## Développement lymphocytaire B et T ; Réarrangements Ig/TCR

I.

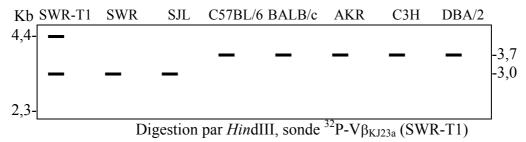
Deux anticorps monoclonaux KJ16 et KJ23a sont capables de se fixer sur les récepteurs T de type  $\alpha\beta$  présents à la surface de <u>certains</u> lymphocytes T. On se propose de déterminer la nature des épitopes reconnus par ces anticorps monoclonaux (épitopes appelés par commodité KJ16 et KJ23a) de même que d'étudier l'expression des sous-populations T KJ16<sup>+</sup> et KJ23a<sup>+</sup> chez différentes lignées de souris consanguines.

Les lymphocytes du sang périphérique sont isolés chez différentes lignées de souris consanguines et les pourcentages de lymphocytes T exprimant les épitopes KJ23a et KJ16 sont mesurés par cytométrie de flux :

	% cellules	Γ positives	
Lignées de souris	KJ23a	KJ16	
SWR	15	0	
SJL	10	0	
C57BL/6	0	16	
BALB/c	0	20	
AKR	0	11	
СЗН	0	13	
DBA/2	0	14	

Question 1. Quelle(s) hypothèse(s) vous suggère(nt) ces observations quant à la nature des épitopes reconnus par les anticorps KJ16 et KJ23a ?

Dans la suite de l'exercice, on pose l'hypothèse que les épitopes reconnus par KJ23a et KJ16 sont codés chacun par un segment de gène Vβ particulier. On isole à partir de la souris SWR un hybridome T KJ23a<sup>+</sup> appelé SWR-T1. On clone le segment Vβ utilisé par la chaîne TCRβ de ce clone qu'on utilise comme sonde pour l'analyse de l'ADN génomique de l'hybridome SWR-T1 et de l'ADN génomique de foie des différentes lignées de souris étudiées :



NB : dans les conditions de l'expérience, la sonde utilisée révèle des fragments d'ADN contenant des séquences présentant au moins 90 % d'identité.

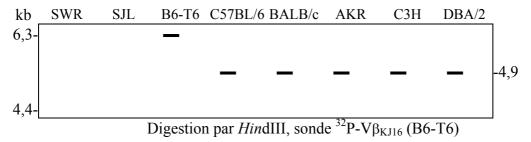
Question 2. En quelle configuration se trouve le locus  $TCR\beta$  dans les cellules de foie ?

Question 3. En quelle configuration se trouve le locus  $TCR\beta$  dans l'hybridome SWR-T1?

Question 4. A quoi correspond la bande supplémentaire observée pour l'hybridome SWR-T1?

## Question 5. Peut-on préciser les hypothèses avancées précédemment ?

De manière similaire, on isole à partir de la souris C57BL/6 un hybridome T KJ16<sup>+</sup> appelé B6-T6. On clone le segment Vβ utilisé par la chaîne TCRβ de ce clone qu'on utilise comme sonde pour l'analyse de l'ADN génomique de l'hybridome B6-T6 et de l'ADN génomique de foie des différentes lignées de souris étudiées :



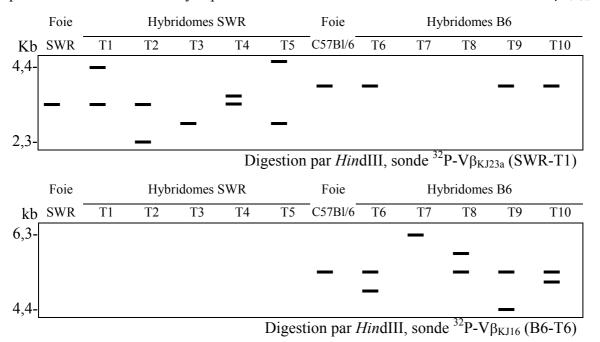
NB : dans les conditions de l'expérience, la sonde utilisée révèle des fragments d'ADN contenant des séquences présentant au moins 90 % d'identité.

