

TLEMCEM

N° d'Ordre _____

UNIVERSITÉ DE TLEMCEM – ABOU-BEKRBELKAÏD

FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du grade de

Master en Sciences Biologiques

Spécialité Immunologie

par :

BOUKADA MOHAMED EL AMINE

Soutenu publiquement le 26 JUIN 2021

Intitulé :

Evaluation de l'activité fonctionnelle globale du Complément dans la maladie de Parkinson

————— **Sous la direction du Professeur MOURAD ARIBI** —————

Jury

Dr Hadj Merabet Djahiida
Dr. Djelti Farah
Pr.Mourad ARIBI

Université de Tlemcen, Algérie
Université de Tlemcen, Algérie
Université de Tlemcen, Algérie

Présidente
Examinatrice
Encadrant

Remerciements

Je tiens à adresser mes remerciements à Monsieur le Professeur **MOURAD ARIBI** pour m'avoir donné la possibilité d'intégrer au laboratoire des biologie moléculaire et immunologie biomolim et de m'avoir développé mes connaissances en immunologie et de m'encadrer .

Je tiens à remercier **Mme MESALI RABIA** L'ingénieure de labo biomolim pour nous aide pendant notre travaille pratique.

J'adresse mes remerciements à tout mes collègues pour facilités et m'aider de trouver l'ambiance favorable et l'énergie positive de travailler que ce soit les étudiants de la M2 **BENSMAIN DJIHANE ; BILAMI FARAH ; BENARRAGE HOURIA ; BENAMAR SOUMEYA**. Aussi les étudiants du M1 comme notre ami **RAMADAN** et **SAHI AMANI LAMIS**. Aussi le étudiants du L3 **BOUREGBA RANIA ; MESMOUDI NADIR ; MERAHI IKRAM ; KHATIR GHIZLAN ; HAKEM ZOKHA**.

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à

Mes chers parents et mes sœurs, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments , pour leur soutien , leur encouragement , leur aide , en témoignage de mon profond amour et respect pour leur grands sacrifices.

Table des Matières

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION.....	1
1 maladie de parkinson.....	1
1-1 Définition	1
1-2 Symptômes	1
2 Système de complément	2
2-1 définition	2
2-2 Voie classic	3
2-2-1 définition.....	3
2-2-2 Activation de voie classic.....	4
2-3 Voie alternative.....	5
2-4 Voie des lectines.....	6
2-5 Régulateurs de complément	6
2-6 système de complément dans la maladie de Parkinson.....	6
MATERIEL ET METHODES.....	8
1 chromatographie sur couche mince	8
1-1 but	8
1-2-1 Préparation de la cuve	8
1-2-2 Préparation de la plaque de cellulose	8
1-3 Révélation des résultats	8
2 CH50	8
2-1 but	8
2-2 préparation du sérum du lapin.....	8
2-3 Dilution du sérum du lapin (sérum hémolytique)	9
2-4 sensibilisation des hématies	9
2-5 Dosage	9
2-6 calcul.....	9

3 DOSAGE DES IG.....	9
3-1 étapes	9
3-2 Calcul	9
RESULTATS.....	10
REFERENCES	21

Résumé

Introduction

La maladie de Parkinson c'est la maladie neurodégénératives qui donne l'intention d'une nécrose comme type de mort cellulaire responsable de cette neurodégénération la nécrose peut provoquer une inflammation ; un des marqueurs de l'inflammation c'est le système de Complément qui est un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et qui peut être activé pendant une inflammation . L'objectif est d'évaluer le fonctionnement du système de complément chez des sujets atteints de la maladie de Parkinson .

Matériel et Méthodes

Vingt patients de la maladie de Parkinson ont été recrutés au sein du service neurologie au niveau du centre médical de Boudghene et le service neurologie.CHU.de Tlemcen ; plus vingt contrôles sains , pour évaluer l'activité globale du système de complément et les immunoglobulines(IgA) et les acides aminés (TRP , GLY , PHE).

Mots clés : Maladie de Parkinson , système de complément , acides aminés , anti-corps

Abstract

Introduction

Parkinson's disease is a neurodegenerative disease that causes necrosis as a type of cell death responsible for this neurodegeneration. Necrosis can provoke inflammation; one of the markers of inflammation is the complement system which is a bridge between innate and adaptive immunity and which can be activated during inflammation. The objective is to evaluate the functioning of the complement system in subjects with Parkinson's disease

Materials and Methods

Twenty patients with Parkinson's disease were recruited in the neurology department at the medical center of Boudghene and the neurology department of the University Hospital of Tlemcen, plus twenty healthy controls, to evaluate the overall activity of the complement system and the immunoglobulin (IgA) and amino acids (TRP, GLY, PHE).

