

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2005 IF-IVc&IVd
21 février 2005

1

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

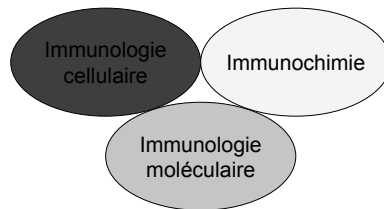
2

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

3

Moyens d'étude des populations lymphocytaires (1)



4

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

5

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.

6

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
- ...

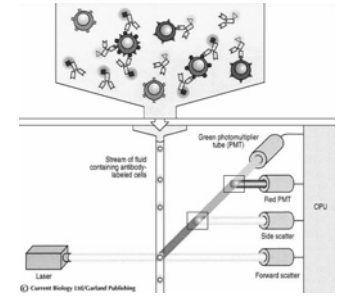
7

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)
- ...

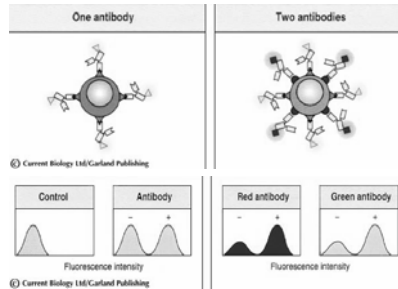
8

Cytométrie de flux (1)



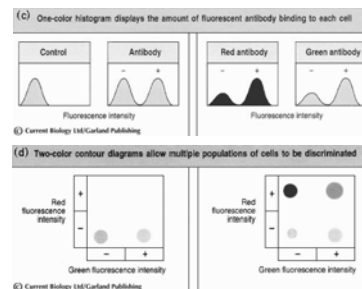
9

Cytométrie de flux (2)



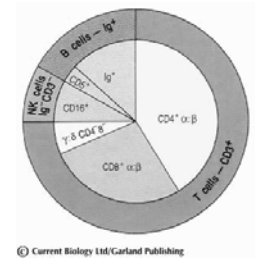
10

Cytométrie de flux (2)



11

Distribution lymphocytaire du sang périphérique humain (PBL)



12

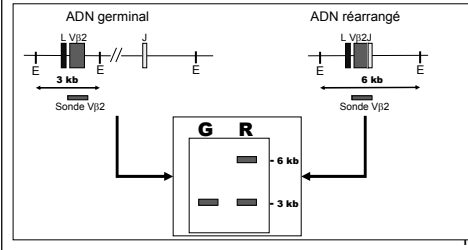
Outils de biologie moléculaire

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

13

Détection des réarrangements (1)

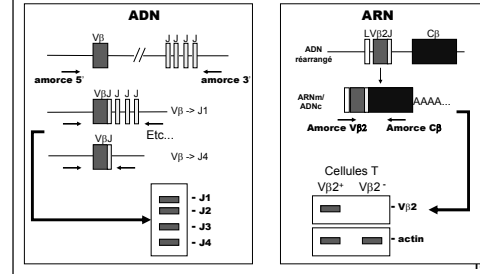
- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par Southern blot.



14

Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR au niveau ADN ou ARN.



15

Utilisation des animaux génétiquement modifiés

- Transgénèse
- Inactivation génique

16

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

27

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...

