

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2005 IF-IVc&IVd
21 février 2005

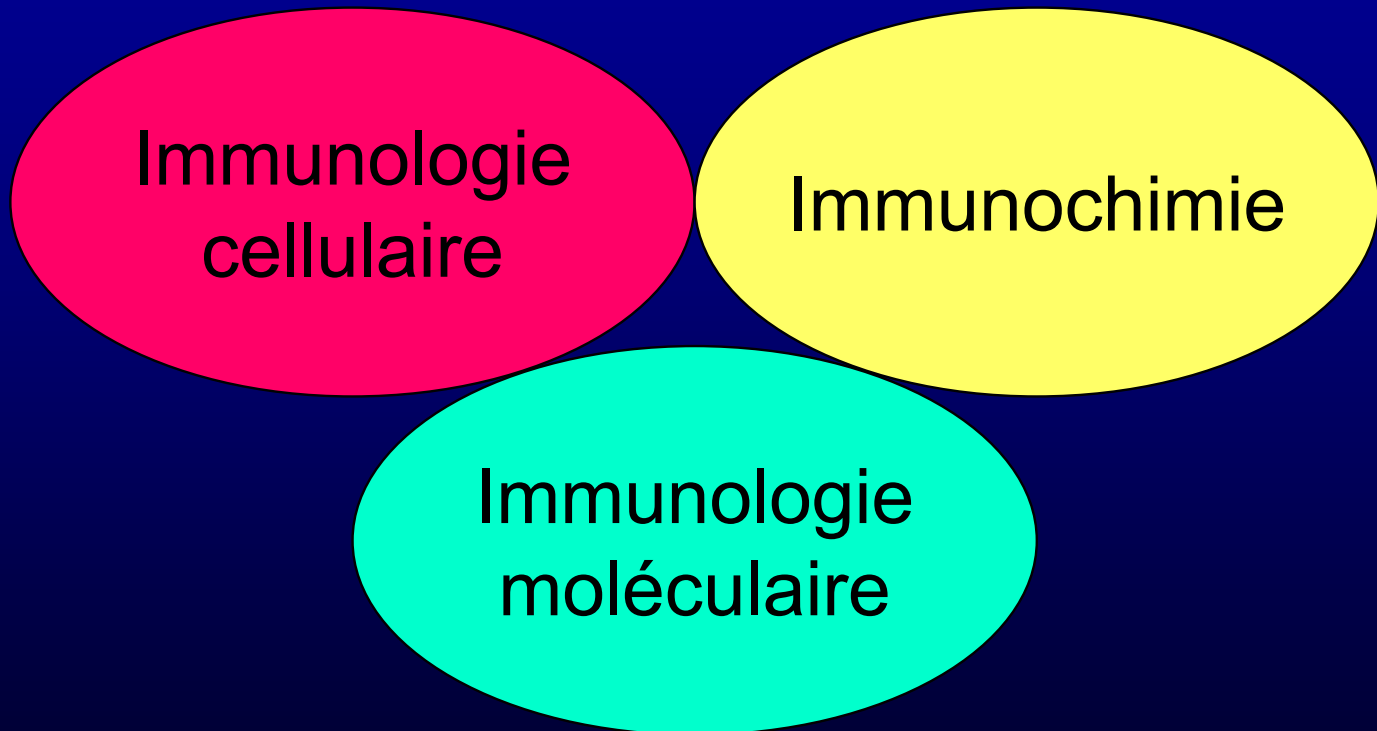
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

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:
 - **transgenèse**: 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.

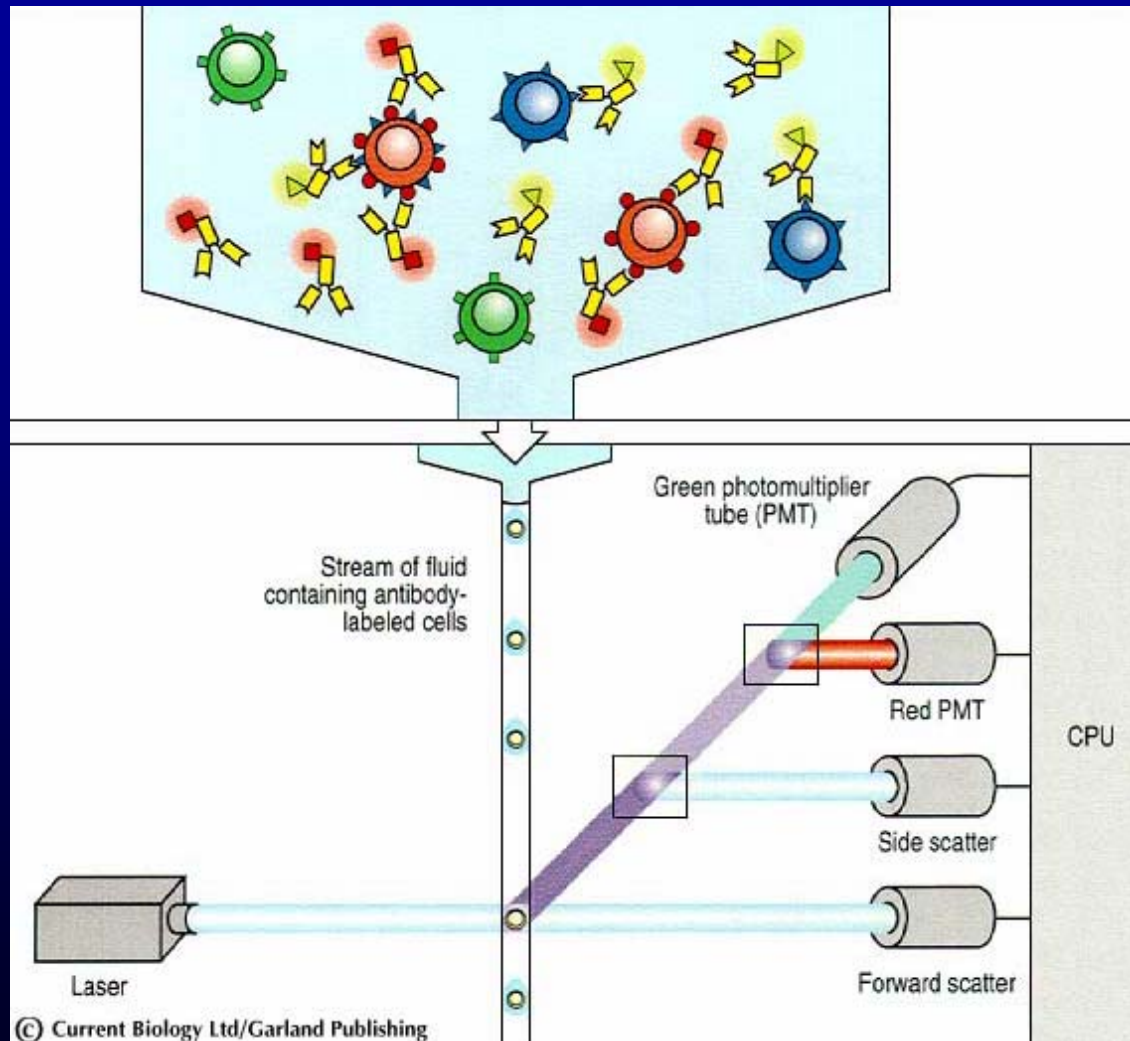
Marqueurs de différenciation T

- 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

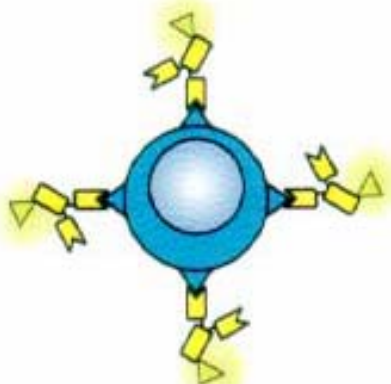
- CD5 ?
- CD19 co-récepteur du BCR
- CD21 co-récepteur du BCR; CR2
- CD28 marqueur d'activation
- CD40 activation des cellules B
- B220 isoforme de CD45
- CD79 α/β molécules associées au BCR
- CD80 activation des cellules T (B7.1)
- ...

Cytométrie de flux (1)



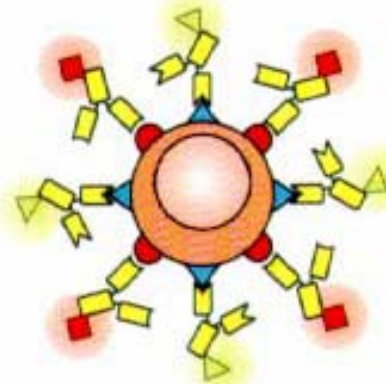
Cytométrie de flux (2)

One antibody



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

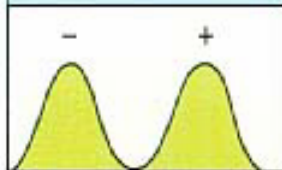
Two antibodies



Control



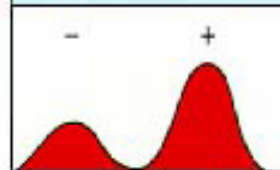
Antibody



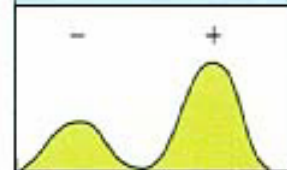
Fluorescence intensity

© Current Biology Ltd/Garland Publishing

Red antibody



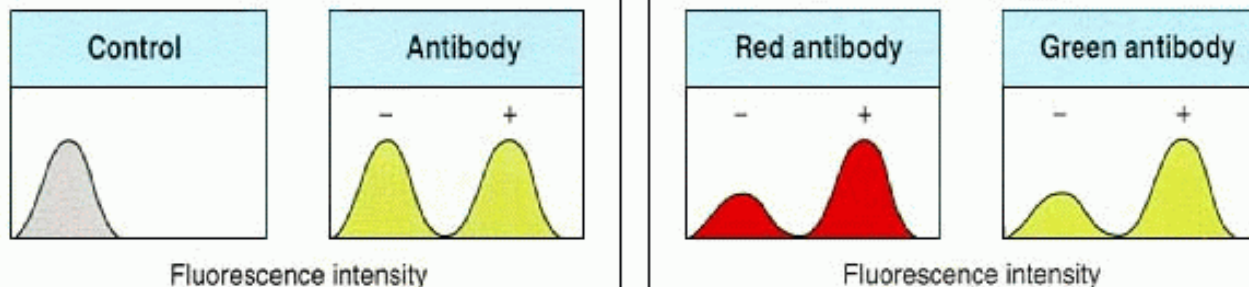
Green antibody



Fluorescence intensity

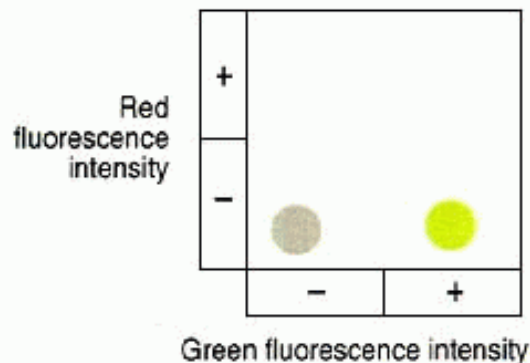
Cytométrie de flux (2)

(c) One-color histogram displays the amount of fluorescent antibody binding to each cell

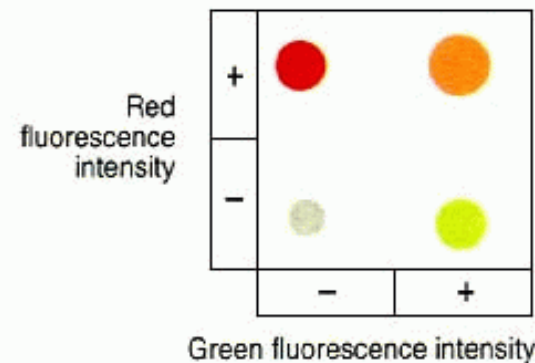


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

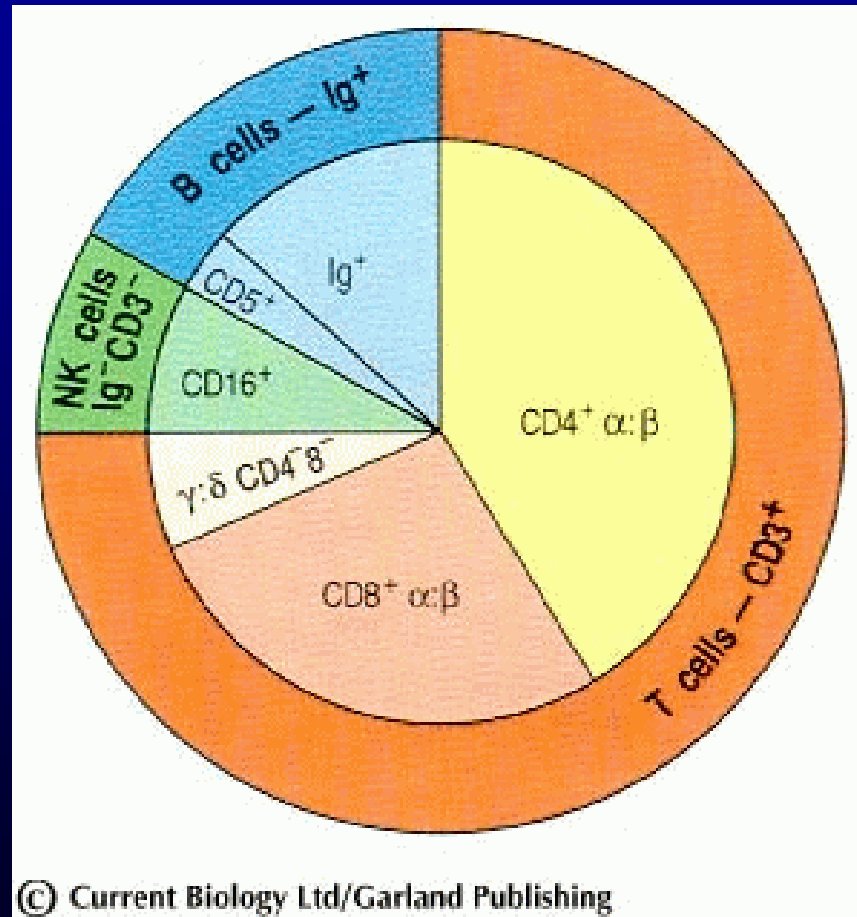
(d) Two-color contour diagrams allow multiple populations of cells to be discriminated



© Current Biology Ltd/Garland Publishing



Distribution lymphocytaire du sang périphérique humain (PBL)

