

Hématopoïèse

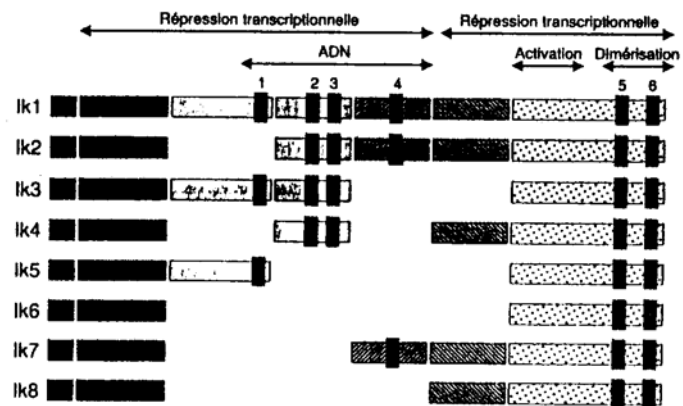
I.

La production continue des cellules des différentes lignées sanguines est assurée par une seule population cellulaire, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques est essentiellement gouvernée par des facteurs intervenant à des stades précis de leur différenciation en différentes cellules du sang. Des expériences de manipulations génétiques, en particulier de perte de fonction, ont permis d'ordonner l'intervention de ces différentes molécules.

Nous vous proposons d'étudier un de ces facteurs de transcription appelé Ikaros et de déterminer son rôle dans la différenciation des CSH et dans la mise en place du système immunitaire. Il existe 6 isoformes Ikaros (Ik1 à Ik6) produites par épissage alternatif du même gène. Ces isoformes sont représentées sur la figure ci-dessous. L'isoforme la plus longue (Ik1) possède 4 motifs à doigts de zinc en position N terminale permettant la liaison à l'ADN et 2 doigts de zinc en position C-terminale impliqués dans les propriétés de dimérisation des différents facteurs Ikaros.

Figure 1 : Représentation schématique des différentes isoformes de la protéine Ikaros

Les limites des exons sont indiquées. Les domaines codant pour les doigts de zinc sont numérotés de 1 à 6. Les doigts F1 à F4 sont responsables de la capacité de liaison à l'ADN. Les doigts F5 à F6 permettent l'association avec les différents membres de la famille Ikaros. La fonction des différents domaines protéiques produits est indiquée.



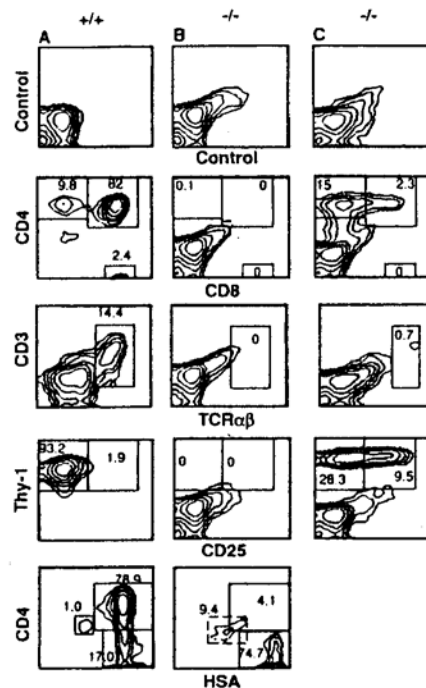
Par manipulation génétique, des souris mutantes synthétisant des molécules Ikaros délétées au niveau des motifs à doigts de zinc nécessaires à leur liaison à l'ADN ont été obtenues. La majorité des souris mutantes meurent entre la première et la troisième semaine de leur vie ; ces souris sont dépourvues de ganglions lymphatiques.

Dans un premier temps, les thymus des souris homozygotes pour la mutation sont analysés. Contrairement aux souris sauvages, les thymus des animaux mutants apparaissent rudimentaires. Bien que les structures épithéliales soient identiques à celles des souris sauvages, le nombre des thymocytes est cependant très réduit (10^5 cellules/ 10^8 cellules). Une analyse par cytométrie en flux est réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques de sous-populations thymiques.

