

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2004 BF-IVd&Ve
2 mars 2004

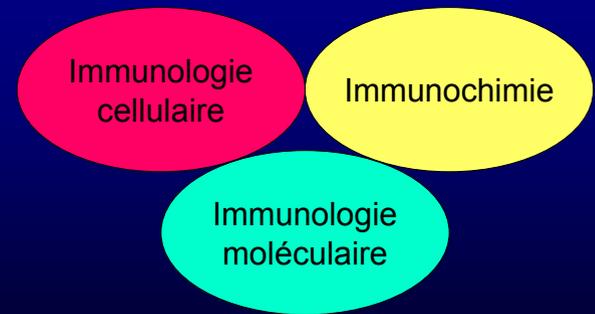
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

1. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
2. Développement lymphocytaire B et T
3. Sélection des répertoires

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

1. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
2. Développement lymphocytaire B et T
3. Sélection des répertoires

Moyens d'étude des populations lymphocytaires (1)



Moyens d'étude des populations lymphocytaires (2)

- Identification de marqueurs de différenciation
- Utilisation des anticorps monoclonaux
- Cytométrie de flux
- Techniques de biologie moléculaire
- Technique Immunoscope
- Étude d'animaux génétiquement modifiés:
 - **transgénèse**: introduction d'un gène supplémentaire dans le génome
 - **Inactivation génique (knock-out)**: inactivation ciblée d'un gène par recombinaison homologue

Marqueurs de différenciation

- Marqueurs identifiés et caractérisés à la surface des lymphocytes grâce à l'utilisation des anticorps monoclonaux.
- Ces marqueurs sont numérotés CD1, CD2... (*cluster of differentiation*)
- Chaque CD caractérise un stade de développement et/ou une distribution tissulaire.

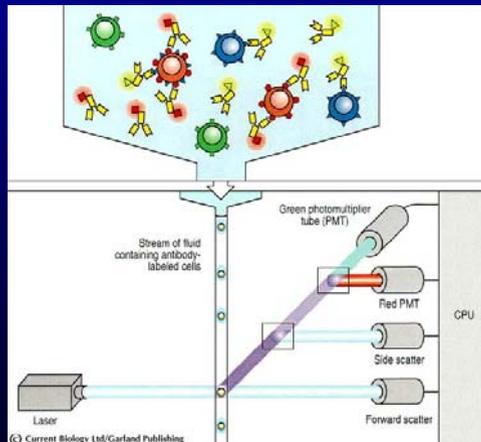
Marqueurs de différenciation T

- CD2 molécule d'adhésion
- CD3 molécules associées au TCR
- CD4 co-récepteur pour CMH II
- CD5 ?
- CD7 ?
- CD8 co-récepteur pour CMH I
- CD28 activation des cellules T naïves
- CD40L activation des cellules B naïves
- ...

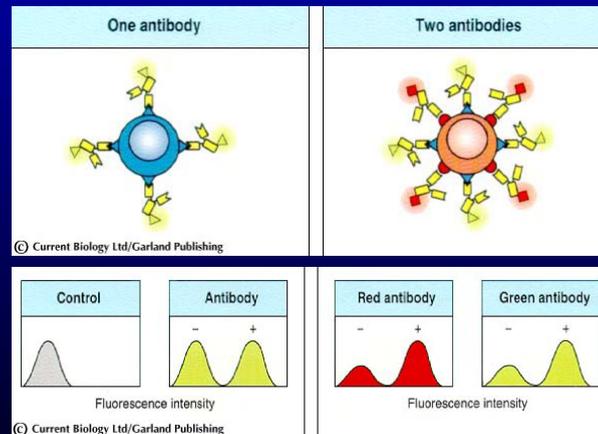
Marqueurs de différenciation B

- CD5 ?
- CD19 co-récepteur du BCR
- CD21 co-récepteur du BCR; CR2
- CD28 marqueur d'activation
- CD40 activation des cellules B
- B220 isoforme de CD45
- CD79 α/β molécules associées au BCR
- CD80 activation des cellules T (B7.1)
- ...

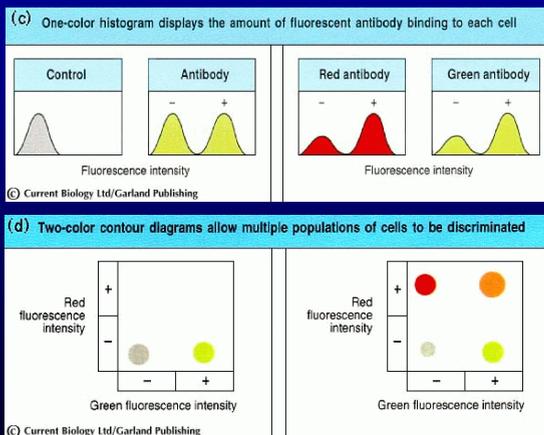
Cytométrie de flux (1)



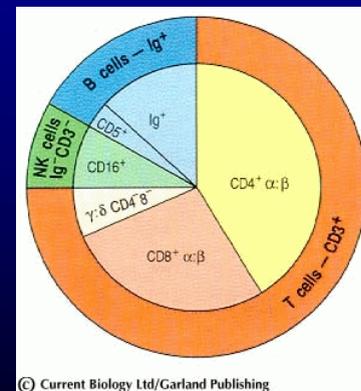
Cytométrie de flux (2)



