

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2006 IF-IVc&IVd
22 février 2006

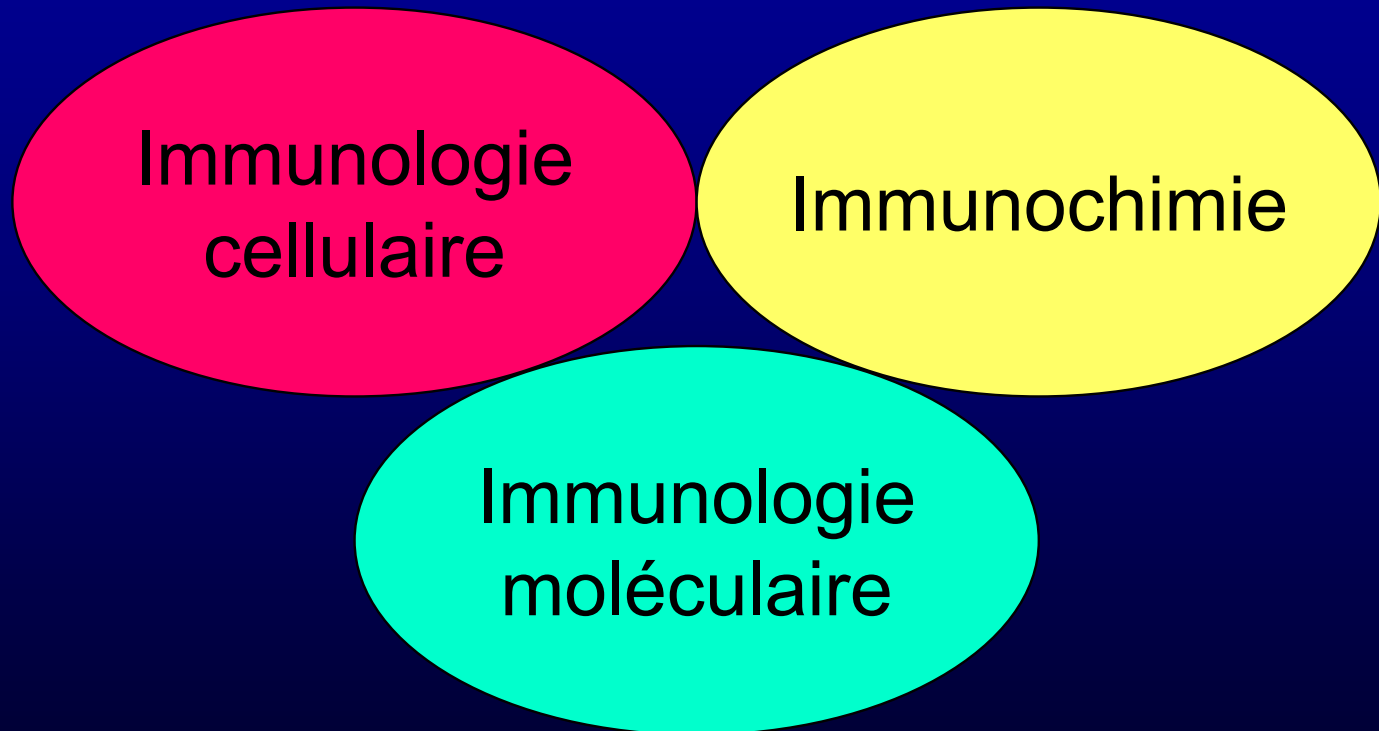
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

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

- 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.

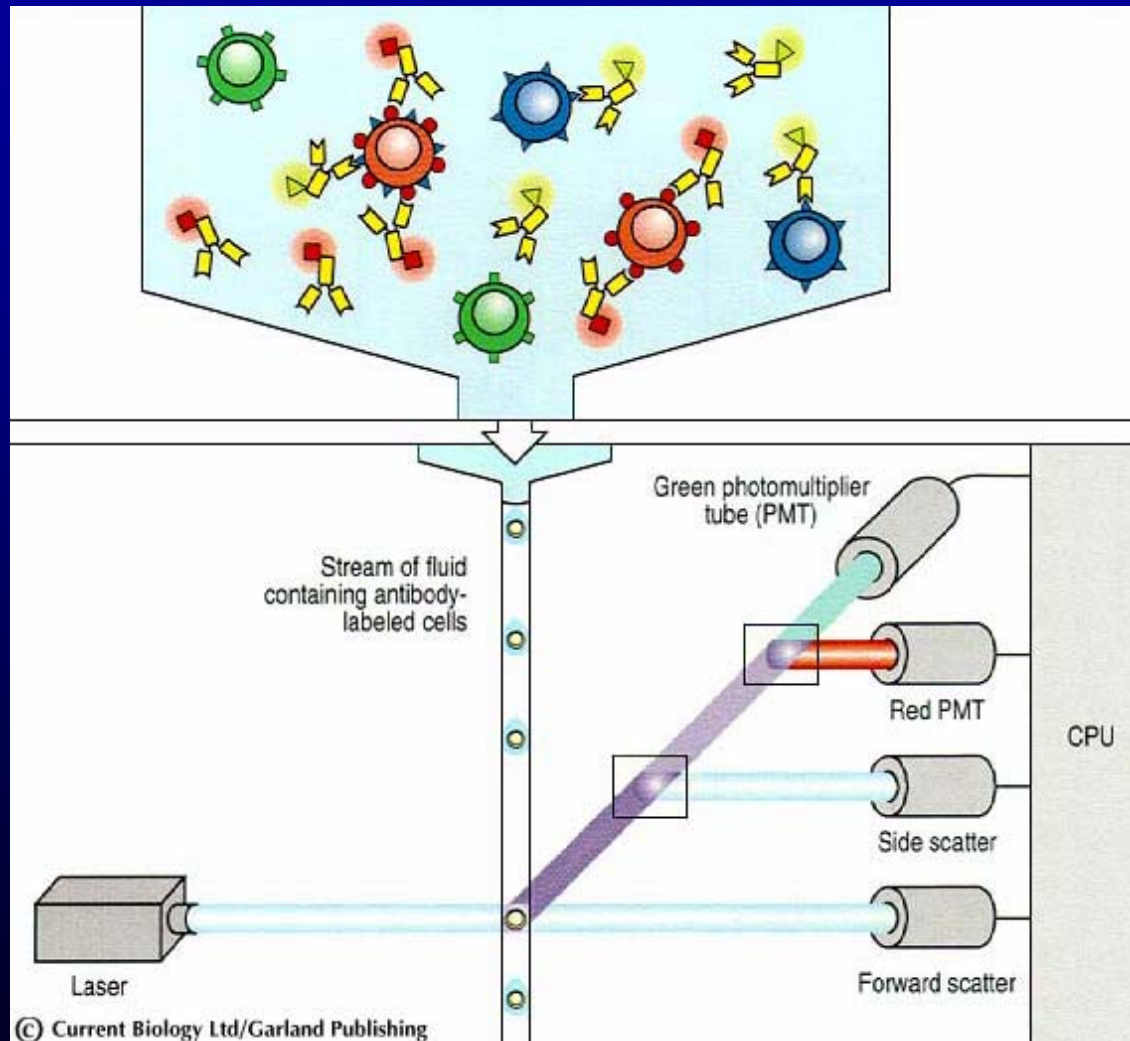
Marqueurs de différenciation T

- 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

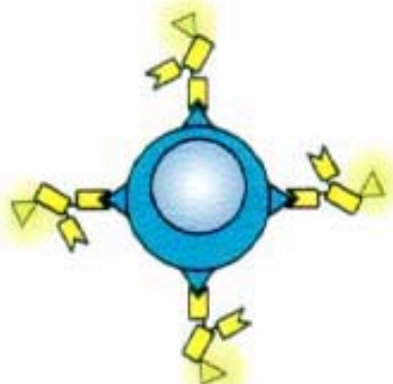
- CD5 ?
- CD19 co-récepteur du BCR
- CD21 co-récepteur du BCR; CR2
- CD28 marqueur d'activation
- CD40 activation des cellules B
- B220 isoforme de CD45
- CD79 α/β molécules associées au BCR
- CD80 activation des cellules T (B7.1)
- ...

Cytométrie de flux (1)



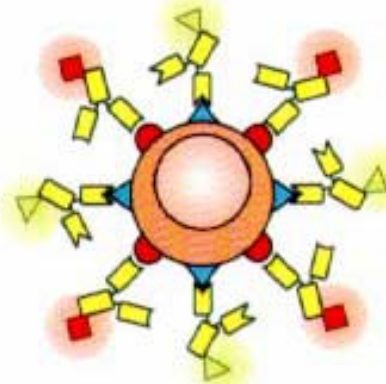
Cytométrie de flux (2)

One antibody



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

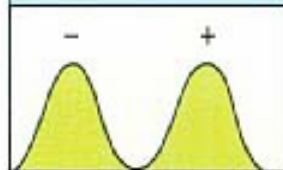
Two antibodies



Control



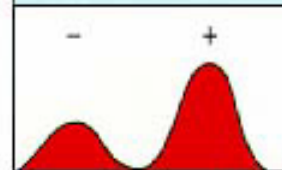
Antibody



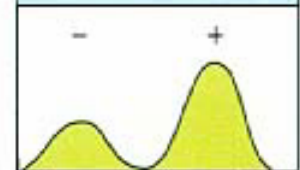
Fluorescence intensity

© Current Biology Ltd/Garland Publishing

Red antibody



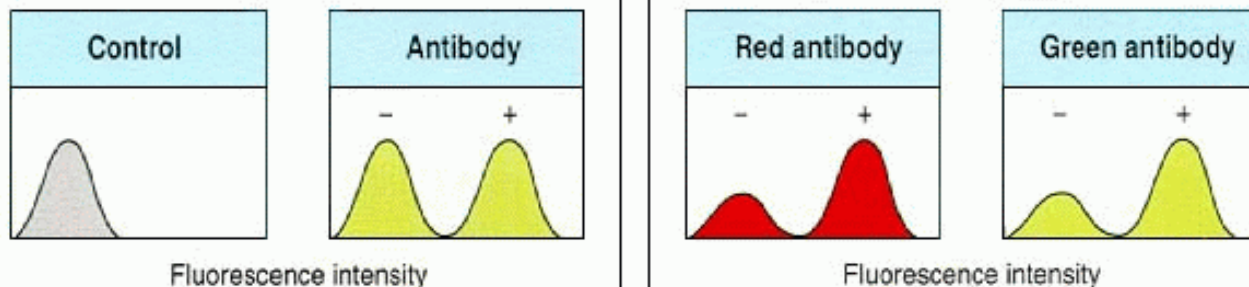
Green antibody



Fluorescence intensity

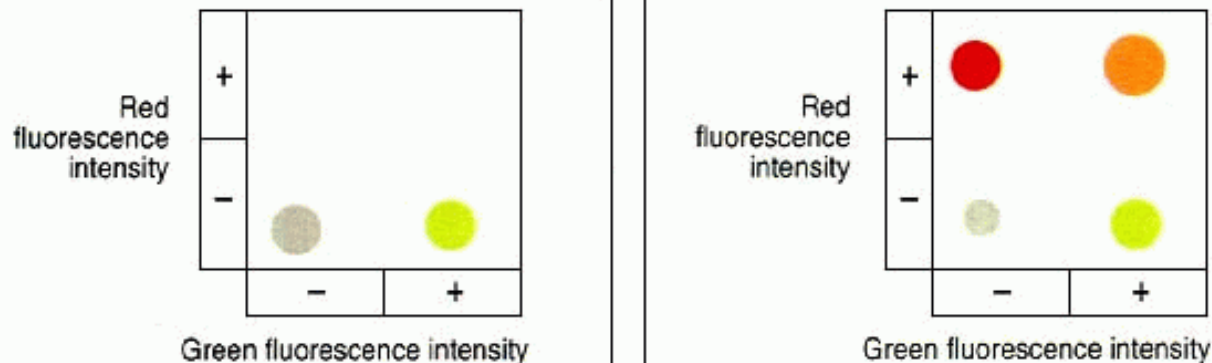
Cytométrie de flux (2)