Keywords : Parkinson's disease, complement system, amino acids, antibody

Liste des figures

Figure1-1 tableau des signes moteurs et non moteurs.....	1
Figure1-2 les trois voies du system du Complément.....	3
Figure3-1 :moyennesdes taux des IgA chez les témoins et les patients.....	10
Figure 3-2 moyenne des acides aminés (Trp,Gly,Phe) chez les témoins et les patients ...	11
Figure3-3 : les pourcentages d'hémolyse par rapport le nombre des dilutions.....	15

Liste des abréviations

Trp :Thryptophane

Gly :Glycine

Phe :Phenyl alanine

IgA :Immunoglobuline α

IgM :Immunoglobuline μ

IgG :Immunoglobuline γ

SN : substantia nigra

MP :Maladie de Parkinson

SC : Système de complément

MCP :Protéine cofacteur membranaire

CCM :Chromatographie sur couche mince

CH50 : The 50% haemolytic Complement

GR : Globules rouges

IDR : Simple immun diffusion radial

INTRODUCTION

1 maladie de parkinson

1-1 Définition

La maladie de Parkinson est une affection neurodégénérative caractérisée par des symptômes moteurs et non moteurs. La psychose de la maladie de Parkinson (PDP) englobe des phénomènes mineurs (illusions, hallucinations de passage et hallucinations de présence), des hallucinations visuelles et non visuelles et des délires. Les caractéristiques pathologiques de la MP sont la perte de des neurones dopaminergiques dans la substantia nigra (SN) pars compacta (SNpc) et l'accumulation de la a-synucléine (Balestrino et Schapira 2020) . Il s'agit de la deuxième maladie neurodégénérative liée à l'âge la plus courante (S, L, et F 2019) . Elle touche environ 1 à 2 % des adultes de plus de 65 ans et 4 % des adultes de plus de 80 ans(Capriotti et Terzakis 2016).

1-2 Symptômes

Le patient a une posture voûtée caractéristique, avec une démarche lente et traînante sans balancier bras. Parfois, la personne peut paraître raide sans expression faciale jusqu'à 80 % des patients atteints de la MP ont une démarche figée avec un risque de chutes et jusqu'à 50% des patients déclarent s'étouffer. Les symptômes de stade avancé, tels que la démence et les chutes, sont souvent à l'origine du l'admission en soins de longue durée et une mortalité élevée.(Capriotti et Terzakis 2016).

Motor Sign/Symptoms	Nonmotor Sign/Symptoms
Tremor	Staring appearance
Bradykinesia	Flat affect
Postural instability	Excessive salivation
Falls	Anosmia
Shuffling gait	Depression/anxiety
Stooped posture	Psychotic symptoms
Dyskinesia	Sleep disruption
Muscle rigidity	Fatigue
"Freezing" episodes	Autonomic dysfunction
Micrographia	Cognitive impairment
	Constipation
	Dysphagia
	Urinary incontinence
	Dysarthria; difficult pronunciation
	Diminished speech volume
	Unexplained pain

Figure1-1 tableau des signes moteurs et non moteurs (Capriotti et Terzakis 2016)

2 Système de complément

2-1 définition

Le système du complément fait partie intégrante de la réponse immunitaire innée, et agit comme un pont entre l'immunité innée et adaptative. Il s'agit d'un groupe des protéines qui sont principalement (mais pas exclusivement) synthétisées dans le foie, et qui existent dans le plasma et sur les surfaces cellulaires sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes). Le complément sert de médiateur aux réponses aux déclencheurs inflammatoires par le biais d'une cascade enzymatique coordonnée et séquentielle conduisant à l'élimination des cellules étrangères par la reconnaissance de l'agent pathogène, l'opsonisation et la lyse. (Schifferli, Ng, et Peters 1986). Le complément possède également des fonctions anti-inflammatoires : il se lie aux complexes immuns et aux cellules apoptotiques, et contribue à leur élimination de la circulation et des tissus endommagés (Davies, Schifferli, et Walport 1994), (Mevorach et al. 1998). Les protéines du complément sont activées par les anticorps IgG et IgM, d'où le nom de "complément". De nombreuses protéines du complément existent sous une précurseur " et sont activées sur le site de l'inflammation. Le système du complément est plus complexe que de nombreuses cascades enzymatiques car il nécessite la formation de fragments de protéines activées séquentielles associées de manière non covalente. Ceux-ci deviennent à leur tour des convertases et clivent des composants pour le complexe enzymatique suivant dans la cascade, et la dissociation rapide de ces complexes (par exemple, l'enzyme de conversion). La dissociation rapide de ces complexes (et la perte de l'activité enzymatique) fait partie intégrante de la régulation élégante de l'activité du complément.