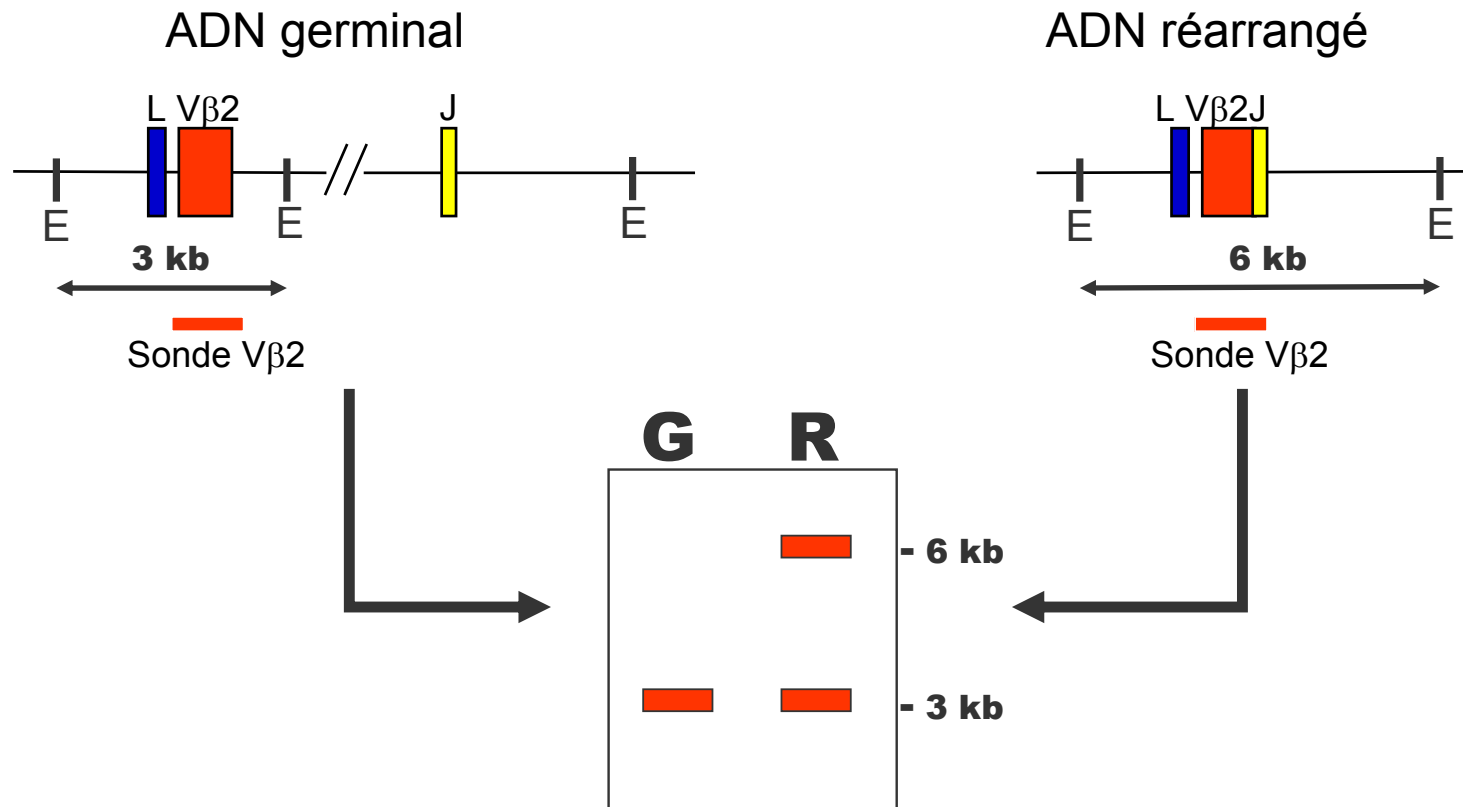


Outils de biologie moléculaire

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

Détection des réarrangements (1)

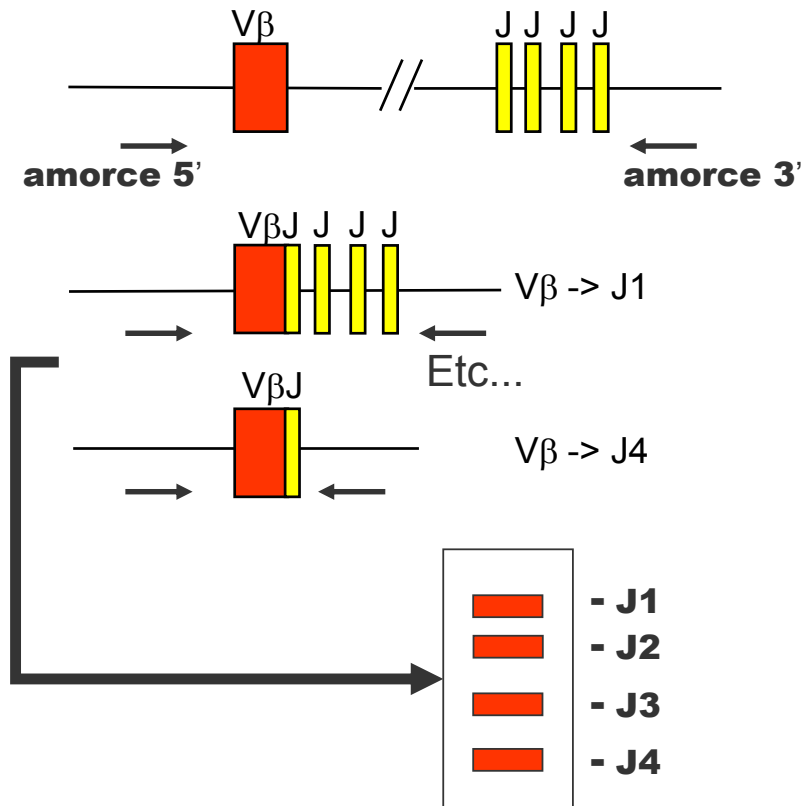
- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par Southern blot.



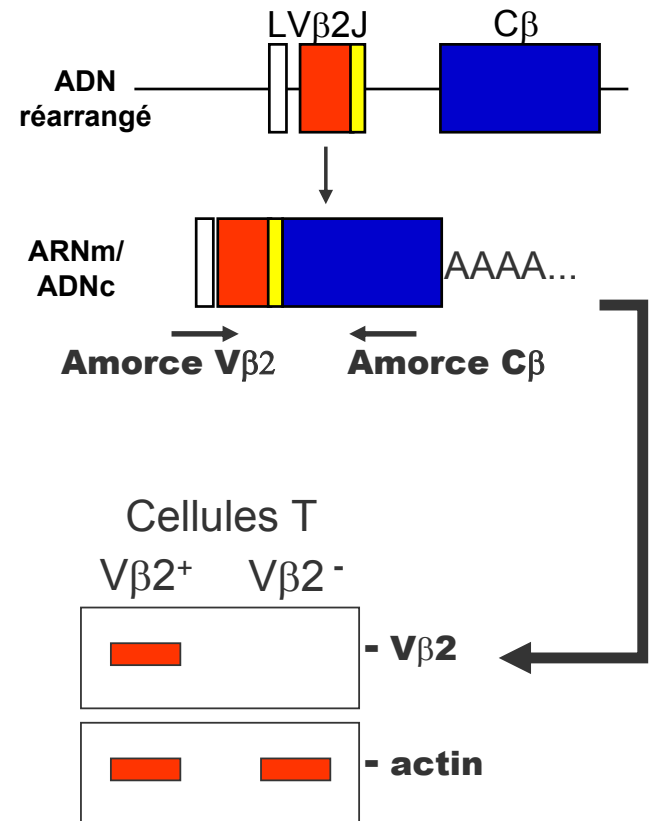
Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR au niveau ADN ou ARN.

ADN



ARN



Utilisation des animaux génétiquement modifiés

- Transgénèse
- Invalidation génique

Avantages de l'invalidation

- 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

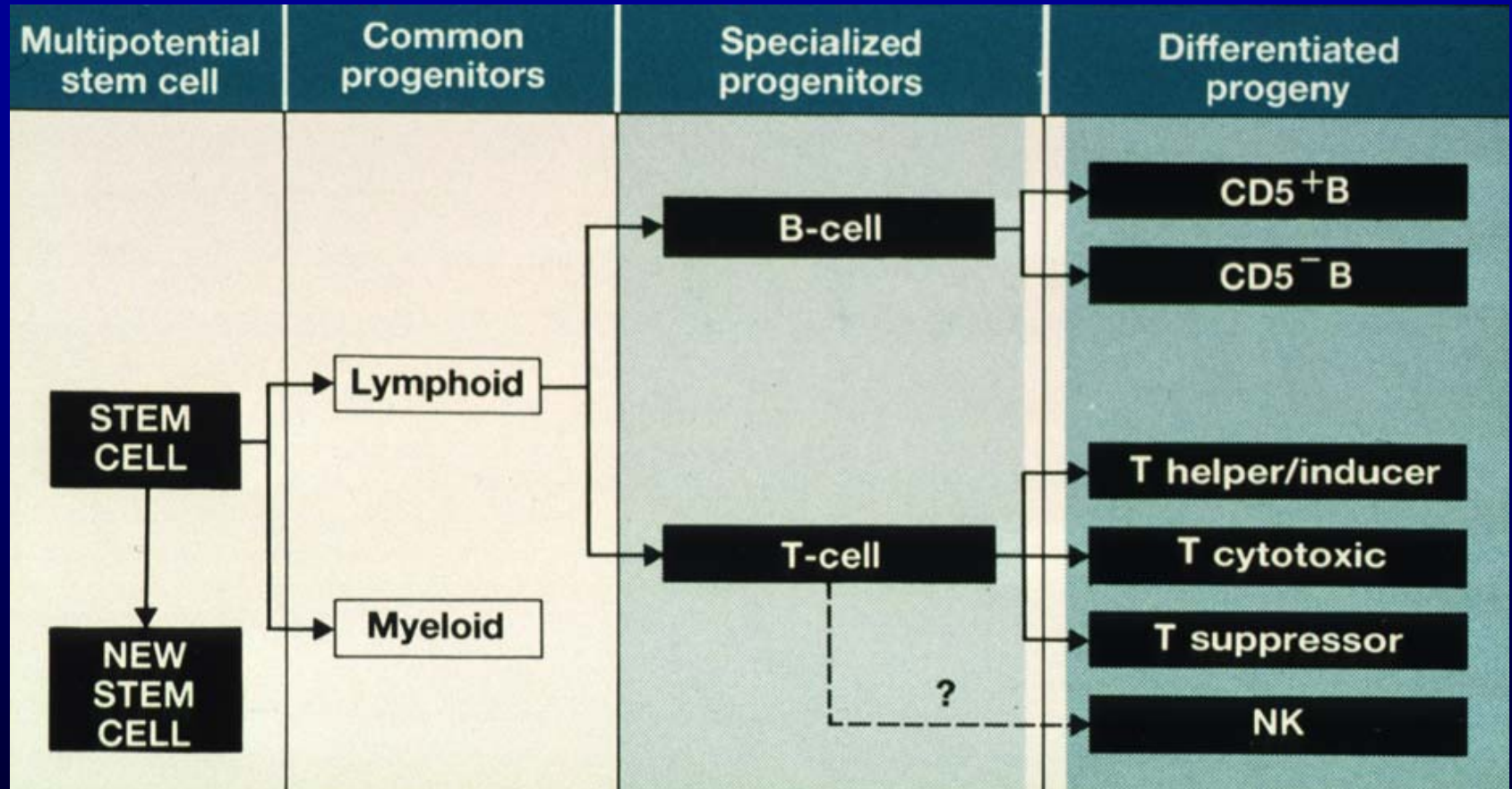
- Physiologie: rôle pour développement lymphocytaire, transduction de signaux, activation...
- Pathologie: rôle pour réponses immunitaires appropriées/inappropriées
- Thérapie: immunodéficiency, cancer...
- Nombreuses lignées de souris transgéniques ou invalidées:
Ig, TCR, IL, IL-R, CD, RAG-1, RAG-2,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