(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



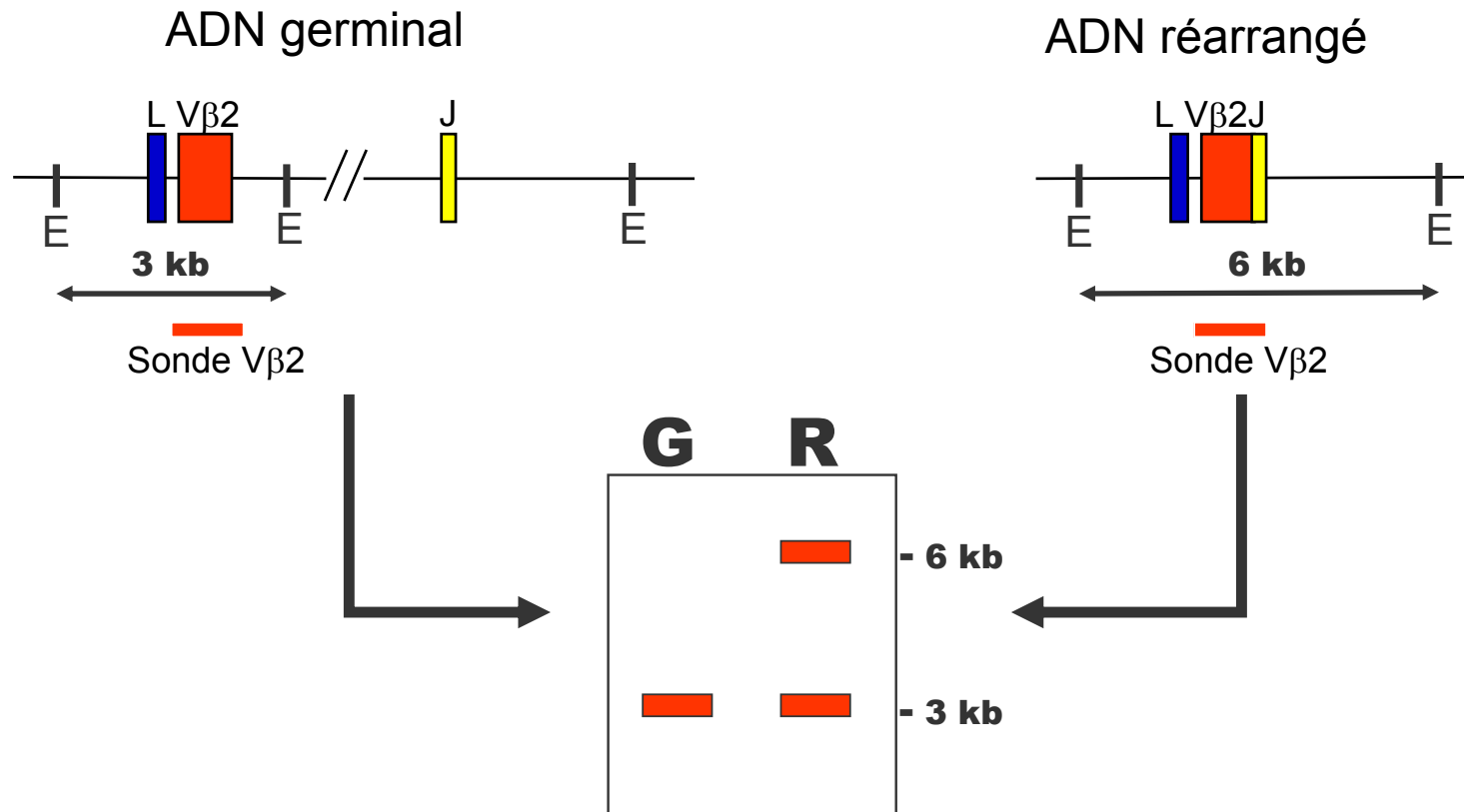
© Current Biology Ltd/Garland Publishing

Outils de biologie moléculaire

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

Détection des réarrangements (1)

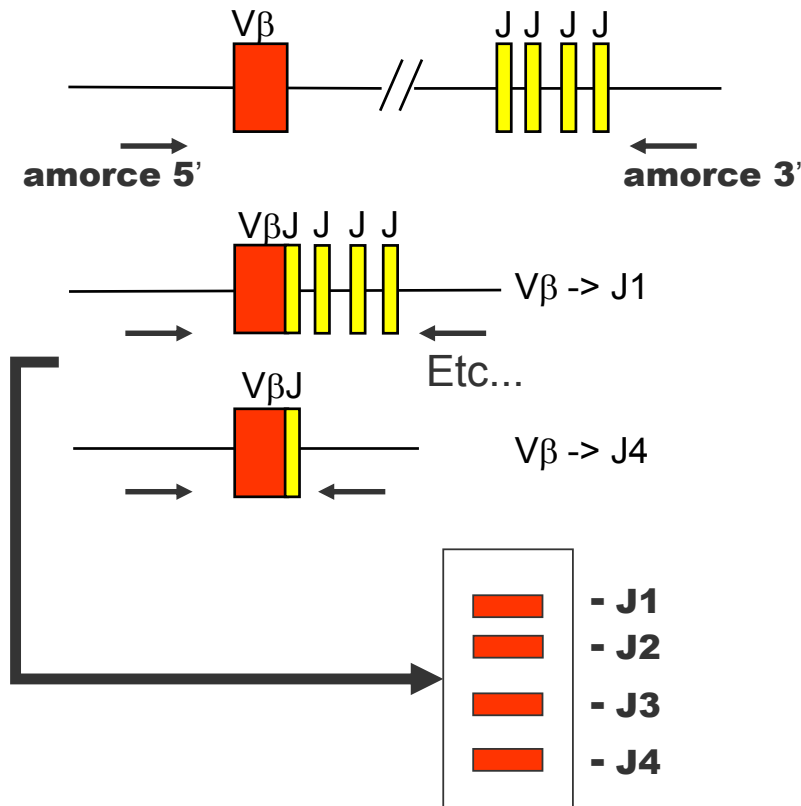
- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par Southern blot.



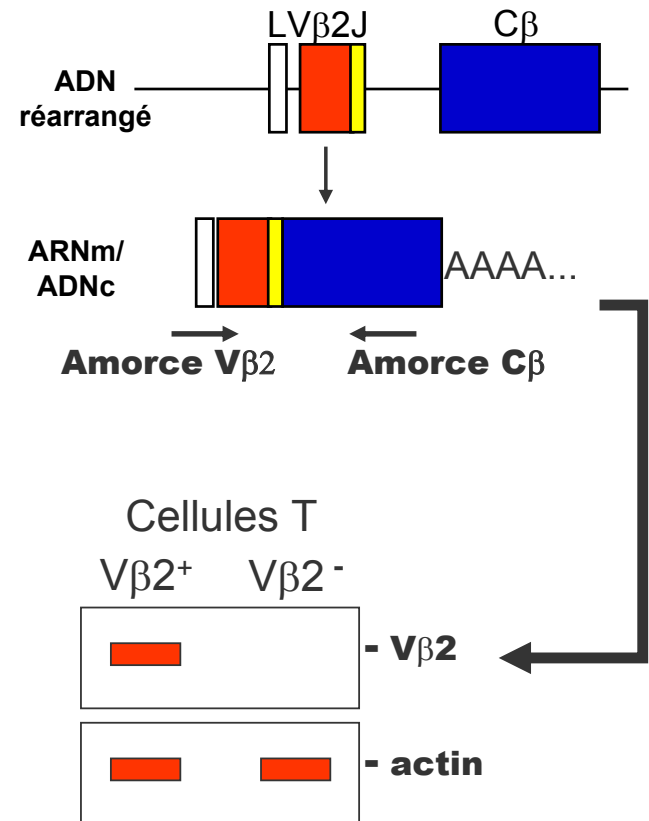
Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR au niveau ADN ou ARN.

ADN



ARN

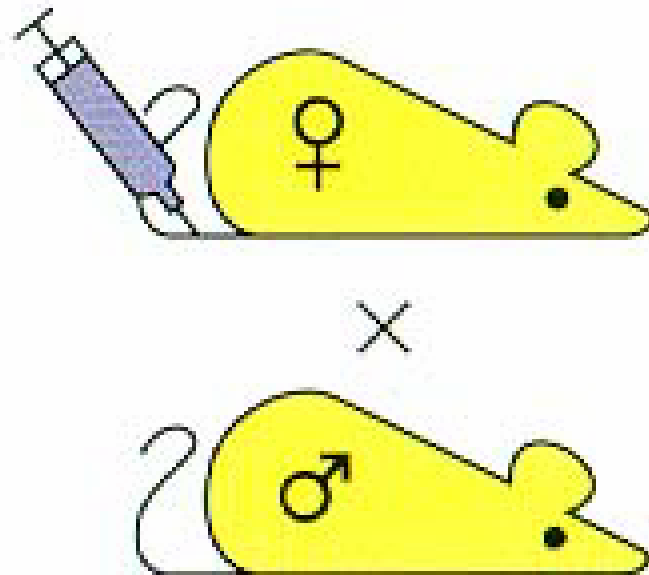


Utilisation des animaux génétiquement modifiés

- Transgénèse
- Invalidation génique

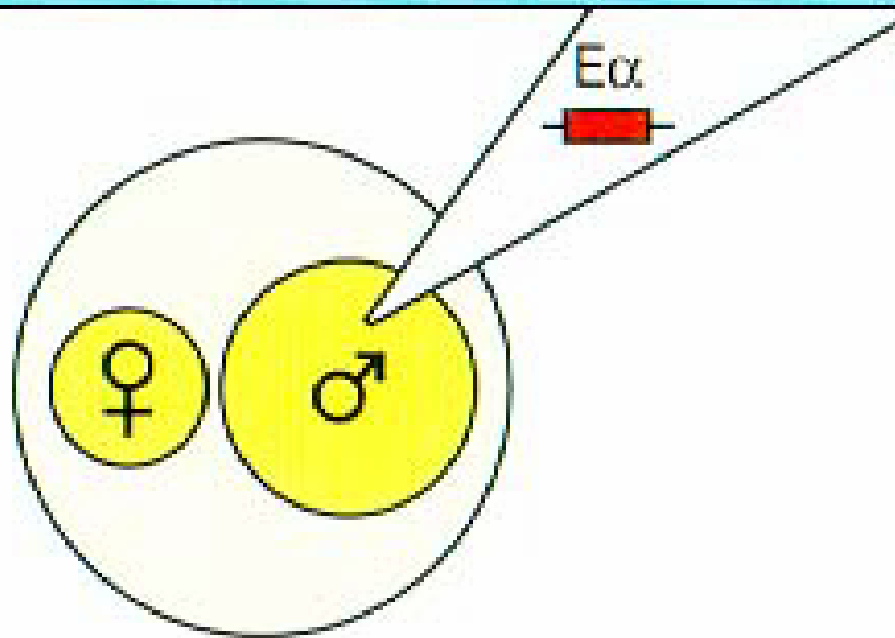
Transgenèse (1)

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



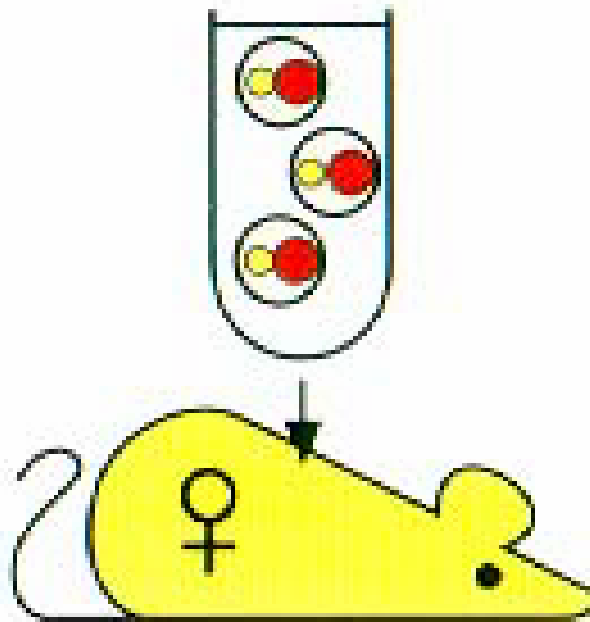
Transgenèse (2)