Cytométrie de flux (2)



Distribution lymphocytaire du sang périphérique humain (PBL)

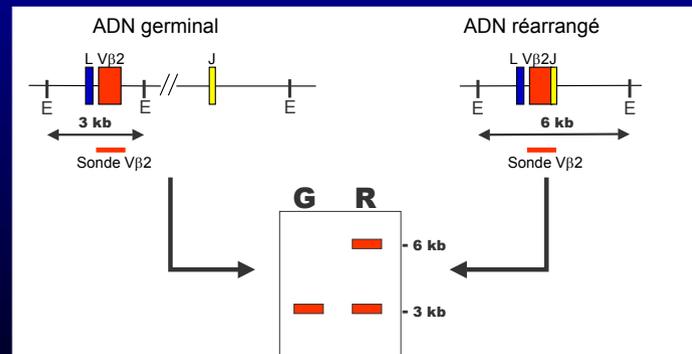


Outils de biologie moléculaire

- Sondes ADN Ig, TCR, IL, CD...
- Southern blot (ADN)
- Northern blot (ARN)
- Clonage, séquençage
- PCR

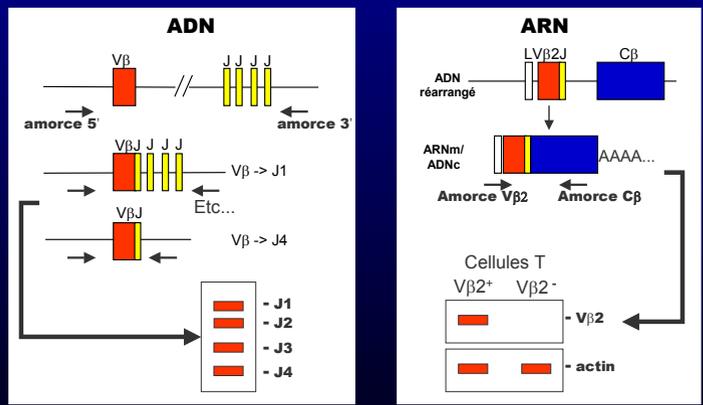
Détection des réarrangements (1)

- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par Southern blot.



Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR au niveau ADN ou ARN.

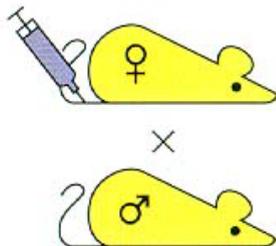


Utilisation des animaux génétiquement modifiés

- Transgénèse
- Invalidation génique

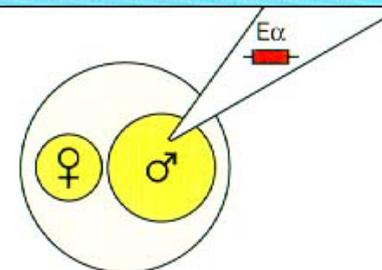
Transgénèse (1)

Female $E\alpha^-$ mouse is injected with follicle-stimulating hormone and chorionic gonadotropin to induce superovulation, and then mated



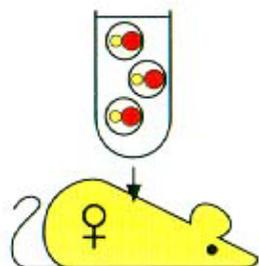
Transgénèse (2)

Fertilized oocytes removed from female. DNA containing $E\alpha$ gene is injected into the male pronucleus



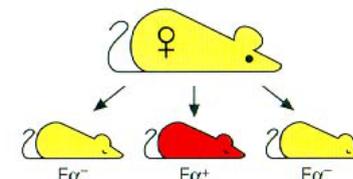
Transgénèse (3)

Injected eggs transferred into uterus of pseudopregnant female



Transgénèse (4)

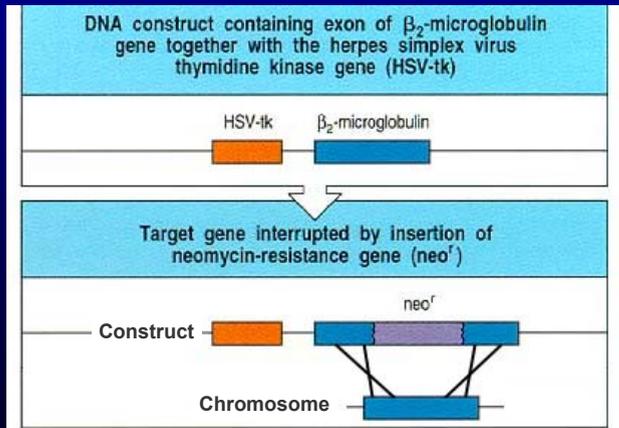
Some offspring will have incorporated injected $E\alpha$ gene (transgene)



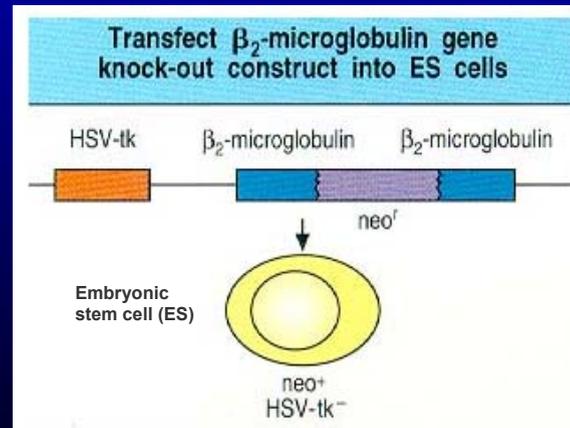
Mate transgenic animal to $E\alpha^-$ C57BL/6 mice to produce a strain carrying the $E\alpha$ transgene