Question 1. Interprétez les résultats obtenus à la Figure 2.

Figure 2 : Flow cytometric analysis of cells in the rudimentary Thymus of Ikaros mutant mice

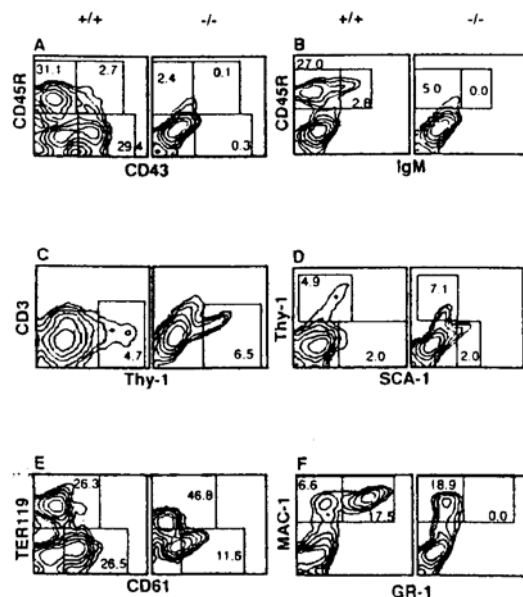
(A) The cell composition of the thymus in wild-type controls (+/+; 2×10^8 cells recovered per thymus) and in Ikaros mutant mice (-/-; B and C) was determined. A maximum of 1×10^5 cells were recovered per thymus in 62 out of 65 mutant animals (irrespective of age); a group of three 2-week-old mutant mice is shown in (B). In 3 out of 65 mutant animals, 0.5×10^6 to 1×10^6 cells were recovered per thymus. From this groups of three, the thymus with the most definitive T cell phenotype is shown in (C). Cells were double stained with: a pool of FITC- and PE-conjugated isotype controls, anti-CD4^{PE}/anti-CD8^{FITC}, anti-CD3^{PE}/anti-TCR $\alpha\beta$ ^{FITC}, anti-Thy1.2^{PE}/anti-CD25^{FITC}, and anti-CD4^{PE}/anti-HSA^{FITC}. Positive populations are boxed and percentages are indicated. Animals whose cell analysis is shown were 2 weeks of age.



La même étude par cytométrie en flux est réalisée sur les cellules de la moelle osseuse de souris mutantes à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs de différenciation des cellules hématopoïétiques.

Figure 3 : Hematopoietic populations in the bone marrow of Ikaros mutant mice

Bone marrow cells recovered from the two femurs of 2-week old Ikaros mutant mice (-/-; 0.5×10^6 to 1.5×10^6 cells) and of wild-type littermates (+/+; 1×10^7 to 2×10^7 cells) were analyzed with the following combinations of Mabs: anti-CD45^{PE}/anti-CD43^{FITC} (A); anti-CD45^{PE}/anti-IgM^{FITC} (B); anti-CD3^{PE}/anti-Thy1.2^{FITC} (C); anti-Thy1.2^{PE}/anti-SCA-1^{FITC} (D); anti-TER-119^{PE}/anti-CD61^{FITC} (E); and anti-Mac-1^{PE}/anti-Gr-1^{FITC} (F). Positive populations are boxed and percentages are shown.



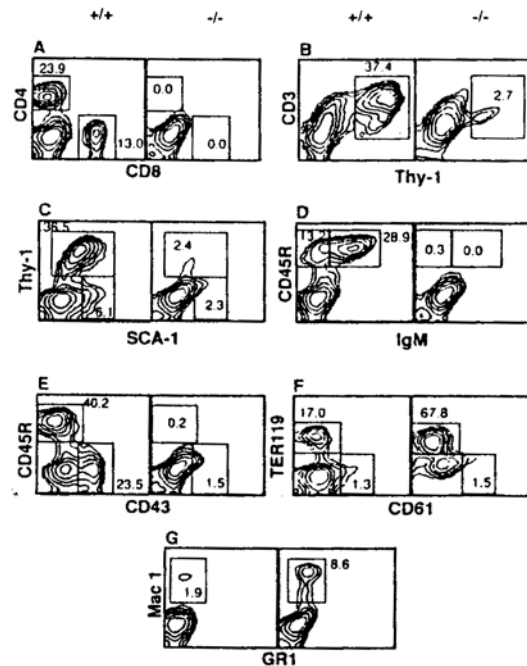
Question 2. Interprétez les résultats obtenus à la **Figure 3**.