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



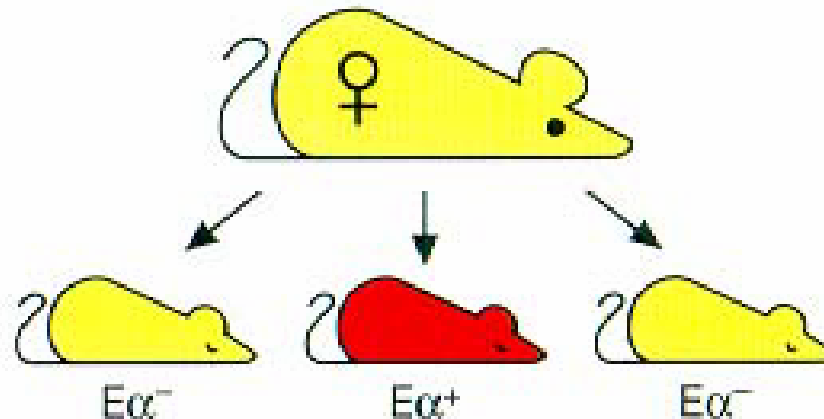
Transgenèse (3)

Injected eggs transferred into uterus
of pseudopregnant female



Transgenèse (4)

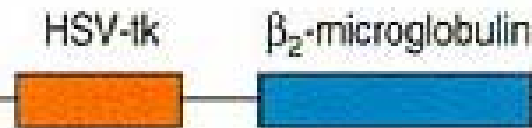
Some offspring will have incorporated injected $E\alpha$ gene (transgene)



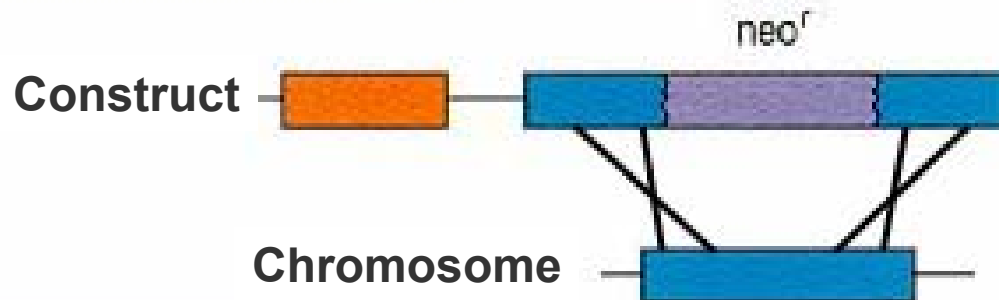
Mate transgenic animal to $E\alpha^-$ C57BL/6 mice to produce a strain carrying the $E\alpha$ transgene

Invalidation génique (1)

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

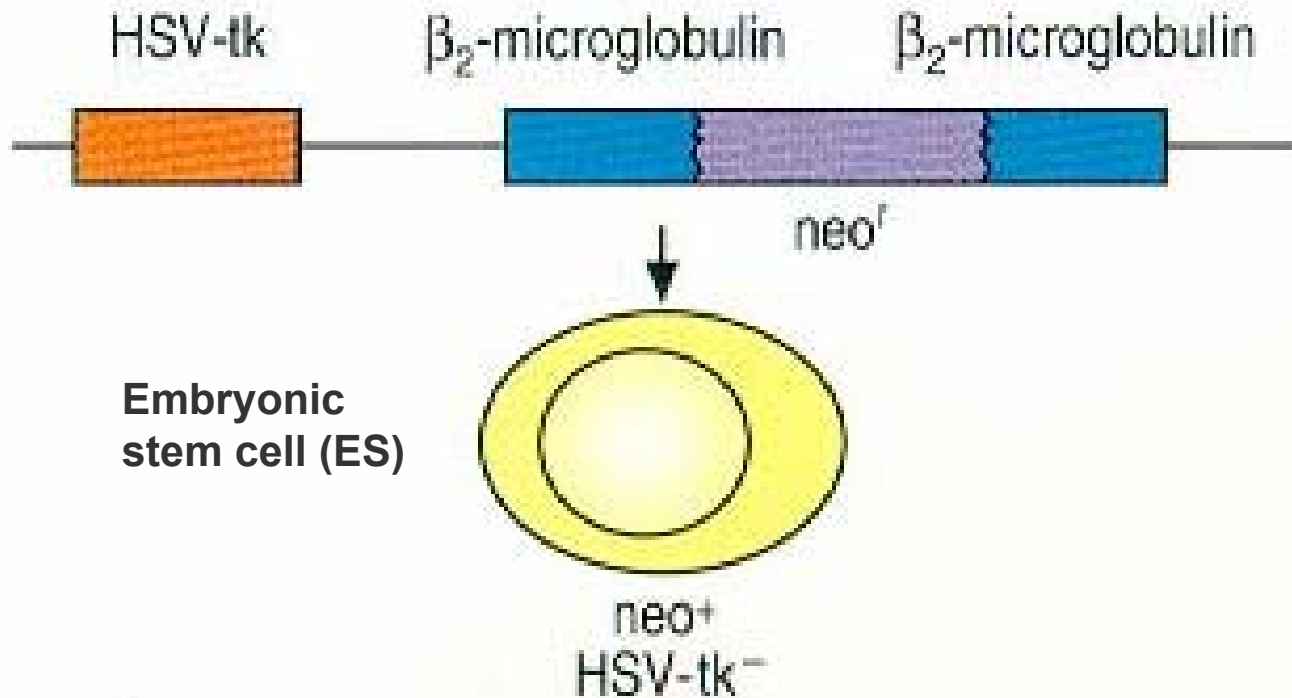


Target gene interrupted by insertion of neomycin-resistance gene (neo^r)

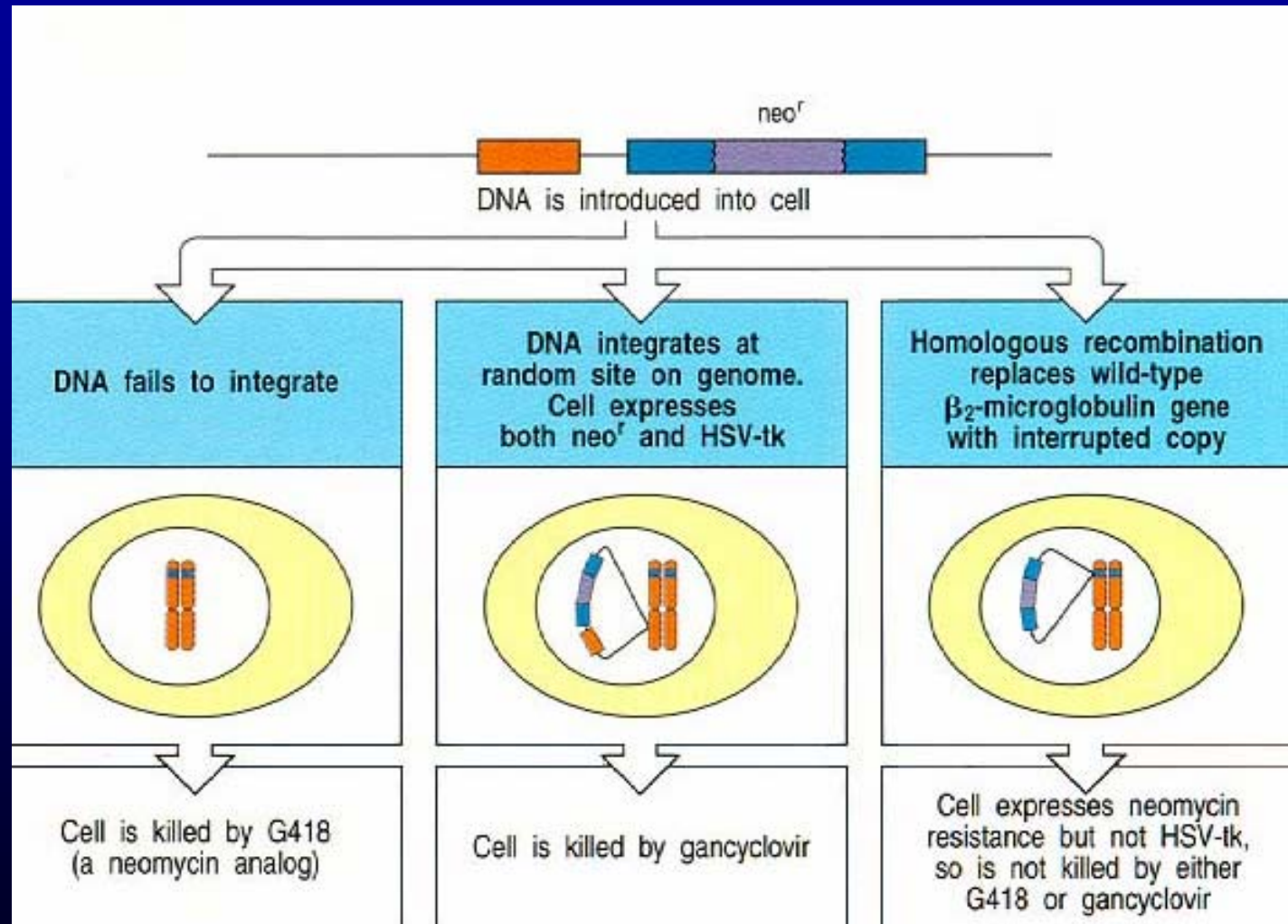


Invalidation génique (2)

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

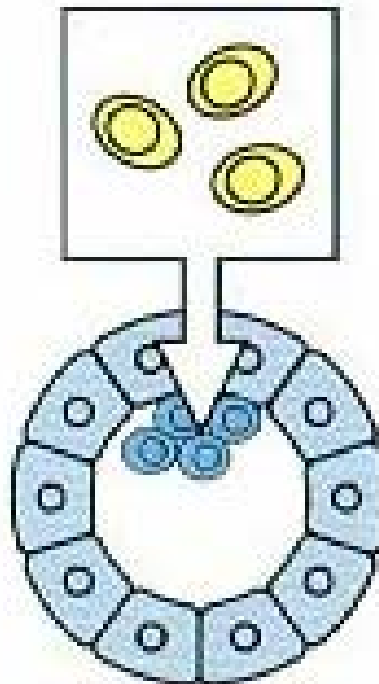


Invalidation génique (3)



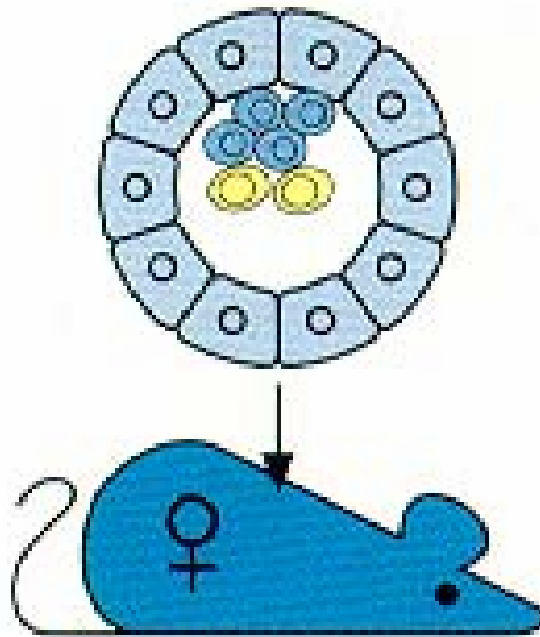
Invalidation génique (4)

Inject ES cells into mouse blastocyst



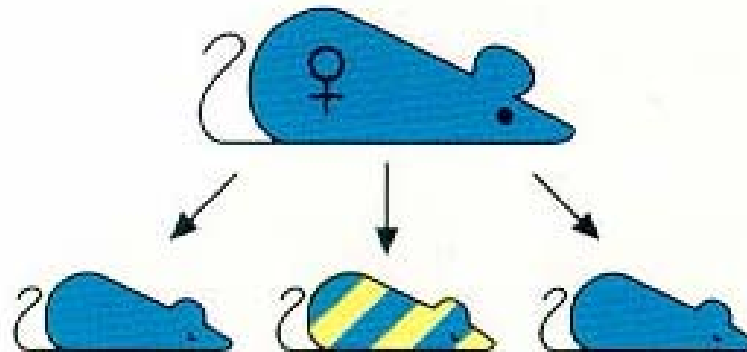
Invalidation génique (5)

