocytes d'une pureté suffisante pour permettre des tests de cytotoxicité avec seulement 500 cellules, par rapport aux quelque 50 000 cellules requises pour les protocoles décrits précédemment. Les tests de microcytotoxicité ont révolutionné la capacité d'apparier les donneurs et les receveurs d'organes greffés et ont aidé à la découverte de sous-types d'antigènes leucocytaires humains (HLA), ce qui a permis un typage précis des tissus. Les bases de cette technique sont encore utilisées aujourd'hui pour la détermination de la compatibilité des greffes. (**Figure 5**)

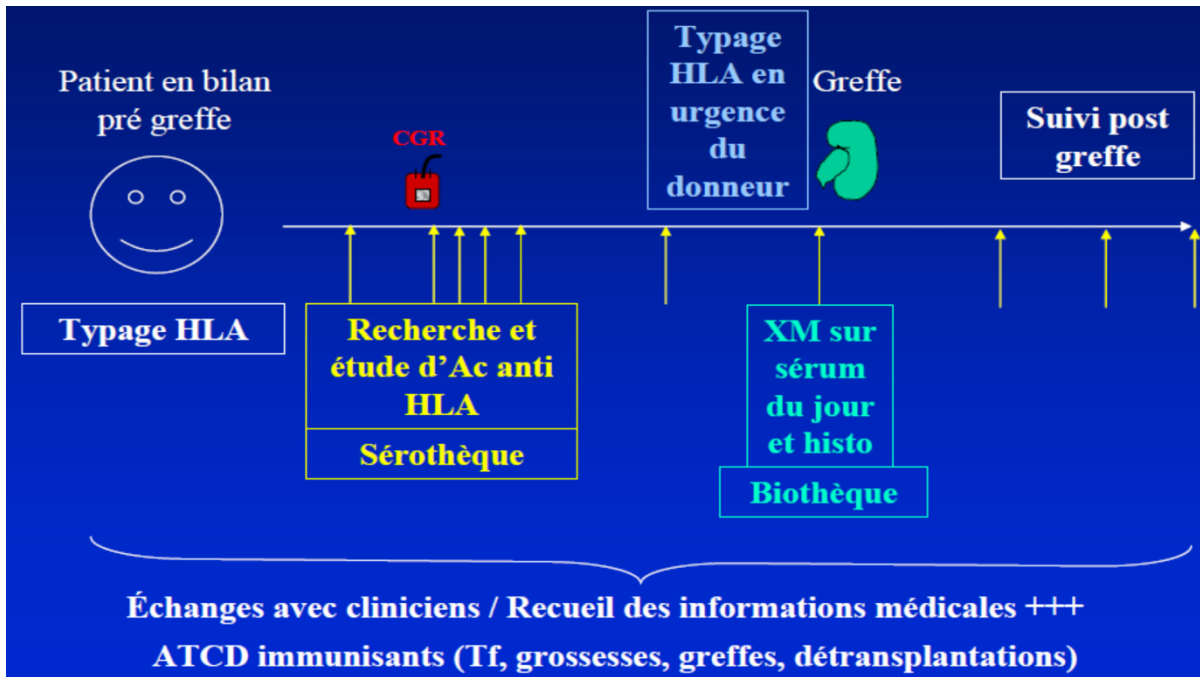


Figure 5 : Application de la lymphocytotoxicité dans la transplantation d 'organe

Évaluation type

Q1). Problème concernant l'intervention des LT cytotoxiques dans les rejets de greffe, en particulier lors des xéno greffes

Si l'on admet la théorie de la délétion clonale qui s'effectue dans le thymus pour les LT et qui stipule que lors d'une première phase de sélection clonale, tous les LT incapables de reconnaître le CMH de l'organisme dont ils sont issus, sont éliminés, comment les LT cytotoxiques immunocompétents peuvent-ils reconnaître le CMH présenté par les cellules appartenant au greffon, la double reconnaissance étant indispensable ?

Q2). L'expérience classique (Zinkernagel, 1974) de la restriction H2 est utilisée en TS pour amener le modèle de la double reconnaissance rec.T /HLA+Ag. Dans cette expérience, une cellule, viralemment infectée, de lignée génétique x n'est pas lysée par un LT de lignée génétique y.

Question de Nicolas Zaragoza, élève de TS : Mais alors, dans le cas d'une allogreffe, comment les lymphocytes T d'un receveur peuvent-ils reconnaître les cellules du greffon ?