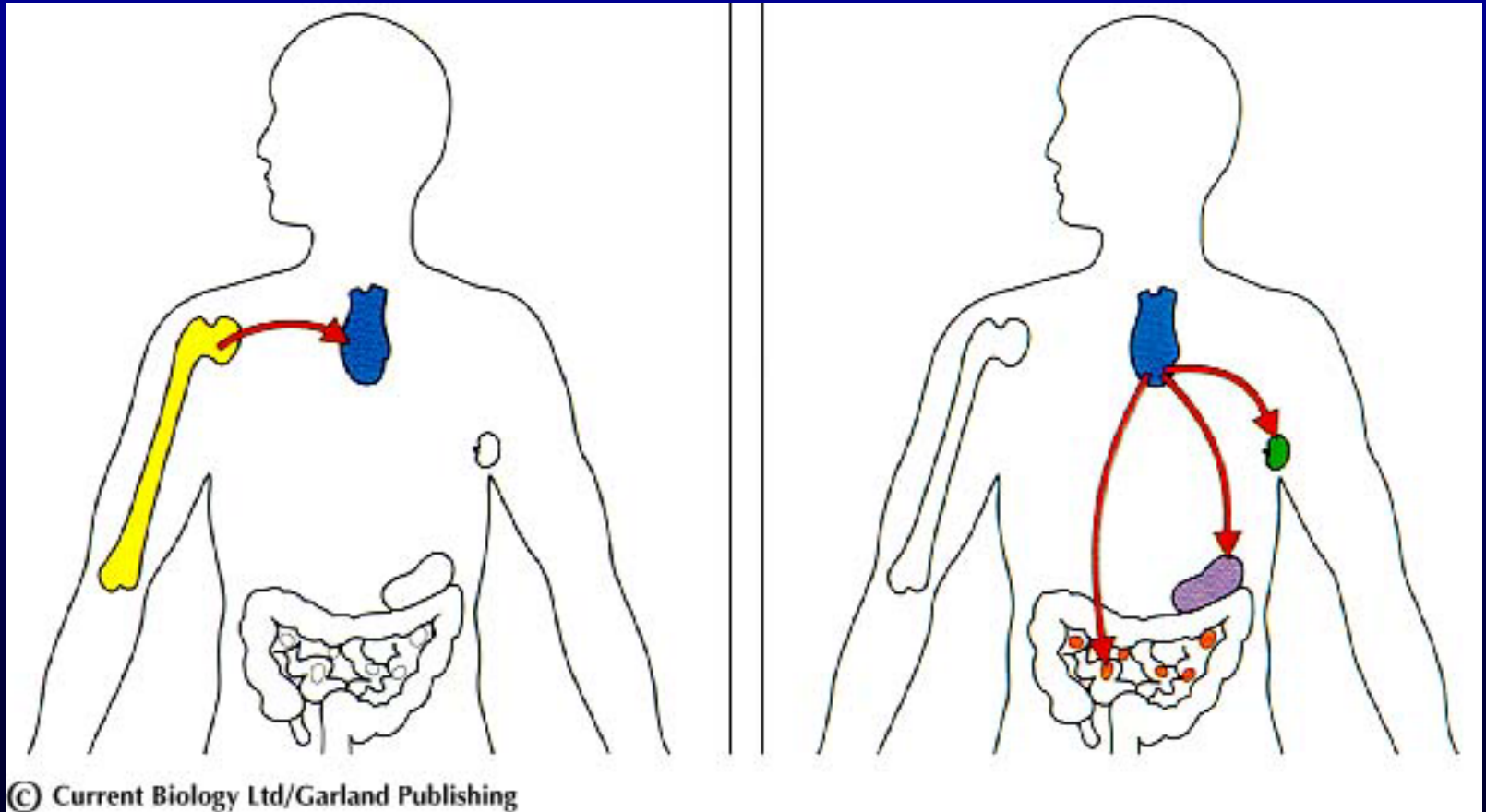
La lignée lymphocytaire



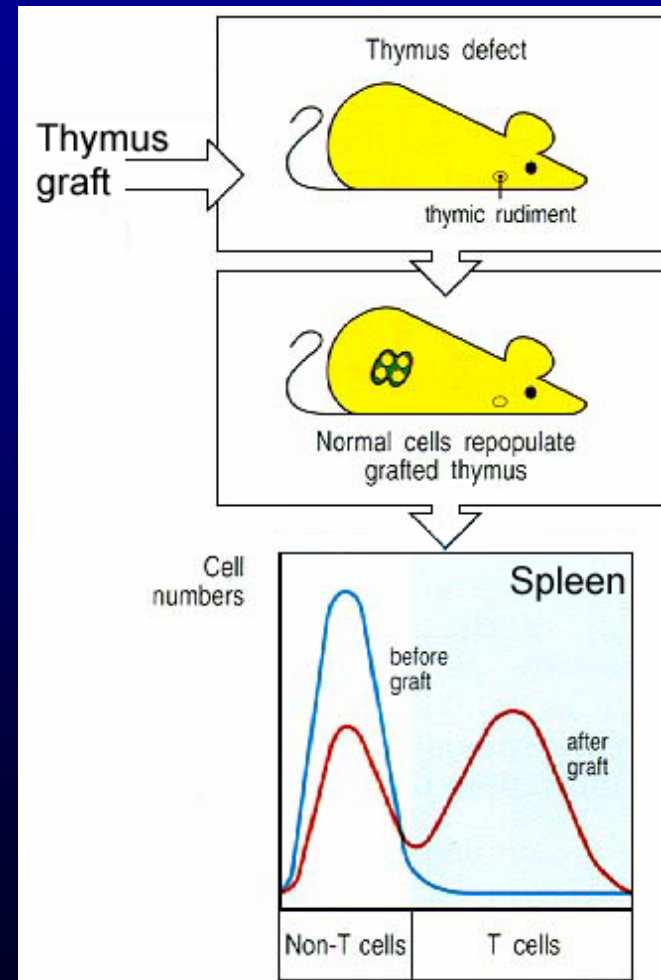
Questions

- 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

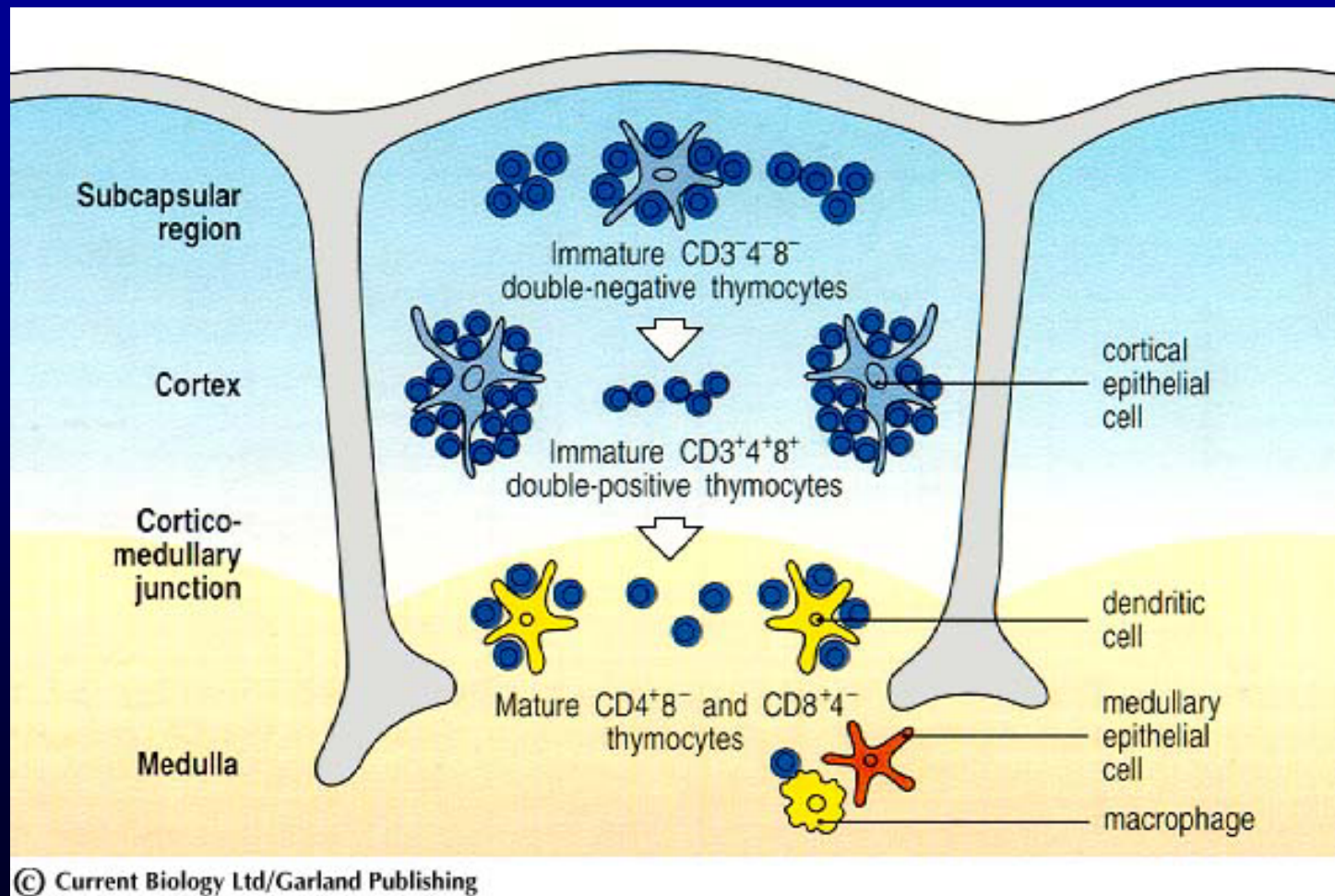
Les lymphocytes T se différencient dans le thymus



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



Architecture cellulaire du thymus



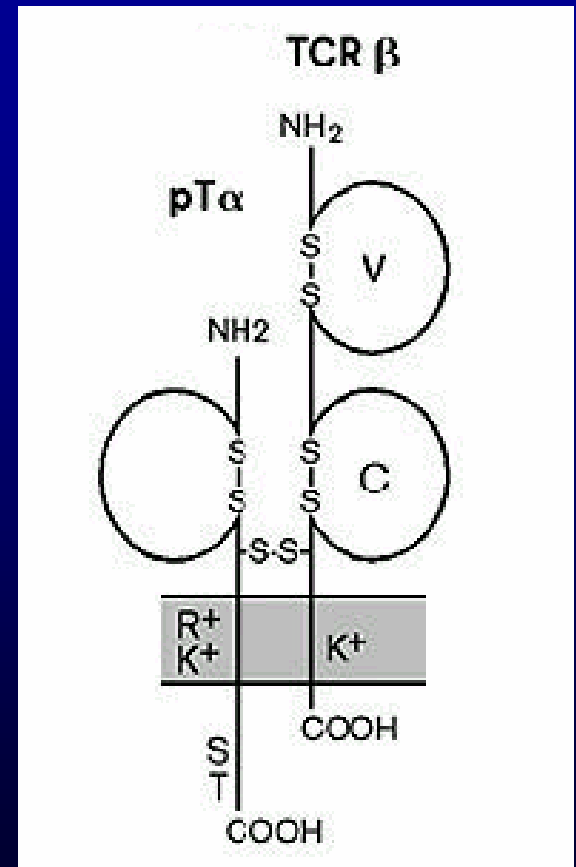
Stades de différenciation des thymocytes

- 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

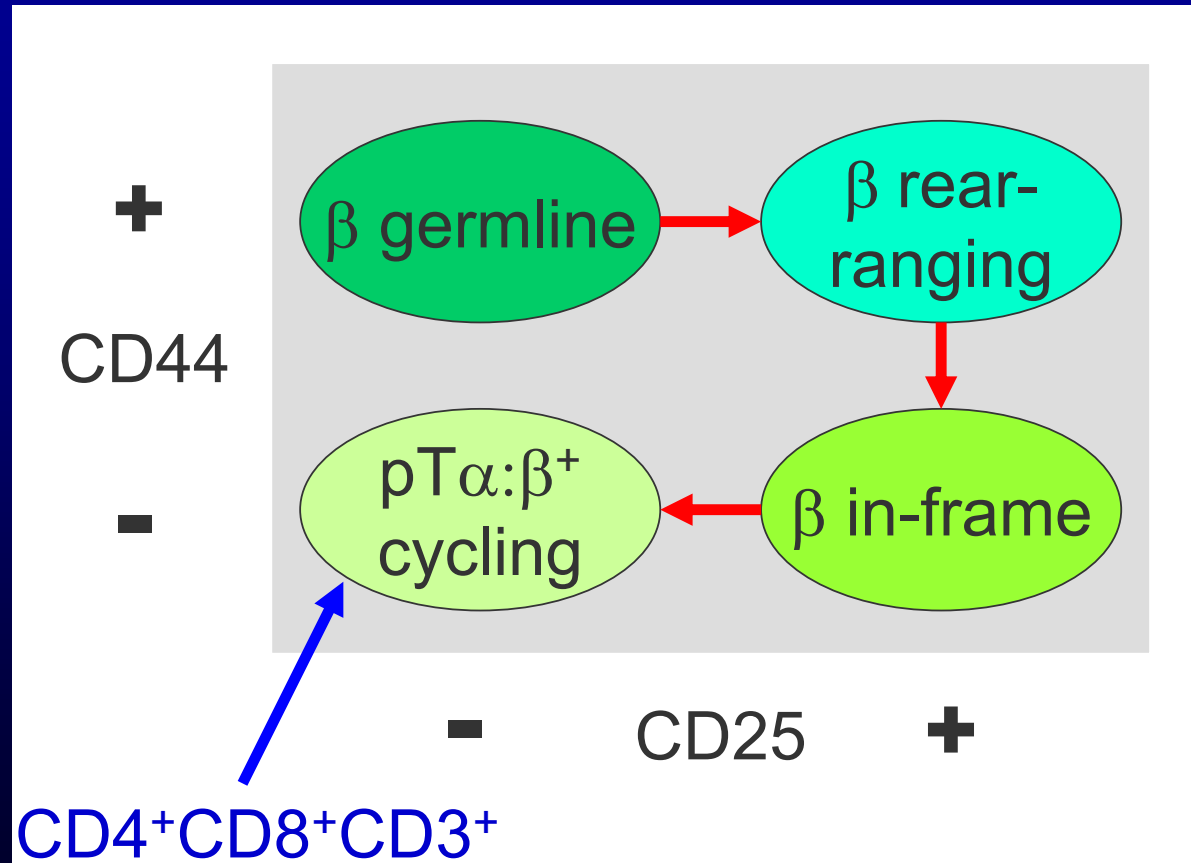
=> identification de la chaîne pT α



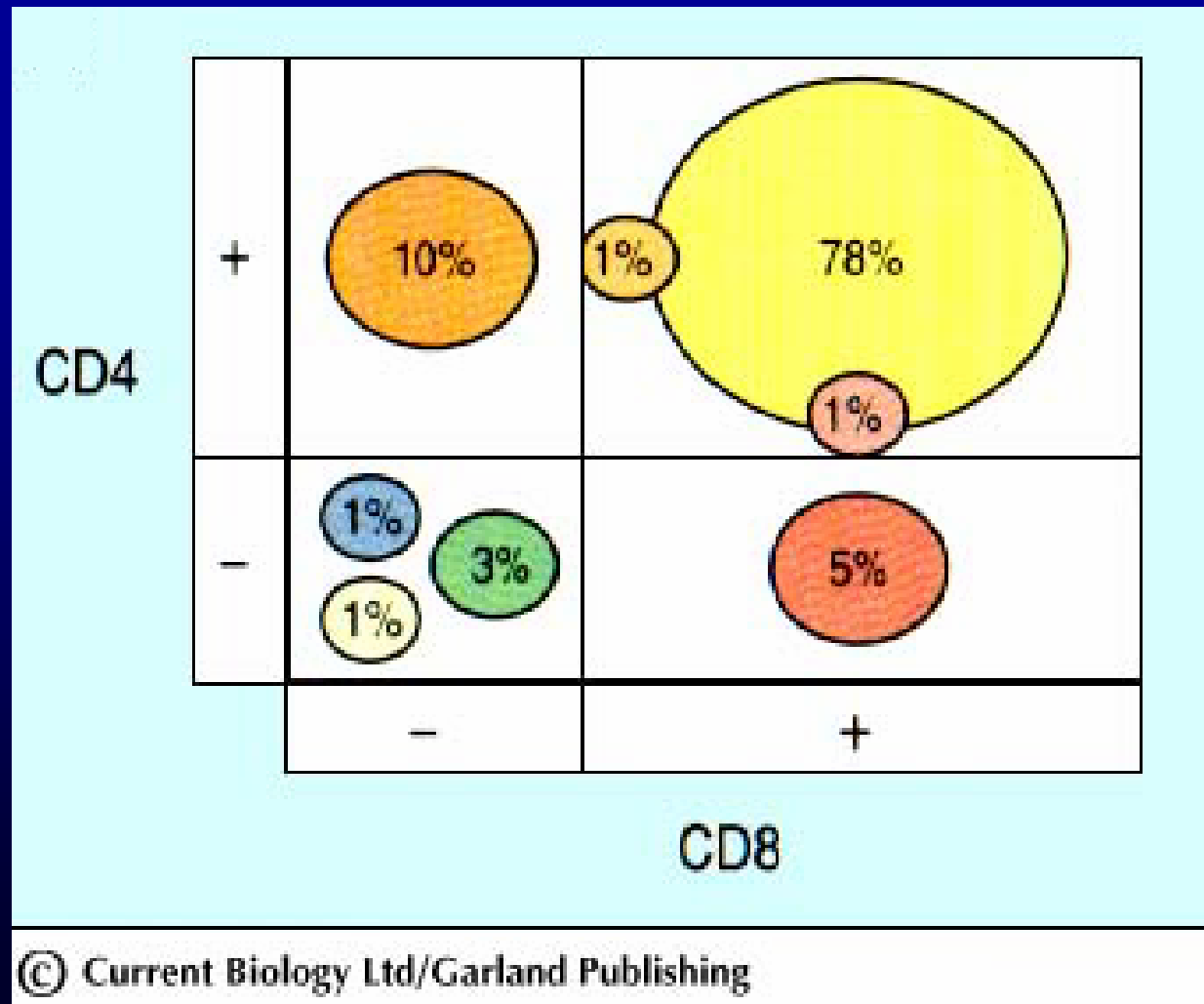
Rôle critique du pré-TCR

- 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

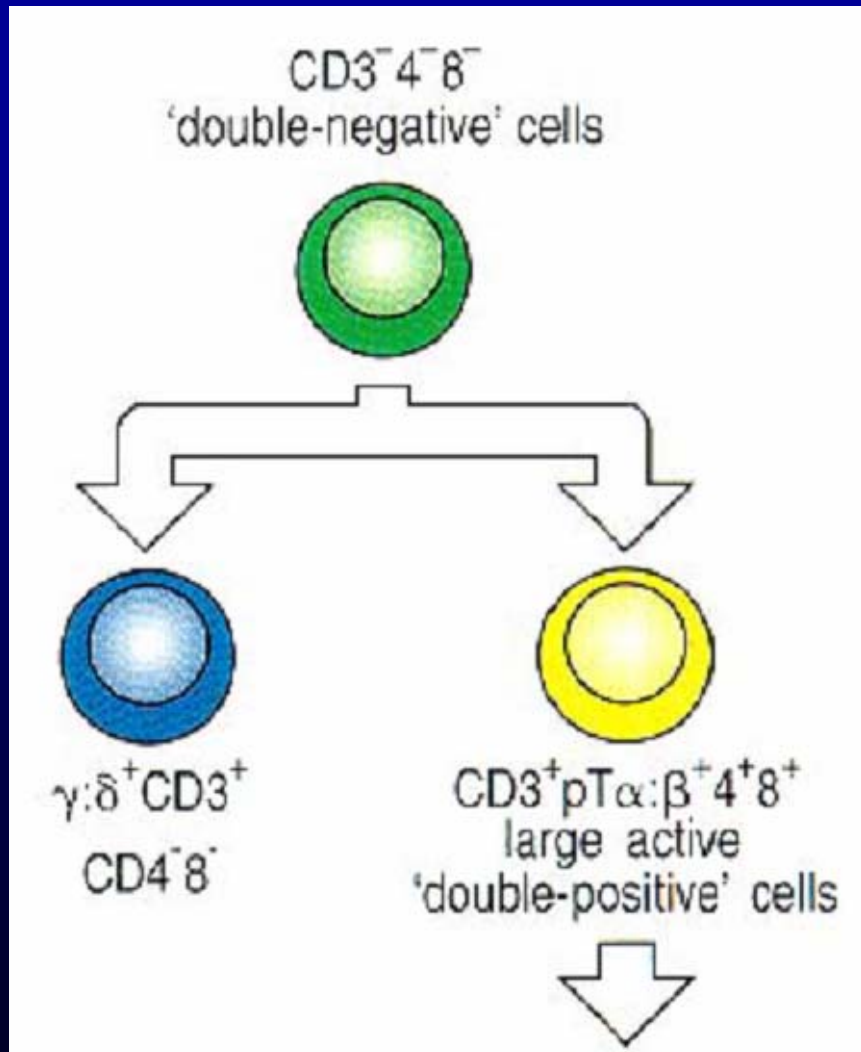
Différenciation des thymocytes (1)