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

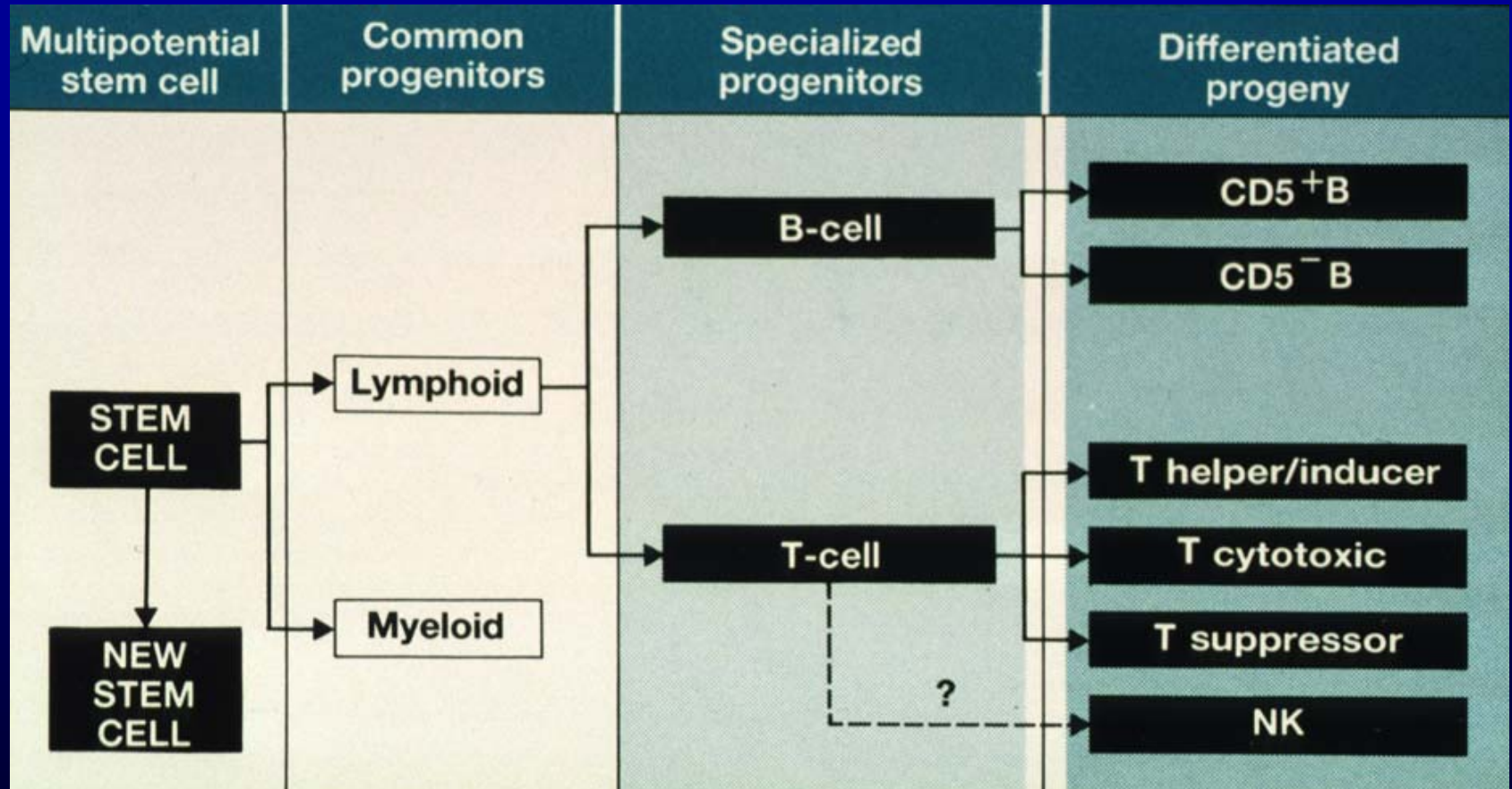
Avantages de l'invalidation

- 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

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

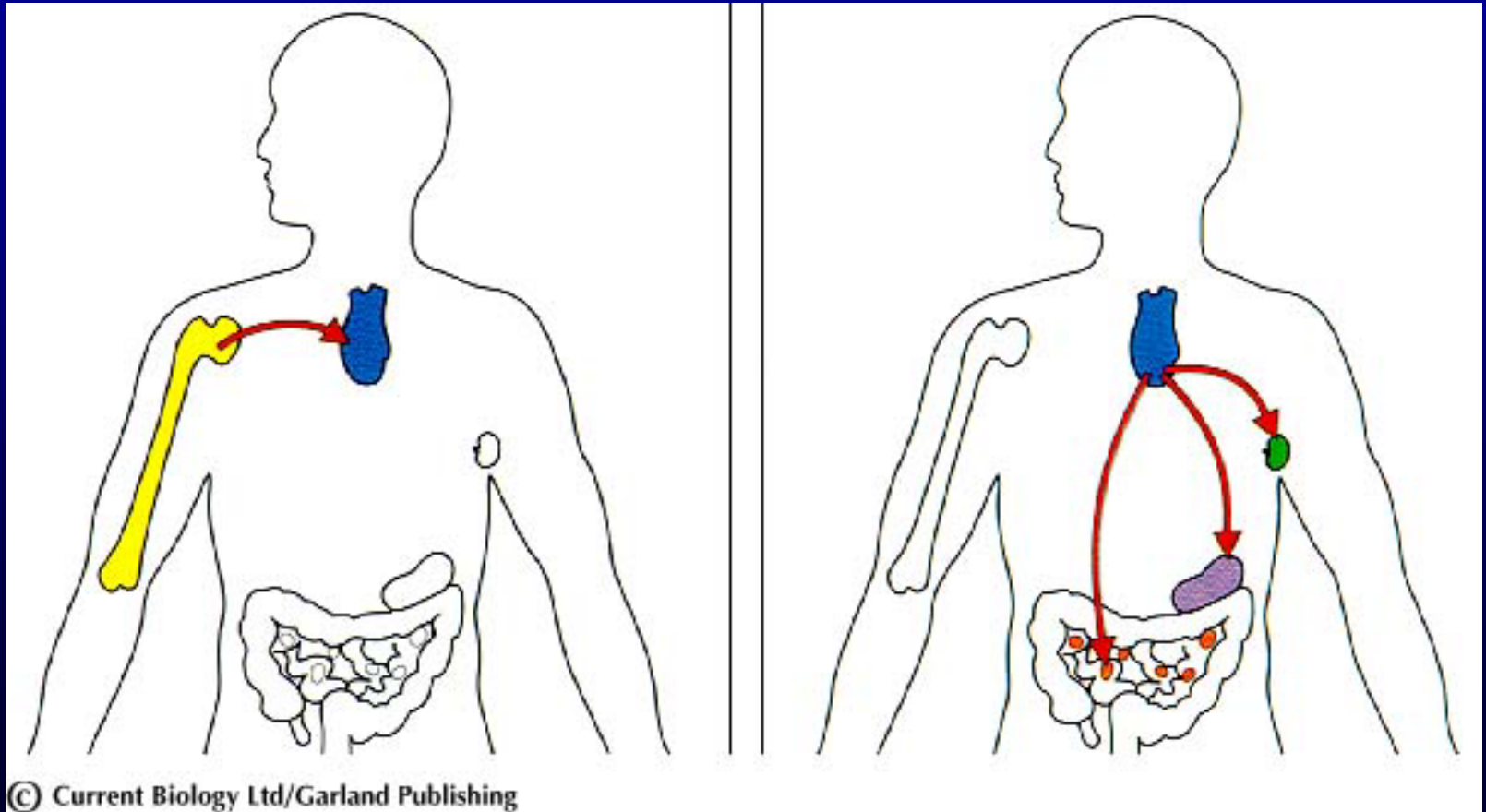
La lignée lymphocytaire



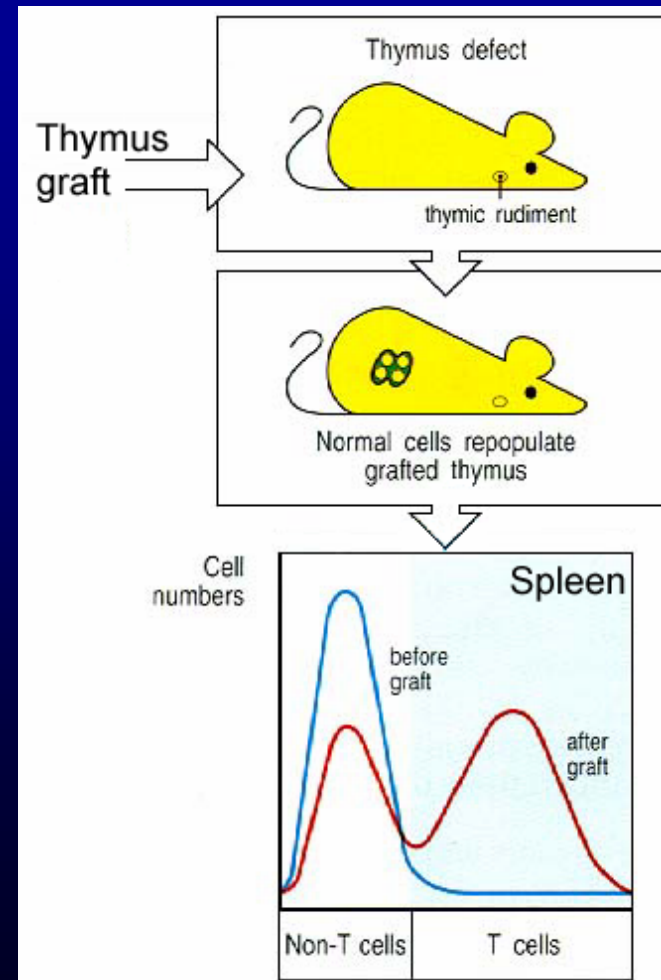
Questions

- 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

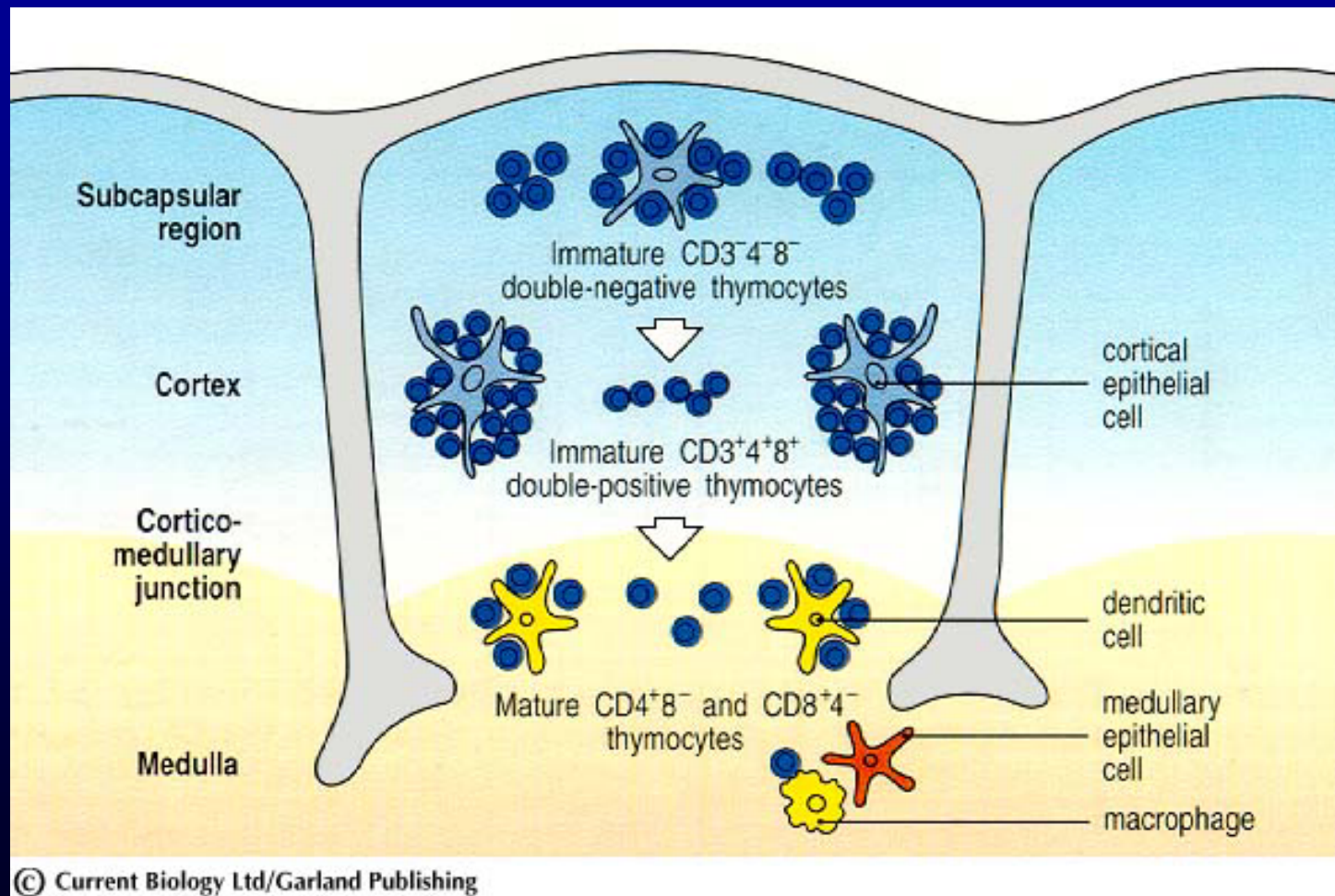
Les lymphocytes T se différencient dans le thymus