28

La technique Immunoscope

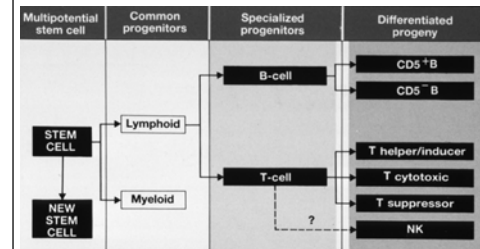
29

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

30

La lignée lymphocytaire



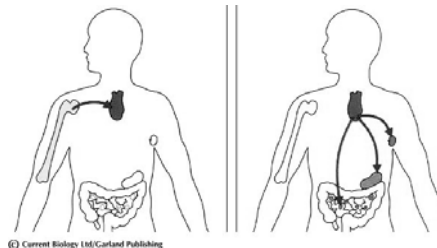
31

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

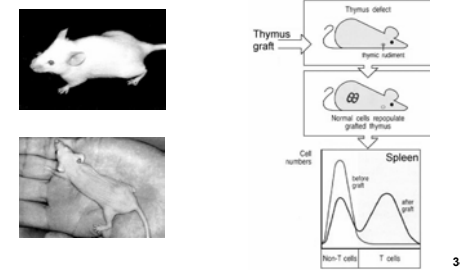
32

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus



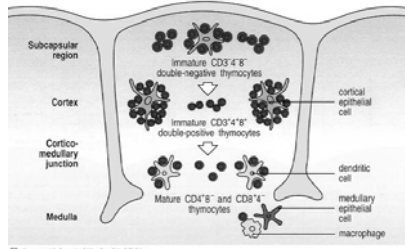
33

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



34

Architecture cellulaire du thymus



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

35

Stades de différenciation des thymocytes

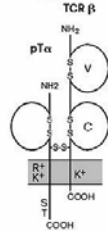
- Les différentes populations identifiées correspondent à des stades de différenciation des thymocytes
 - Chaque stade peut-être critique pour:
 - les réarrangements du TCR
 - la restriction par le CMH
 - la sélection positive ou négative
- notion de *points de contrôle (checkpoint)*

36

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



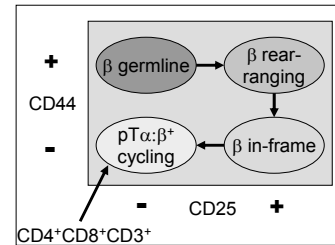
D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-187

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

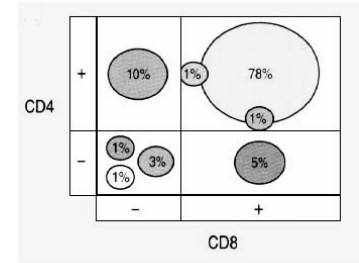
38

Différenciation des thymocytes (1)



39

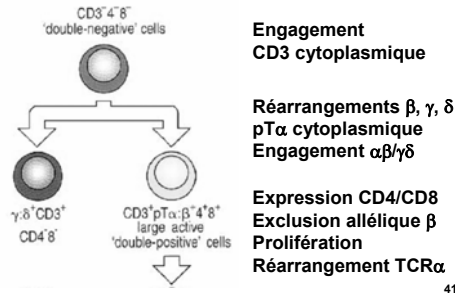
Différenciation des thymocytes (2)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

40

Différenciation des thymocytes (3)



Exclusion allélique

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

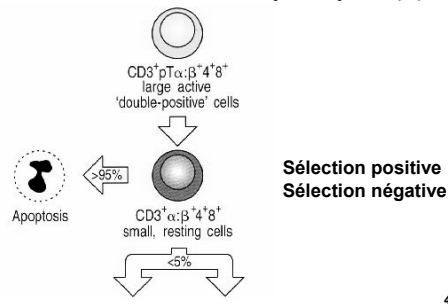
42

Régulation des réarrangements

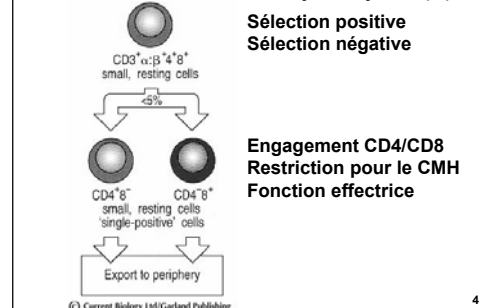
- TCR δ , TCR γ et TCR β réarrangent en même temps au stade pro-T
- Les réarrangements TCR α sont limités aux thymocytes pré-T DP engagés vers la lignée $\alpha\beta$ et exprimant TCR β
- A l'inverse de TCR β , les réarrangements TCR α ont lieu sur les deux chromosomes → l'exclusion allélique a lieu au stade post-transcriptionnel

43

Différenciation des thymocytes (4)



Différenciation des thymocytes (5)

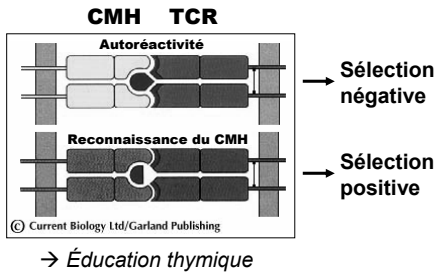


Sélections positive et négative (1)

- 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

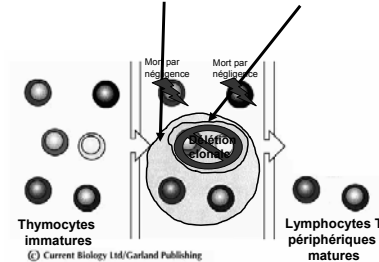
46

Sélections positive et négative (2)