Différenciation des thymocytes (2)



Différenciation des thymocytes (3)



Engagement
CD3 cytoplasmique

Réarrangements β , γ , δ
pT α cytoplasmique
Engagement $\alpha\beta/\gamma\delta$

Expression CD4/CD8
Exclusion allélique β
Prolifération
Réarrangement TCR α

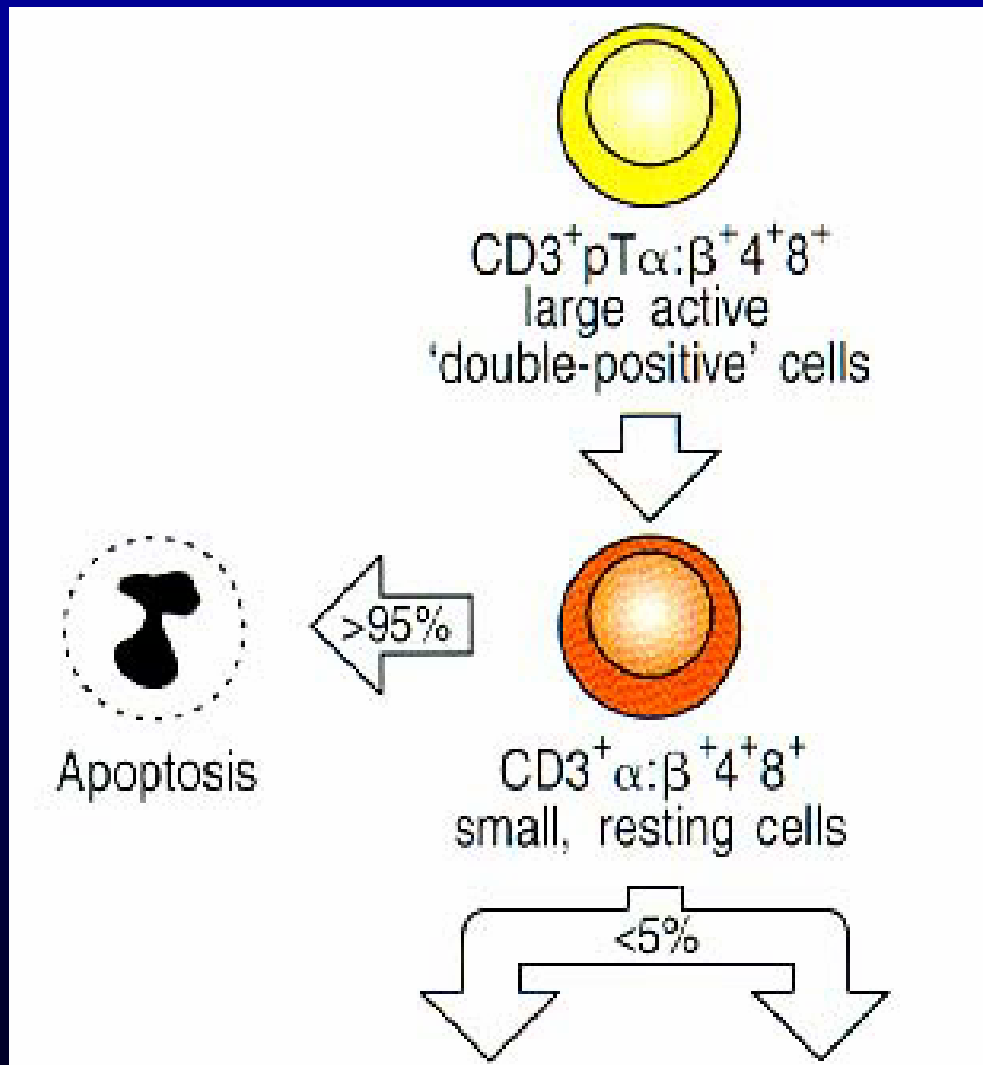
Exclusion allélique

- 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

Régulation des réarrangements

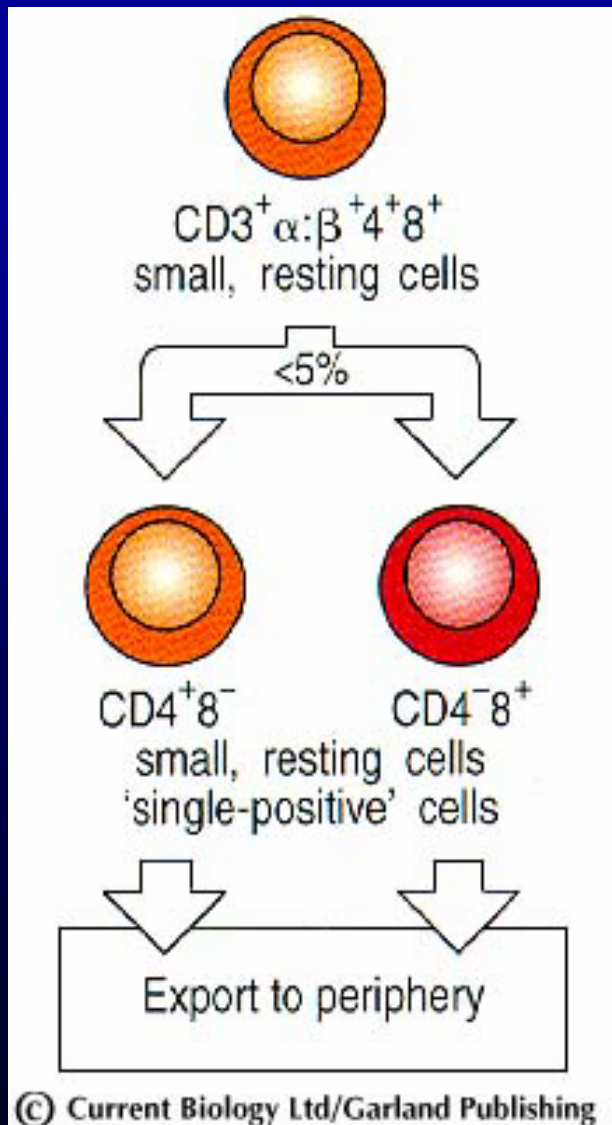
- TCR δ , TCR γ et TCR β réarrangent en même temps au stade pro-T
- Les réarrangements TCR α sont limités aux thymocytes pré-T DP engagés vers la lignée $\alpha\beta$ et exprimant TCR β
- A l'inverse de TCR β , les réarrangements TCR α ont lieu sur les deux chromosomes → l'exclusion allélique a lieu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

Différenciation des thymocytes (4)



Sélection positive
Sélection négative

Différenciation des thymocytes (5)



Sélection positive
Sélection négative

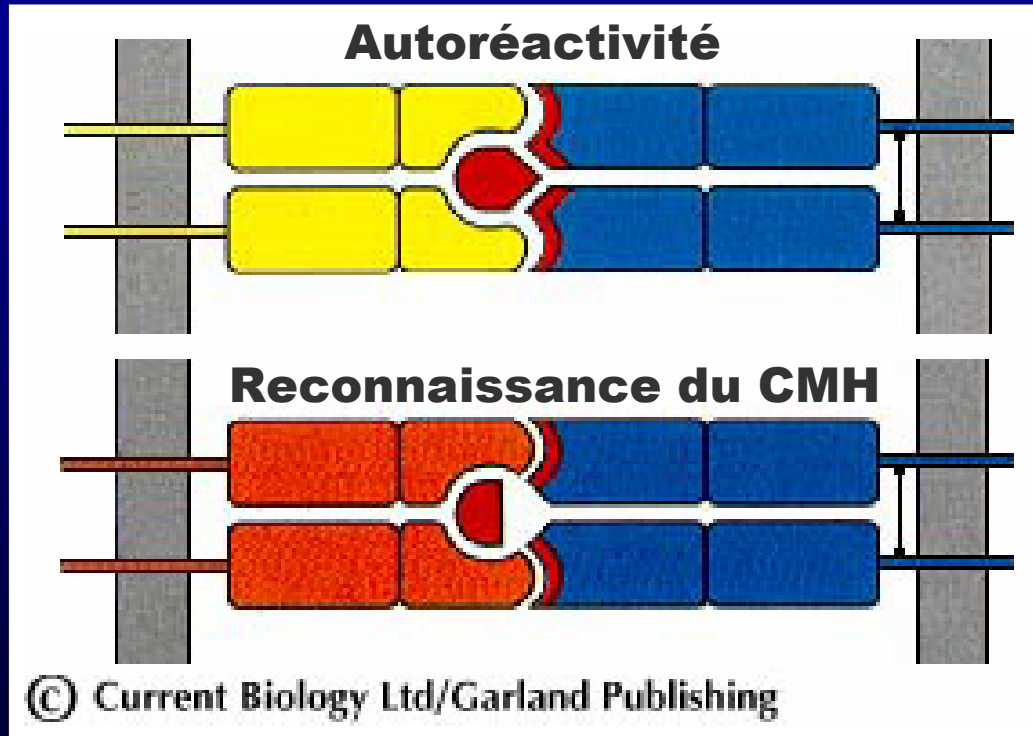
Engagement CD4/CD8
Restriction pour le CMH
Fonction effectrice

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)