© Current Biology Ltd/Garland Publishing

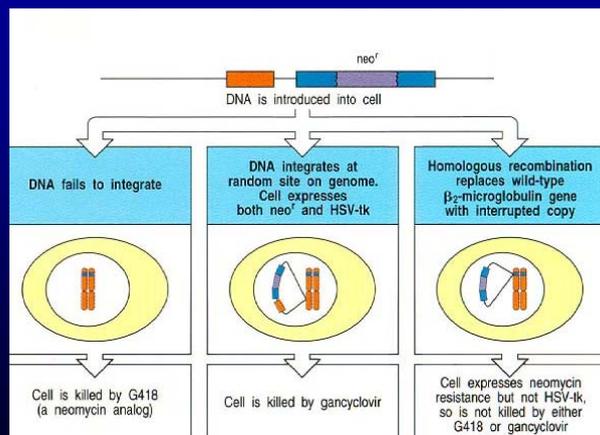
Invalidation génique (1)



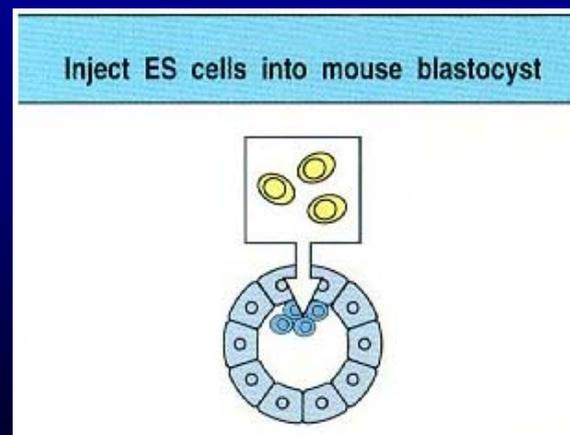
Invalidation génique (2)



Invalidation génique (3)

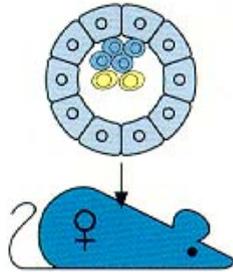


Invalidation génique (4)



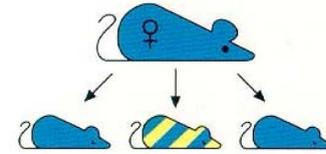
Invalidation génique (5)

Re-implant blastocyst
into pseudopregnant female



Invalidation génique (6)

Some offspring contain tissues
(including germ cells) that
derive from the injected cells



Breed chimeric mice to generate
homozygous β_2 -microglobulin-deficient strain

© Current Biology Ltd/Garland Publishing

Avantages de l'inactivation

- Mutation précise et déterminée
- Possibilité de contrôler l'étendue de la mutation:
 - promoteur spécifique de tissu
 - promoteur spécifique de stade de développement
- Possibilité d'induire ou d'annuler la mutation
- Système cre-loxP

Applications en immunologie

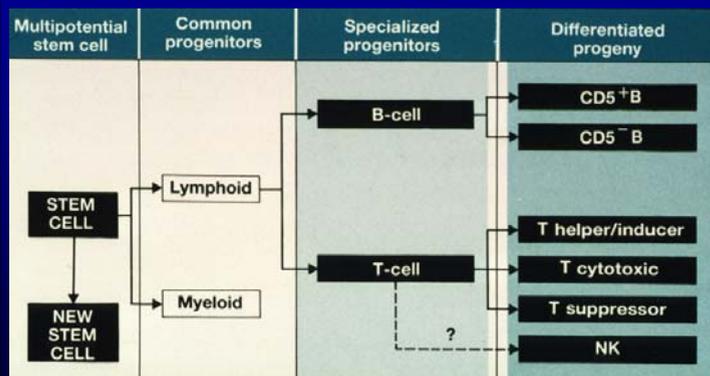
- Physiologie: rôle pour développement lymphocytaire, transduction de signaux, activation...
- Pathologie: rôle pour réponses immunitaires appropriées/inappropriées
- Thérapie: immunodéficience, cancer...
- Nombreuses lignées de souris transgéniques ou invalidées:
Ig, TCR, IL, IL-R, CD, RAG-1, RAG-2, TdT, facteurs de transcription...