En l'absence de ganglions lymphatiques, la rate reste le seul véritable organe lymphoïde secondaire chez les souris mutantes. Les proportions des différentes populations hématopoïétiques sont analysées par cytométrie en flux.

Question 3. Interprétez les résultats de la **Figure 4**.

Figure 4 : Hematopoietic populations in the spleen of Ikaros mutant mice

After red blood cells were lysed with NH₄Cl, cells from the spleen of 2-week-old Ikaros mutant mice (-/-; 3x10⁷ to 10x10⁷ cells per animal) and wild-type littermates (+/+; 4x10⁷ to 10x10⁷ cells per animal) were examined with the following combinations of Mabs: anti-CD4^{PE}/anti-CD8^{FITC} (A); anti-CD3^{PE}/anti-Thy1.2^{FITC} (B); anti-CD3^{PE}/anti-SCA-1^{FITC} (C); anti-CD45^{PE}/anti-IgM^{FITC} (D); anti-CD45^{PE}/anti-CD43^{FITC} (E); anti-TER-119^{PE}/anti-CD61^{FITC} (F); and anti-Mac-1^{PE}/anti-Gr-1^{FITC} (G). Positive populations are boxed and percentages are indicated.



Le nombre de cellules NK présentes dans la rate reste faible même chez les souris sauvages (2-5%). Afin d'identifier la présence de ces cellules chez les souris mutantes, des tests de cytotoxicité sont réalisés. Des dilutions de cellules spléniques de souris sauvages ou mutantes sont cultivées en présence d'IL2 pendant 48 à 72 h. Ces conditions de culture permettent de générer des cellules NK activées prêtes à lyser leurs cellules cibles (cellules YAC-1). Les résultats des expériences sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Effector-to-Target Cell Ratio	Percent Lysis* (%)			
	Experiment 1 (Standard Deviation)		Experiment 2 (Standard Deviation)	
	+/+	-/-	+/+	-/-
60:1	59 (6)	1	ND	ND
30:1	48 (4)	2	75 (15)	4
15:1	43 (6)	4 (1)	57 (3)	10
7.5:1	16 (2)	4	29 (4)	2

Spleen cells from wild type (+/+) or Ikaros mutant (-/-) mice were cultured in complete RPMI medium containing 500 U/ml recombinant interleukin-2 for 72 hr and were then cultured in triplicate with 3000 Cr⁵¹-labeled Yac-1 cells in the indicated ratios in a standard 4 hr chromium release assay. Abbreviations: ND, not determined; and CPM, counts per minute.

* Percent lysis = $\frac{[\text{CPM} - \text{spontaneously released CPM}] \times 100}{[\text{Total lysis CPM} - \text{spontaneously released CPM}]}$

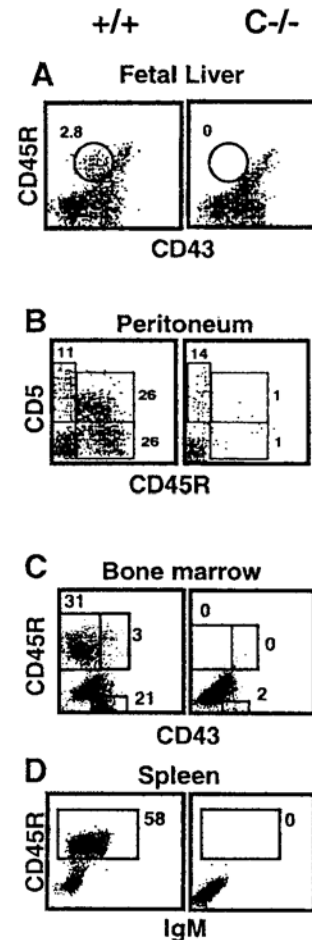
Question 4. *Interprétez les résultats. D'après les résultats obtenus, que pouvez-vous déduire du rôle d'Ikaros dans la mise en place des lignages hématopoïétiques ?*