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



Architecture cellulaire du thymus



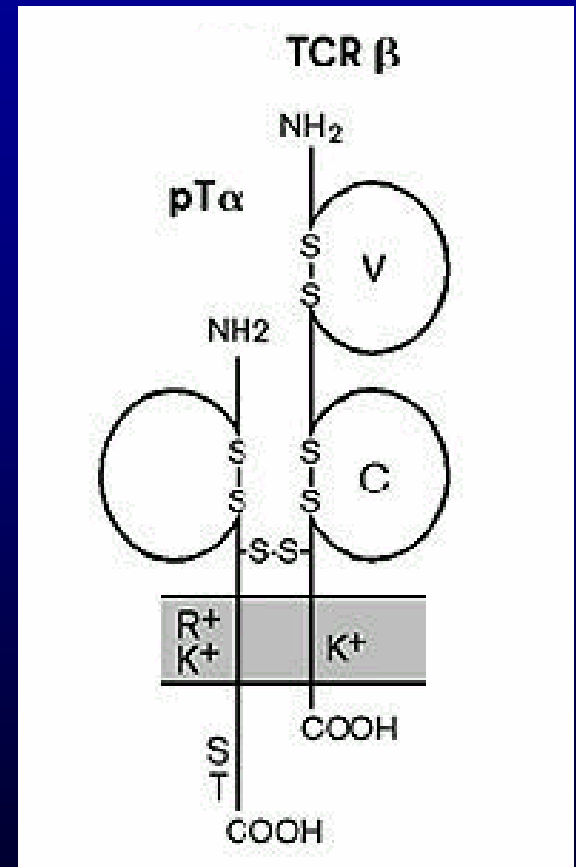
Stades de différenciation des thymocytes

- 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

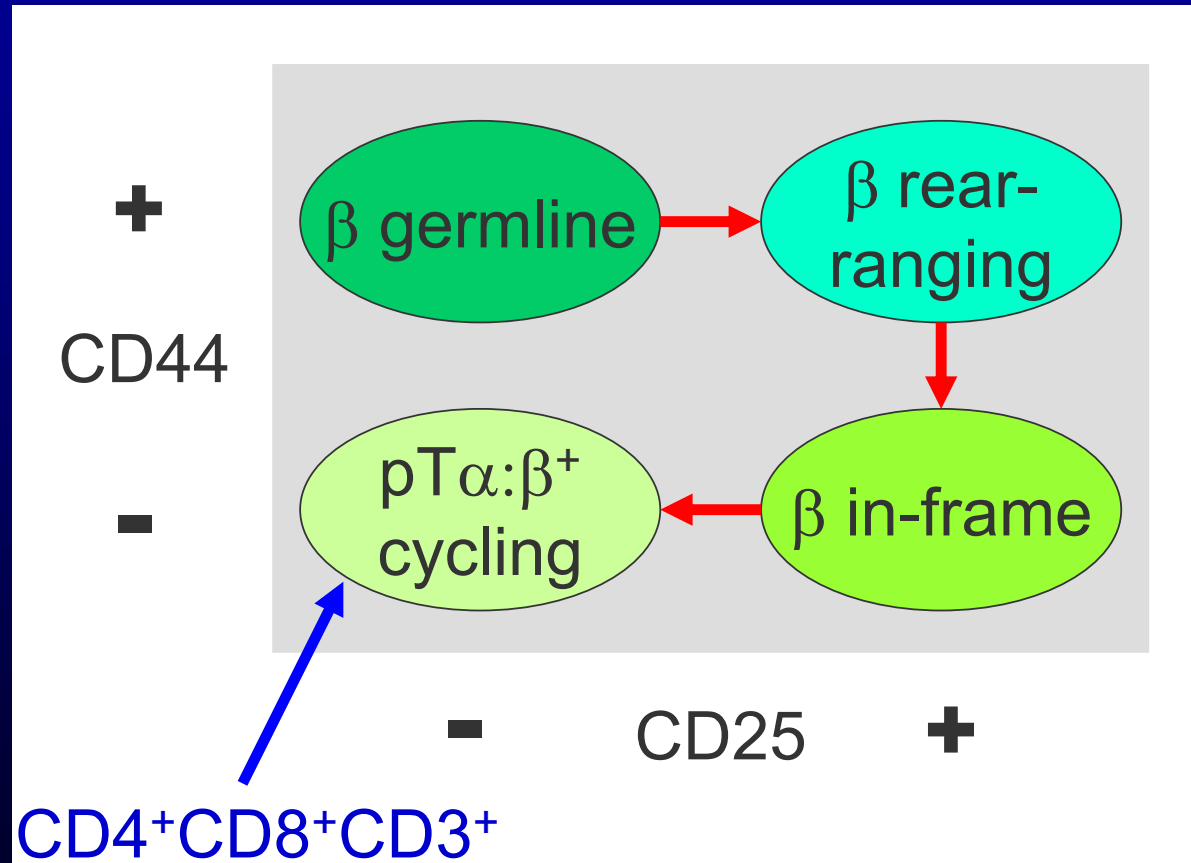
=> identification de la chaîne pT α



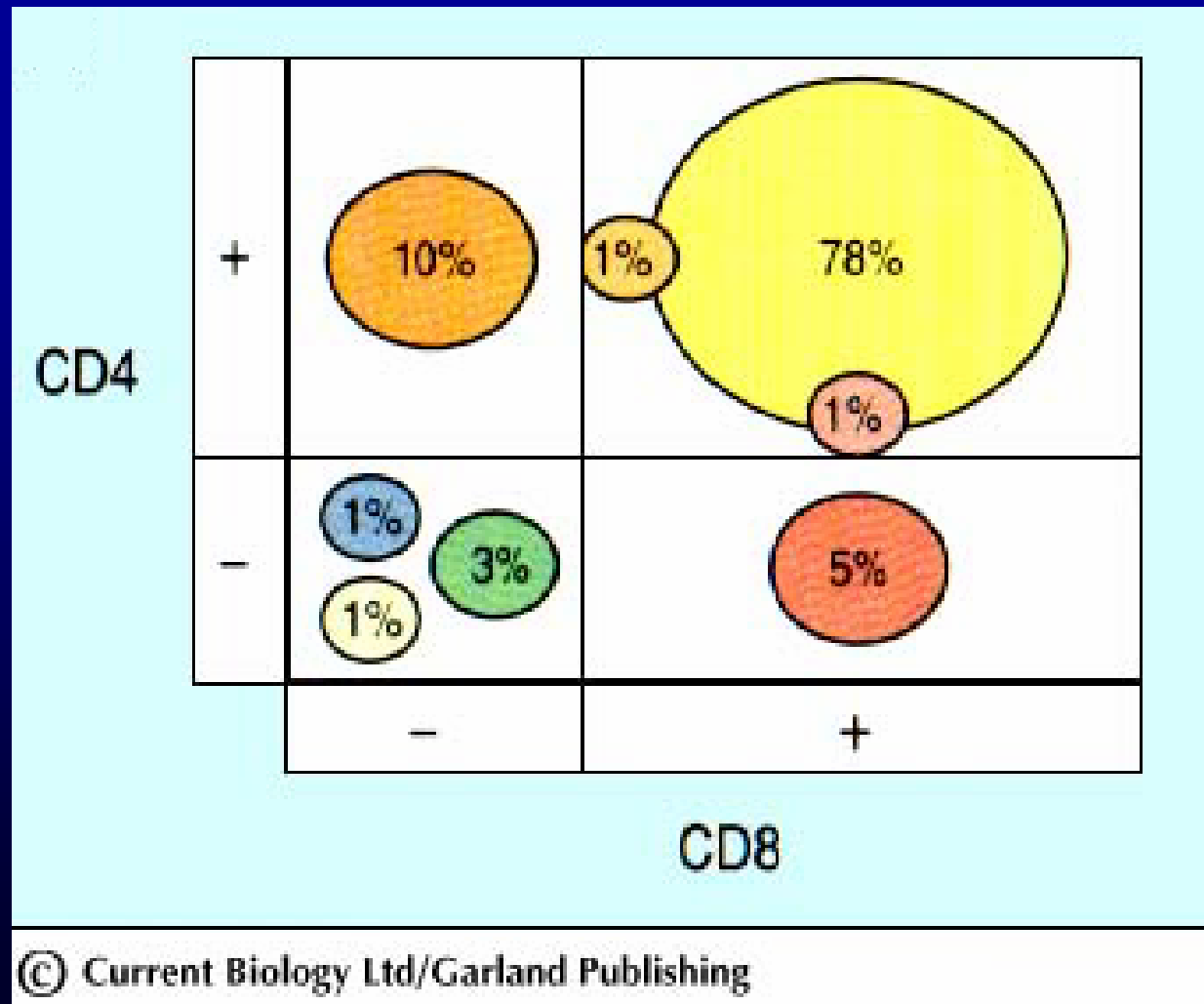
Rôle critique du pré-TCR

- 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

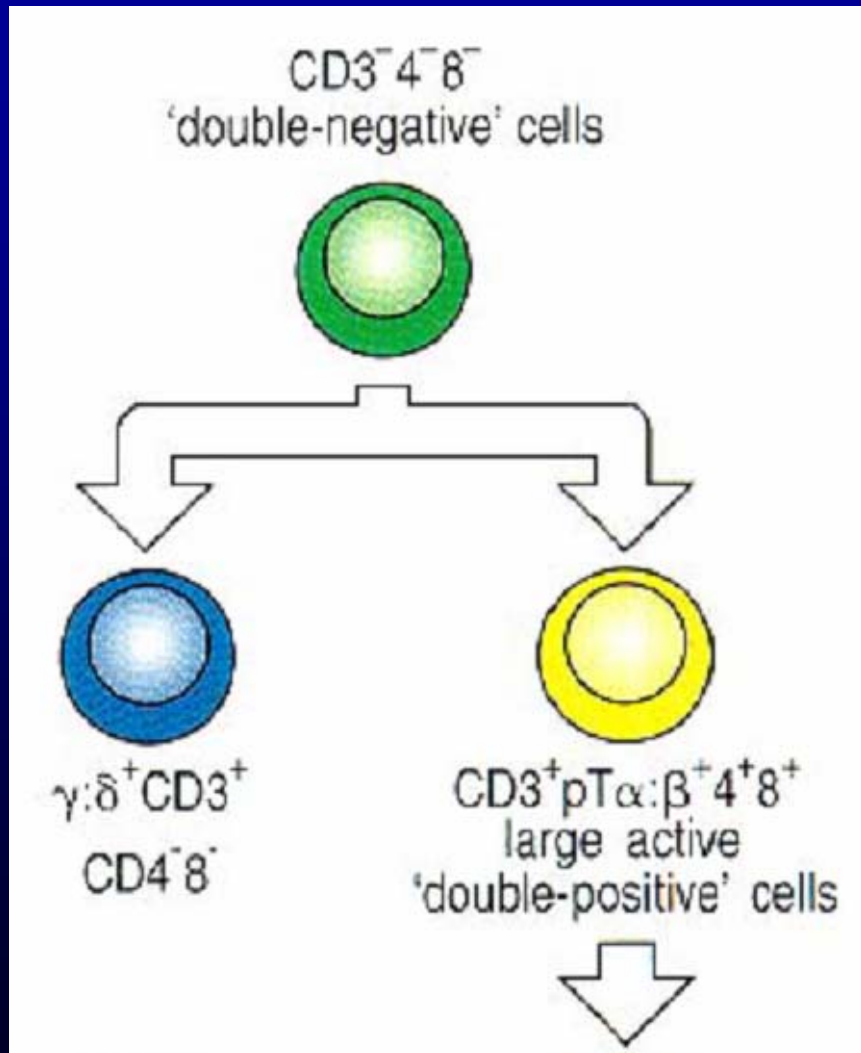
Différenciation des thymocytes (1)