La technique Immunoscope

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

1. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
2. Développement lymphocytaire B et T
3. Sélection des répertoires

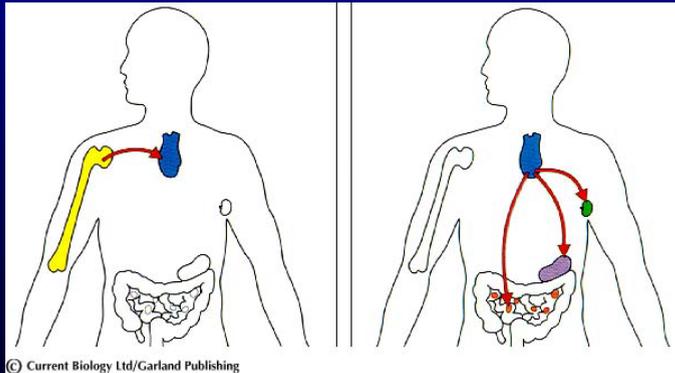
La lignée lymphocytaire



Questions

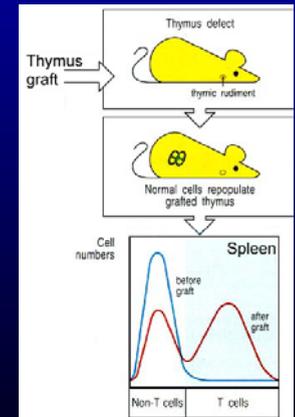
- Engagement des précurseurs communs vers les différentes lignées lymphocytaires
- Régulation de la taille des populations lymphocytaires
- Régulation de la recombinaison V(D)J
 - ♦ développement
 - ♦ spécificité tissulaire
 - ♦ spécificité de lignée
- Sélection des répertoires lymphocytaires

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus

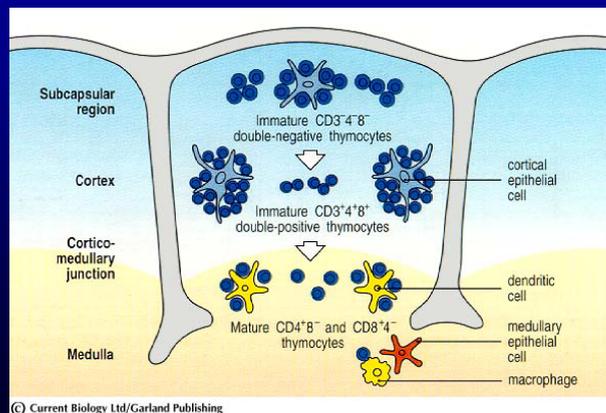


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

Pas de lymphocytes T chez les enfants athymiques (DiGeorge) ou les souris *nude*



Architecture cellulaire du thymus



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

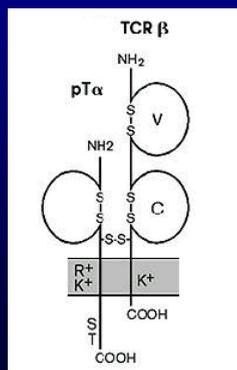
Stades de différenciation des thymocytes

- Les différentes populations identifiées correspondent à des stades de différenciation des thymocytes
 - Chaque stade peut-être critique pour:
 - les réarrangements du TCR
 - la restriction par le CMH
 - la sélection positive ou négative
- notion de *points de contrôle (checkpoint)*

Identification du pré-TCR

- Lors de stades précoces de différenciation, la chaîne TCR β est trouvée en surface sans la chaîne TCR α .

=> identification de la chaîne pT α .

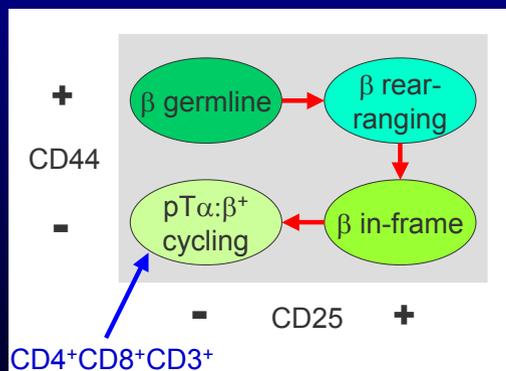


D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-190.

Rôle critique du pré-TCR

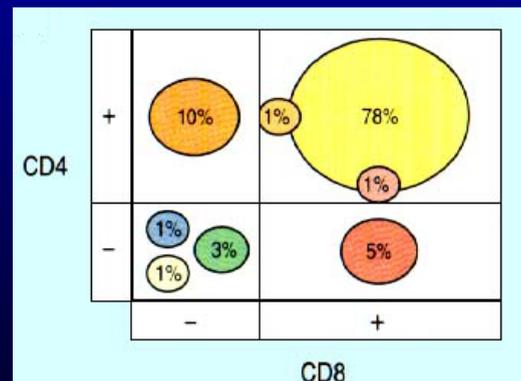
- pT α (gp33) exprimée tôt dans l'ontogénie et associée à CD3/TCR β
- L'expression du pré-TCR à la surface du thymocyte permet :
 - transition du stade double négatif CD4 $^-$ CD8 $^-$ (DN) vers le stade double positif CD4 $^+$ CD8 $^+$ (DP)
 - exclusion allélique (arrêt des réarrangements TCR β)
 - prolifération des thymocytes DP
 - induction des réarrangements TCR α

Différenciation des thymocytes (1)



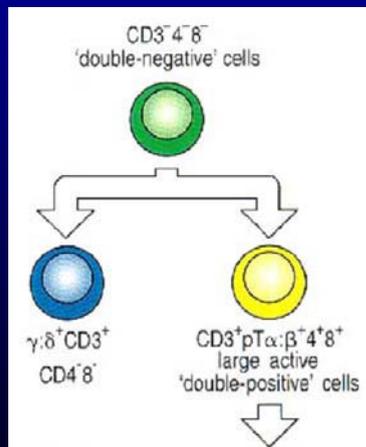
CD4 $^+$ CD8 $^+$ CD3 $^+$

Différenciation des thymocytes (2)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

Différenciation des thymocytes (3)