Un nouveau lot de souris mutantes est obtenu par manipulation génétique. Ces souris mutantes synthétisent des molécules Ikaros délétées du domaine C-terminal codé par l'exon 7 du gène *Ikaros*. Ce domaine contient les motifs à doigts de zinc nécessaires à la dimérisation des molécules Ikaros et des motifs essentiels à l'activation de la transcription. Contrairement aux premières souris mutantes, les souris homozygotes pour cette nouvelle mutation peuvent vivre jusqu'à l'âge de 4 mois.

La présence des lymphocytes B et de leur précurseur est analysée dans les tissus lymphoïdes de fœtus et de souris adultes âgées de 4 mois par double immunofluorescence en cytométrie de flux.

Figure 5: Fetal and adult B cell development in Ikaros C^{-/-} mice

Cells obtained from the embryonic day 16 (E16) fetal liver (A) and peritoneum (B), bone marrow (C), and spleen (D) of 4-week-old Ikaros C^{-/-} mice and wild-type littermates were analysed with the following combinations of Mabs: anti-CD45^{PE}/anti-CD43^{FITC} (A); anti-CD45^{PE}/anti-CD45R^{FITC} (B); anti-CD45^{PE}/anti-CD43^{FITC} (C); anti-CD45^{PE}/anti-IgM^{FITC} (D). Positive stained populations are boxed and percentages are shown. Fetal liver pre-B cell precursors (CD45R⁺) and their progeny, peritoneal B-1a B cells (CD5⁺/CD45R⁺), were absent in Ikaros C^{-/-} mice. Bone marrow pro-B cells and splenic B cells were also missing from all C^{-/-} mice tested.

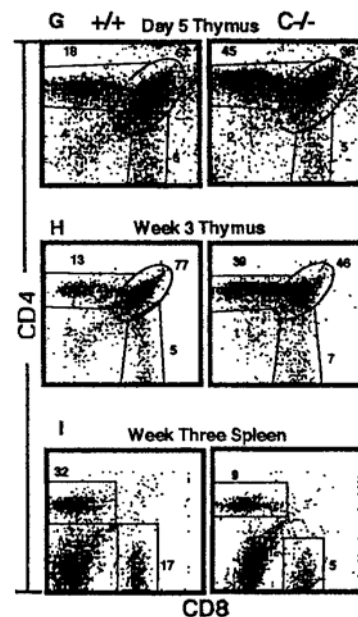


Question 5. Analysez et interprétez les résultats obtenus à la Figure 5.

Les sous-populations thymiques sont analysées par double immunofluorescence en cytométrie de flux à l'aide d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8. Ces mêmes anticorps sont utilisés sur des cellules spléniques de souris âgées de 3 semaines.

Figure 6

Cytofluorometric analyses of 5-day-old and 3-week old animals is shown (G and H). At 5 days after birth, Ikaros C^{-/-} thymi contain 100- to 300-fold fewer thymocytes than age-matched wild-type thymi. An increase in the proportion of CD4 single positive thymocytes is detected even at this early stage in thymocyte development (G). The increase in the proportion of CD4 single positive thymocytes persists in the adult C^{-/-} thymus in which the total number of thymocytes has reached nearly normal levels (H). Single positive CD4 and CD8 thymocytes are exported to the spleen (I). Thymocytes and splenic populations were stained with FITC- and PE-conjugated isotype control antibodies (data not shown) or anti-CD4-PE and anti-CD8-FITC. Positively stained populations are boxed and percentages are indicated.



Question 6. Analysez et interprétez les résultats présentés à la Figure 6.

La proportion des lymphocytes $T\gamma\delta$ dans différents tissus est également analysée par cytométrie en flux.