CMH TCR

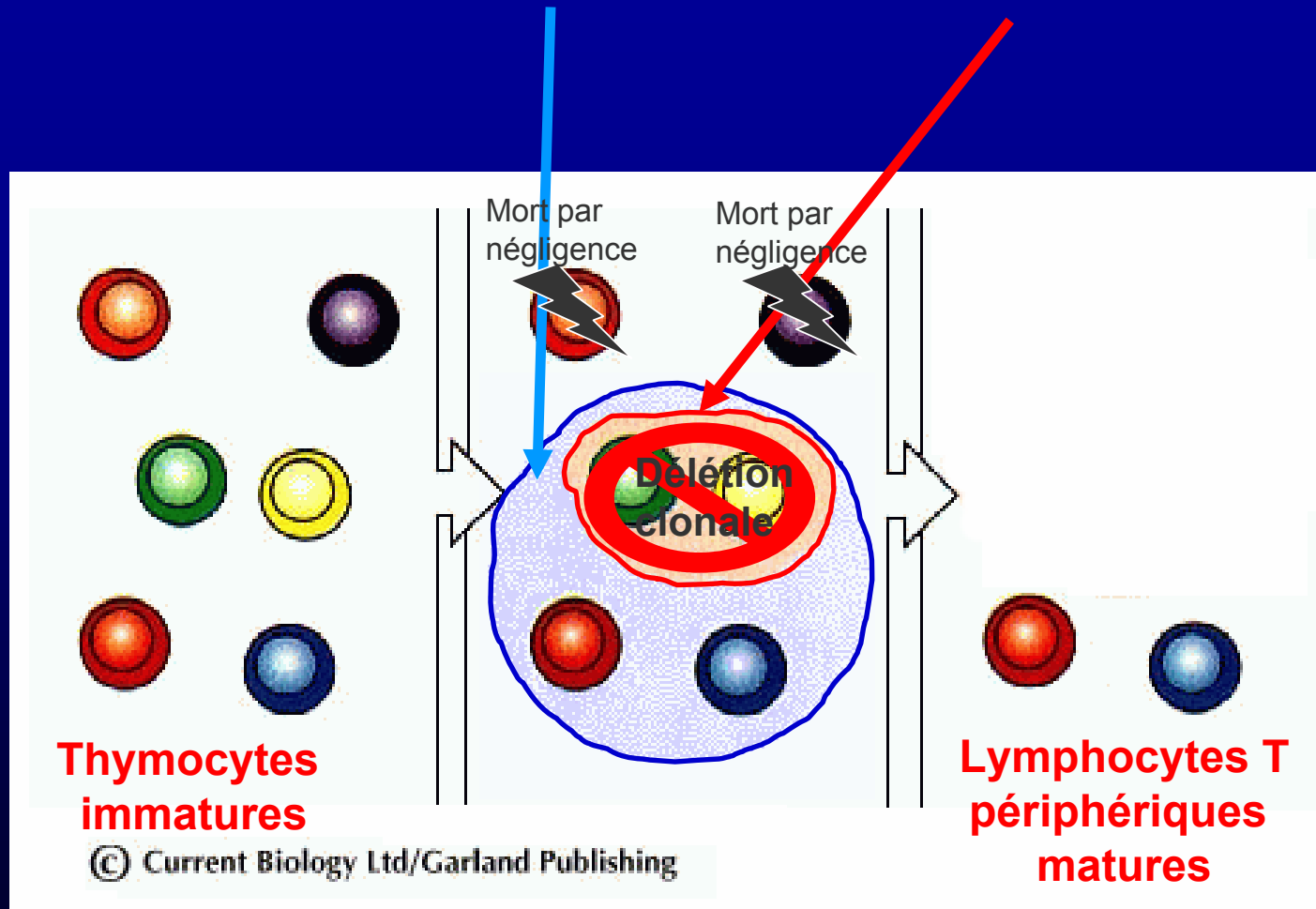


→ **Sélection négative**

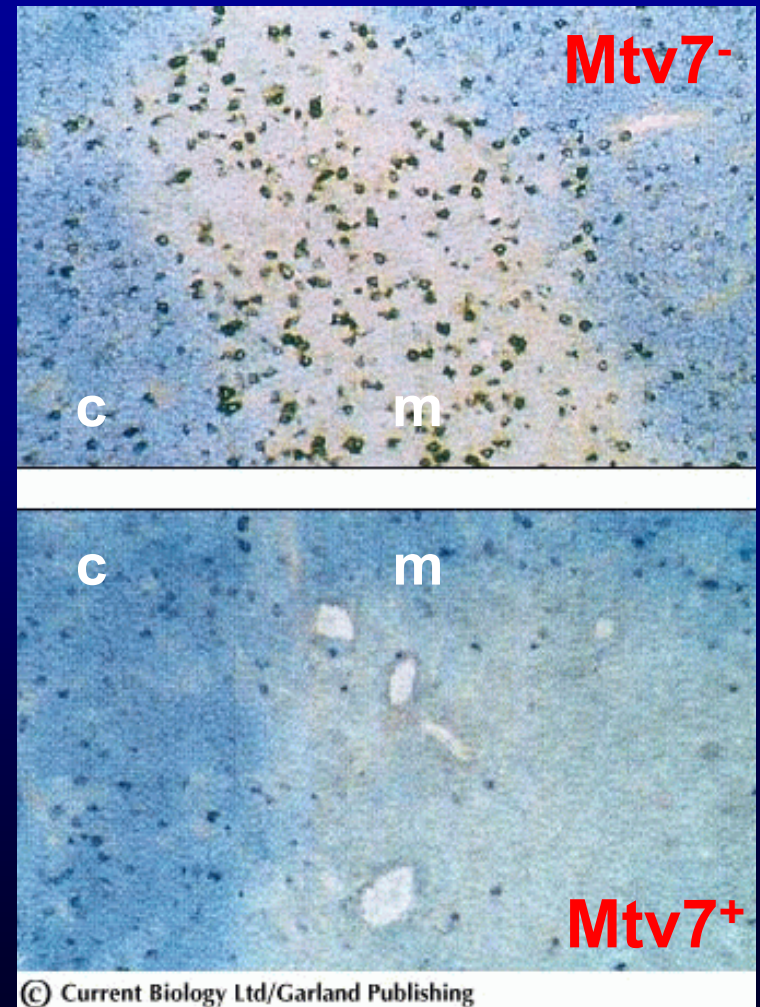
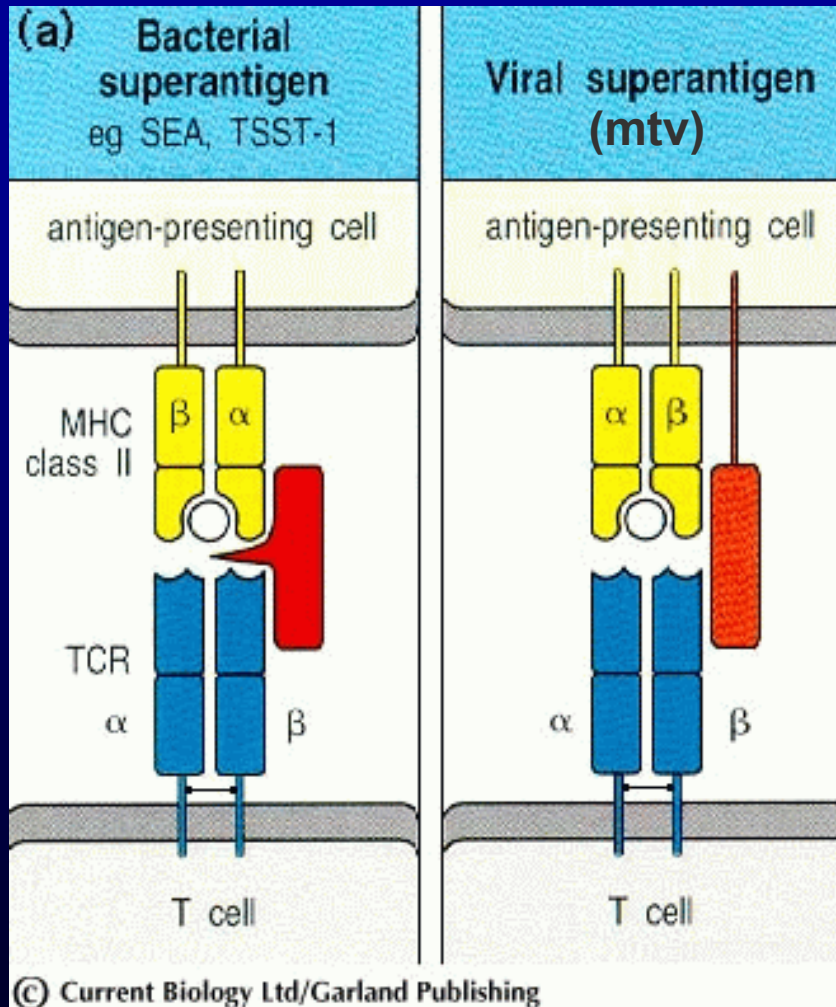
→ **Sélection positive**

→ *Éducation thymique*

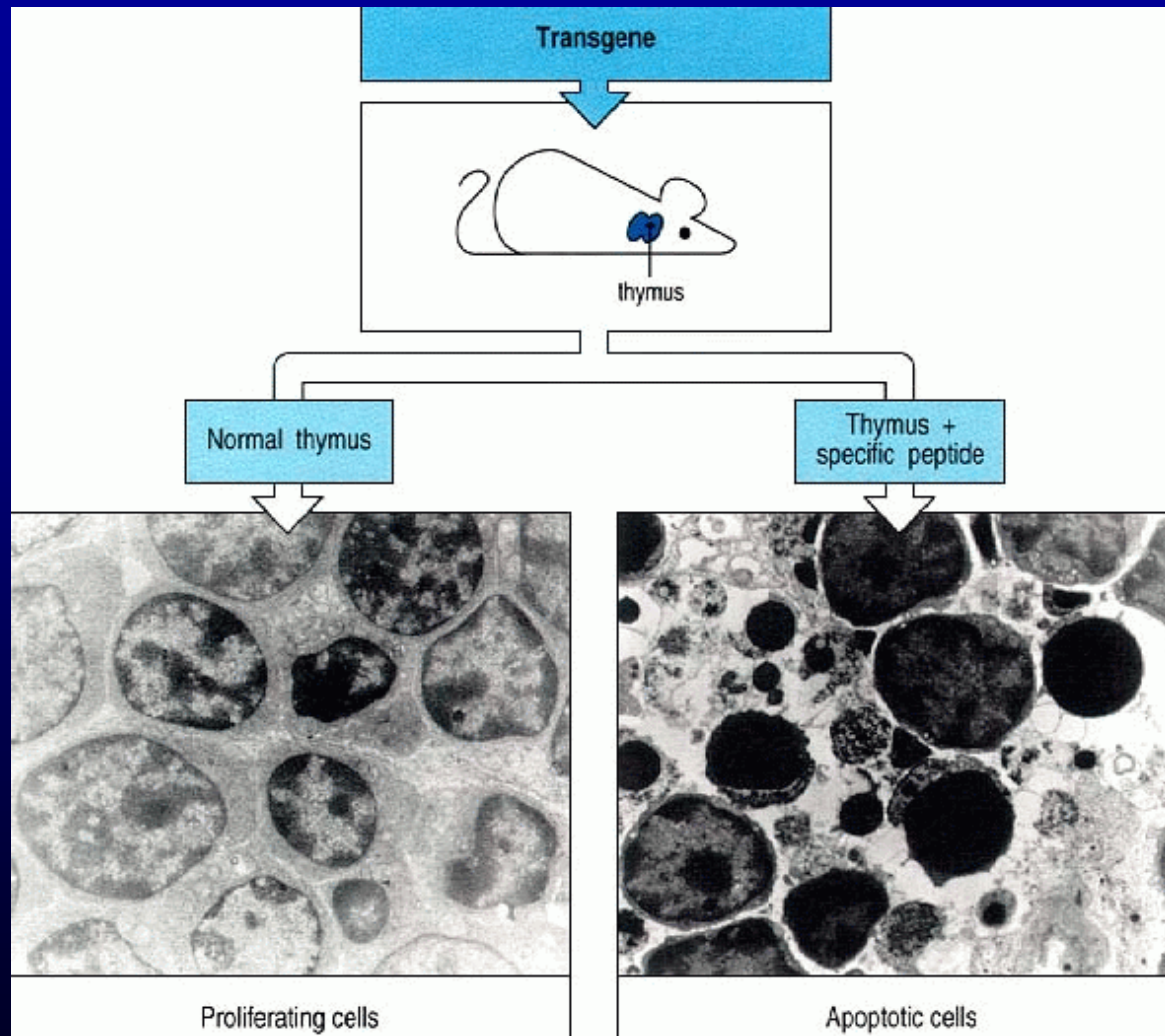
Sélections positive et négative (3)



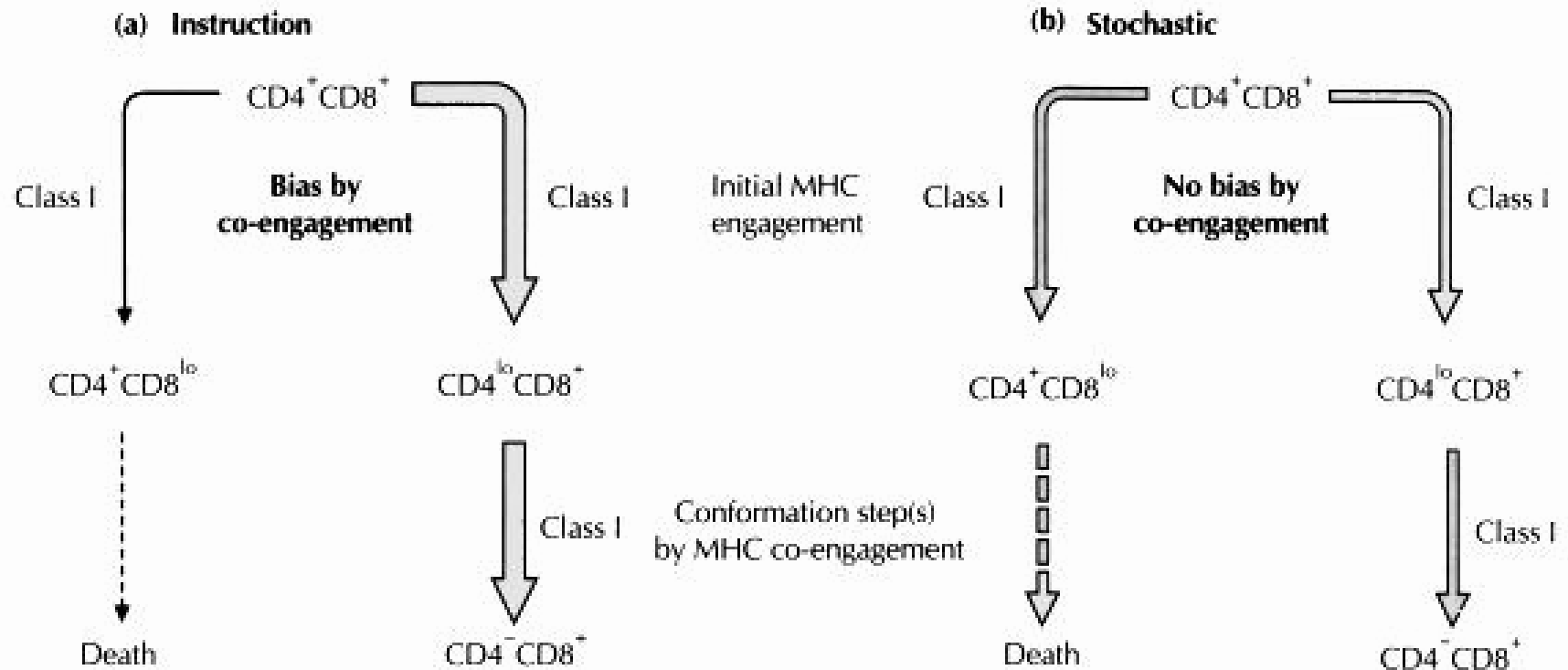
Délétion clonale et superantigènes



Délétion clonale et TCR transgénique



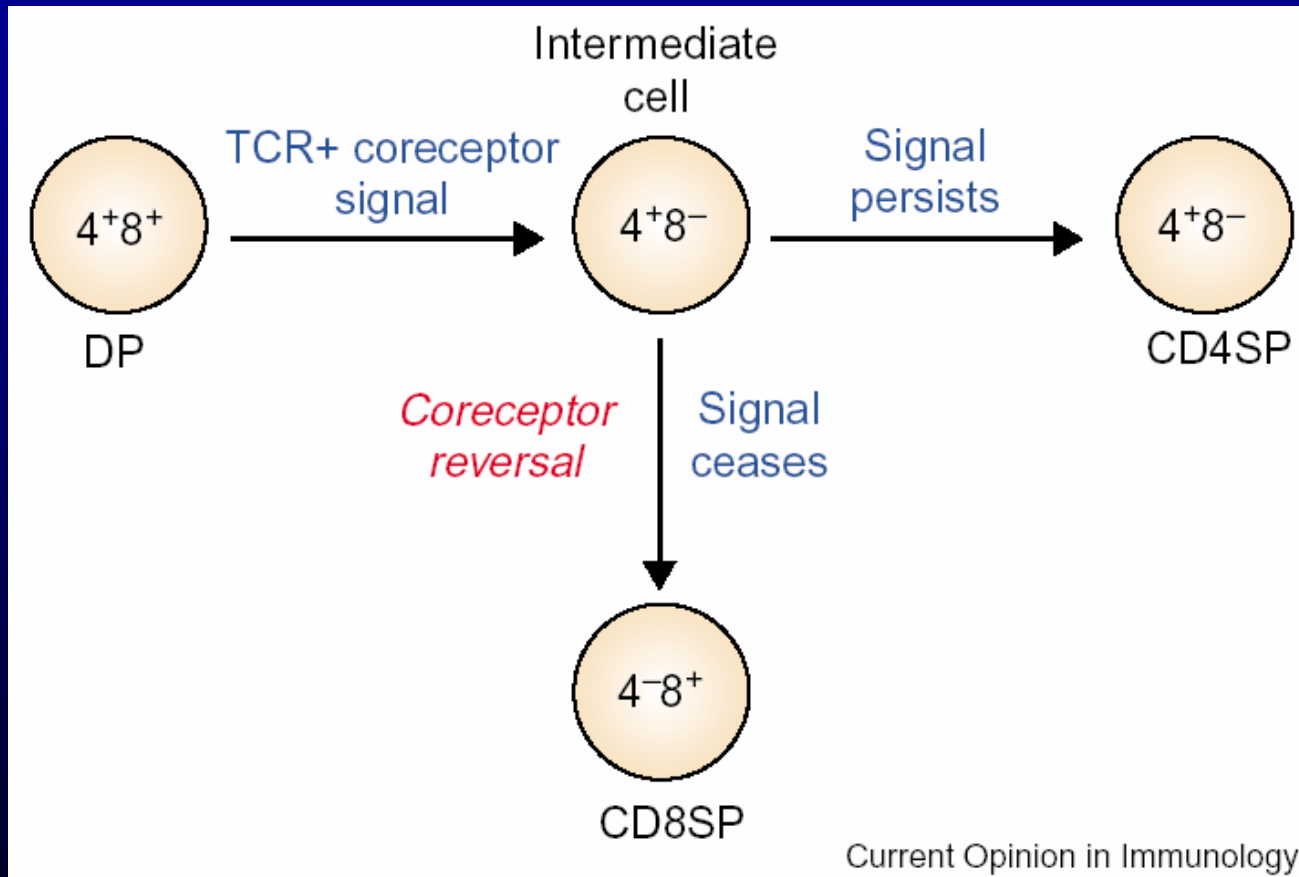
Mécanisme de la restriction au CMH (1)