Question 6. En quelle configuration se trouve le locus TCRβ dans l'hybridome B6-T6?

Question 7. Comment expliquer la disparition de la bande germinale pour l'hybridome B6-T6?

#### Question 8. Peut-on préciser les hypothèses avancées précédemment ?

On isole davantage d'hybridomes T KJ23a<sup>+</sup> chez SWR (appelés SWR-T2, SWR-T3, SWR-T4, SWR-T5) et KJ16<sup>+</sup> chez C57BL/6 (appelés B6-T7, B6-T8, B6-T9, B6-T10). L'ADN génomique purifié à partir de ces clones est analysé par Southern blot comme ci-dessus avec les sondes Vβ<sub>KJ23a</sub> et Vβ<sub>KJ16</sub>:



Question 9. En quelle configuration se trouve le locus  $TCR\beta$  dans les hybridomes ?

Question 10. Analyser et interpréter les images de Southern blot ci-dessus, en particulier on essaiera de donner la position relative des gènes  $V\beta KJ23a$  et  $V\beta KJ16$ .

### II.

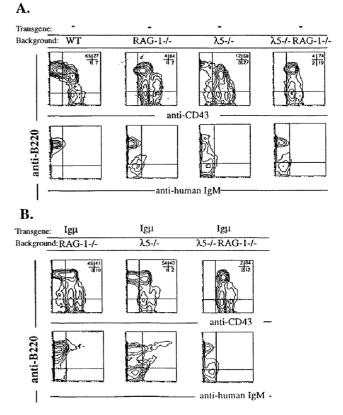
(d'après Papavasiliou, F. et al. (1996) J. Exp. Med. 184:2025)

Les auteurs de cette étude ont examiné le rôle de différents composants du récepteur pré-BCR dans le développement des cellules B. Ils ont introduit plusieurs transgènes d'immunoglobuline (Ig) dans des souris RAG-/-, λ5-/- et double mutantes (RAG-/- λ5-/-). Tous les transgènes sont des gènes réarrangés sous contrôle du promoteur VH et de l'enhancer IgH. Les résultats sont présentés sur les figures suivantes :

## Figure 1 : Analyse par FACS des cellules de la moelle osseuse de souris âgées de 6 à 8 semaines.

- A. Souris sauvages (WT) et mutantes (RAG-/-,  $\lambda$ 5-/- et double mutantes RAG-/-  $\lambda$ 5-/-).
- B. Souris chez lesquelles on a introduit un transgène codant la forme membranaire de la chaîne μ humaine (Igμ).

Les cellules ont été marquées par des anticorps anti-B220, anti-CD43 et anti-IgM humain (ne reconnaît que IgM humaine). Le pourcentage de lymphocytes présents dans chaque cadran est inscrit en haut et à droite pour les marquages B220/CD43.



- Question 1. Quel est l'effet de l'introduction du transgène  $\lg \mu$  dans les mutants RAG-/-,  $\lambda$ 5-/- et RAG-/-  $\lambda$ 5-/- ?
- Question 2. Que suggèrent ces expériences quant aux éléments nécessaires à l'expression de la chaîne  $\mu$  à la surface et quant à son effet sur le développement des cellules B?
- Question 3. Donner les raisons qui ont conduit à l'utilisation des souris mutantes RAG-/-, λ5-/- et double mutantes RAG-/- λ5-/-.
- Question 4. D'après les résultats présentés aux **Figure 3** et **Figure 4** que peut-on conclure quant au rôle des chaînes légères dans l'assemblage, le transport et la fonction du récepteur pré-B?

Figure 2 : Analyse de l'expression intracellulaire du transgène lgμ humain dans les cellules B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> de la moelle.

Après marquage avec les anticorps anti-B220 et anti-CD43, les cellules des souris utilisées à la **Figure 1** ont été fixées, perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-IgM humain.

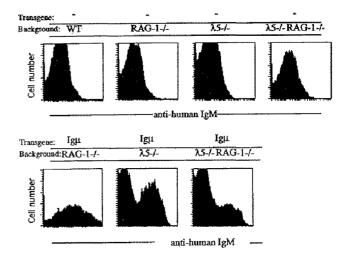


Figure 3 : Analyse du complexe pré-BCR par des expériences d'immunoprécipitation.