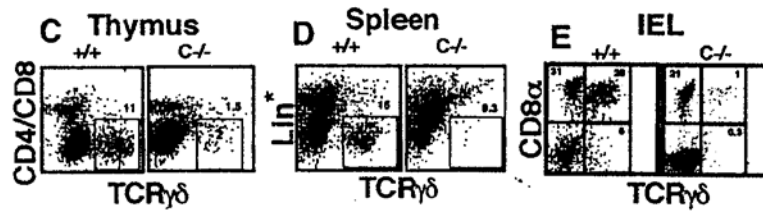


Figure 7

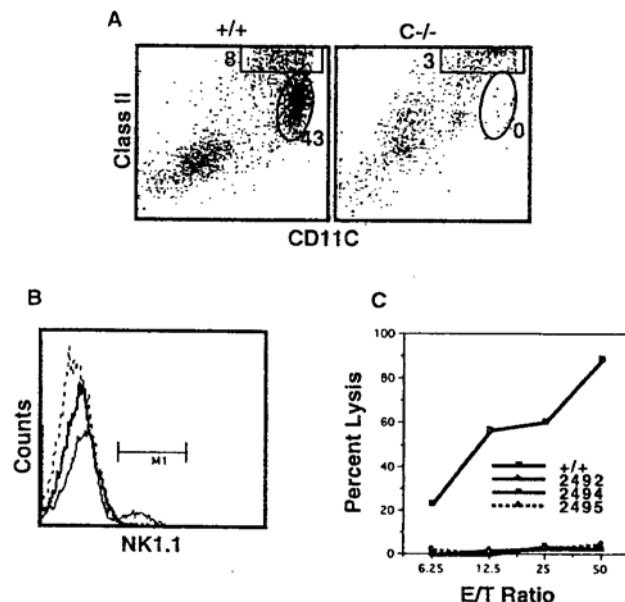
Thymocyte (C) and splenic populations (D) depleted of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells and lineage cells, respectively, were analysed for their $\gamma\delta$ T cell content. $\gamma\delta$ T cells were detected in the thymus of mutant mice but at significantly reduced levels. They were not present in the spleen in any appreciable number. Intestinal intraepithelial lymphocytes (E) were analysed for their $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ composition. The great majority of Ikaros $C^{-/-}$ IELs were $\alpha\beta$ T cells. No appreciable numbers of $\gamma\delta$ T cells were present.

Question 7. Interprétez les résultats présentés à la **Figure 7**.

Les pourcentages des cellules dendritiques thymiques et des cellules NK spléniques sont déterminées par cytométrie en flux chez les souris mutantes et sauvages.

Figure 8

Lineage-depleted splenocytes from Ikaros $C^{-/-}$ and wild-type mice were stained with an antibody to NK1.1, which is expressed on mature NK cells of the C57BL/6 background (A). Among Lin^- splenocytes in the wild type, 3%-5% were NK1.1 $^+$. No NK1.1 $^+$ cells were detected in the Ikaros $C^{-/-}$ spleen. The broken line histogram indicates the isotype control, whereas simple and bold line histograms show NK1.1 staining of the respective wild-type and Ikaros $C^{-/-}$ splenocytes. NK cell function in Ikaros $C^{-/-}$ and wild-type controls was tested by culturing splenocytes for 4 days in the presence of 500 U/ml of IL-2 (B). In wild-type mice, these conditions are known to generate activated NK cells that can readily lyse Yac-1 targets. Spleen cells from wild-type mice lysed chromium-labeled Yac-1 over a wide range of effector to target cell ratios. In contrast, spleen cells from Ikaros $C^{-/-}$ mice were unable to lyse NK targets even at the highest effector to target cell ratio. Lineage-depleted thymocytes from Ikaros $C^{-/-}$ and wild-type mice were stained with antibodies to class II and CD11c antigens expressed on mature dendritic APCs (C). CD11c $^+$ /class II high APCs were absent from the Ikaros $C^{-/-}$ spleen. Interestingly CD11c $^+$ /class II low cells were present. These cells may represent a distinct class or state of maturation of APCs.



Question 8. Interprétez les résultats présentés à la **Figure 8**.

De la même façon, les pourcentages des cellules des lignées érythroïdes et myéloïdes sont analysés dans le foie fœtal ainsi que dans la rate et la moelle osseuse des souris âgées de trois semaines.

Question 9. Interprétez les résultats présentés à la **Figure 9**.