L'activation du système du complément se fait en cascade selon 3 voies : La voie classique ; La voie des lectines ; La voie alterne .

Ces 3 voie procèdent la formation du c3 convertase ; responsable du clivage du c3 en 2 parties. Le c3a et c3a, et la c5 convertase qui clive la c5 en c5a et c5a. Les 2 enzymes (c3 convertase et c5 convertase) sont parmi les composant essentiels pour la résistance contre les pathogènes, la génération du c3b permettent l'opsonisation de la cible (par favoriser la reconnaissance par l'immunité innée). Les c3a et c5a induisent la réponse inflammatoire.

Les 3 voies faites démarrer l'assemblage du CAM : le c5b qu'elle génèrent se lie aux c6, c7, c8, c9 puis l'ancrage à la membrane de la cellule permettant de former un pore lytique.(Daugan et al. 2017).

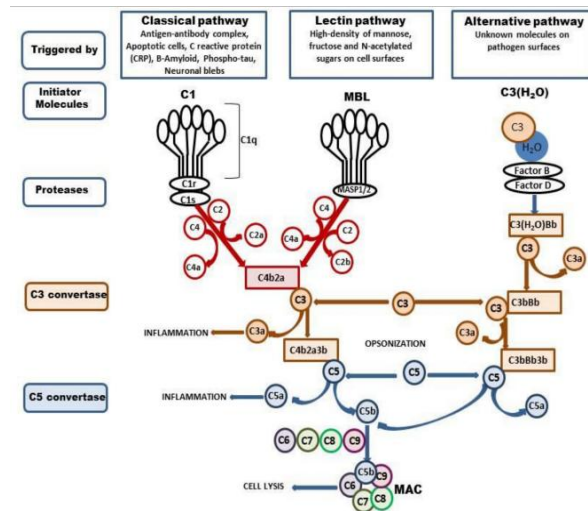


Figure1-2(Ziabska et al. 2021)

Activation du système du complément. Le système du complément peut être activé par trois voies : classique, lectine, et alternative. La voie classique est déclenchée par la liaison des complexes anticorps-antigène, des cellules apoptotiques, de la CRP, de l'amyloïde B, de la phospho-tau ou des bulles neuronales au C1. La C1 est composée de C1q, C1r, et C1s, et la liaison de Cq1 avec les composants énumérés change la conformation du C1 et active la protéase C1s. Le C1s actif clive le C4 en C4a et C4b et le C2 en C2a et C2, et forme la C3 convertase-C4b2a qui divise le C3 en deux fragments, C3b, qui peut opsoniser les pathogènes microbiens, et C3a, qui active les mastocytes et les macrophages et favorise l'inflammation. La voie des lectines est activée par la liaison de la lectine liant le mannose (MBL) aux résidus de mannose présents à la surface de l'agent pathogène. Cette liaison active à son tour les protéases à sérine associées à la MBL, MASP-1/2, qui activent le C4 et le C2 et forment le C4b2a. Le C3b peut se lier au C4b2b pour former la C5 convertase (C4b2a3b). Le C5 est clivé pour former le C5a, qui favorise l'inflammation, et le C5b, qui se lie à C6, C7, C8 et C9 et forme le complexe d'attaque membranaire (MAC) qui permet la lyse cellulaire. La voie alternative est déclenchée par l'hydrolyse de C3 en C3-H₂O ; ensuite, les facteurs B et D génèrent la C3 convertase-C3(H₂O) Bb, qui clive d'autres molécules C3 en C3a et C3b. Ce dernier forme à son tour le complexe C3bBb, qui poursuit le clivage du C3 et permet la formation de la convertase C5-C3bBb3b, qui clive le C5 et conduit à la formation du MAC. .(Ziabska et al. 2021)

2-2 Voie classic

2-2-1 définition

Telle qu'elle est décrite dans la plupart des manuels, cette voie est activée principalement par les anticorps via la liaison C1q, et n'est donc présente que chez les espèces possédant des immunoglobulines. Il est fort probable qu'à un certain stade de l'évolution de la voie classique, le C1q ait reconnu les structures glucidiques des immunoglobulines ; on peut donc la considérer comme une variante de la voie des lectines. Cette définition conduit à considérer l'activation par liaison directe du C1q à des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP), à l'ADN, etc., comme cela se produit chez les vertébrés supérieurs ainsi que chez les vertébrés inférieurs dépourvus d'anticorps, comme plus proche de la voie des lectines.(Dodds et Matsushita 2007)

2-2-2 Activation de voie classic

Des études récentes ont mis en lumière les mécanismes moléculaires d'activation du CP et du LP. Il est établi depuis longtemps que le C1q a besoin d'une IgM liée à la surface ou de plusieurs molécules d'IgG à proximité afin d'interagir avec plusieurs de ses domaines globulaires et d'activer le complément. Cependant, les mécanismes moléculaires et la stœchiométrie de l'anticorps C1 requis pour une activation optimale restent mal compris. L'IgM est une molécule polymère plane (pentamère ou hexamère), dans laquelle les sites de liaison au C1q sont cachés.