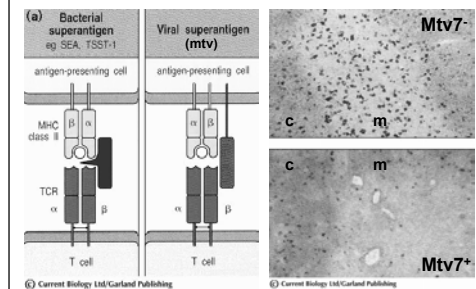
47

Sélections positive et négative (3)



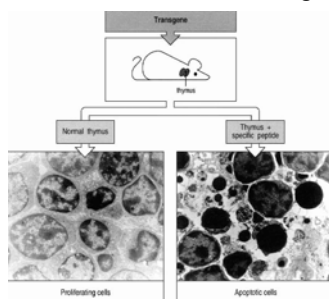
48

Délétion clonale et superantigènes



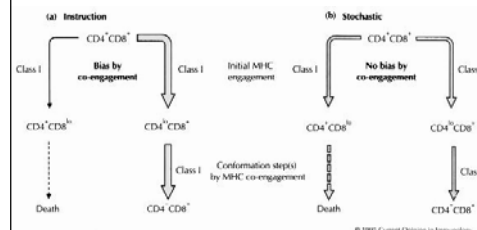
49

Délétion clonale et TCR transgénique



50

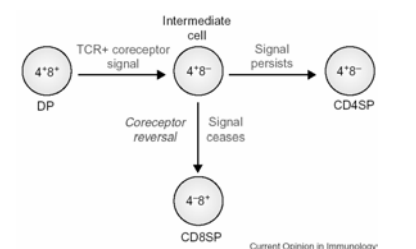
Mécanisme de la restriction au CMH (1)



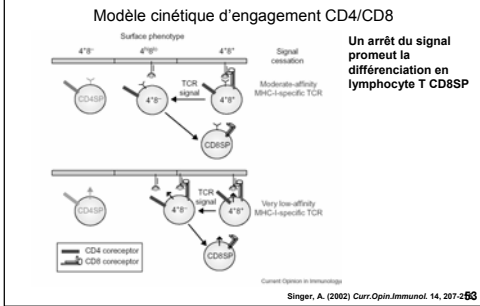
51

Mécanisme de la restriction au CMH (2)

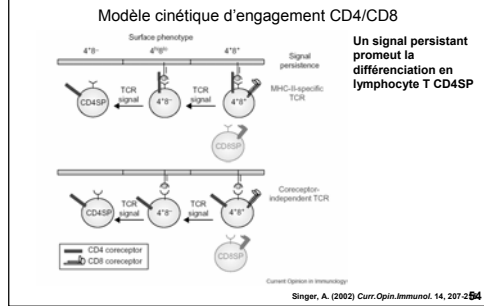
Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



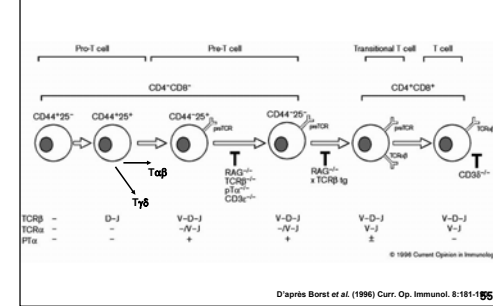
Mécanisme de la restriction au CMH (3)



Mécanisme de la restriction au CMH (4)



Différenciation thymique: souris

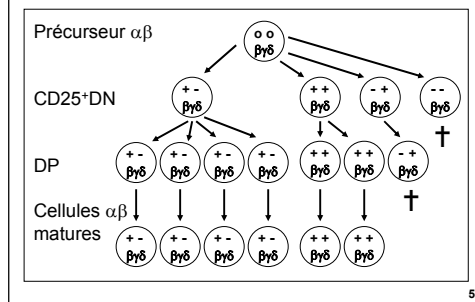


Lignées $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$

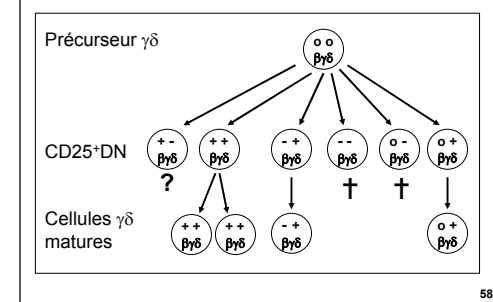
- Controverse concernant le mécanisme contrôlant le choix vers les lignées T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$
 - Certaines cellules T $\gamma\delta$ expriment TCR β
Certaines cellules T $\alpha\beta$ expriment TCR γ
 - Différent modèles proposés :
 - Réarrangements séquentiels
 - Réarrangements compétitifs
 - Lignées séparées
- Instructif
Aléatoire

