

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2006 IF-IVc&IVd
22 février 2006

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

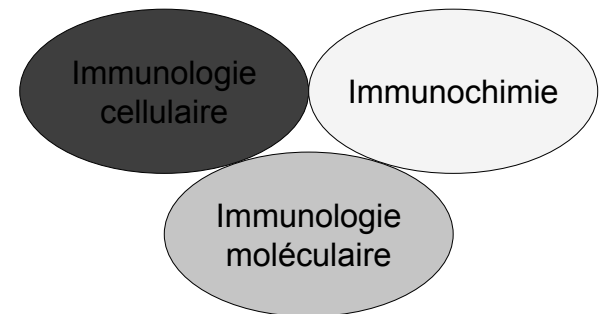
2

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

- 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
- ...

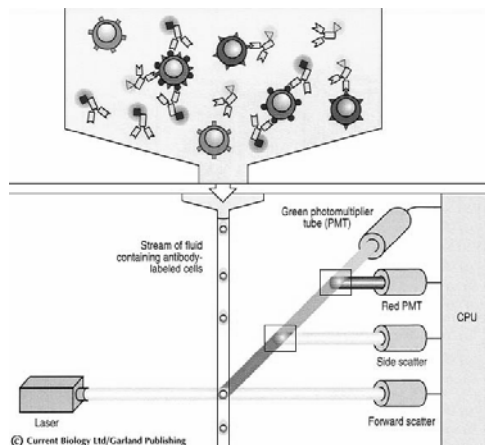
7

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)
- ...

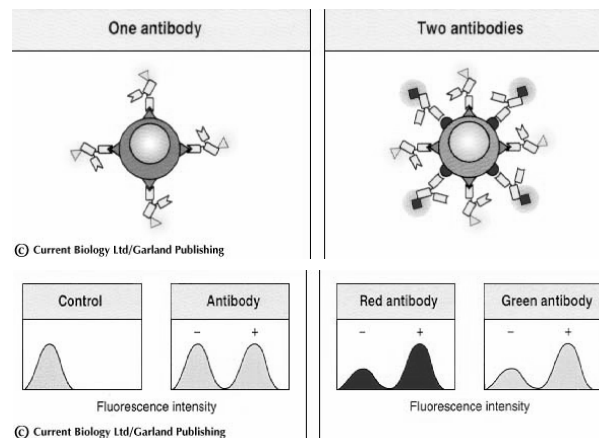
8

Cytométrie de flux (1)



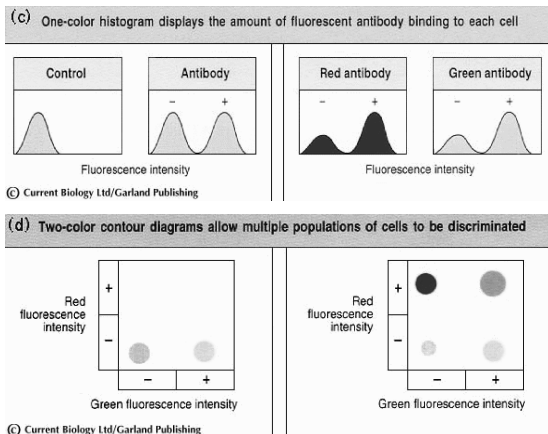
9

Cytométrie de flux (2)



10

Cytométrie de flux (2)