Un changement de conformation se produit lors de la liaison à un antigène (conformation en agrafe), entraînant l'exposition des sites de liaison au C1q. Contrairement à l'IgM, l'IgG est un monomère et, malgré la présence des sites de liaison au C1q, seule une très faible affinité de liaison peut être obtenue. La distribution des épitopes de l'antigène et la densité de la liaison des IgG déterminent le niveau d'activation du complément, mais les mécanismes moléculaires étaient inconnus jusqu'à récemment. Diebold et ses collègues ont démontré que des interactions non covalentes spécifiques entre les fragments Fc des IgG et la formation d'hexamères d'anticorps ordonnés à la surface de l'antigène sont nécessaires pour une liaison efficace au C1q . Le modèle qu'ils proposent pourrait expliquer la forte dépendance de l'activation du complément vis-à-vis des antigènes et des épitopes. Une liaison efficace au C1q ne pourrait se produire qu'après la formation d'une plate-forme de fragments Fc d'IgG présentant une compatibilité stérique avec les domaines gC1q. Le regroupement des molécules d'IgG sur la surface de l'antigène pourrait être affecté par la taille, la densité et la fluidité de l'antigène, de sorte que les petits complexes antigène-anticorps ne permettent qu'une activation modérée du complément

En outre, la stœchiométrie de la liaison est encore compliquée par la fluidité des anticorps sur les surfaces d'épitopes régulièrement espacés. Il a été démontré que les IgG présentent une marche stochastique " bipède " formant des amas transitoires qui pourraient servir de sites d'amarrage pour la liaison au C1q et l'activation du complément. Une fois que le C1q se lie à sa surface cible, un changement de conformation est nécessaire pour transmettre le signal du domaine gC1q via le CLR pour induire l'auto-activation du C1r. La modélisation moléculaire, la mutagenèse et l'analyse des mutations associées aux maladies ont révélé la structure du site de liaison C1r2 C1s2 dans le cône des bras collagènes de C1q. Le

tétramère de la pro-enzyme C1r₂ C1s₂ au sein du complexe C1 à l'état de repos adopte une forme en huit. Lors de l'activation, les changements de conformation du tétramère permettent la transition vers une forme active en forme de S, en passant par un état de transition. Ce changement de conformation permet l'auto-activation du domaine SP de C1r. Par la suite, le C1r activé va cliver et activer le C1s. La force motrice de cette auto-activation de C1r est une augmentation de l'angle entre les tiges de collagène de C1q. Cependant, le mécanisme de ce changement structural est mal compris. Des expériences de mutagenèse ont révélé que les résidus situés sur l'apex et la surface latérale de la chaîne B de la gC1q sont importants pour les interactions avec les IgG, IgM, CRP ou PTX-3. Compte tenu de la morphologie de la surface de la gC1q et de ses cibles, il est difficile d'envisager comment ces résidus peuvent s'engager simultanément dans la liaison. Une possibilité est que ces résidus forment des sites de liaison, qui entrent en contact avec la cible ultérieurement et non simultanément. Ces données, combinées à l'importance des ions Ca²⁺ pour le champ électrostatique de C1q, et le changement conformationnel induit conduisant à une augmentation de l'angle entre les tiges collagéniques par gC1q et l'interaction avec la cible a conduit à la proposition d'un modèle électrostatique pour l'activation du complexe C1. Ce modèle suggère que l'augmentation de l'angle entre les tiges de collagène se produit en raison d'une rotation des domaines gC1q, entraînée par les interactions électrostatiques entre gC1q et la molécule cible (IgG, IgM ou CRP). Les interactions entre les sites de liaison chargés négativement sur la cible peuvent entraîner l'élimination de l'ion Ca²⁺ de la gC1q. La perte de Ca²⁺ modifie considérablement la taille et l'orientation du vecteur du moment électrique de la gC1q. Ce changement électrostatique peut induire la rotation de la gC1q, lui permettant de s'engager dans la surface latérale de la chaîne B. Cette rotation peut fournir la contrainte mécanique nécessaire à la transition du complexe C1r₂ C1s₂ d'une conformation fermée et inactive en forme de huit à une conformation active en forme de S, permettant l'autostimulation de C1r et une activation supplémentaire de C1s par C1r. Sous cette forme active, le tétramère peut se déplier et étendre ses extrémités C1s en dehors du cône C1q pour interagir avec C4 et C2. Le clivage de C4 et C2 par C1s permet la formation de la CP (Merle et al. 2015).