Q3). Une cellule sans marqueurs HLA sera t-elle reconnue comme non-soi ? C'est-à-dire : est-ce que "le système immunitaire s'attaque à toutes les cellules sauf celles reconnues comme soi", ou bien est ce que "le système immunitaire ne s'attaque qu'aux cellules/corps reconnus comme non-soi ?"

Q4). Lors d'une transfusion sanguine, il faut s'assurer de la compatibilité des groupes sanguins concernant donc les hématies... Mais ne se préoccupe-t-on pas des marqueurs HLA se trouvant sur les leucocytes du donneur ?

Corrigé Évaluation :

R1).

C'est effectivement une question qu'on nous pose fréquemment, car il est difficile de comprendre le rejet de greffe quand on essaie de le replacer dans les mécanismes immunologiques. Voici une réponse que j'avais envoyée à un de vos collègues il y a quelques semaines :

Il y a beaucoup de littérature sur ce sujet compliqué du rejet des greffes. C'est assez clair dans le livre de Janis Kuby "Immunology". Plusieurs mécanismes peuvent intervenir :

- les lymphocytes T du receveur reconnaissant très bien son propre CMH (avec une forte affinité) ont été détruits dans le thymus mais ceux qui reconnaissent très bien (avec une forte affinité) d'autres CMH, et donc modérément (avec une faible affinité) le CMH du soi n'ont pas été déléétés et donc circulent ;
- d'autre part il peut y avoir une présentation de peptides issus des cellules du receveur ensuite reconnus dans les molécules de classe I du greffon avec suffisamment de similitude entre les différentes molécules du CMH pour une reconnaissance ;
- il y a aussi la possibilité d'une sensibilisation du receveur par ses propres cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques ou macrophages) à partir de cellules du greffon dégradées.

R2)

L'activation lymphocytaire, secondaire à la reconnaissance d'un complexe peptide / CMH, est fonction de l'affinité de l'interaction, qui doit être maintenue un temps suffisant pour que le lymphocyte T puisse répondre. Du fait de la sélection thymique, par les molécules du CMH du Soi, les lymphocytes T matures possèdent une affinité suffisante pour le CMH autologue, qui va autoriser les "communications".

Mais une molécule allogénique peut se présenter au lymphocyte T, au niveau des régions exposées de la niche - hélices alpha 1 et 2 - de la même façon que le CMH autologue. Le lymphocyte T n'y verra que du feu. Le peptide sélectionné, par contre différent, sera vu comme un peptide étranger présenté par un CMH autologue, ce qui peut être ennuyeux et conduire à la destruction de la cellule allogénique si cette reconnaissance implique un lymphocyte CD8 cytotoxique et des molécules de classe I présentant des peptides du "soi" du

donneur.

Une autre hypothèse serait qu'un certain degré de variabilité des régions exposées du CMH

pourraient à l'inverse, renforcer les interactions avec le récepteur T ; et de ce fait transmettre un signal activateur. On pense que cette reconnaissance forte du CMH par le TCR est un des moyens de délétion des lymphocytes autologues dans le thymus. A l'évidence, les TCR qui pourraient reconnaître avec une forte affinité un CMH allogénique ne sont pas éliminés pendant cette phase de sélection. Au moment d'une transplantation, ils peuvent donc se trouver soudain en contact avec des cellules exprimant un CMH pour lequel ils sont très affines.

Enfin, s'il n'y a vraiment aucune affinité entre un lymphocyte T et des molécules du CMH du donneur, il n'y a pas de reconnaissance. Ceci concerne vraisemblablement une partie du répertoire de lymphocytes T circulants du receveur.

R3)

Normalement, toutes les cellules nucléées de l'organisme portent des molécules HLA de classe I. Toutefois, une cellule sans molécule HLA de classe I peut échapper à certaines réponses immunitaires cytotoxiques T dépendant d'une reconnaissance par le biais du TCR.

C'est un mécanisme

utilisé par les cellules cancéreuses pour ne pas être détruites par le système immunitaire.

Par contre les cellules NK tuent spécifiquement les cellules qui ne portent pas ces molécules HLA de classe I ou qui portent des molécules HLA de classe I anormales (parce qu'elles contiennent un peptide viral ou tumoral, ou parce qu'elles proviennent d'un autre individu (globules blancs en transfusion, transplantation d'organes).