11

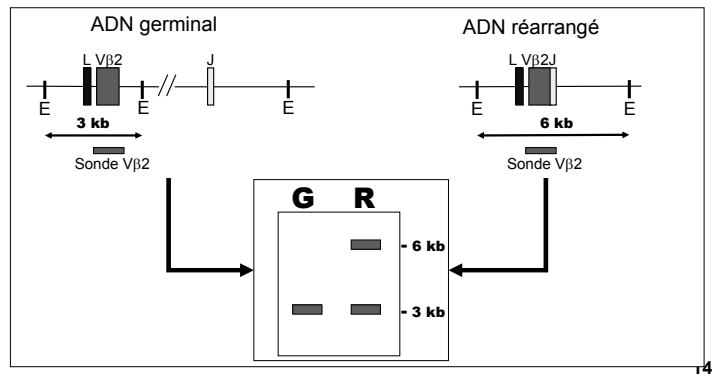
Outils de biologie moléculaire

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

13

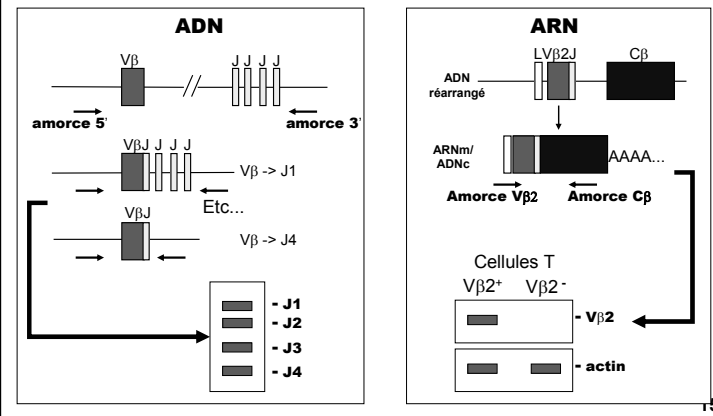
Détection des réarrangements (1)

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



Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR au niveau ADN ou ARN.



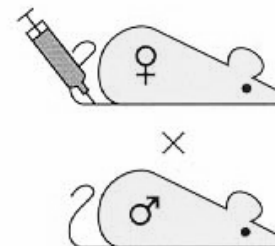
Utilisation des animaux génétiquement modifiés

- Transgénèse
- Invalidation génique

16

Transgénèse (1)

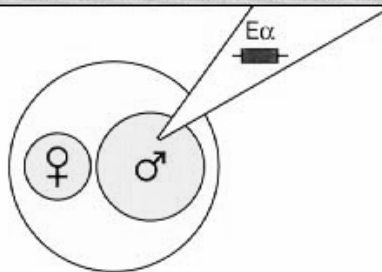
Female $E\alpha^-$ mouse is injected with follicle-stimulating hormone and chorionic gonadotropin to induce superovulation, and then mated



17

Transgénèse (2)

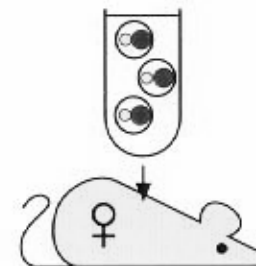
Fertilized oocytes removed from female.
DNA containing $E\alpha$ gene is injected into
the male pronucleus



18

Transgénèse (3)

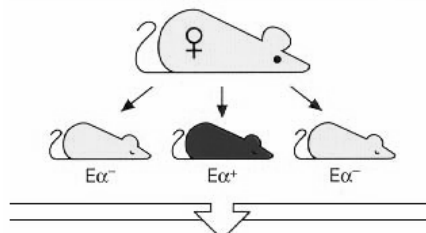
Injected eggs transferred into uterus
of pseudopregnant female



19

Transgénèse (4)

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



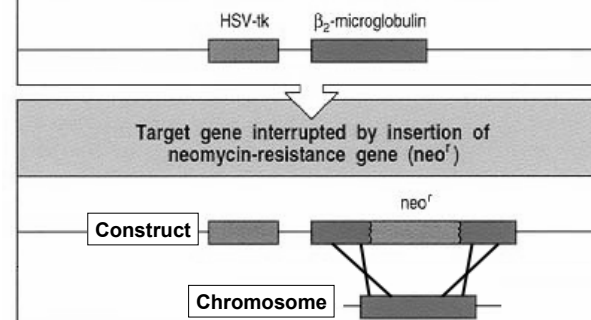
Mate transgenic animal to $E\alpha^-$ C57BL/6 mice
to produce a strain carrying the $E\alpha$ transgene

© Current Biology Ltd/Garland Publishing

20

Invalidation génique (1)

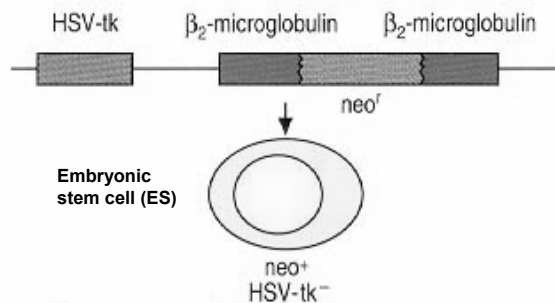
DNA construct containing exon of β_2 -microglobulin
gene together with the herpes simplex virus
thymidine kinase gene (HSV-tk)