Engagement
CD3 cytoplasmique

Réarrangements β, γ, δ
pTα cytoplasmique
Engagement αβ/γδ

Expression CD4/CD8
Exclusion allélique β
Prolifération
Réarrangement TCRα

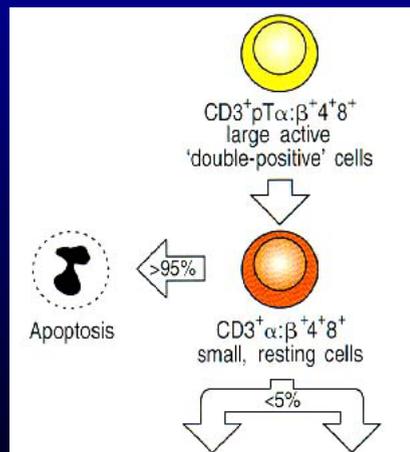
Exclusion allélique

- Un réarrangement TCRβ productif sur un locus TCRβ entraîne l'arrêt de la recombinaison V(D)J sur l'autre locus
- une seule chaîne TCRβ par cellule T, en accord avec la théorie de sélection clonale

Régulation des réarrangements

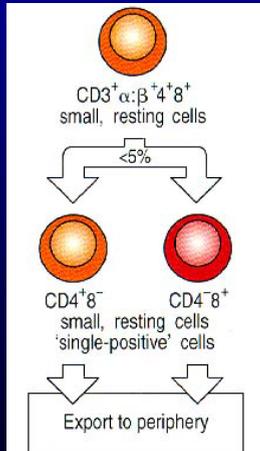
- TCRδ, TCRγ et TCRβ réarrangent en même temps au stade pro-T
- Les réarrangements TCRα sont limités aux thymocytes pré-T DP engagés vers la lignée αβ et exprimant TCRβ
- A l'inverse de TCRβ, les réarrangements TCRα ont lieu sur les deux chromosomes → l'exclusion allélique a lieu au stade post-transcriptionnel

Différenciation des thymocytes (4)



Sélection positive
Sélection négative

Différenciation des thymocytes (5)



Sélection positive
Sélection négative

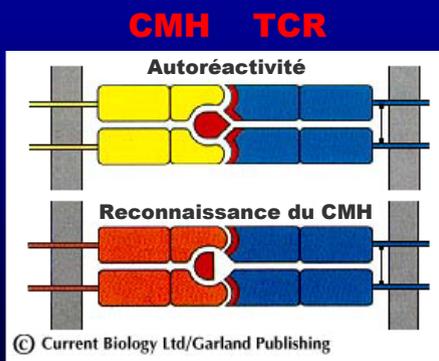
Engagement CD4/CD8
Restriction pour le CMH
Fonction effectrice

© Current Biology Ltd/Garland Publishing

Sélections positive et négative (1)

- **Sélection positive:** le TCR doit avoir une certaine réactivité avec une molécule du CMH du soi
- L'expression du co-récepteur CD4/CD8 suit la restriction pour le CMH
→ CD4/classe II et CD8/classe I
- **Sélection négative:** les cellules T autoréactives (reconnaissant CMH + peptide du soi) sont éliminées

Sélections positive et négative (2)



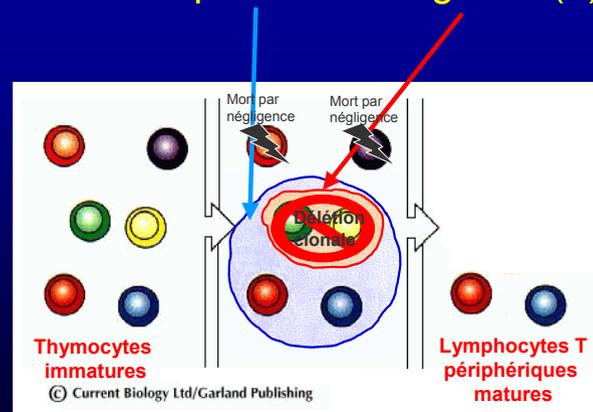
→ Sélection négative

→ Sélection positive

© Current Biology Ltd/Garland Publishing

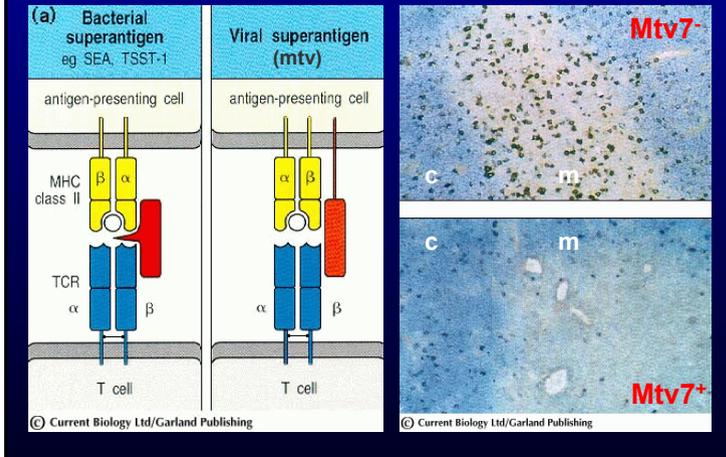
→ *Éducation thymique*

Sélections positive et négative (3)