2-3 Voie alternative

Cinquante ans après la découverte de la voie d'activation classique, Pillemer et al. ont proposé une voie d'activation alternative très controversée. Initialement, cette hypothèse a été rejetée par la communauté scientifique et n'a été corroborée et acceptée que plus d'une décennie plus tard. L'hypothèse de Pillemer était fondée sur les observations selon lesquelles le système du complément pouvait être activé par la liaison directe de bactéries et de levures, indépendamment de l'interaction des anticorps. Cette voie, initialement appelée "voie de la properdine", est désormais connue sous le nom de "voie alternative". La voie alternative n'est pas tant une voie d'activation qu'une incapacité à réguler la formation continue de faible niveau d'une convertase C3 soluble. La liaison thioester interne du C3 est très réactive et subit une hydrolyse spontanée, ce qui donne une molécule appelée C3 (H₂O) qui ressemble au C3b. Celle-ci peut alors se lier au facteur B et être transformée en une C3 convertase soluble de courte durée qui peut générer davantage de C3b. Si ce C3b se lie à une surface voisine incapable de l'inactiver (comme des bactéries, des cellules de levure ou des tissus hôtes endommagés), cela entraîne l'amplification de la voie alternative. La présence de régulateurs du complément dans les cellules saines permet de contrôler l'hydrolyse spontanée du C3. L'activation du C3 a lieu lorsque le C3b se lie au facteur B et

est ensuite clivé par le facteur D (un processus qui est stabilisé par les ions magnésium et la properdine). L'action enzymatique du facteur D agit comme l'étape limitant la vitesse de la voie alternative et clive le facteur B, dont le plus grand fragment reste lié au C3b pour former la voie alternative C3 convertase-C3bBb. C3b est capable de créer une nouvelle C3 convertase en présence des facteurs B et D, agissant ainsi comme une " boucle d'amplification " pour les autres voies, ainsi que pour la voie alternative. La voie alternative omet les composants C1, C2.

2-4 Voie des lectines

Les molécules de reconnaissance de motifs du LP sont la MBL, les collectines, ainsi que les ficolines H, L et M. Les molécules de reconnaissance de motifs du LP ont une région collagénique N-terminale similaire à celle du C1q, mais leurs domaines C-terminaux diffèrent du gC1q. Les collectines contiennent des domaines de reconnaissance des glucides, qui reconnaissent les motifs de sucre. La MBL, qui appartient à la famille des collectines, reconnaît les monosaccharides terminaux exposant les groupes 3'- et 4'-OH horizontaux (glucose, mannose et N-acétyl-glucosamine) d'une manière Ca-dépendante. Ces sucres sont rarement présents sur les protéines de l'hôte et les surfaces cellulaires, mais fréquemment exprimés sur les bactéries, les virus et les cellules mourantes. Les ficolines sont associés à la protéine MASP dans la circulation et possèdent des domaines de reconnaissance C-terminaux de type fibrinogène, qui sont capables de se lier à des groupes acétyles, tels que la N-acétyl-glucosamine, à la surface des bactéries. Après la liaison, les MASP associées aux LBM ou aux ficolines sont activées et entraînent le clivage de C4 et C2. Comme pour C1q, une liaison stable ne peut être obtenue que celle-ci.

2-5 Régulateurs de complément

Afin de limiter les dommages potentiels qu'il peut induire sur les tissus sains, le système du complément est finement régulé. Cette régulation se fait à trois niveaux : l'inhibition de l'activité des protéases impliquées dans la cascade d'activation du complément ; la facilitation de la dégradation de ces protéases ; et le contrôle de la formation du complexe d'attaque membranaire. Les régulateurs du système du complément peuvent être solubles, comme l'inhibiteur C1, le facteur I et le facteur H, ou membranaires, comme le CD35 (récepteur 1 du complément, CR1), le CD46 (protéine cofacteur membranaire, MCP), le CD55 (facteur accélérateur de désintégration, DAF) et le CD59 (Daugan et al. 2017).