Des lignées de précurseurs B immortalisées par le virus d'Abelson ont été obtenues à partir de la moelle de souris de type sauvage (WT), mutantes (RAG-/-), (λ5-/-) et (RAG-/λ5-/-) ainsi que de souris mutantes exprimant le transgène Igμ humain:  $(m\mu RAG-/-)$ ,  $(m\mu\lambda5-/-)$  et  $(m\mu RAG-/-\lambda5-/-)$ . Les complexes Ig ont été immunoprécipités avec un immunsérum anti-IgM humain et analysés par la technique de Westen blot. Les protéines ont été révélées avec des anticorps anti-IgM humain (hlgM); anti-lg $\alpha$  (lg $\alpha$ ) et anti-lg $\beta$  (lg $\beta$ ). s.f.: forme membranaire; forme c.f. : cytoplasmique. surexposition, on voit apparaître sur un blot une bande correspondant à la forme membranaire (s.f.) de la protéine Igβ dans la 1<sup>ère</sup> piste (m $\mu\lambda$ 5-/-).

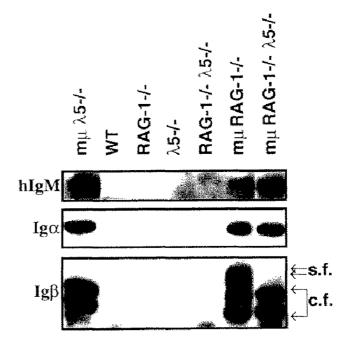
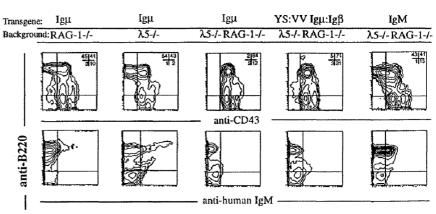


Figure 4 : Analyse par FACS des cellules de la moelle provenant de souris mutantes dans lesquelles on a introduit soit le transgène  $lg_{\mu}$  comme précédemment, soit un transgène YS:VV  $lg_{\mu}$ : $lg_{\beta}$  codant pour une protéine chimérique  $lg_{\mu}$ - $lg_{\beta}$ , soit un transgène  $lg_{\beta}$  codant pour une immunoglobuline complète  $(lg_{\mu}/lg_{\kappa})$ .

Voir la légende de la figure 1 pour les détails expérimentaux. N.B. : après introduction des transgènes YS:VV  $lg\mu:lg\beta$  et lgM, on observe la présence de chaîne  $\mu$  transgénique dans le cytoplasme des précurseurs de la moelle.



Question 5. Donner un titre qui résume les points essentiels de ces expériences

#### III.

(d'après Anderson, S. J. et al. (1993) Nature 365:552; Arpaia, E. et al. (1994) Cell 76:947; Elder, M. E. et al. (1994) Science 264:1596; Mombaerts, P. et al. (1994) Immunity 1:261)

Les expériences présentées ci-dessous ont apporté des contributions fondamentales à la compréhension du rôle de la chaîne TCRβ, et des protéines tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> et ZAP70 dans le développement et la physiologie des lymphocytes T.

Figure 5 : Profils d'expression CD4/CD8 de thymocytes de souris normales (WT) et mutantes pour la protéine lck (lck-/-, également désignée lckKO)

En dessous de chaque figure de marquage, le nombre absolu de thymocytes par thymus est indiqué.

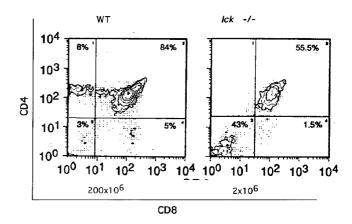


Figure 6 : Profils d'expression CD4/CD8 de thymocytes de souris déficientes pour RAG1 (RAG1-/-), déficientes pour RAG1 et transgéniques pour une chaîne TCR $\beta$  réarrangée (RAG1-/-  $\beta$ Tg), ou déficientes pour RAG1 et lck, et transgéniques pour une chaîne TCR $\beta$  réarrangée (RAG1-/- lck -/-  $\beta$ Tg).