Un anticorps polyclonal dirigé contre le domaine N-terminal des protéines Ikaros est utilisé en Western-blotting sur des extraits nucléaires provenant de cellules thymiques de souris mutantes ou sauvages âgées de 2 à 4 semaines.

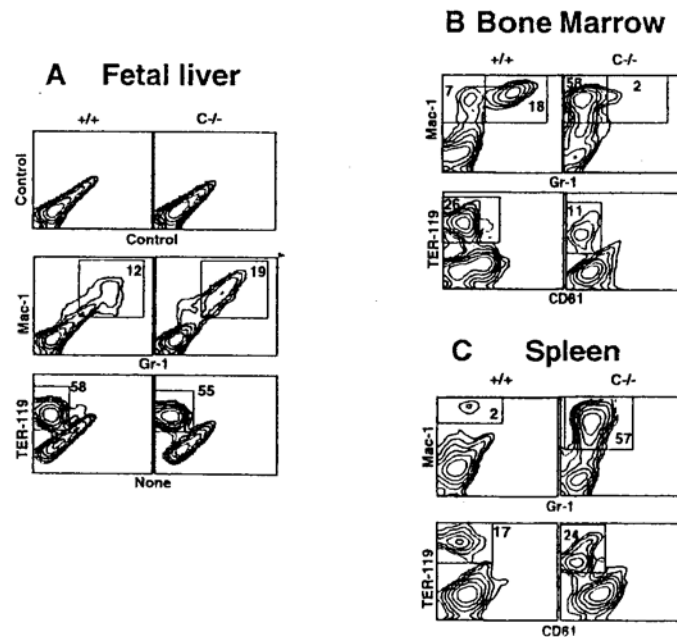


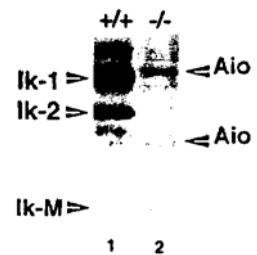
Figure 9

Fetal and Postnatal Waves of Myeloid and Erythroid Differentiation in Ikaros C-/- Mice

Cells obtained from the E16 fetal liver (A) and from the bone marrow (B) and spleen (C) of 3-week-old wild-type and Ikaros C-/- mice were stained with anti-Mac-1-PE/anti-Gr-1-FITC, anti-TER-119-PE, and anti-TER-119-PE/anti-CD61-FITC, respectively. Positively stained populations are boxed and percentages are shown. Similar percentages of granulocyte (Mac-1⁺/Gr-1⁺) cells were detected in the fetal liver of wild-type and Ikaros C-/- mice. The granulocyte population was significantly decreased in the bone marrow of Ikaros mutant mice. The percentage of Mac-1⁺/Gr-1⁺ cells (which includes committed myeloid precursors, mature monocytes, and macrophage) was significantly increased in both the spleen and bone marrow of Ikaros mutant mice. The percentages of committed erythroid precursors (TER-119⁺) were similar in fetal and adult hematopoietic sites of Ikaros C-/- and wild-type mice.

Figure 10

Western blot analysis of nuclear extracts prepared from the thymus of 2- to 4-week-old mice revealed that C-/- mice (lane 2) lack wild-type Ikaros isoforms (Ik-1 and Ik-2) and have a truncated Ikaros protein (Ik-M) that is present in a >100-fold lower concentration than the wild-type Ikaros isoforms (Ik-1 and Ik-2) produced in +/+ mice (lane 1). The antibody used was raised to the N-terminal domain of Ikaros proteins.



Question 10. Analysez les résultats obtenus à la **Figure 10**. A quoi peuvent correspondre les deux bandes (Aio) persistant sur le Western blot des souris mutantes C-/- ?

Question 11. Ces expériences confirment-elles l'hypothèse émise sur le rôle d'Ikaros lors de l'étude des premières souris mutantes ? Comment expliquez-vous la présence d'une différenciation T chez le deuxième lot de souris mutantes ?

Question 12. Indiquez sur le schéma de différenciation des lignées hématopoïétiques ci-dessous, où se situe l'intervention des gènes et des protéines Ikaros.