56

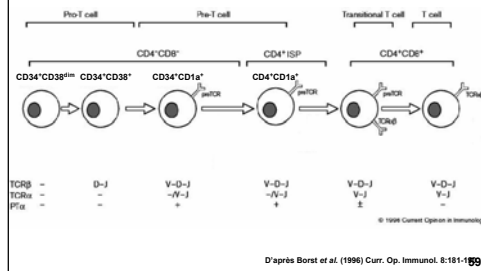
Modèle modifié de lignée séparée (1)



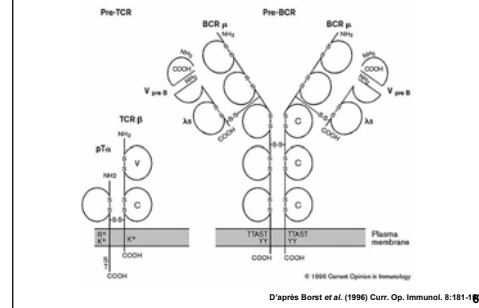
Modèle modifié de lignée séparée (2)



Différenciation thymique: homme



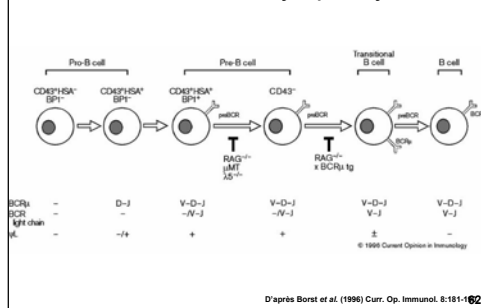
Caractérisation du pré-BCR



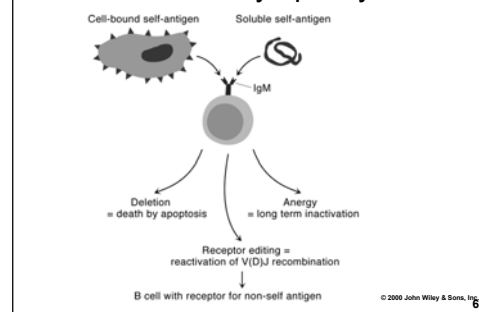
Rôle du pré-BCR

- **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



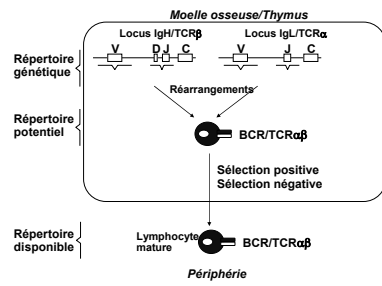
Sélection des lymphocytes B



Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

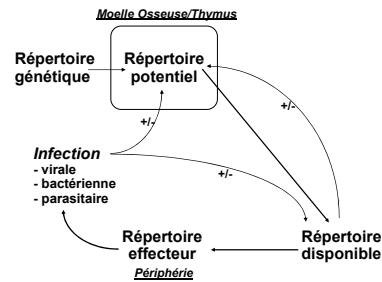
1. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
2. Développement lymphocytaire B et T
3. Sélection des répertoires

Notions de répertoires (1)



65

Notions de répertoires (2)



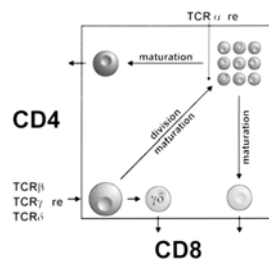
66

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Conclusion

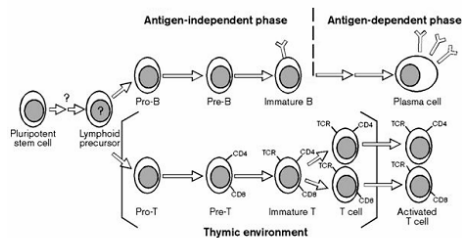
67

Rappel différenciation T



68

Parallèle différenciations B et T



© 1998 Current Opinion in Immunology

D'après Fitzsimmons et Hagman (1996) Curr. Op. Immunol. 8:166-169

Questions/Discussion...

70