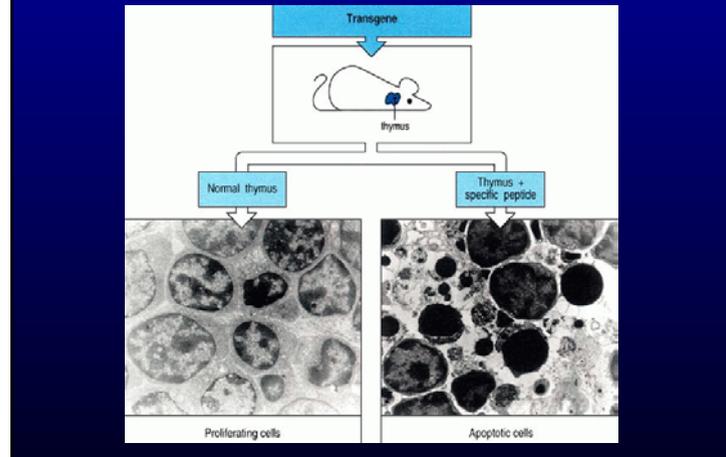


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

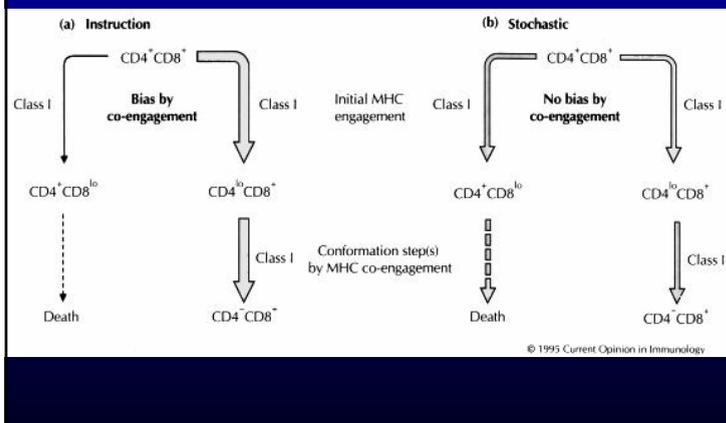
Délétion clonale et superantigènes



Délétion clonale et TCR transgénique

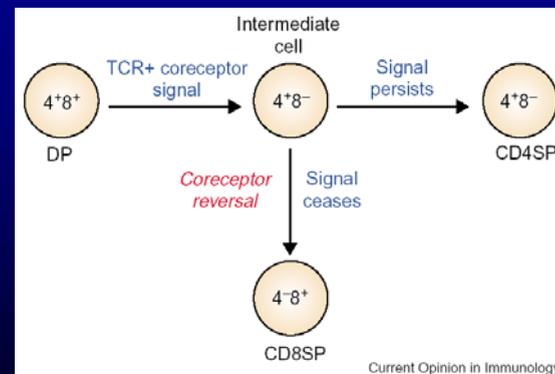


Mécanisme de la restriction au CMH (1)



Mécanisme de la restriction au CMH (2)

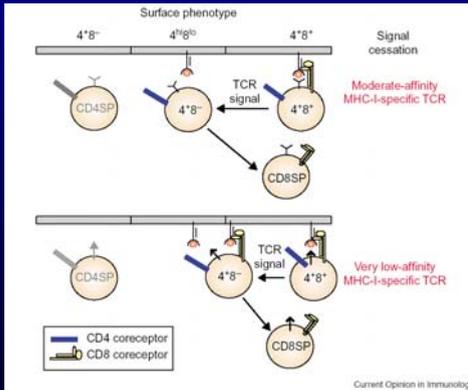
Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



Singer, A. (2002) *Curr.Opin.Immunol.* 14, 207-215.

Mécanisme de la restriction au CMH (3)

Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



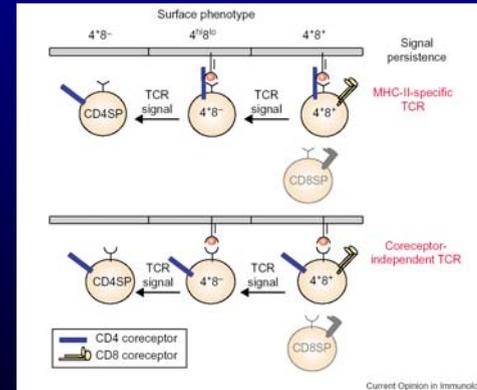
Un arrêt du signal promeut la différenciation en lymphocyte T CD8SP

Current Opinion in Immunology

Singer, A. (2002) *Curr.Opin.Immunol.* 14, 207-215.

Mécanisme de la restriction au CMH (4)

Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8

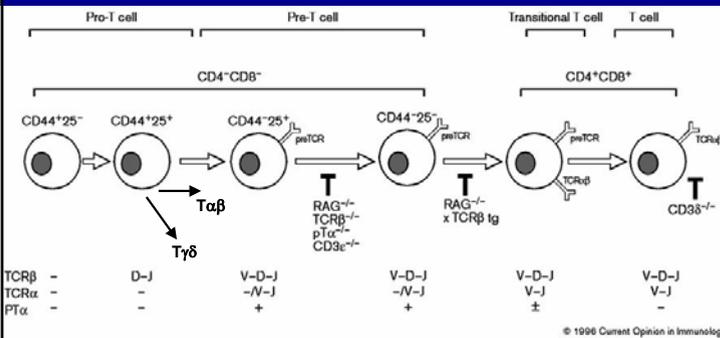


Un signal persistant promeut la différenciation en lymphocyte T CD4SP

Current Opinion in Immunology

Singer, A. (2002) *Curr.Opin.Immunol.* 14, 207-215.