2-6 système de complément dans la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie dégénérative progressive qui entraîne la perte de neurones dopaminergiques dans la substantia nigra (SN), provoquant une déplétion de dopamine dans les projections striatales (Gao et Wu 2016),(Sharma et Deshmukh 2015). La principale caractéristique de cette pathologie est un dysfonctionnement moteur progressif. Les signes neuropathologiques requis pour le diagnostic de la MP sont des agrégats de protéines intracellulaires appelés corps de Lewy, composés principalement d'alpha-synucléine et d'ubiquitine. Bien que le mécanisme qui déclenche la dégénérescence cérébrale dans la MP soit inconnu, plusieurs facteurs (tels que l'altération de l'activité

mitochondriale, la perte de facteurs trophiques, l'activité anormale des kinases, le dysfonctionnement protéosomal et lysosomal, et la neuroinflammation) sont considérés comme les composants clés de la pathogenèse de la maladie (McDonald et al. 2018) (Moore et al. 2010) . Au cours des dernières décennies, le système du complément a reçu une attention considérable en tant que médiateur important des réponses inflammatoires dans plusieurs troubles neurologiques. On a donc postulé un lien possible entre le complément et la MP. Les premières observations de produits du complément activés C3d et C4d dans le cerveau post-mortem de patients atteints de la MP ont été rapportées en 1980 par McGeer et McGeer (P. L. McGeer et McGeer 1980). Quelques années plus tard, le même groupe de chercheurs a constaté une augmentation marquée des niveaux d'ARNm des composants du complément dans les régions touchées par la MP (Patrick L. McGeer et McGeer 2004) . Ensuite, une série de publications a permis d'identifier plusieurs composants - C1q, C3d, C4d, C7 et C9 - dans les corps de Lewy neuronaux de patients atteints de la maladie de Parkinson (Depboylu et al. 2011)(Loeffler, Camp, et Conant 2006) (Yamada et al. 2004) .

En outre, une altération des facteurs du complément dans le sang des patients atteints de la maladie de Parkinson a également été détectée (Goldknopf et al. 2006) . D'autres études systémiques *in vitro* ont montré que l'activation du complément est provoquée par la variante d'épissage de l'alpha-synucléine-112 associée à la maladie, mais pas par la protéine complète (Klegeris, McGeer, et McGeer 2007) . La même année, Wang et al ont démontré que la C5a synergisée avec l'IgG isolée du sérum de patients atteints de la maladie de Parkinson entraînait la mort sélective des neurones dopaminergiques dans des cultures de neurones et de glie mésencéphaliques de rat (Wang et al. 2007). Néanmoins, malgré l'insuffisance continue des données, il est postulé que le système du complément est impliqué dans la pathologie de la MP. En outre, les rôles fonctionnels exacts des composants du complément dans ce trouble ne sont pas encore clarifiés. L'absence de C1q et de C3 n'a pas protégé contre la déplétion des neurones dopaminergiques dans un modèle de souris MPTP induit par une toxine (Patrick L. McGeer et McGeer 2004) (Liang et al. 2007). L'effet bénéfique exprimé par la protection de la perte de neurones dopaminergiques et du dysfonctionnement moteur a été observé après la délétion du récepteur CR3 chez la souris. Cette observation suggère clairement que CR3 contribue au processus pathologique (Hou et al. 2018) . Le mode d'action de CR3 est associé à l'activation de la NADPH oxydase microgliale et à la dégénérescence subséquente dans un modèle de souris PD induite par une toxine. Enfin, la pertinence de ces observations pour la pathologie de la MP reste notable. Cependant, les données disponibles sont largement insuffisantes, contrairement aux informations sur d'autres maladies du SNC, et ne permettent pas de définir le rôle du système du complément dans la MP (Ziabska et al. 2021).

MATERIEL ET METHODES

1 chromatographie sur couche mince

1-1 but : la chromatographie a pour but de détecter les acides aminés et calculer leur rapport frontal

1-2 étapes

1-2-1 Préparation de la cuve

On prépare le d'éluant à partir de 70 ml butanol ; 18ml acide acétique ; 12ml eau puis on ajoute ce mélange dans la cuve puis on dépose un papier filtre imprégné finalement on referme la cuve.

1-2-2 Préparation de la plaque de cellulose

On chauffe la plaque dans l'étuve à 80° pendant 1h puis on trace un trait au crayon à environ 1cm de l'extrémité inférieure puis avec une micropipette calibrée on dépose 2micro litre de la solution diluée (échantillon + solvant) et les acides aminés , en un point situé sur le trait , après on place la plaque dans la cuve verticalement à l'aide d'une pince . Puis avec une pince on retire la plaque lorsque le front du solvant se trouve à environ 1cm de l'extrémité supérieure de la plaque ; après on met la plaque dans ninhydrine pendant 10 minutes, après on sèche la plaque dans l'étuve pendant 15 minutes.