21

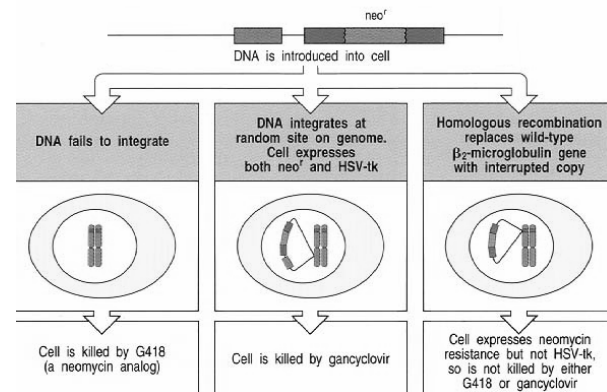
Invalidation génique (2)

Transfect β_2 -microglobulin gene knock-out construct into ES cells



22

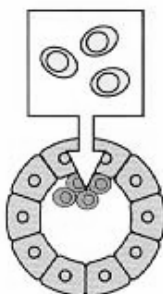
Invalidation génique (3)



23

Invalidation génique (4)

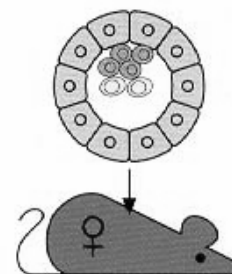
Inject ES cells into mouse blastocyst



24

Invalidation génique (5)

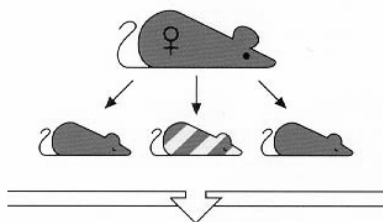
Re-implant blastocyst into pseudopregnant female



25

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

26

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

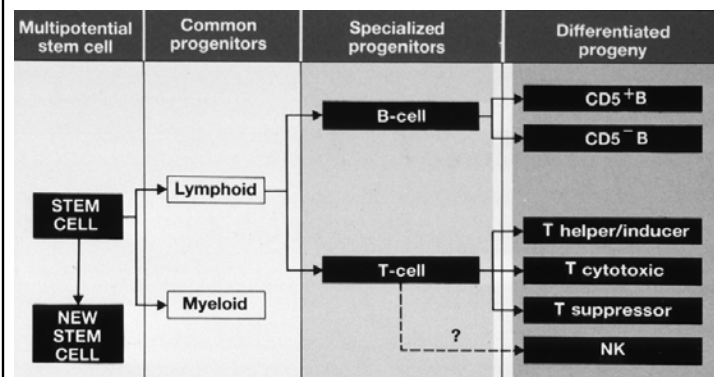
27

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



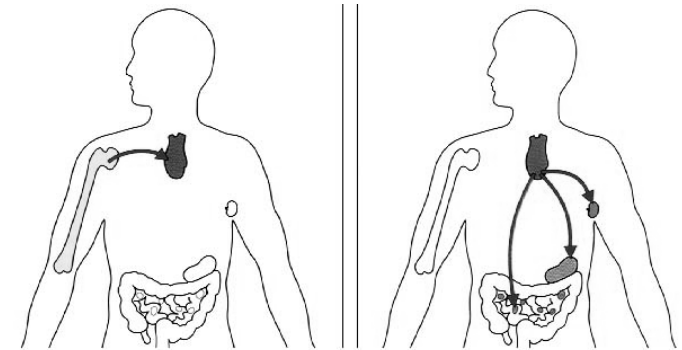
31

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

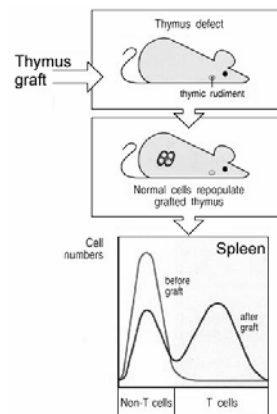
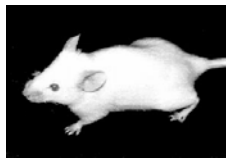
Les lymphocytes T se différencient dans le thymus