© 1995 Current Opinion in Immunology

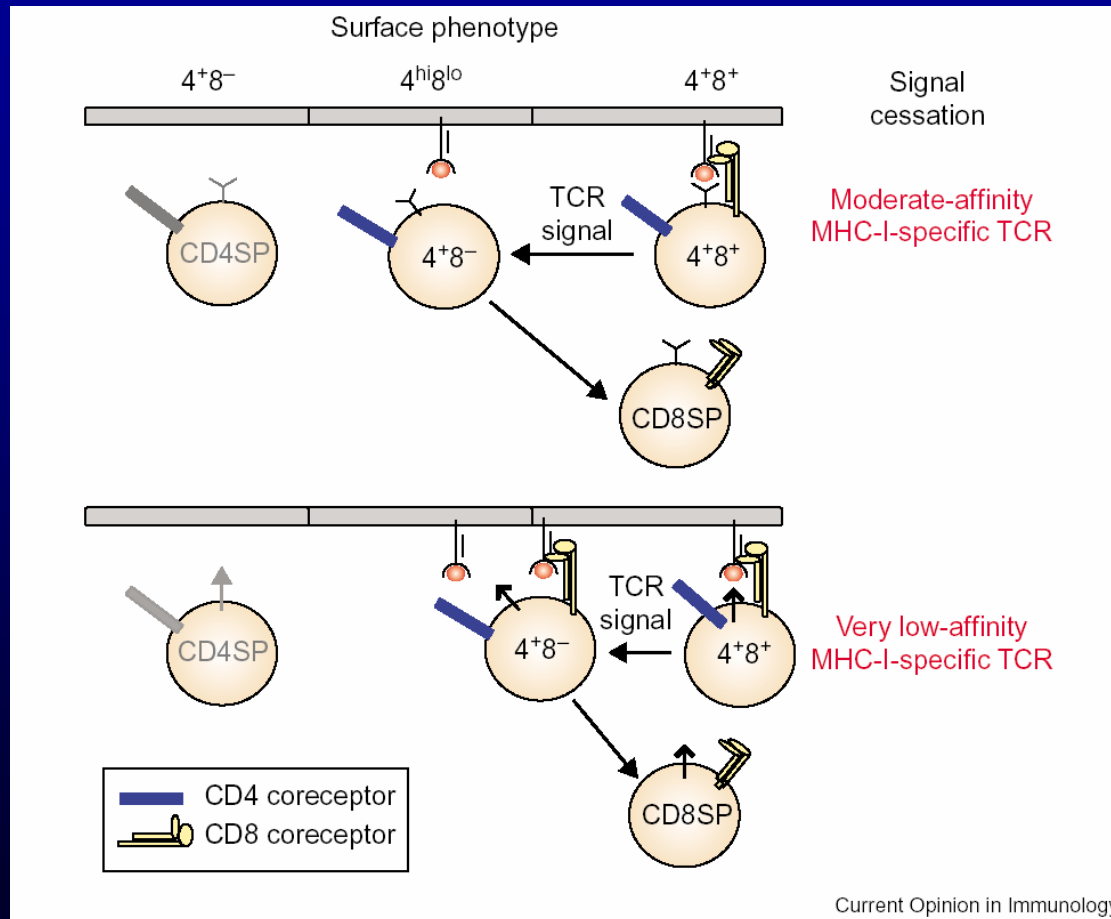
Mécanisme de la restriction au CMH (2)

Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



Mécanisme de la restriction au CMH (3)

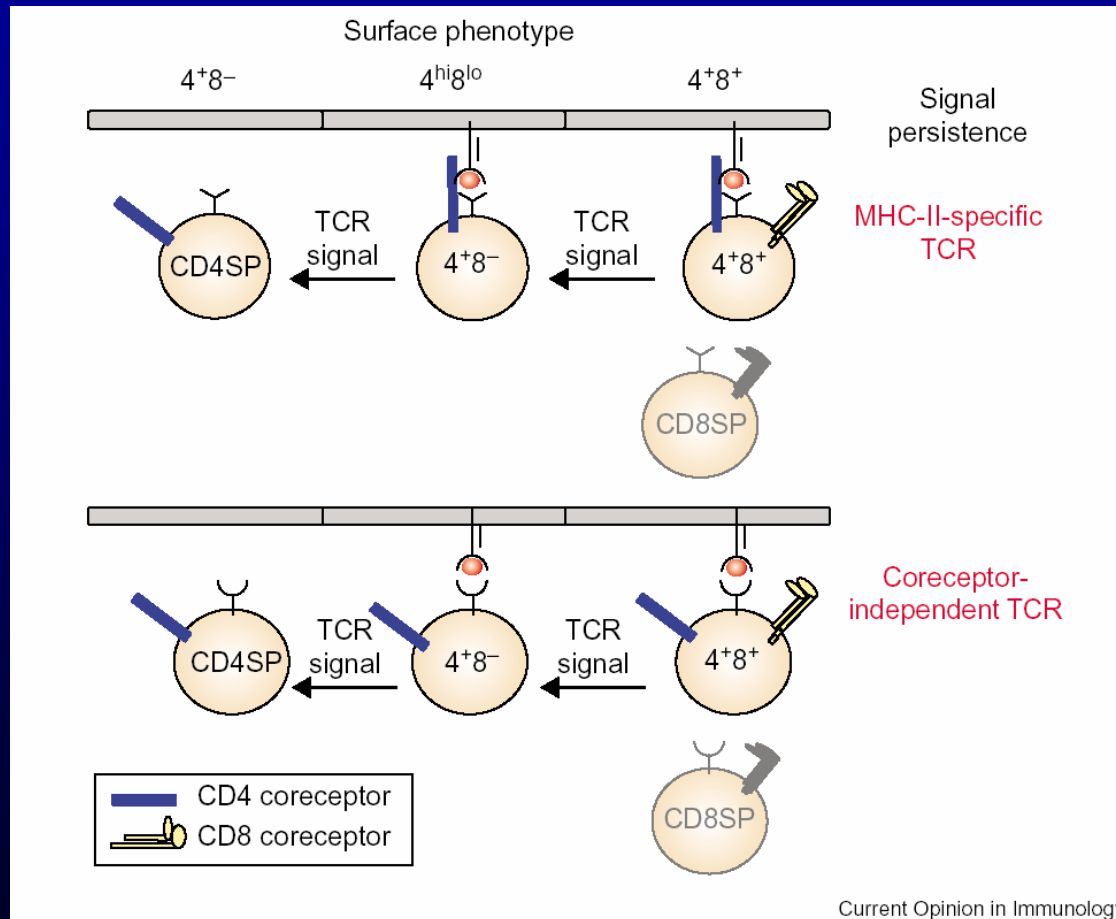
Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



**Un arrêt du signal
promeut la
différenciation en
lymphocyte T CD8SP**

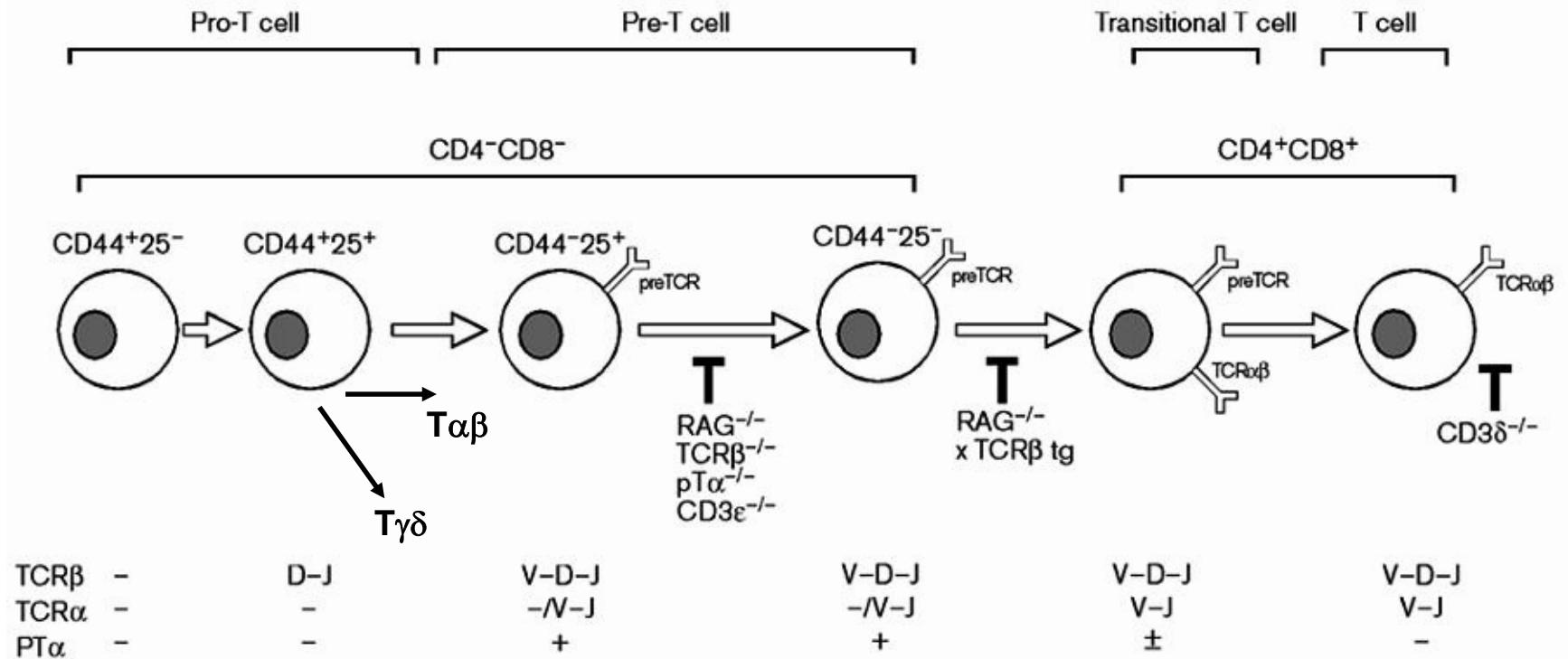
Mécanisme de la restriction au CMH (4)

Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



**Un signal persistant
promeut la
différenciation en
lymphocyte T CD4SP**

Différenciation thymique: souris



© 1996 Current Opinion in Immunology

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

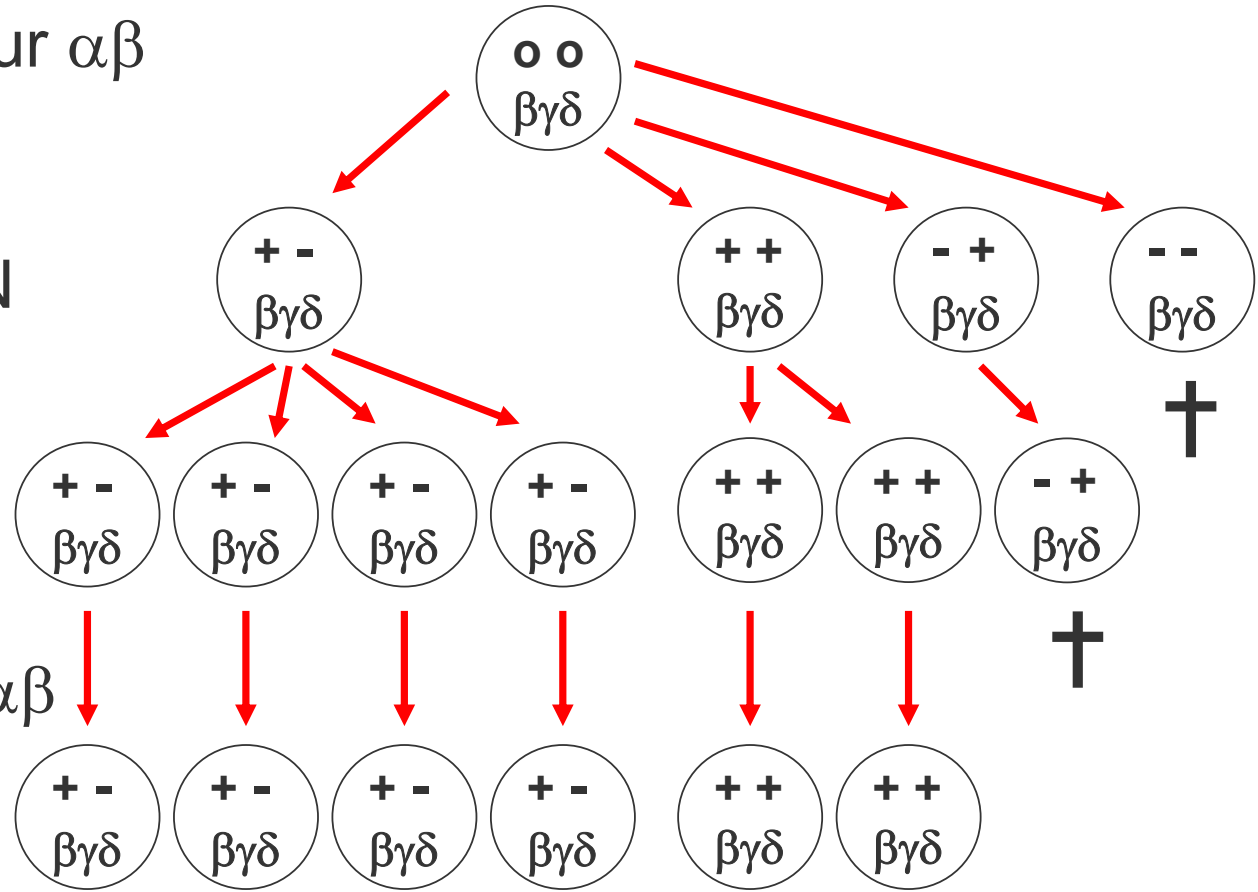
Modèle modifié de lignée séparée (1)