Le nombre absolu de thymocytes par thymus est indiqué dans les cadrans inférieurs FSC/SSC.

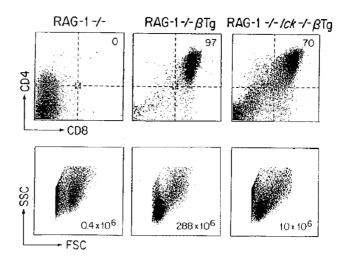
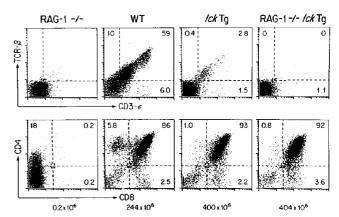


Figure 7 : Profils d'expression de marqueurs de surface de thymocytes de différentes souris mutantes.

Les thymocytes de souris normales (WT), déficientes pour RAG1 (RAG1-/-), transgéniques pour une forme constitutivement activée de lck (lckTg), déficientes pour RAG1 et transgéniques pour une forme constitutivement activée de lck (RAG1-/- lckTg) ont été analysés pour l'expression des marqueurs CD3 $\epsilon$ /TCR $\beta$  (en haut) et CD4/CD8 (en bas). Le nombre absolu de thymocytes par thymus en bas des cadrans inférieurs.



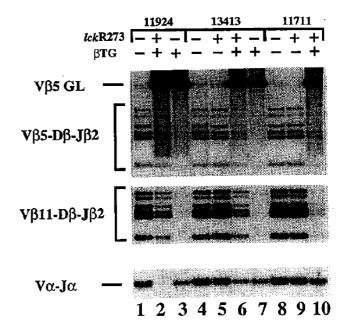
Question 1. Analyser attentivement ces trois figures.

Question 2. Indiquer quel est le rôle de la chaîne  $TCR\beta$  et de la protéine lck dans les différentes étapes du développement des lymphocytes T.

La Figure 8 montre les profils d'analyse par PCR des réarrangements endogènes V $\beta$ 5-D $\beta$ -J $\beta$ 2, V $\beta$ 11-D $\beta$ -J $\beta$  et V $\alpha$ -J $\alpha$  dans des thymocytes de différentes souris mutantes :

## Figure 8 : Analyse des réarrangements $TCR\beta$ et $TCR\alpha$ chez différentes souris mutantes.

Profils d'analyse des réarrangements endogènes V $\beta$ 5-D $\beta$ -J $\beta$ 2, V $\beta$ 11-D $\beta$ -J $\beta$  et V $\alpha$ -J $\alpha$  dans des thymocytes de différentes souris mutantes : exprimant lckR273 un transgène mutant dominant négatif de la protéine lck (phénotype de la souris lck-/-) et/ou un transgène réarrangé pour la chaîne V $\beta$ 8. La présence de chaque caractère est signalée par un +.



Question 3. Rappeler la définition de l'exclusion allélique.

Question 4. D'après les résultats présentés sur les Figure 7 et Figure 8 expliquer le rôle de la chaîne  $TCR\beta$  et de la protéine lck dans l'exclusion allélique de la chaîne  $TCR\beta$  et dans l'induction des réarrangements de la chaîne  $TCR\alpha$ .

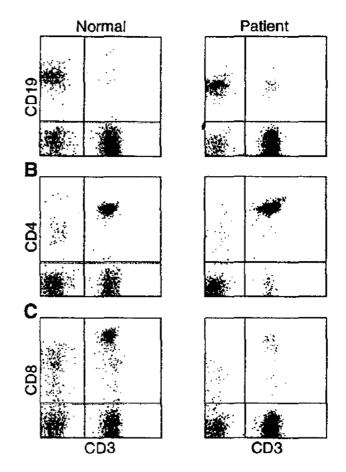
Une maladie génétique rare a été diagnostiquée chez deux enfants. Elle est due à une mutation du gène qui code la protéine kinase ZAP70. Sur la Figure 9, l'expression de différents marqueurs de surface a été étudiée sur les cellules du sang périphérique d'un malade et d'un donneur sain. Le Tableau 1 montre les résultats d'une expérience d'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules du sang de deux malades (P1F1 et P2F2) après stimulation avec différentes stimulus.