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

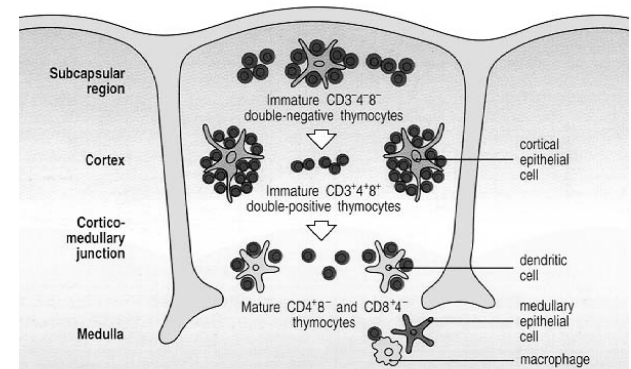
33

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

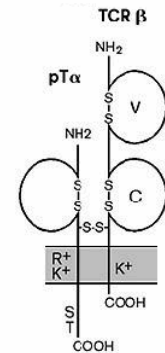
- Les différentes populations identifiées correspondent à des stades de différenciation des thymocytes
 - Chaque stade peut-être critique pour:
 - les réarrangements du TCR
 - la restriction par le CMH
 - la sélection positive ou négative
- notion de *points de contrôle (checkpoint)*

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



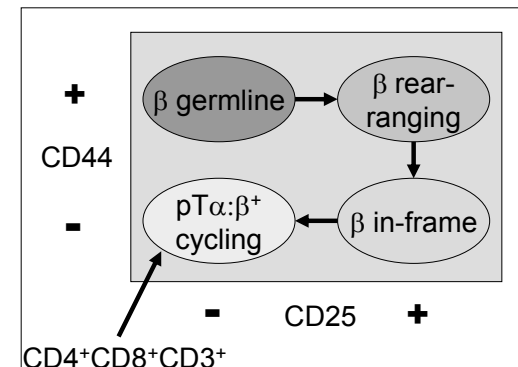
D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-197

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

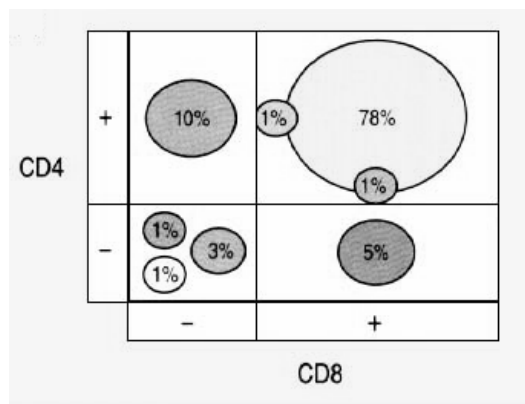
38

Différenciation des thymocytes (1)



39

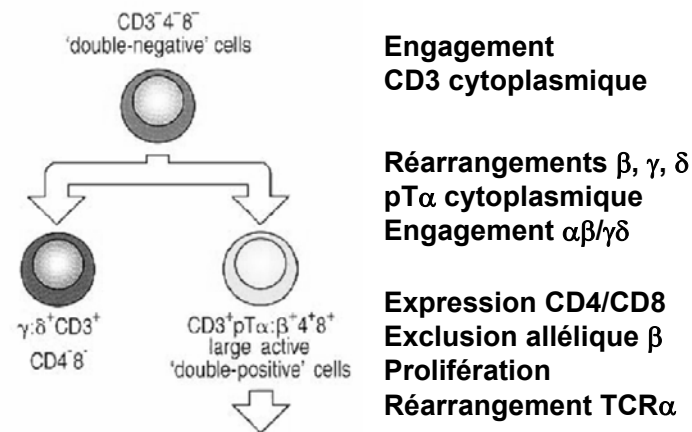
Différenciation des thymocytes (2)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

40

Différenciation des thymocytes (3)