Précurseur $\alpha\beta$

CD25⁺DN

DP

Cellules $\alpha\beta$
matures

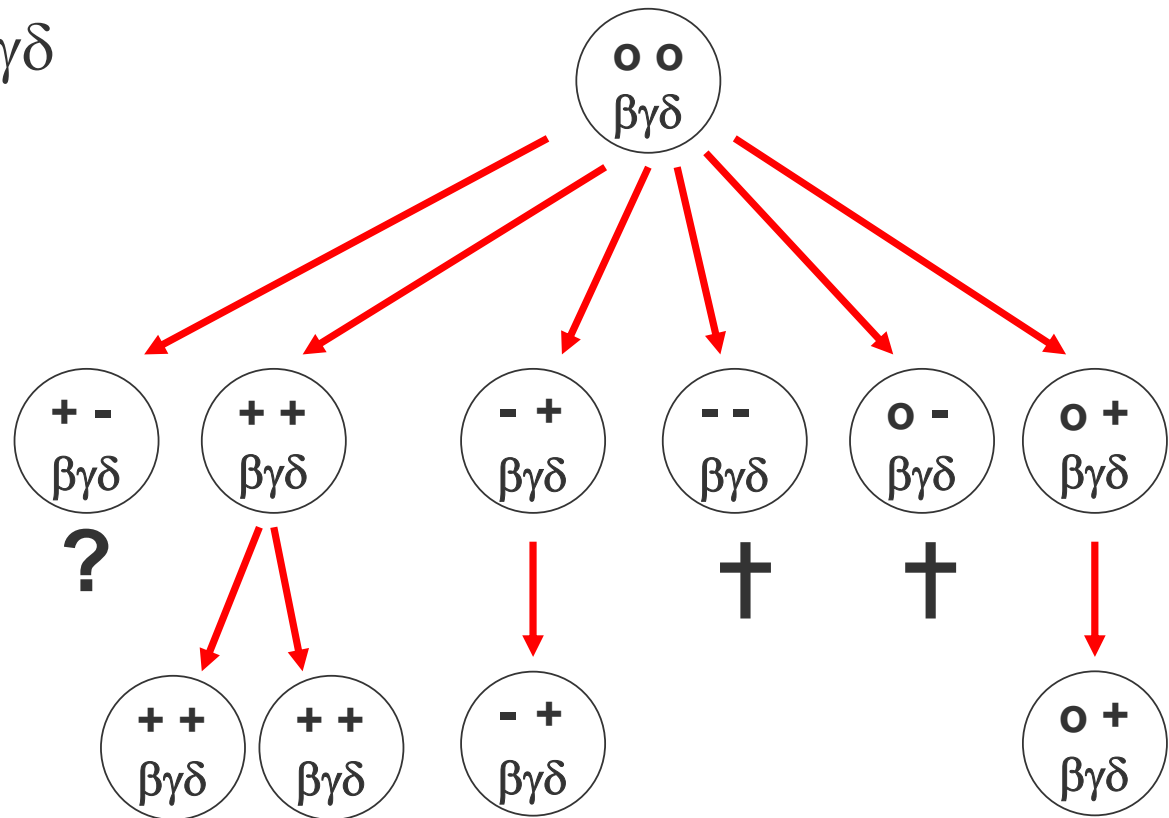


Modèle modifié de lignée séparée (2)