Différenciation thymique: souris



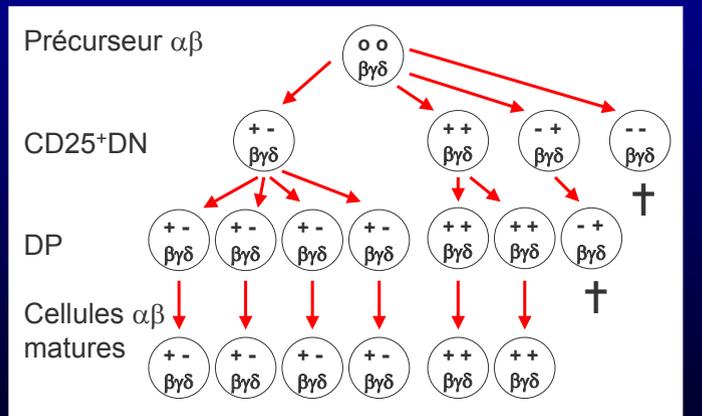
D'après Borst et al. (1996) *Curr. Op. Immunol.* 8:181-190.

Lignées αβ versus γδ

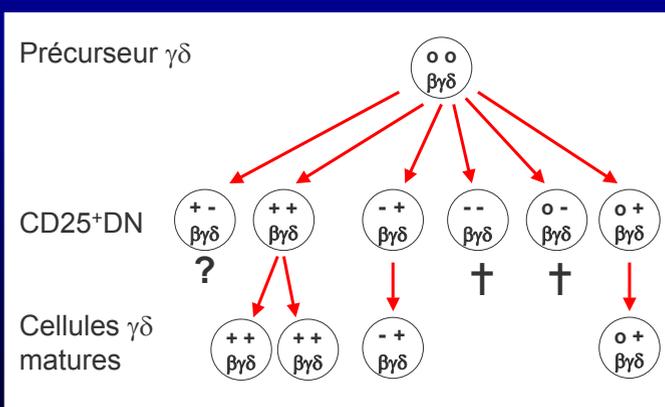
- Controverse concernant le mécanisme contrôlant le choix vers les lignées T αβ et γδ
- Certaines cellules Tγδ expriment TCRβ
Certaines cellules Tαβ expriment TCRγ
- Différent modèles proposés :
 - Réarrangements séquentiels
 - Réarrangements compétitifs
 - Lignées séparées

} Instructif
} Aléatoire

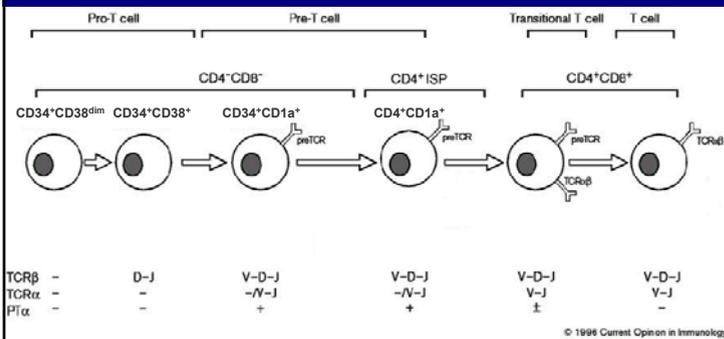
Modèle modifié de lignée séparée (1)



Modèle modifié de lignée séparée (2)

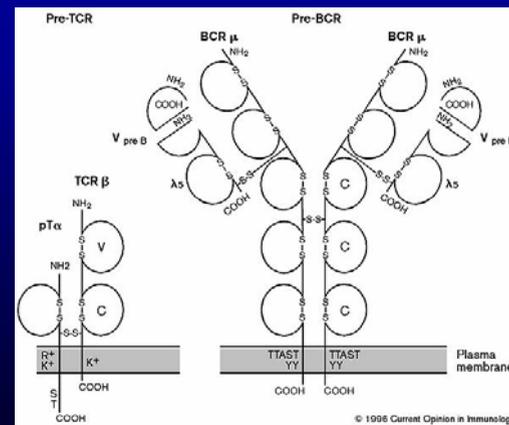


Différenciation thymique: homme



D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-190.

Caractérisation du pré-BCR

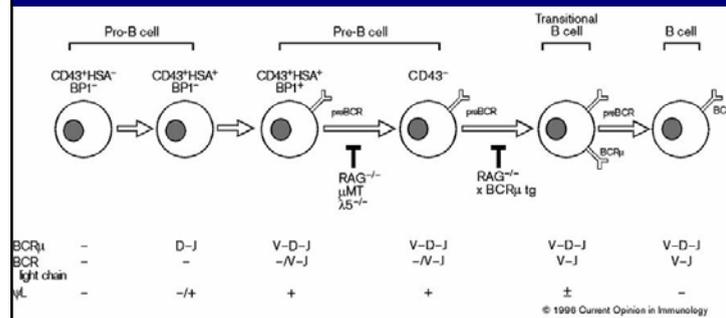


D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-190.