41

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

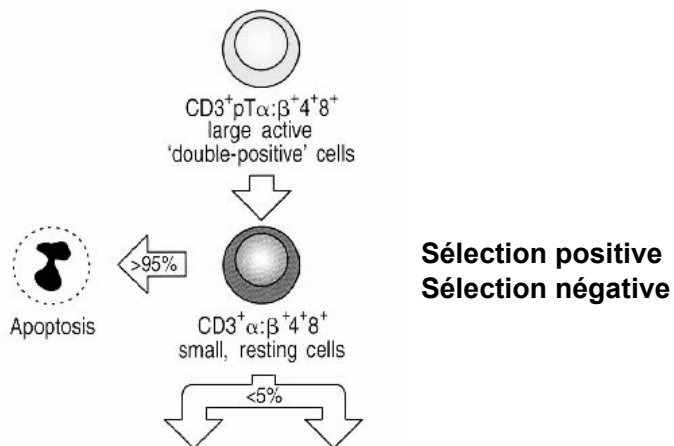
42

Régulation des réarrangements

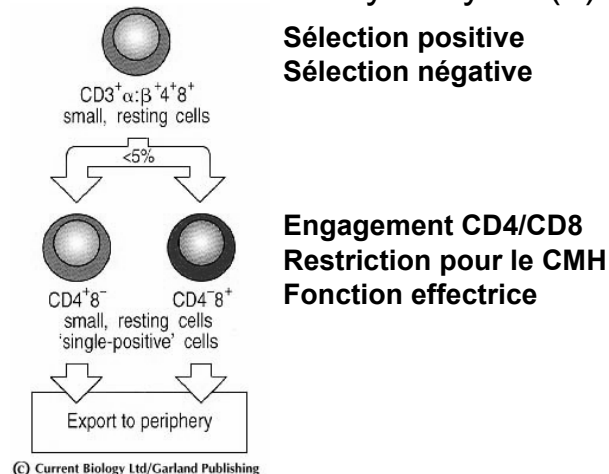
- TCR δ , TCR γ et TCR β réarrangent en même temps au stade pro-T
- Les réarrangements TCR α sont limités aux thymocytes pré-T DP engagés vers la lignée $\alpha\beta$ et exprimant TCR β
- A l'inverse de TCR β , les réarrangements TCR α ont lieu sur les deux chromosomes → l'exclusion allélique a lieu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

43

Différenciation des thymocytes (4)



Différenciation des thymocytes (5)

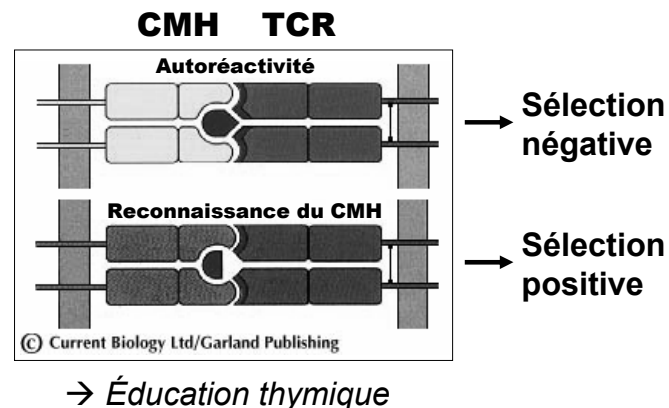


Sélections positive et négative (1)

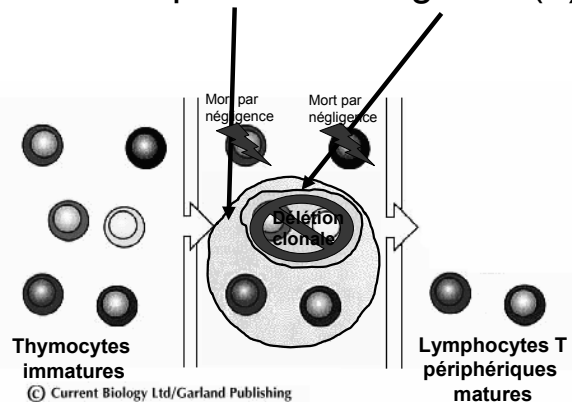
- Sélection positive: le TCR doit avoir une certaine réactivité avec une molécule du CMH du soi
- L'expression du co-récepteur CD4/CD8 suit la restriction pour le CMH
→ CD4/classe II et CD8/classe I
- Sélection négative: les cellules T autoréactives (reconnaissant CMH + peptide du soi) sont éliminées

46

Sélections positive et négative (2)