1-3 Révélation des résultats

A l'aide de logiciel ImageJ on calcule le CTCF des acides amines connues et les autres substances révélées durant la chromatographie

2 CH50

2-1 but

la CH50 est une méthode immun enzymatique colorimétrique pour la détermination qualitative de la fonctionnalité du complément dans le sérum humain.

2-2 préparation du sérum du lapin

A l'aide des GR du mouton on injecte un lapin (on respectent les règles d'étiques vis-à-vis l'utilisation des animaux dans les expériences scientifiques) un pour le sensibiliser et obtenir des anticorps polyclonaux anti GR du moutons depuis le sérum du lapin.

2-3 Dilution du sérum du lapin (sérum hémolytique)

(sérum hémolytique 1/50 (0.5ml + 24.5ml du tampon) ce qui fait le volume total est de 25ml. (Costabile 2010)

2-4 sensibilisation des hématies

25ml des hématies de mouton à 2%+ 25ml sérum hémolytique , puis on ajoute doucement le sérum aux hématies et on incube pour 30 minutes à 37°

2-5 Dosage

Pour chaque échantillons on utilise 6 tubes(un témoins et 5 dilution :d1 , d2, d3 ,d4, d5)

Puis on prépare deux tubes blancs hématies à 0% hémolyse et à 100% et on les incube pour 30 minutes à 37° ; on centrifuge à froid (1500g/5minutes). (Costabile 2010)

2-6 calcul

En utilisant lecteur ELISA on observe l'absorbance de chaque puits à longueur d'onde de 450nm, , puis on calcule le pourcentage d'hémolytique

$$\% \text{ d' hémolytique} = \frac{A \text{ échantillon}}{A \text{ hémolyse totale}} * 100$$

3 DOSAGE DES IG par (IDR : simple immun diffusion radiale)

IDR : simple immun diffusion radiale

3-1Principe :

le dosage des immunoglobulines a été réaliser à l'aide de la technique d'immunodiffusion radiale par Mancini et al ont décrit la relation existante entre la concentration des antigènes et le diamètre des anneaux immunprecipitine formés dans le système gel-anticorps .

3-1 étapes

Les sérums à analyser ont étaient déposés dans des puits creusés dans une couche de gel d'agarose contenant un anti-sérum spécifique (anti-sérum anti IgA).

- Gel d'agarose à partir une quantité avec un volume de PBS dans un bécher, puis on les mettre sur une plaque chauffante ; après refroidissement on un volume de noir d'amidon et l'anti-sérum (AC anti IgA) ; on mélange tout et on les étale sur une boîte.

- Après refroidissement on crée des puits à l'aide d'une seringue.

- Dans chaque puits on dépose le sérum des échenillent et on ferme la boîte et on la laisse incuber dans température ambiante.

3-2 Calcul

On calcule le diamètre des anneaux de précipitation après 48 heures en mm^2 .

RESULTATS

Confidentiel

Confidentiel

REFERENCES

- Balestrino, R., et A. H. V. Schapira. 2020. « Parkinson Disease ». *European Journal of Neurology* 27 (1): 27- 42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>.
- Capriotti, Teri, et Kristina Terzakis. 2016. « Parkinson Disease ». *Home Healthcare Now* 34 (6): 300- 307. <https://doi.org/10.1097/NHH.0000000000000398>.
- Costabile, Maurizio. 2010. « Measuring the 50% Haemolytic Complement (CH50) Activity of Serum ». *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n° 37 (mars): 1923. <https://doi.org/10.3791/1923>.
- Daugan, Marie, Remi Noe, Wolf Herman Fridman, Catherine Sautes-Fridman, et Lubka T. Roumenina. 2017. « [The complement system: a double edge sword in tumor progression] ». *Medecine Sciences: M/S* 33 (10): 871- 77. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173310019>.
- Davies, K. A., J. A. Schifferli, et M. J. Walport. 1994. « Complement Deficiency and Immune Complex Disease ». *Springer Seminars in Immunopathology* 15 (4): 397- 416. <https://doi.org/10.1007/BF01837367>.
- Depboylu, Candan, Martin K.-H. Schäfer, Oscar Arias-Carrión, Wolfgang H. Oertel, Eberhard Weihe, et Günter U. Höglinger. 2011. « Possible Involvement of Complement Factor C1q in the Clearance of Extracellular Neuromelanin from the Substantia Nigra in Parkinson Disease ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 70 (2): 125- 32. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31820805b9>.
- Dodds, Alister W., et Misao Matsushita. 2007. « The Phylogeny of the Complement System and the Origins of the Classical Pathway ». *Immunobiology* 212 (4-5): 233- 43. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.11.009>.
- Gao, Lin-Lin, et Tao Wu. 2016. « The Study of Brain Functional Connectivity in Parkinson's Disease ». *Translational Neurodegeneration* 5: 18. <https://doi.org/10.1186/s40035-016-0066-0>.
- Goldknopf, Ira L., Essam A. Sheta, Jennifer Bryson, Brian Folsom, Chris Wilson, Jeff Duty, Albert A. Yen, et Stanley H. Appel. 2006. « Complement C3c and Related Protein Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinson's Disease ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342 (4): 1034- 39. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.051>.
- Hou, Liyan, Ke Wang, Cong Zhang, Fuqiang Sun, Yuning Che, Xiulan Zhao, Dan Zhang, Huihua Li, et Qingshan Wang. 2018. « Complement Receptor 3 Mediates NADPH Oxidase Activation and Dopaminergic Neurodegeneration through a Src-Erk-Dependent Pathway ». *Redox Biology* 14 (avril): 250- 60. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.017>.
- Klegeris, Andis, Edith G. McGeer, et Patrick L. McGeer. 2007. « Therapeutic Approaches to Inflammation in Neurodegenerative Disease ». *Current Opinion in Neurology* 20 (3): 351- 57. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3280adc943>.
- Liang, Yajie, Shurong Li, Qiang Guo, Yanling Zhang, Yanliang Zhang, Can Wen, Qiang Zou, et Bingyin Su. 2007. « Complement 3-Deficient Mice Are Not Protected against MPTP-