R4)

Très bonne question ! L'alloimmunisation liée à la transfusion a été mise à profit positivement pour générer des sérums "polysensibilisés" qui sont utilisés pour la détermination sérologique des groupes HLA (en utilisant le sérum de sujets polytransfusés contenant des taux élevés d'anticorps dirigés contre le HLA de leurs donneurs). C'est par contre un des grands inconvénients de la transplantation d'organes, en particulier rénale : les dialysés, polytransfusés pour leur anémie, et les multipares présentent souvent des taux

élevés d'anticorps contre diverses spécificités HLA.

Ceci conduit à sélectionner soigneusement leurs donneurs potentiels, en récusant ceux qui présentent des spécificités correspondant à ces anticorps. Le problème tend à disparaître d'une part par l'utilisation d'érythropoïétine chez les dialysés qui ne sont donc plus transfusés, d'autre part par le fait que les établissements de transfusion sanguine ne distribuent plus maintenant que du sang déleucocyté.

REFERENCES

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A et al. (2003) Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: New players and new insights. *J Clin Immunol.*;23:147–161.

Camper SA. (1987) Research applications of transgenic mice. *Bio- techniques* 5: 638.

Caramalho I, Nunes-Cabaço H, Foxhall R, Sousa AE. (2015) Regulatory T-cell development in the thymus. *Front Immunol.*;6:395.

Cell Affinity Chromatography: Principles and Methods, Pharmacia Booklet (1984) Pharmacia Ltd., Midsummer Blvd., Milton Keynes, MK9 3HP, England).

Channing-Rodgers RP. (1994) Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). *Basic and Clinical Immunology, 8th ed.* E Norwalk, CT: Appleton & Lange.

Fu H, Ward EJ, Marelli-Berg FM. (2016). Mechanisms of T cell organotropism. *Cell Mol Life Sci.*;73:3009–3033.

Ghetie, V., Mota, G., and Sjoquist, J, I. (1978) Separation of cells by affinity chromatography on SPA-Sepharose 6MB. *J. Immunol. Methods* 21,133-141.

Gibson G. (2004). *A Primer Of Genome Science, 2nd Ed.* Sunderland, MA: Sinauer. p. 308.

Harlow E, Lane D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hayao, A., Rossio, J. L., Ruscetti, F. W., Matsushima, K., and Oppenheim, J. J. (1986) Establishment of a human B cell line that proliferates in response to B cell growth factor. *J. Immunol. Methods* 90,111-123.

Heesters BA, Myers, RC, Carroll MC. (2014). Follicular dendritic cells: Dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol*;14:495–504.

Hellstrom, U., Dillner, M. L., Hammarstrom, S., and Perlmann, P. (1976) The interaction of nonmitogenic and mitogenic lectins with T-lymphocytes: association of cellular receptor sites. *Scf272dJ. Immunol.* 5,45-55.

Hudson L, Hay FC. (1989) *Practical Immunology, 3rd ed.* Oxford, UK: Blackwell.

Hudson, L. and Hay, F. C. (1980) *Practical Immunology* (Blackwell Scientific Publications), pp. 212,213.

Johnstone A, Thorpe R. (1987) *Immunochemistry in Practice.* Oxford, UK: Blackwell.

Köhler G, Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495.

Koller BH, Smithies O. (1992) Altering genes in animals by gene targeting. *Annu Rev Immunol* 10: 705.

Liuzzi AR, McLaren J, Price DA, Eberl M. (2015). Early innate responses to pathogens: Pattern recognition by unconventional human T cells. *Curr Opin Immunol.*;36:31–37.

Mac Lennan IC. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol.*;12:117–139.

Mayforth RD. (1993) *Designing Antibodies.* San Diego, CA: Academic Press.

Mishell BB, Shiigi SM. (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology.* New York: Freeman.

Morice WG. The immunophenotypic attributes of NK cells and NK lineage lymphoproliferative disorders. *Amer J Clin Path.* 2007;127:881–886.

Muñoz MA, MBiro M, Weninger WT. (2014).Cell migration in intact lymph nodes in vivo. *Curr Opin Cell Biol* 30:17–24.

O'Garra A, Vieira P.(2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.*;10:801–805.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. (2010) FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.*;10:490–500.

Tanoue T, Atarashi K, Honda K. (2016) Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.*;16:295–309.

Thompson KM. (1988) Human monoclonal antibodies. *Immunol Today* 9: 113.

Weir DM. (1986) *Handbook of Experimental Immunology, Vol. 12, 4th Ed.* Oxford, UK: Blackwell.

Winter G, Griffith AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12: 433.