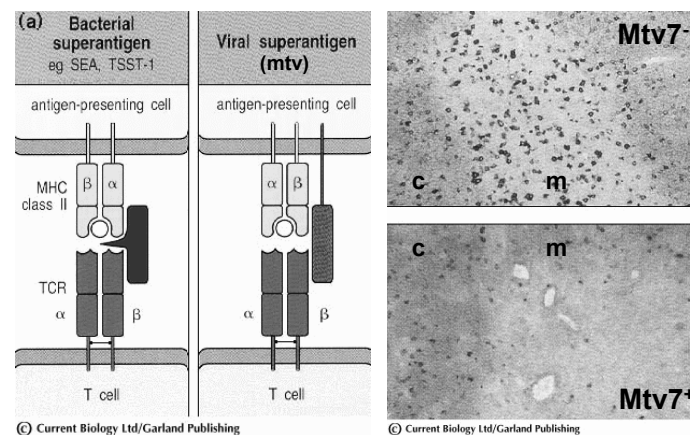


Sélections positive et négative (3)



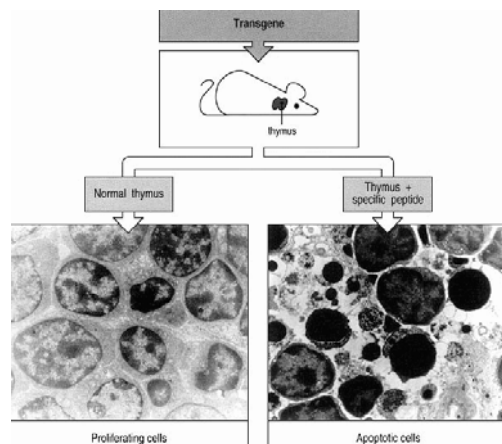
48

Délétion clonale et superantigènes



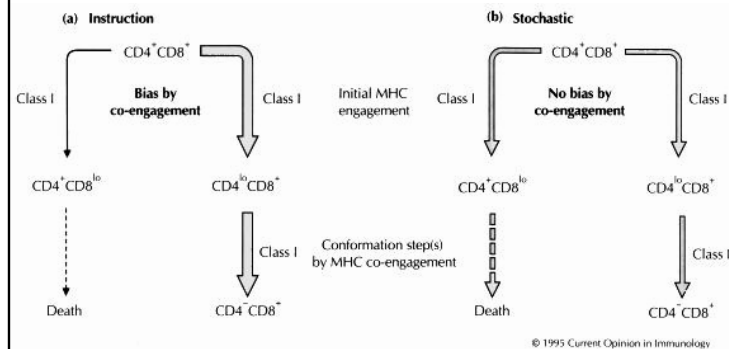
49

Délétion clonale et TCR transgénique



50

Mécanisme de la restriction au CMH (1)



51

Singer, A. (2002) *Curr.Opin.Immunol.* 14, 207-252

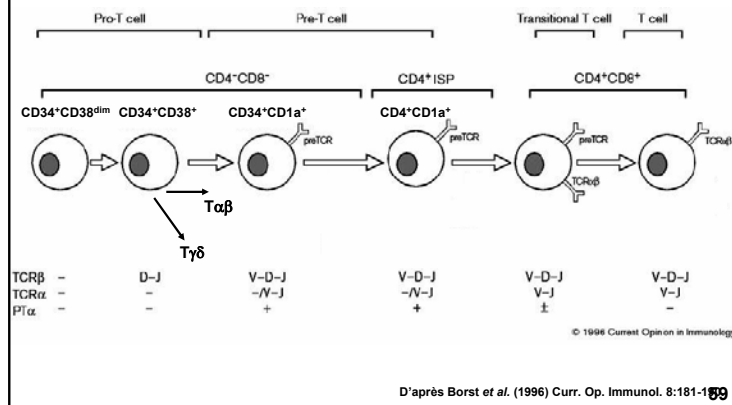
Singer, A. (2002) *Curr.Opin.Immunol.* 14, 207-253