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

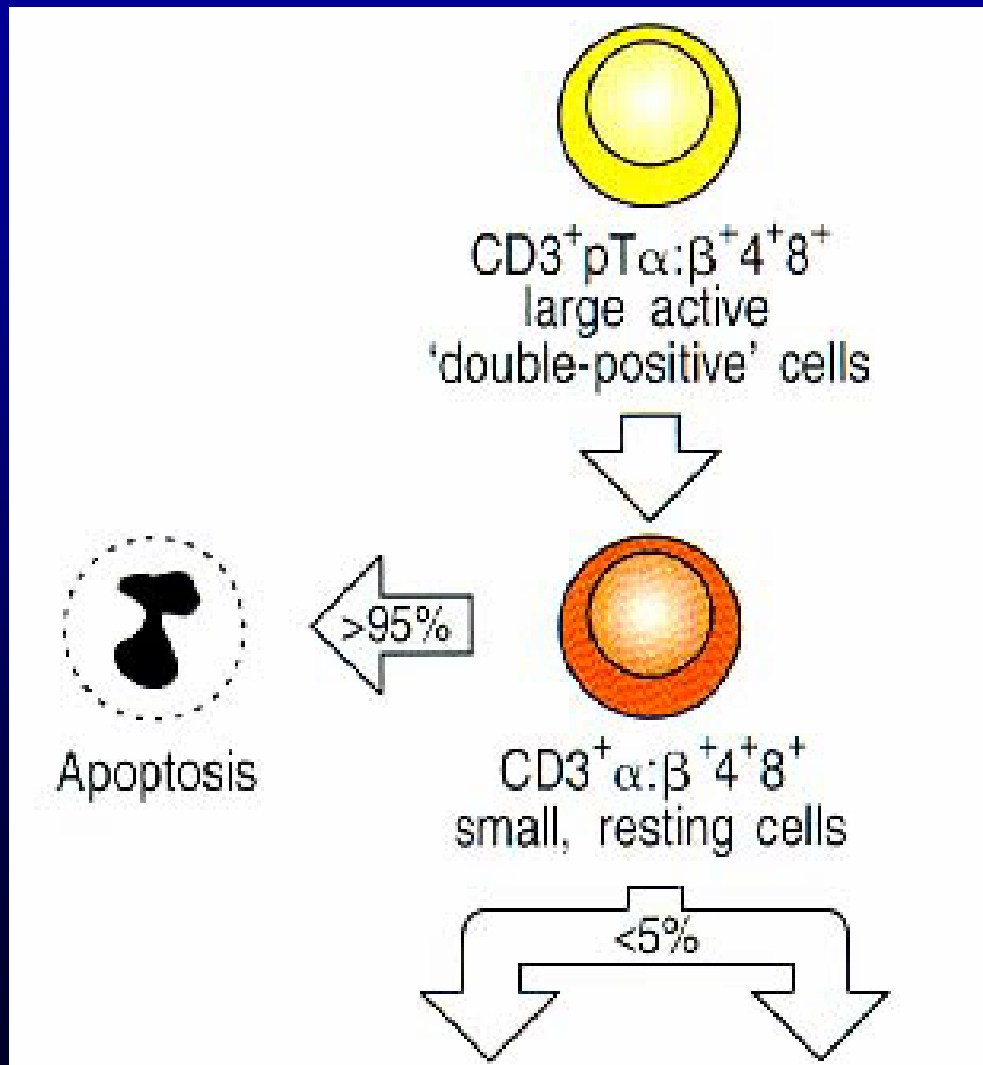
Exclusion allélique

- 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

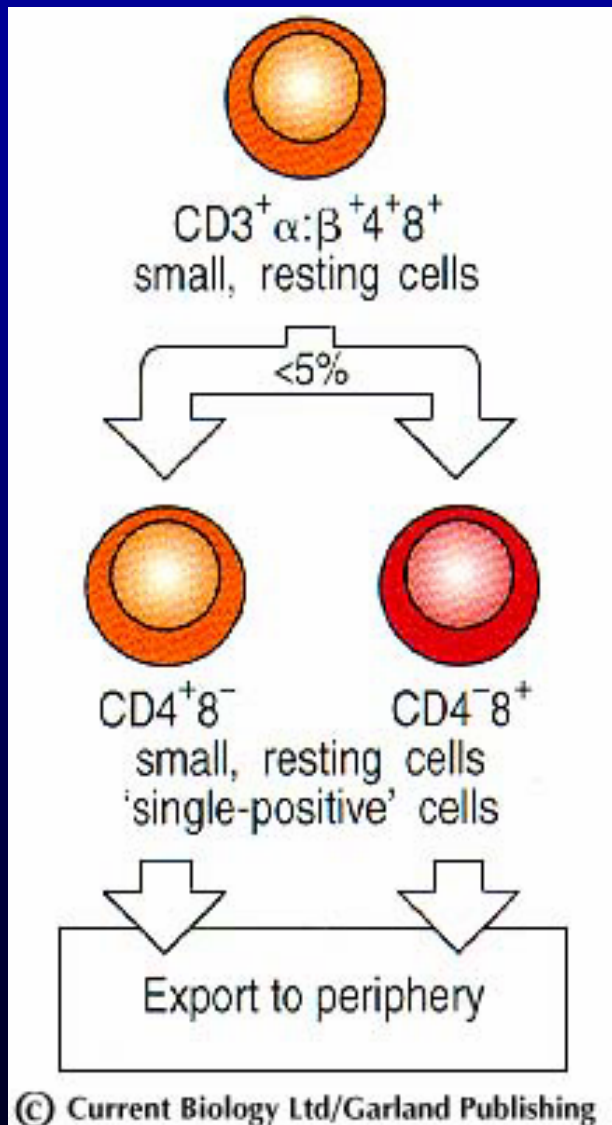
- TCR δ , TCR γ et TCR β réarrangent en même temps au stade pro-T
- Les réarrangements TCR α sont limités aux thymocytes pré-T DP engagés vers la lignée $\alpha\beta$ et exprimant TCR β
- A l'inverse de TCR β , les réarrangements TCR α ont lieu sur les deux chromosomes → l'exclusion allélique a lieu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

Différenciation des thymocytes (4)



Sélection positive
Sélection négative

Différenciation des thymocytes (5)



Sélection positive
Sélection négative

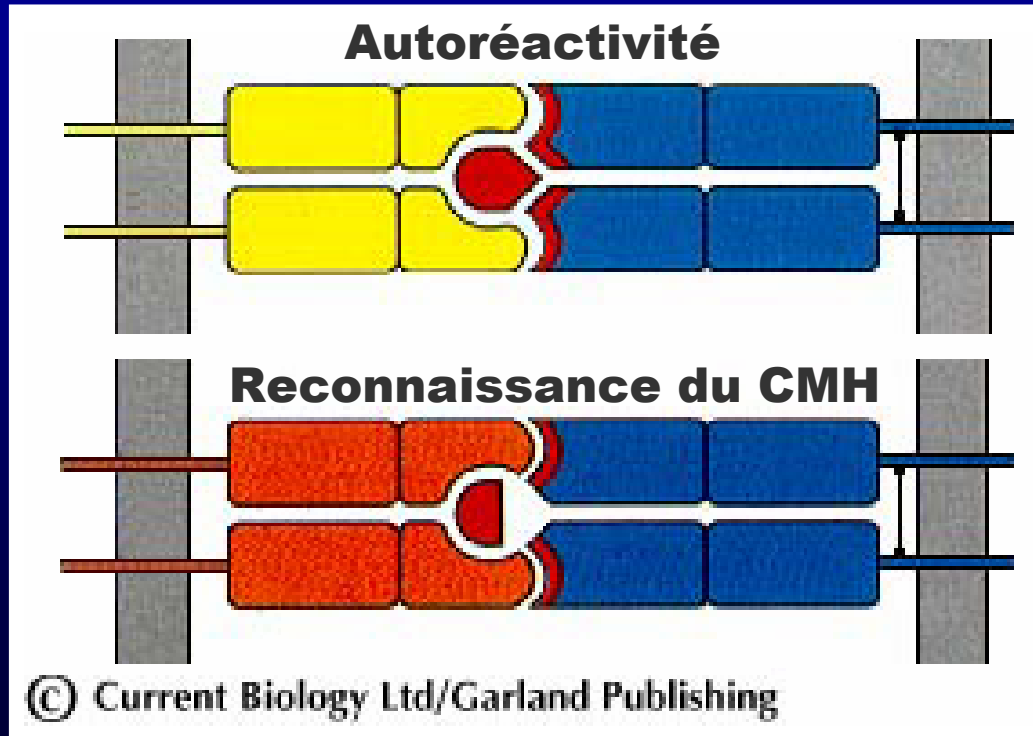
Engagement CD4/CD8
Restriction pour le CMH
Fonction effectrice