Induced Dopaminergic Neurotoxicity ». *Brain Research* 1178 (octobre): 132- 40.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.033>.

McDonald, Claire, Gavin Gordon, Annette Hand, Richard W. Walker, et James M. Fisher. 2018. « 200 Years of Parkinson's Disease: What Have We Learnt from James Parkinson? » *Age and Ageing* 47 (2): 209- 14. <https://doi.org/10.1093/ageing/afx196>.

McGeer, P. L., et E. G. McGeer. 1980. « Chemistry of Mood and Emotion ». *Annual Review of Psychology* 31: 273- 307. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.31.020180.001421>.

McGeer, Patrick L., et Edith G. McGeer. 2004. « Inflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease ». *Parkinsonism & Related Disorders* 10 Suppl 1 (mai): S3-7.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.01.005>.

Merle, Nicolas S., Sarah Elizabeth Church, Veronique Fremeaux-Bacchi, et Lubka T. Roumenina. 2015. « Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation ». *Frontiers in Immunology* 6: 262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>.

Mevorach, D., J. O. Mascarenhas, D. Gershov, et K. B. Elkon. 1998. « Complement-Dependent Clearance of Apoptotic Cells by Human Macrophages ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (12): 2313- 20. <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2313>.

Moore, James W., Susanne A. Schneider, Petra Schwingenschuh, Giovanna Moretto, Kailash P. Bhatia, et Patrick Haggard. 2010. « Dopaminergic Medication Boosts Action-Effect Binding in Parkinson's Disease ». *Neuropsychologia* 48 (4): 1125- 32.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.12.014>.

S, Cerri, Mus L, et Blandini F. 2019. « Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? » *Journal of Parkinson's Disease* 9 (3). <https://doi.org/10.3233/JPD-191683>.

Schifferli, J. A., Y. C. Ng, et D. K. Peters. 1986. « The Role of Complement and Its Receptor in the Elimination of Immune Complexes ». *The New England Journal of Medicine* 315 (8): 488- 95. <https://doi.org/10.1056/NEJM198608213150805>.

Sharma, S., et R. Deshmukh. 2015. « Vinpocetine Attenuates MPTP-Induced Motor Deficit and Biochemical Abnormalities in Wistar Rats ». *Neuroscience* 286 (février): 393- 403.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.008>.

Wang, Xi-Jin, Zhi-Qiang Yan, Guo-Qiang Lu, Smith Stuart, et Sheng-Di Chen. 2007. « Parkinson Disease IgG and C5a-Induced Synergistic Dopaminergic Neurotoxicity: Role of Microglia ». *Neurochemistry International* 50 (1): 39- 50.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.07.014>.

Yamada, Masanori, Takeshi Iwatsubo, Yoshikuni Mizuno, et Hideki Mochizuki. 2004. « Overexpression of Alpha-Synuclein in Rat Substantia Nigra Results in Loss of Dopaminergic Neurons, Phosphorylation of Alpha-Synuclein and Activation of Caspase-9: Resemblance to Pathogenetic Changes in Parkinson's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 91 (2): 451- 61. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02728.x>.

Ziabska, Karolina, Malgorzata Ziemka-Nalecz, Paulina Pawelec, Joanna Sypecka, et Teresa Zalewska. 2021. « Aberrant Complement System Activation in Neurological Disorders ».