Current Opinion in Immunology

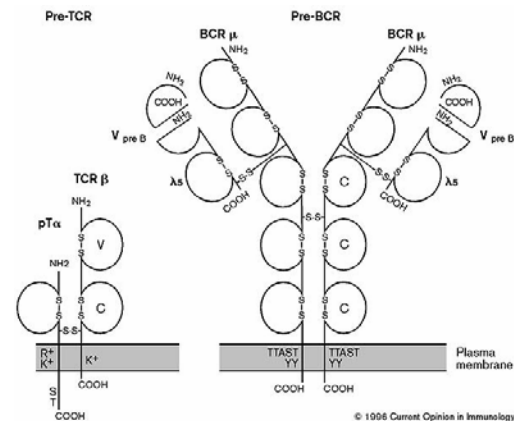
© 1996 Current Opinion in Immunology

D'après Borst *et al.* (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-185

Différenciation thymique: homme



Caractérisation du pré-BCR

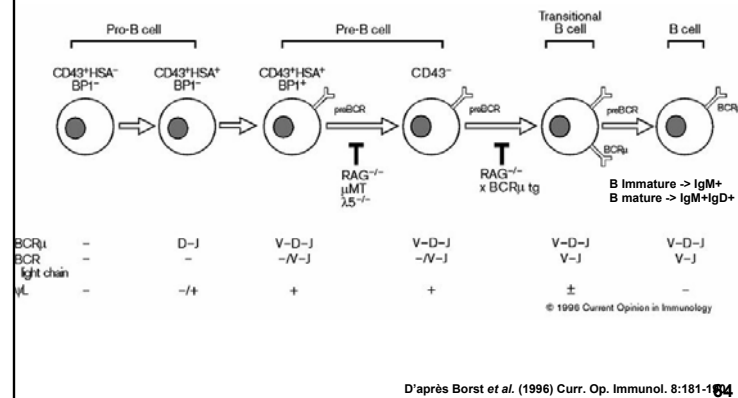


Rôle du pré-BCR

- **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

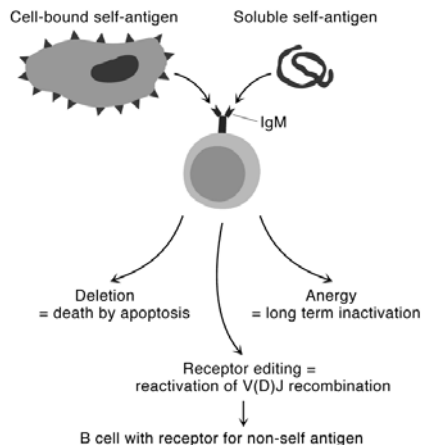
63

Différenciation des lymphocytes B



14

Sélection des lymphocytes B



© 2000 John Wiley & Sons, Inc. 65

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

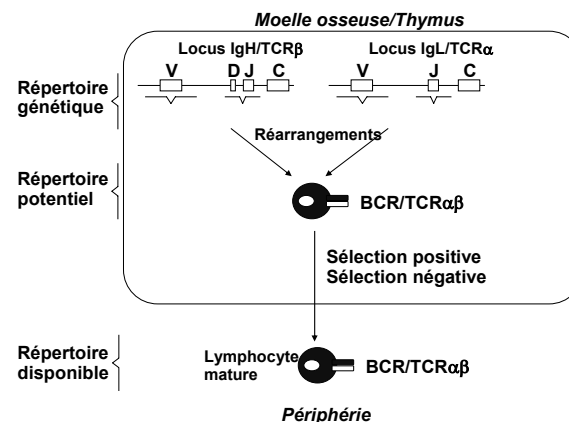
1. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
2. Développement lymphocytaire B et T
3. Sélection des répertoires

66

- Notions de répertoires
- Expansion clonale
- Réponse immunitaire/Tolérance
- Peptide analogue
- Vaccination/Rappel
- Variation antigénique
- Persistance, chronicité

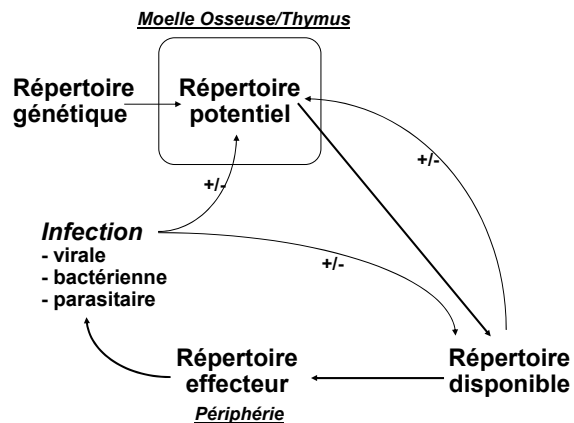
67

Notions de répertoires (1)