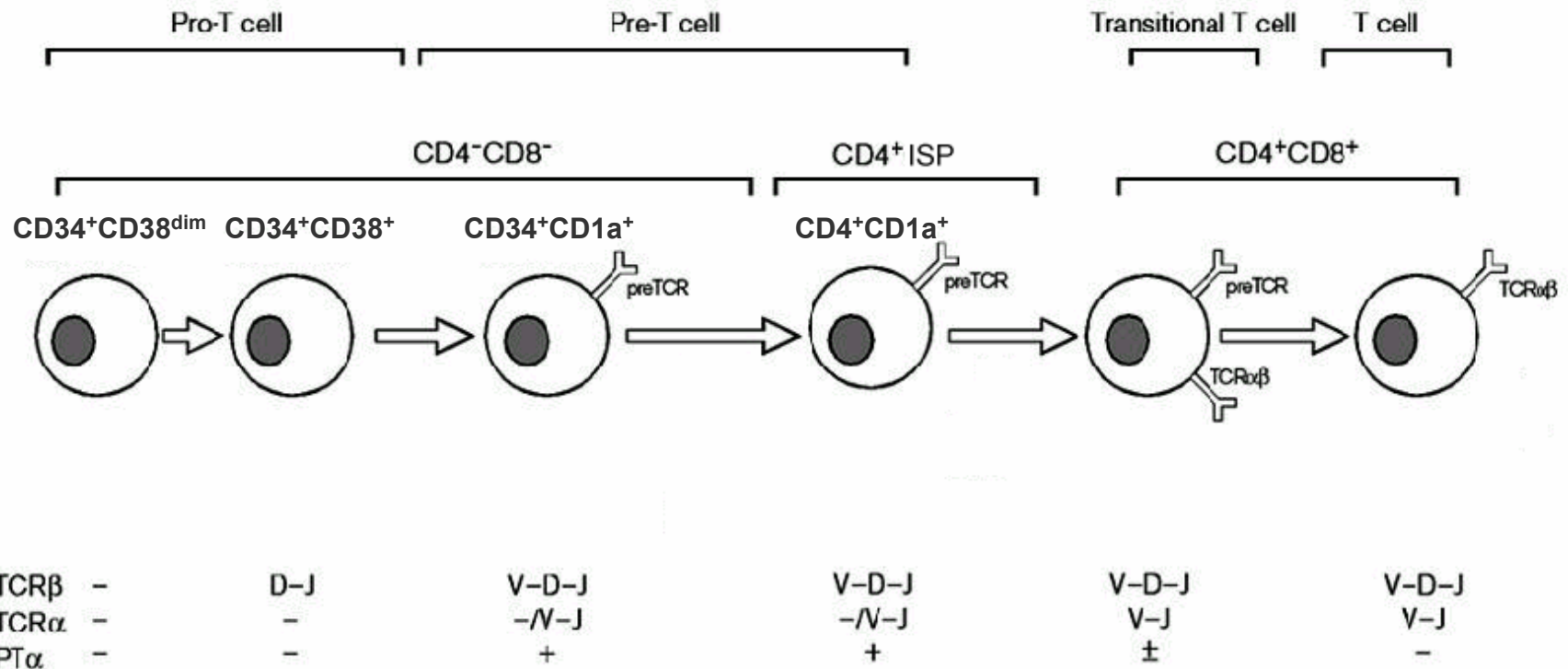
Précurseur $\gamma\delta$

CD25⁺DN

Cellules $\gamma\delta$
matures

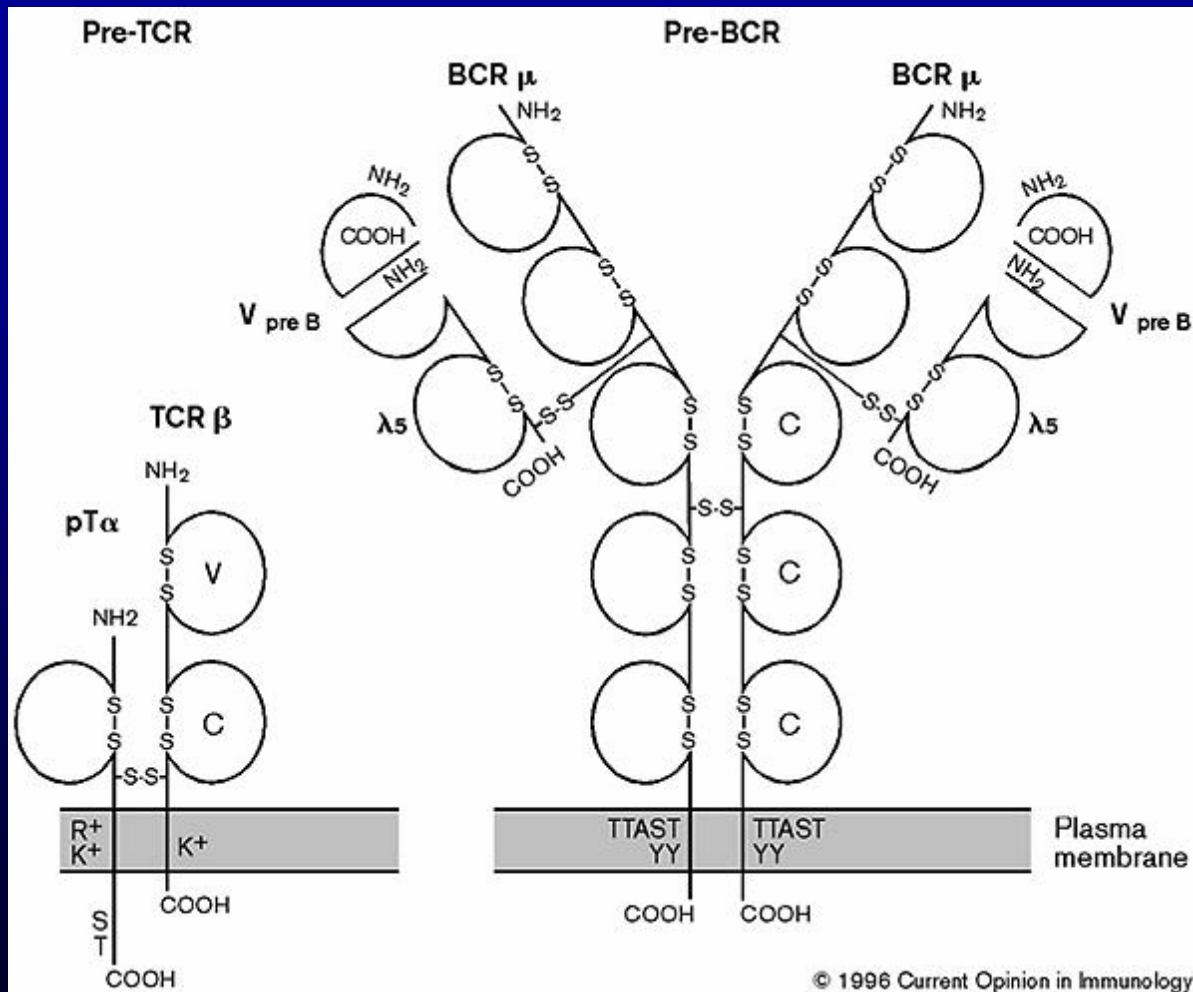


Différenciation thymique: homme



© 1996 Current Opinion in Immunology

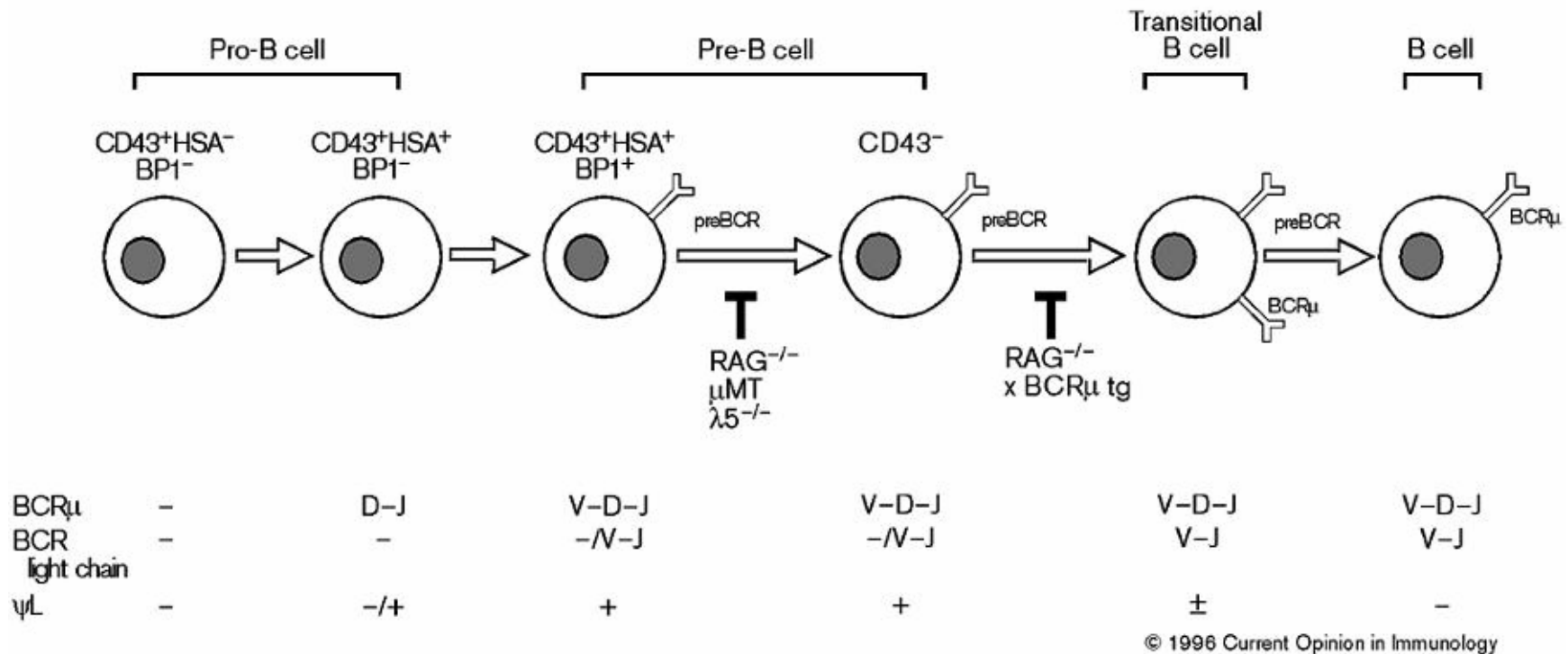
Caractérisation du pré-BCR



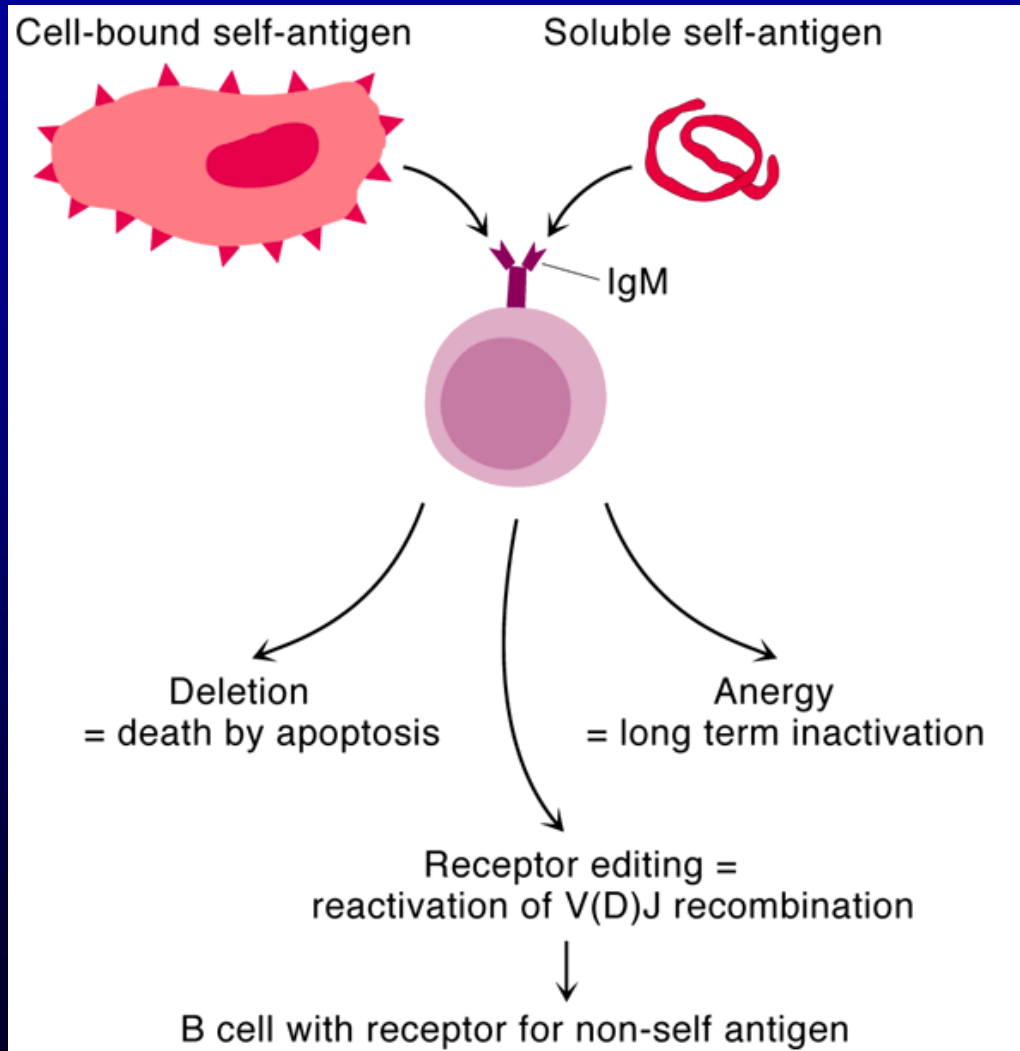
Rôle du pré-BCR

- *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



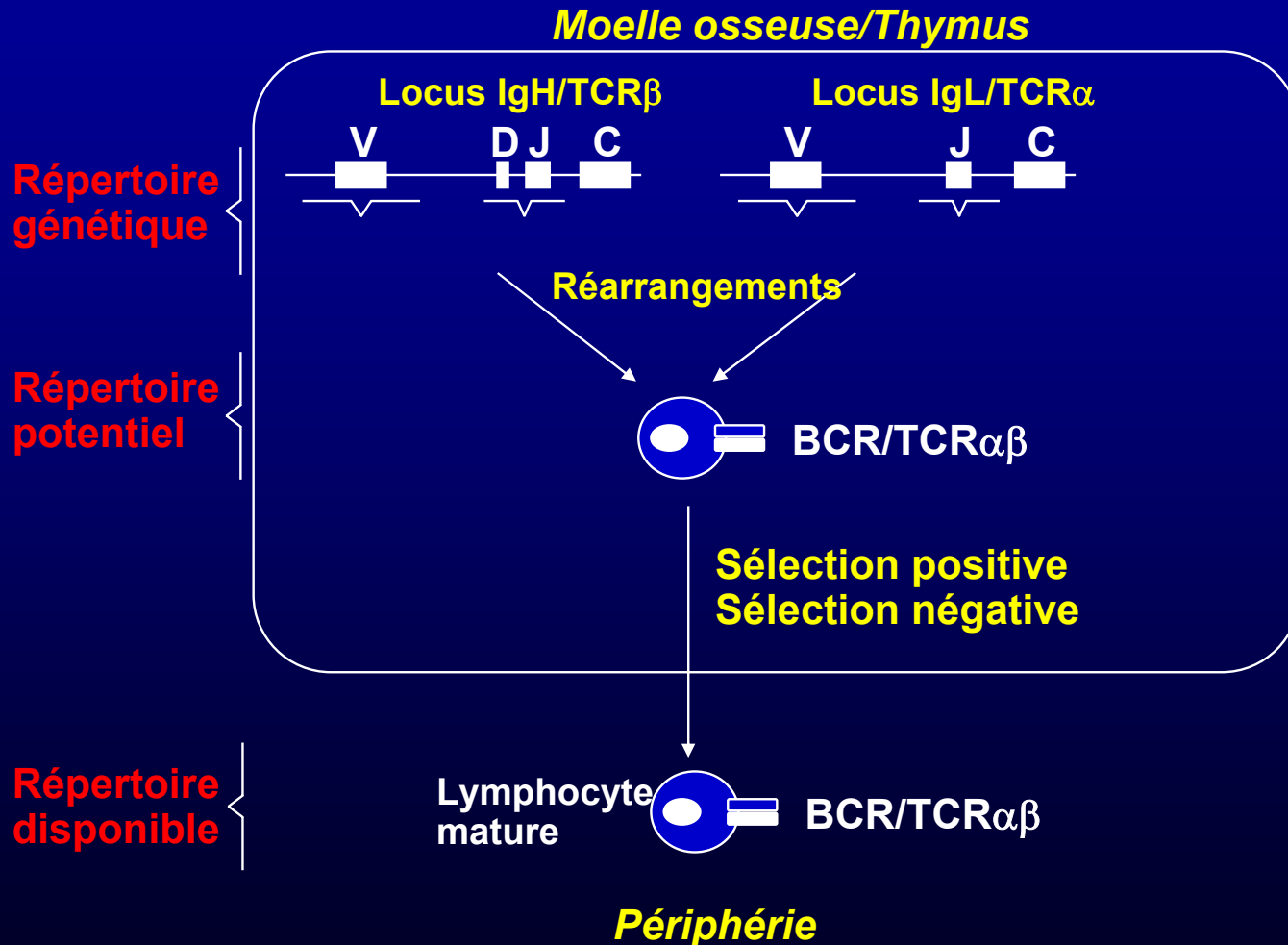
Sélection des lymphocytes B



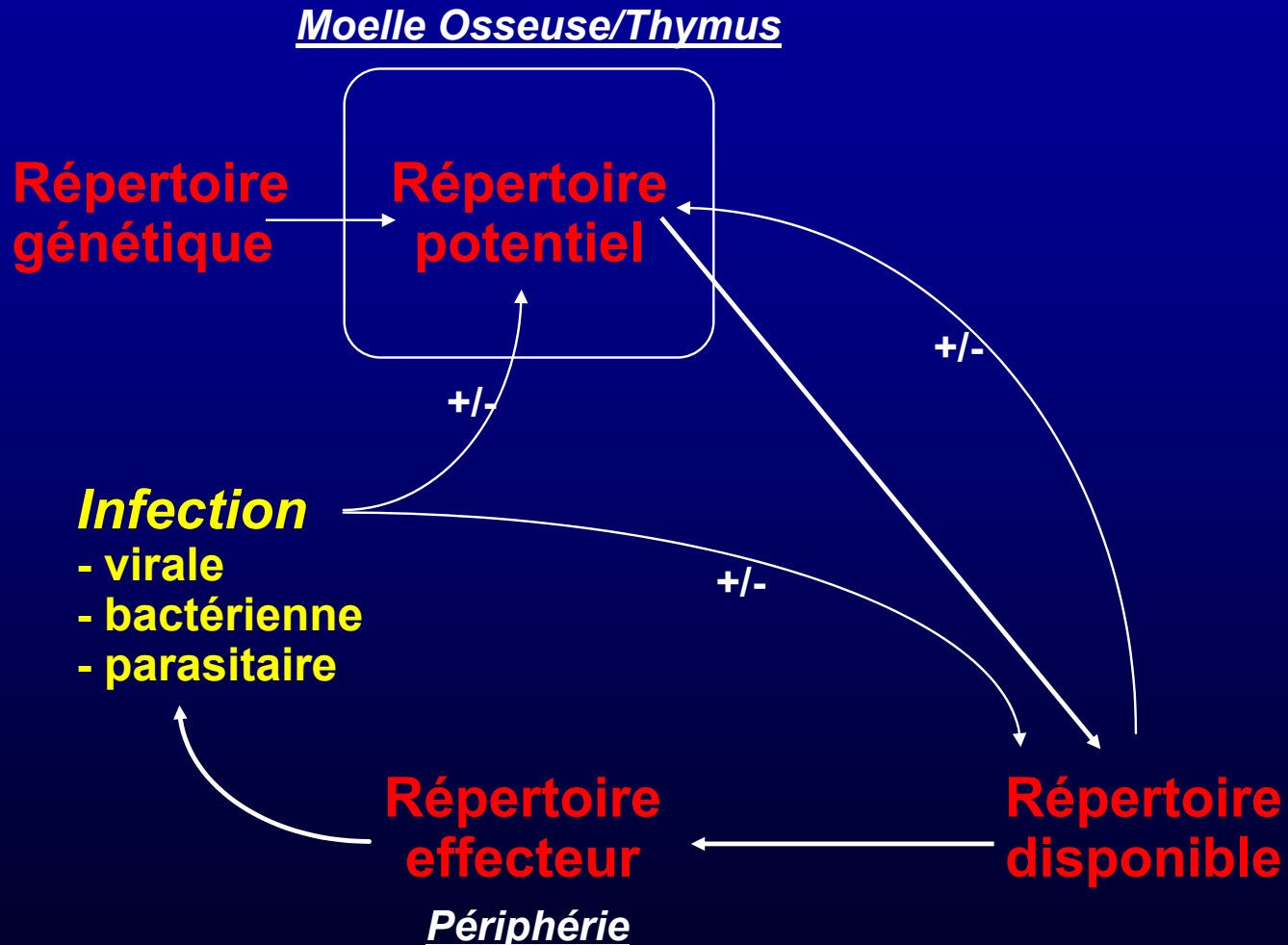
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

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

Notions de répertoires (1)



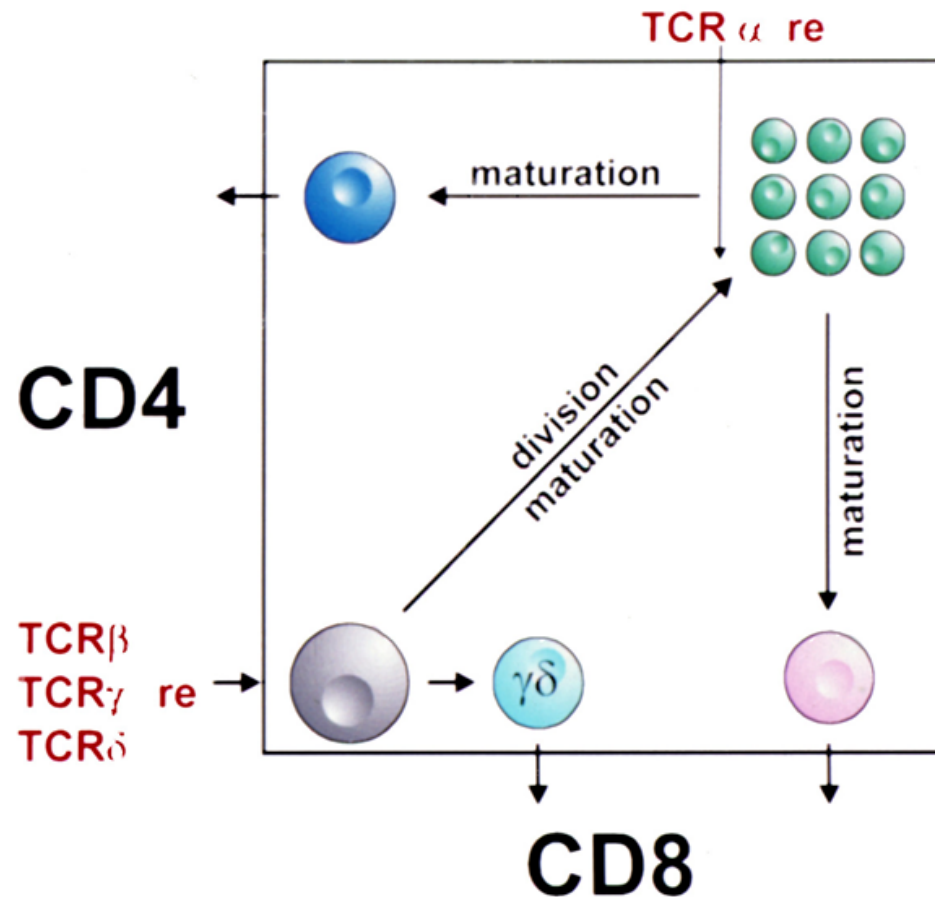
Notions de répertoires (2)



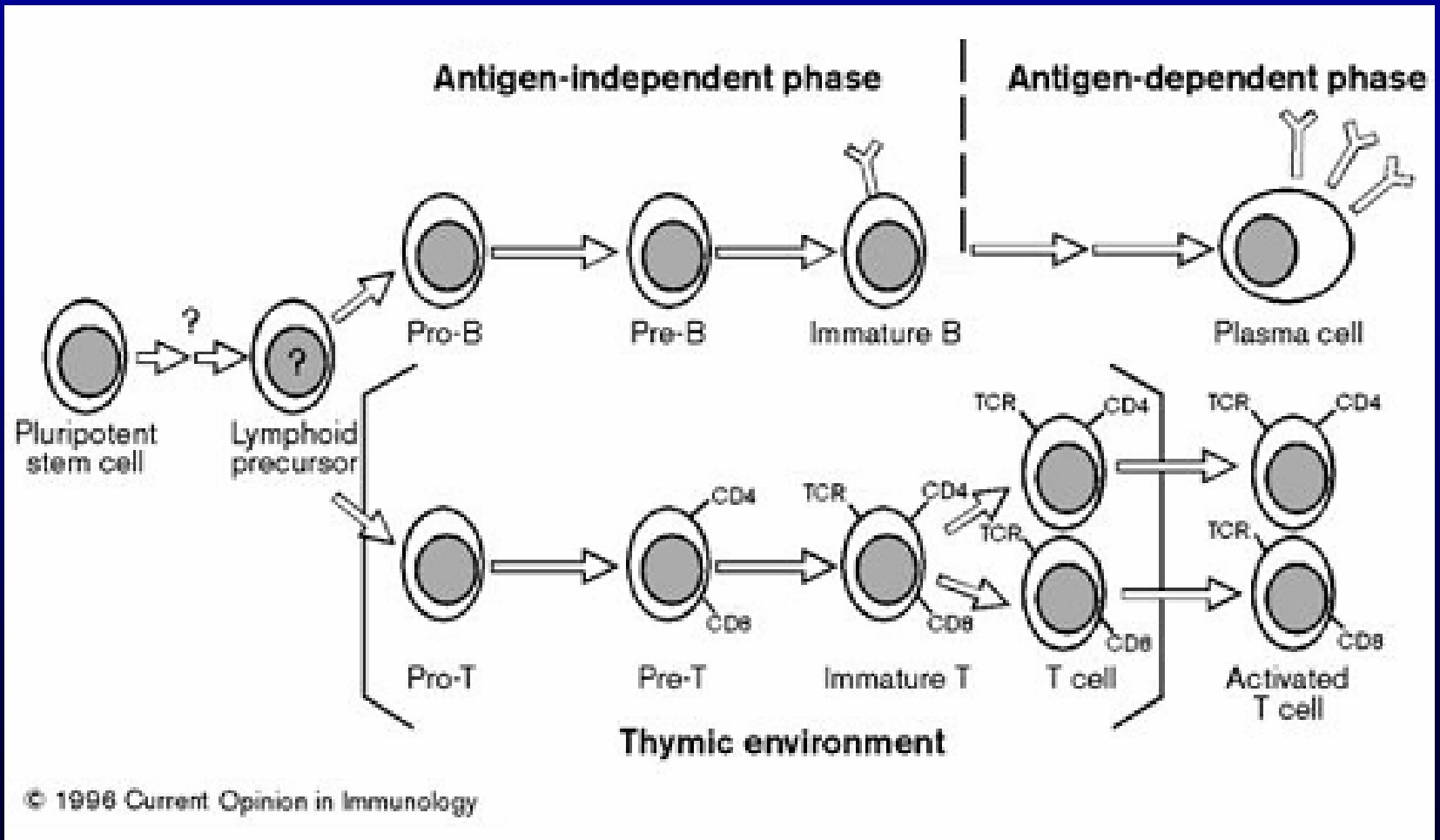
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Conclusion

Rappel différenciation T



Parallèle différenciations B et T



Questions/Discussion...