Rôle du pré-BCR

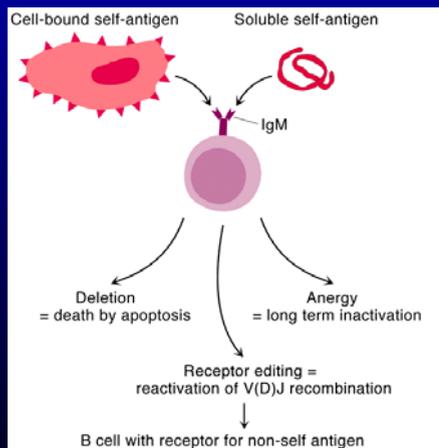
- **Exclusion allélique:** Un réarrangement IgH productif sur un locus IgH entraîne l'arrêt de la recombinaison V(D)J sur l'autre locus
→ Une seule chaîne IgH produite par cellule B, en accord avec la théorie de sélection clonale
- **Prolifération des cellules pré-B:**
→ Enrichissement en réarrangements productifs
- **...Induction des réarrangements IgL:**
→ Production d'une Ig complète

Différenciation des lymphocytes B



D'après Borst *et al.* (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-190.

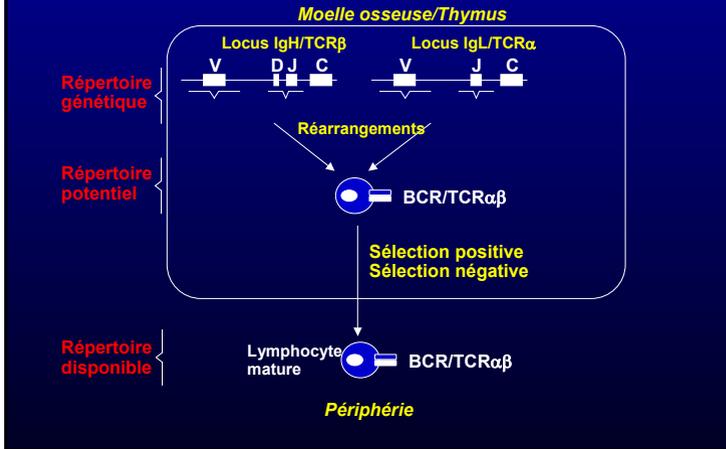
Sélection des lymphocytes B



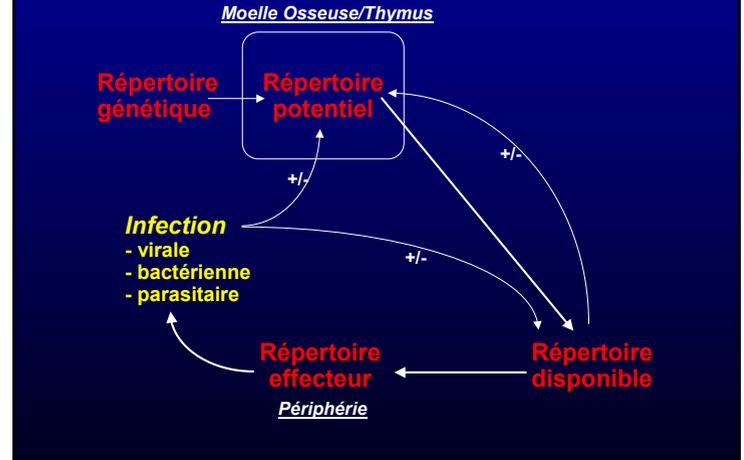
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

1. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
2. Développement lymphocytaire B et T
3. Sélection des répertoires

Notions de répertoires (1)



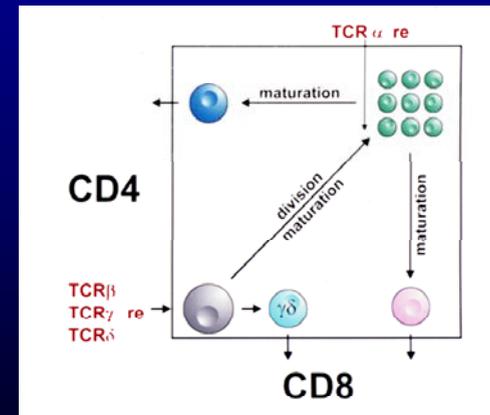
Notions de répertoires (2)



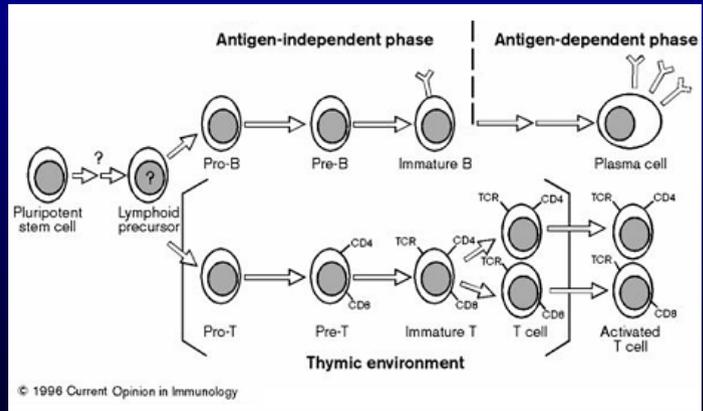
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Conclusion

Rappel différenciation T



Parallèle différenciations B et T



D'après Fitzsimmons et Hagman (1996) Curr. Op. Immunol. 8:166-174

Questions/Discussion...