Stimulus	[3H]Thymidine Incorporation (Counts per Minute)				
	P1F1	Control	P2F2	Control	
T cell mitogen					
PHA	$408 \pm 74$	$48,750 \pm 1,060$	870 ± 112	$59,690 \pm 4,305$	
Anti-CD3 antibody	$376 \pm 64$	$21,530 \pm 1,100$	$900 \pm 280$	$28,540 \pm 2,109$	
rhIL-2	$3,533 \pm 1,060$	$2,896 \pm 495$	$1,280 \pm 155$	$1,390 \pm 16$	
PHA plus IL-2	$22,322 \pm 2,593$	66,902 ± 4,901	$14,250 \pm 1,740$	83,280 ± 3,900	
Anti-CD3 antibody plus IL-2	15,270 ± 1,679	$28,327 \pm 2,596$	$11,210 \pm 710$	44,330 ± 2,815	
B cell mitogen					
S. aureus cowan f	$21,679 \pm 2,058$	20,618 ± 1,526	18,350 ± 1,120	$16,910 \pm 1,030$	

Peripheral mononuclear cells (1  $\times$  10<sup>8</sup>/ml) obtained from P1F1, P2F2, and controls were cultured for 3 days in the presence or absence of PHA (10  $\mu$ g/ml), anti-CD3 antibody (20  $\mu$ g/ml), rh!L-2 (100 U/ml), or S. aureus cowan I (1/10,000 [v/v]) as indicated. [ $^{3}$ H]thymidine incorporation values represent mean  $\pm$  SD of three determinations. Background counts for P1F1 and control were 495  $\pm$  25 and for P2F2 and its control were 785  $\pm$  40.

Figure 9 : Etude de l'expression de différents marqueurs de surface sur les cellules du sang périphérique d'un malade et d'un donneur sain.

Le sang du patient contient 10-20.10³ lymphocytes par mm³ dont environ 20% de cellules CD3⁻CD19⁺ (A) et 75% de cellules CD3⁺CD4⁺ (B). Les rares cellules CD3⁺CD8⁺ (0-2% des lymphocytes totaux contre 20-30% chez l'individu sain) expriment également CD56, un marqueur des cellules NK (C).



Question 5. Quelles conclusions peut-on tirer sur le rôle de ZAP70 dans les différentes phases de l'activation des lymphocytes T?

## IV. Rôle de Notch1 dans le développement T

(d'après Wolfer, A. et al. (2002) Immunity 16:869)

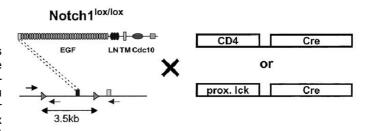
Les protéines Notch sont des récepteurs transmembranaires intervenant dans les choix de différenciation cellulaire chez plusieurs organismes. Leurs domaines extracellulaires contiennent des motifs de type EGF (epidermal growth factor) impliqués dans des interactions avec leurs ligands. Le domaine intracellulaire est clivé lors de la reconnaissance du ligand et transféré dans le noyau où son hétérodimérisation avec RBP-J $\kappa$  (recombinaison signal sequence binding protein pour J $\kappa$ ) convertit RBP-J $\kappa$  de sa forme répresseur en activateur de transcription ; ceci conduit à la transcription des gènes cibles.

Notch1, Notch2 et Notch3, comme les ligands Jagged1, Jagged2 et  $\delta$ -like-4, sont exprimés sur les thymocytes et l'épithélium thymique. Pendant le développement lymphoïde, la signalisation par Notch1 est essentielle pour le choix de différenciation d'un précurseur bipotent T/B vers le lignage T; son rôle dans les étapes postérieures du développement T ( $\alpha\beta vs. \gamma\delta$ ; CD4 vs. CD8) reste controversé. Les expériences présentée ci-dessous apporte des précisions quant au rôle de Notch1 aux différentes étapes du développement thymique.