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

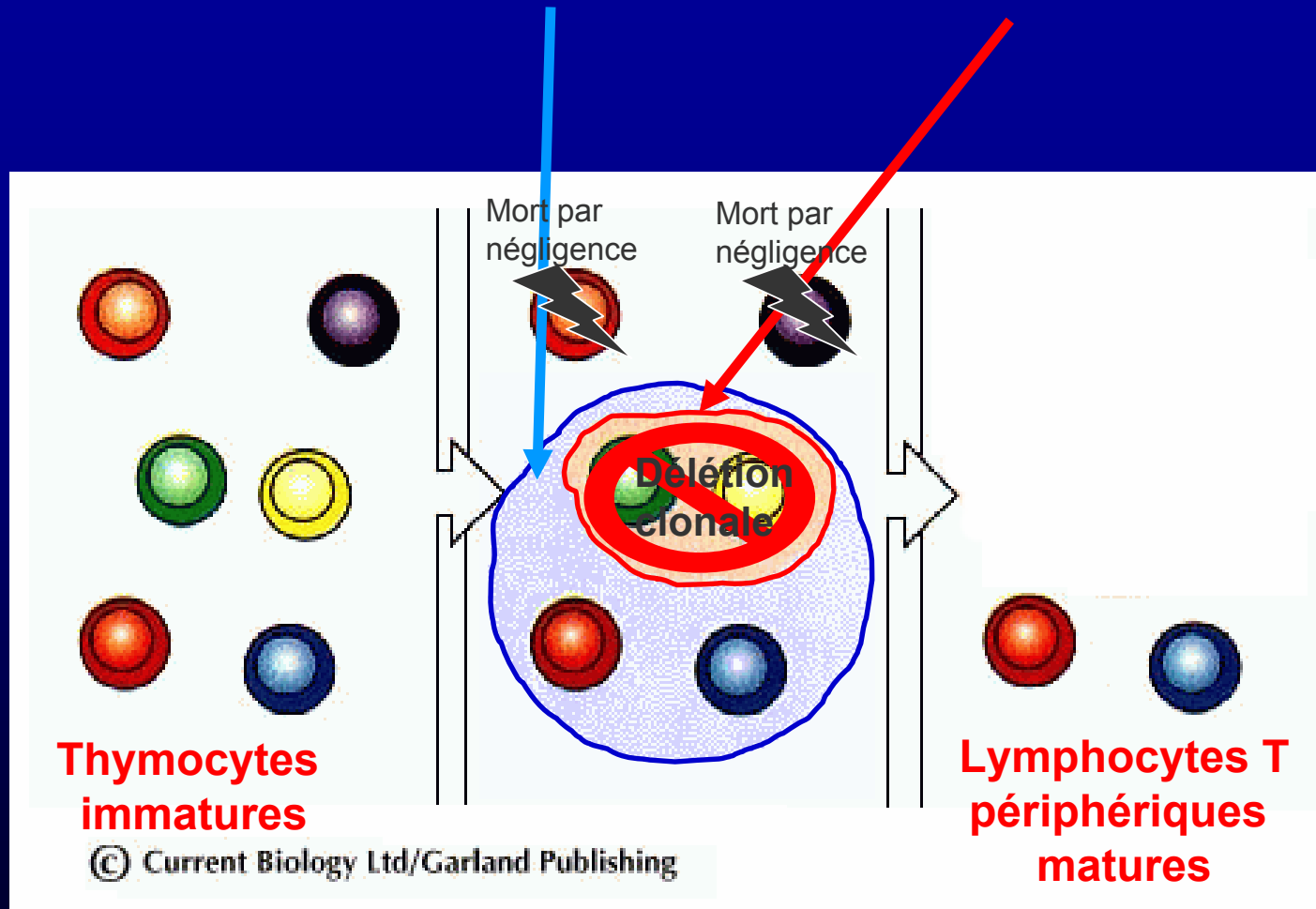


→ **Sélection négative**

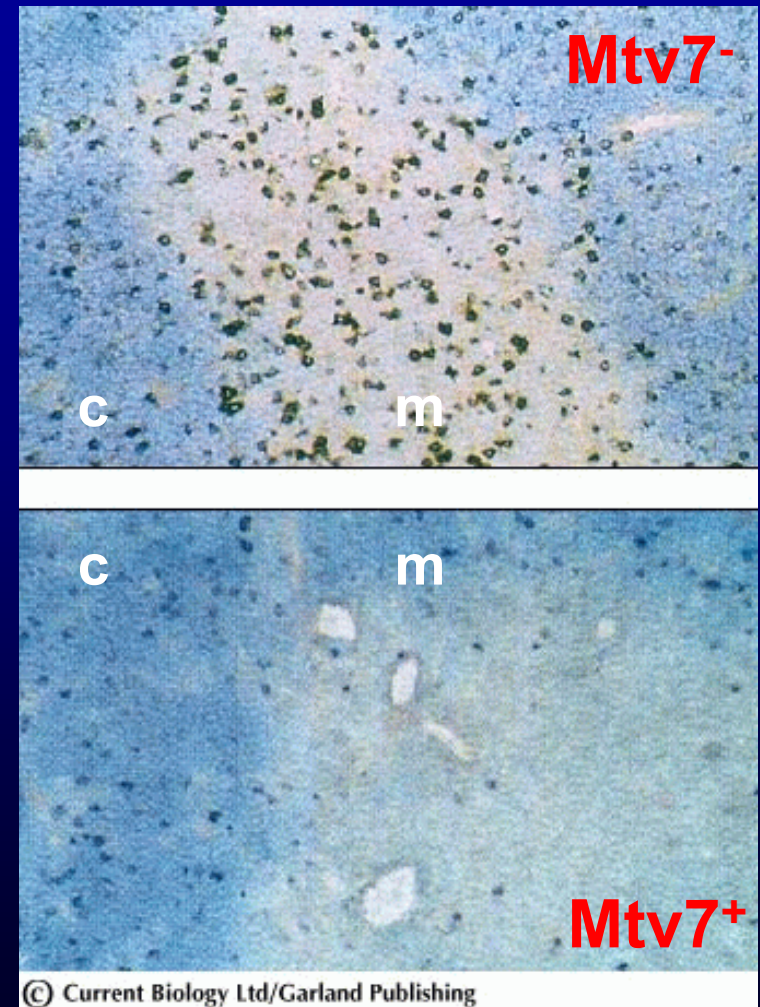
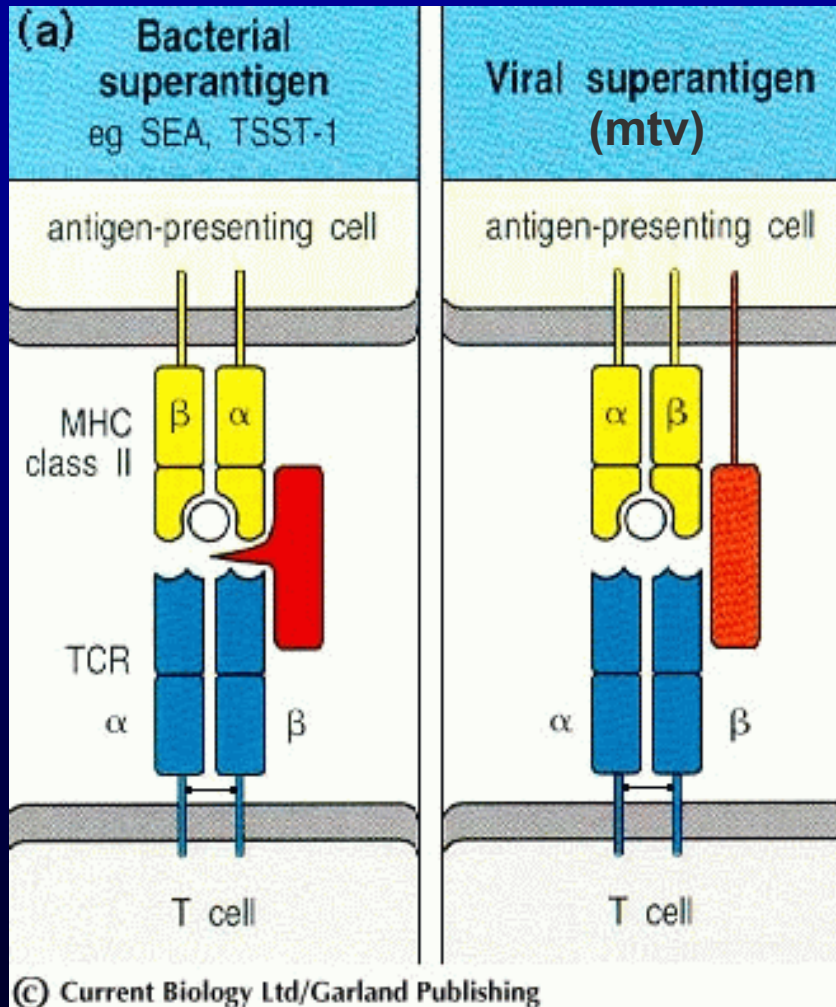
→ **Sélection positive**

→ *Éducation thymique*

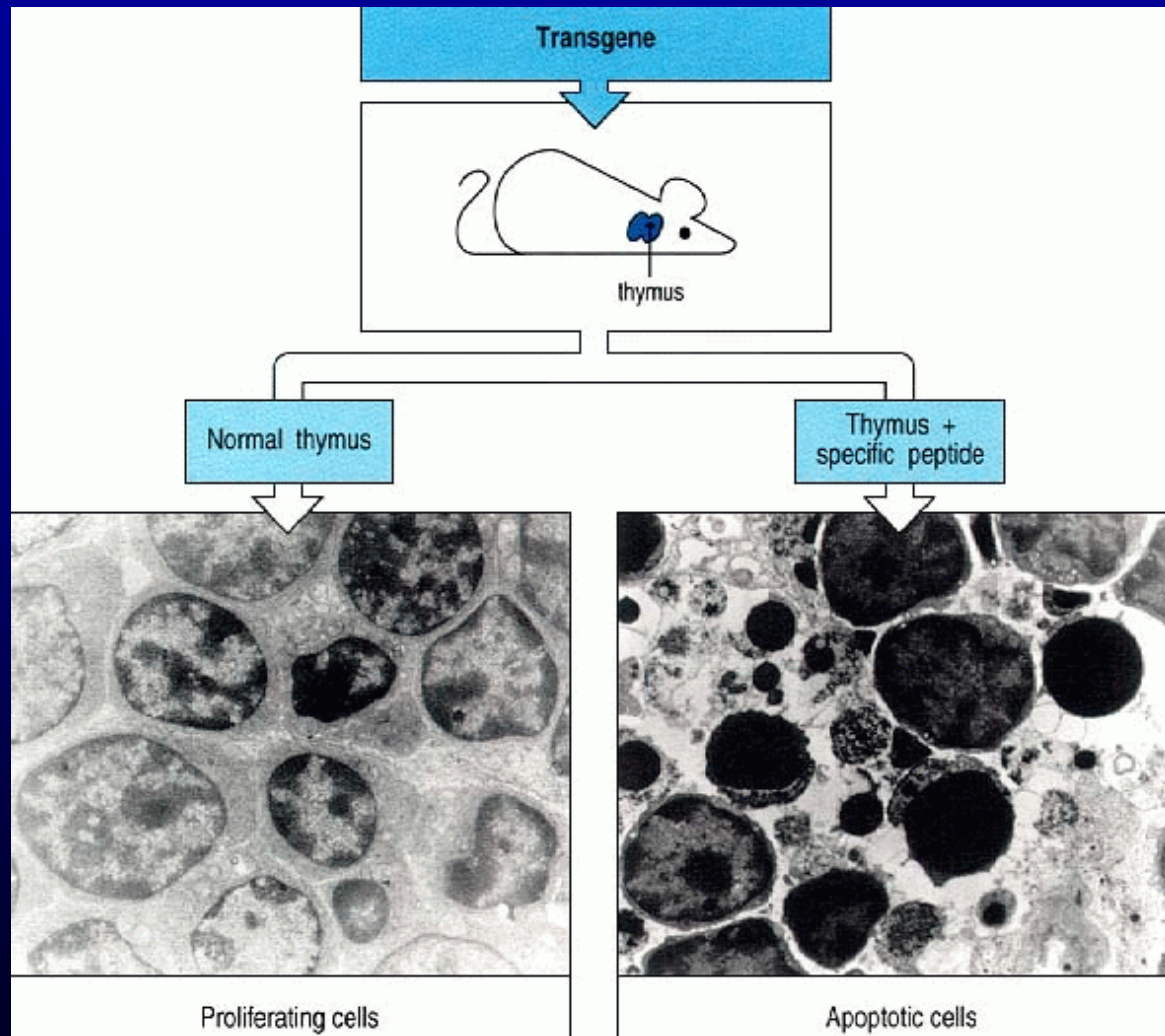
Sélections positive et négative (3)