68

Notions de répertoires (2)



69

Peptides agonistes, antagonistes (1)

Peptide ligand altéré (APL)

= peptide analogue d'un peptide immunogène

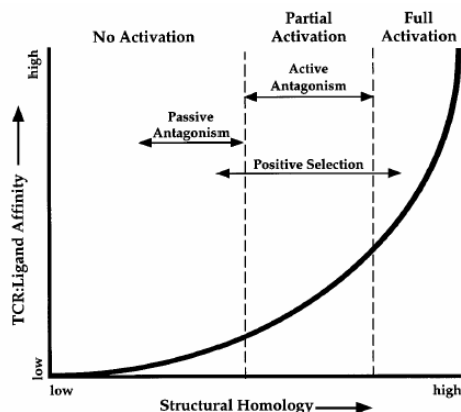
Agoniste → Conserve certaines fonctions d'activation

Antagoniste passif → Compétition pour le CMH

Antagoniste actif → induction d'anergie, modification de la cascade d'activation

70

Peptides agonistes, antagonistes (2)



D'après Sloan-Lancaster et Allen (1996) Annu. Rev. Immunol. 14: 1-27.

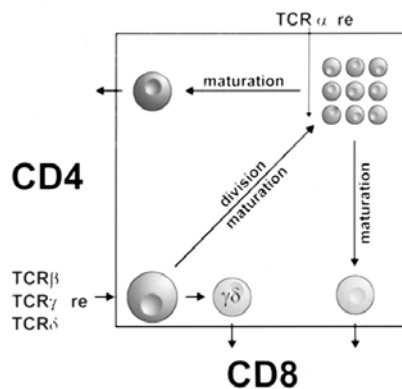
71

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Conclusion

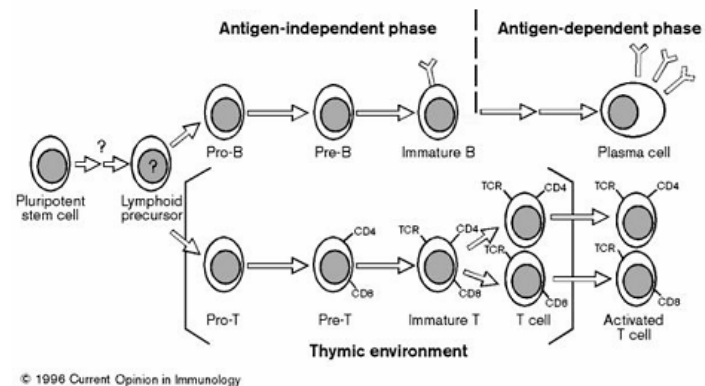
77

Rappel différenciation T



78

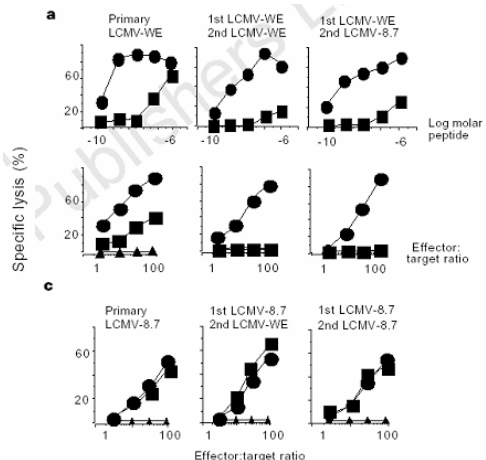
Parallèle différenciations B et T



© 1996 Current Opinion in Immunology

D'après Fitzsimmons et Hagman (1996) Curr. Op. Immunol. 8:166-179

Le « péché originel »



LCMV-WE
→ Sauvage
→ GP33-wt
→ H-2D^b

LCMV-8.7
→ Mutant
→ GP33-3L APL

Effecteurs:
cellules de rate

Cibles:
●: GP33-wt
■: GP33-3L
▲: contrôles

D'après Klenerman et Zinkernagel
(1998) Nature 394:482-485.

80

Questions/Discussion...

81