Une souris *Notch1*<sup>lox/lox</sup>, obtenue précédemment a été croisée avec des souris trangéniques pour la recombinase Cre sous le contrôle des promoteurs de CD4 ou de p56<sup>lck</sup>. Les constructions utilisées sont schématisées sur la Figure 10. L'inactivation de *Notch1* chez ces souris est étudiée par PCR dans différentes sous-populations thymiques comme montré sur la Figure 11.

## Figure 10 : Constructions utilisées pour obtenir l'inactivation conditionnelle de *Notch1*

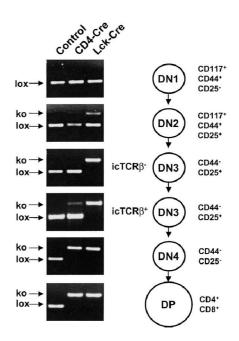
Des souris Notch1<sup>lox/lox</sup> ont été croisées avec des souris transgéniques exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur de CD4 (*CD4-Cre*) ou de p56<sup>lck</sup> (*Ick-Cre*) (à droite). L'organisation génomique schématique du locus *Notch1*<sup>lox/lox</sup> est montré à gauche ; l'exon codant pour le peptide leader (rectangle noir) est flanqué de deux séquences loxP (triangles gris) suivies des exons codant pour les motifs EGF (rectangle gris). Les flèches indiquent la position des amorces utilisées pour détecter la délétion de la région de 3.5 kb contenue entre les deux sites loxP.



Question 1. Expliquer pour quelle(s) raison(s) ces différentes constructions ont été utilisées.

# Figure 11 : Inactivation conditionnelle de *Notch1* au cours du développement thymique

La délétion de la région de 3.5 kb contenue entre les deux sites loxP a été déterminée par PCR (cf. position des amorces sur la Figure 10) pour les sous-populations thymiques indiquées (DN1–DN4 et DP), isolées chez des souris  $Notch1^{lox/lox}$  (control),  $Notch1^{lox/lox}$  x CD4-Cre (CD4-Cre), ou  $Notch1^{lox/lox}$  x Ick-Cre (Lck-Cre) souris. L'amplification de l'allèle  $Notch1^{lox/lox}$  aboutit à un fragment de 350 bp (lox), tandis que l'allèle délété donne une bande de 470 bp (ko). Les thymocytes DN3 ont été triés en deux sous-populations précoces et tardives selon l'expression cytoplasmique pour la chaîne  $TCR\beta$  (icTCR $\beta$  ou icTCR $\beta^{+}$ ).



#### Question 2. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 11.

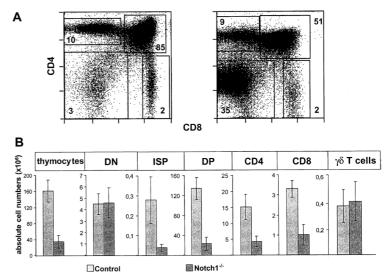
L'influence de *Notch1* sur la différenciation thymique est ensuite étudiée chez les souris  $Notch1^{lox/lox}$  x lck-Cre (dénommée  $Notch1^{-l}$  dans la suite de l'exercice) par comparaison aux souris  $Notch1^{lox/lox}$  (control). Les résultats de l'analyse des sous-populations thymiques par cytométrie de flux chez ces souris sont présentés à la Figure 12.

Question 3. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 12.

Question 4. Quelle(s) sous-population(s) sont-elles affectées par l'invalidation de Notch1 chez les souris Notch1-/-?

## Figure 12 : Sous-populations thymiques chez les souris *Notch1*<sup>-/-</sup> et control

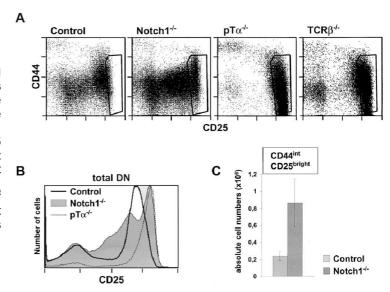
- (A) Une analyse de cytométrie de flux des thymocytes des souris *Control* (à gauche) ou *Notch1*<sup>-/-</sup> (à droite) est présentée pour les marqueurs CD4 et CD8. Les pourcentages de cellules CD4 SP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP), CD8 SP, et CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) sont indiqués dans chaque cadran.
- (B) Les nombres absolus de cellules ont été déterminés pour les thymocytes totaux et les différentes sous-populations de thymocytes décrites en (A), en plus des cellules ISP (CD4 CD8 CD3) et les cellules  $T\gamma\delta$  matures. Les écarts-types sont indiqués (n=20 pour chaque groupe).



Afin de préciser le point de blocage du développement thymique observé chez les souris  $Notch1^{-/-}$ , la sous-population CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) est plus particulièrement étudiée chez ces souris par comparaison aux souris Control et à des souris déficientes pour  $pT\alpha$  ( $pT\alpha^{-/-}$ ) ou  $TCR\beta$  ( $TCR\beta^{-/-}$ ). Les résultats sont présentés à la Figure 13 :

# Figure 13 : Analyse phénotypique des cellules CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) chez les souris Notch1<sup>-/-</sup>

- (A) Analyse en cytométrie de flux des thymocytes DN pour les marqueurs CD44 et CD25 chez les souris Control,  $Notch1^{-l}$ ,  $pT\alpha^{-l}$  et  $TCR\beta^{-l}$ . La fenêtre dessinée met en évidence l'accumulation de thymocytes DN3 CD44 int CD25 bright.
- (B) Histogrammes des profils d'expression de CD25 pour la sous-population de thymocytes DN totale chez les souris *Control* (ligne pleine), Notch1<sup>-/-</sup> (en grisé), et pT $\alpha^{-/-}$  (pointillé).
- (C) Nombres absolus de thymocytes CD44<sup>int</sup> CD25<sup>bright</sup> chez les souris *Control* (gris clair) et *Notch1*<sup>-/-</sup> (gris foncé). Les écarts-types sont indiqués pour les souris *Control* (n=10) et *Notch1*<sup>-/-</sup> (n=13).



Question 5. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 13.

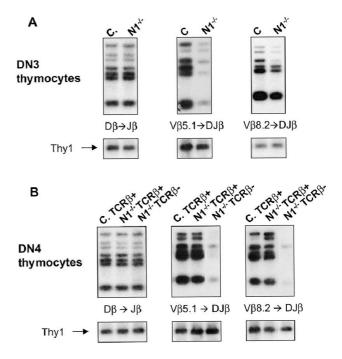
### Question 6. A quel stade le blocage de la différenciation des thymocytes a-t-il lieu?

La fréquence des réarrangements au niveau du locus TCRβ est étudiée au niveau de l'ADN génomique. Les résultats sont présentés sur la **Figure 14** :

#### Figure 14 : Analyse des réarrangements TCRβ

(A) L'ADN génomique de thymocytes DN3 triés de souris *Control* (C.) ou *Notch1*- $^{1-}$  (N1 $^{-1-}$ ) a été analysé par PCR pour la présence de réarrangements D $\beta$ -J $\beta$ , V $\beta$ 5.1-J $\beta$  et V $\beta$ 8.2-J $\beta$ . Les produits d'amplification ont été révélés par la technique de Southern blot à l'aide d'une sonde D $\beta$ 2-J $\beta$ 2.6. Le gène témoin Thy1 est révélé après PCR et hybridation avec une sonde Thy1.

(B) Les thymocytes DN4 de souris *Control* ou *Notch1*<sup>-/-</sup> ont été triés pour l'expression cytoplasmique de la chaîne TCR $\beta$  (icTCR $\beta$ ). Les réarrangements TCR $\beta$  ont été analysés comme précédemment pour les cellules DN4 des souris *Control* icTCR $\beta$ <sup>+</sup> (C.TCR $\beta$ +), *Notch1*<sup>-/-</sup> icTCR $\beta$ <sup>+</sup> (N1<sup>-/-</sup>TCR $\beta$ +) ou *Notch1*<sup>-/-</sup> icTCR $\beta$ <sup>-</sup> (N1<sup>-/-</sup>TCR $\beta$ -).



Question 7. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 14.

Question 8. Quel serait l'effet de l'introduction d'un transgène codant une chaîne TCRβ réarrangée chez les souris Notch1-/-?