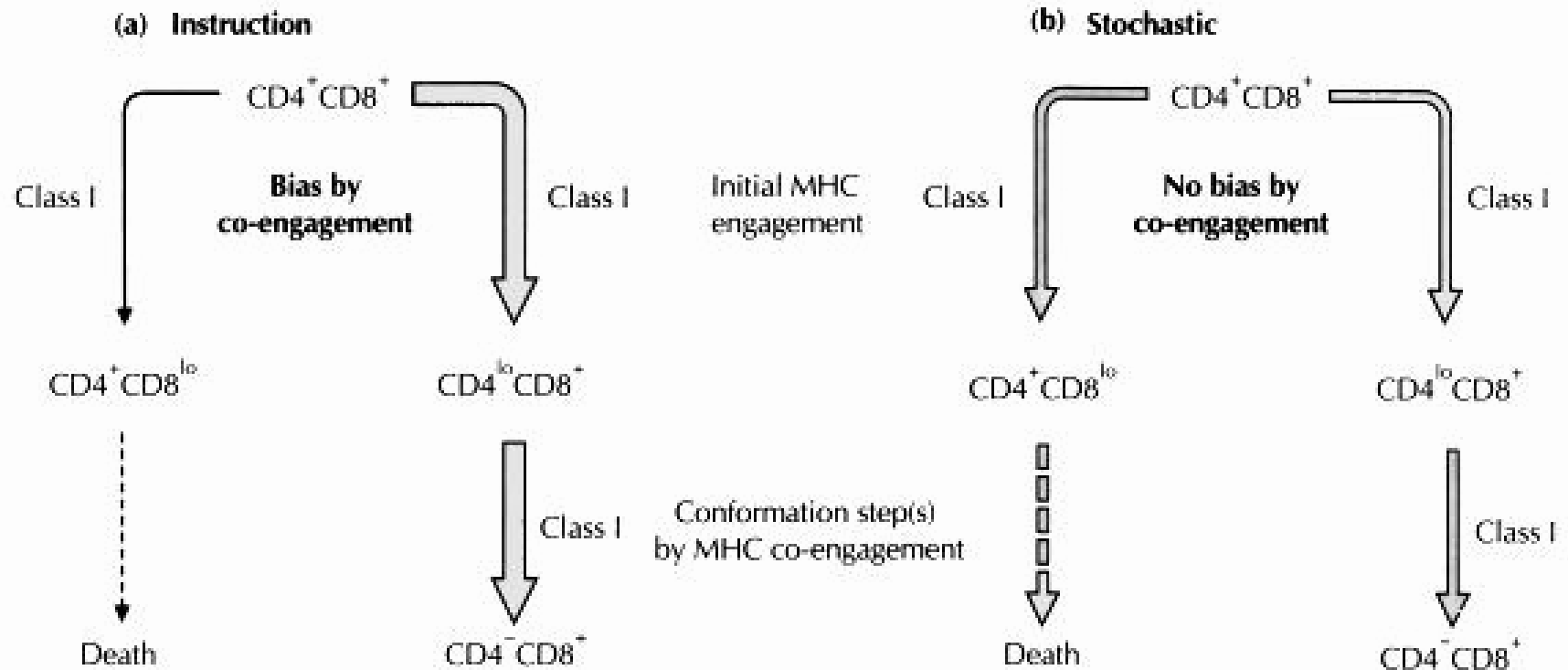
Délétion clonale et superantigènes



Délétion clonale et TCR transgénique



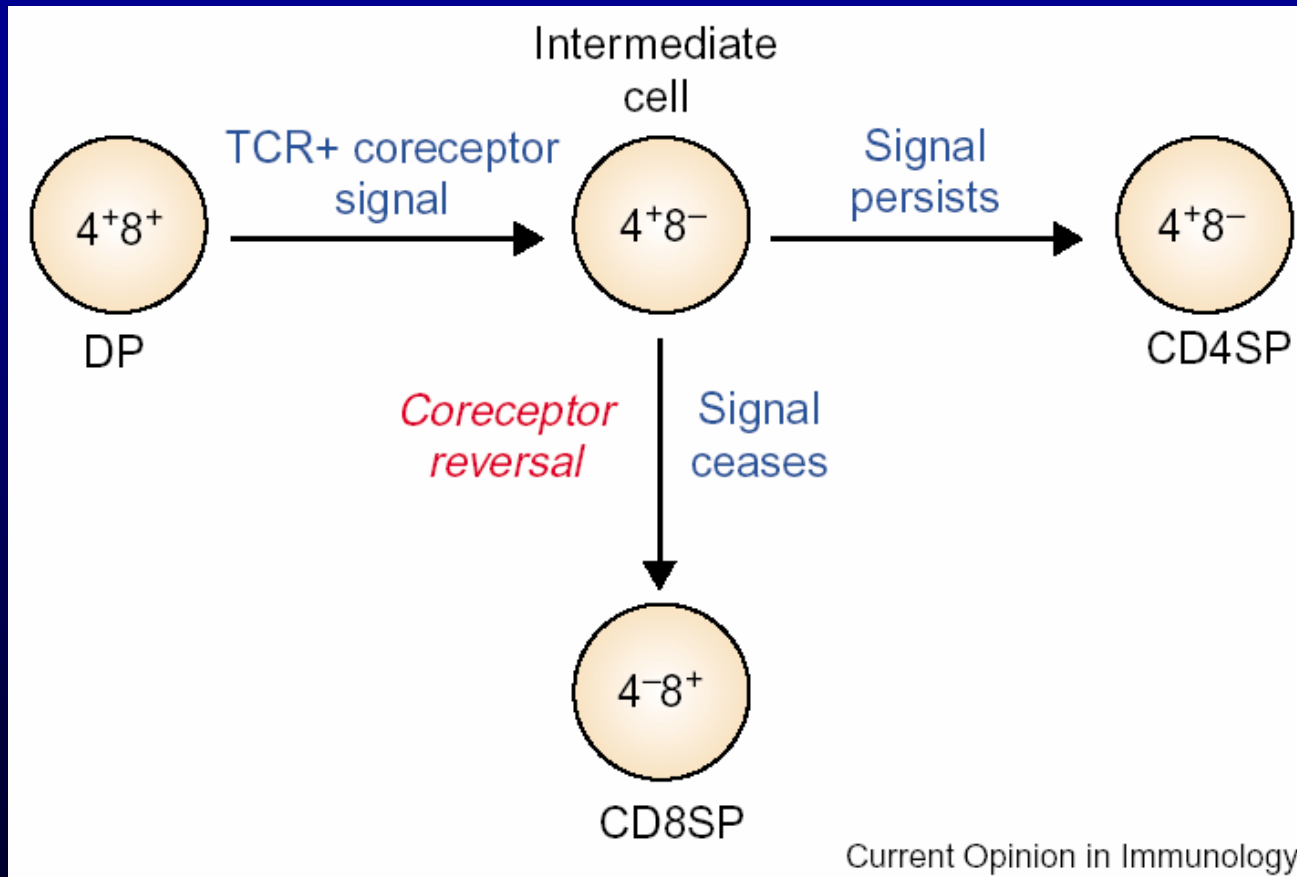
Mécanisme de la restriction au CMH (1)



© 1995 Current Opinion in Immunology

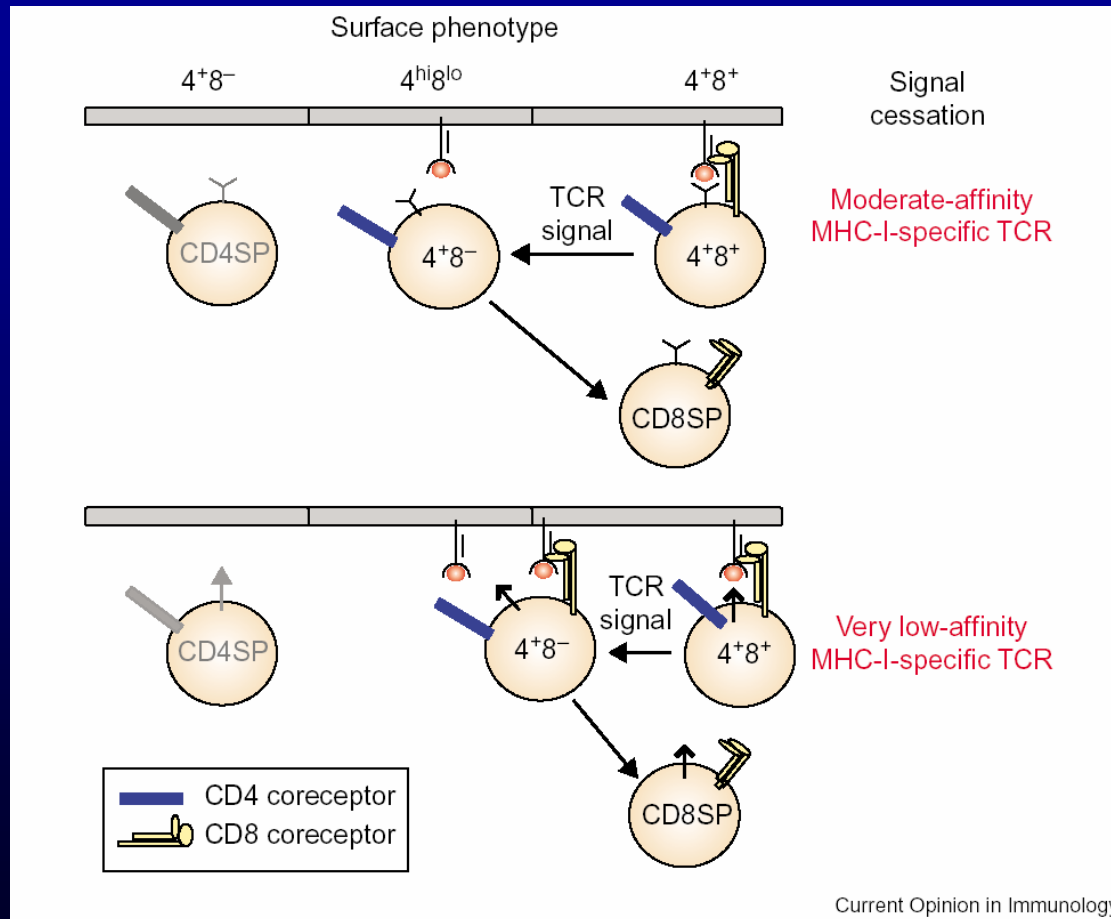
Mécanisme de la restriction au CMH (2)

Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



Mécanisme de la restriction au CMH (3)

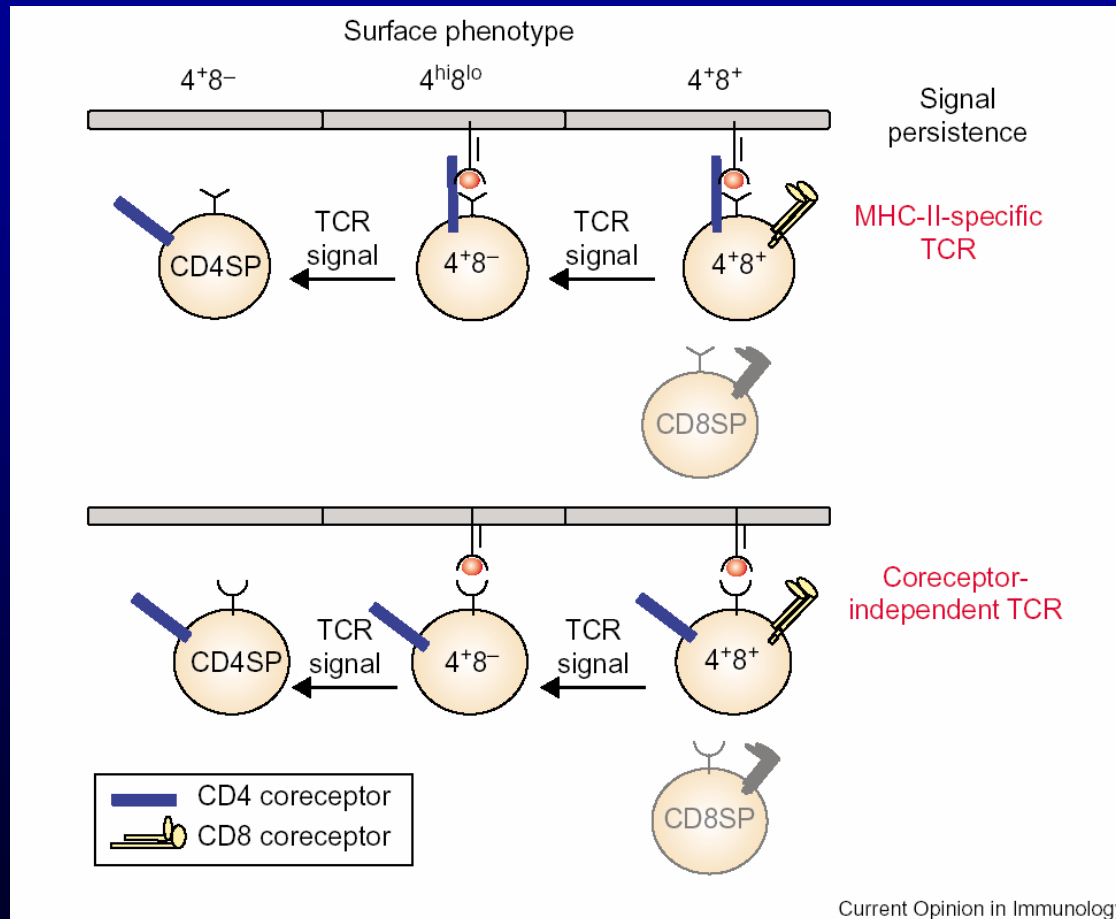
Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



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

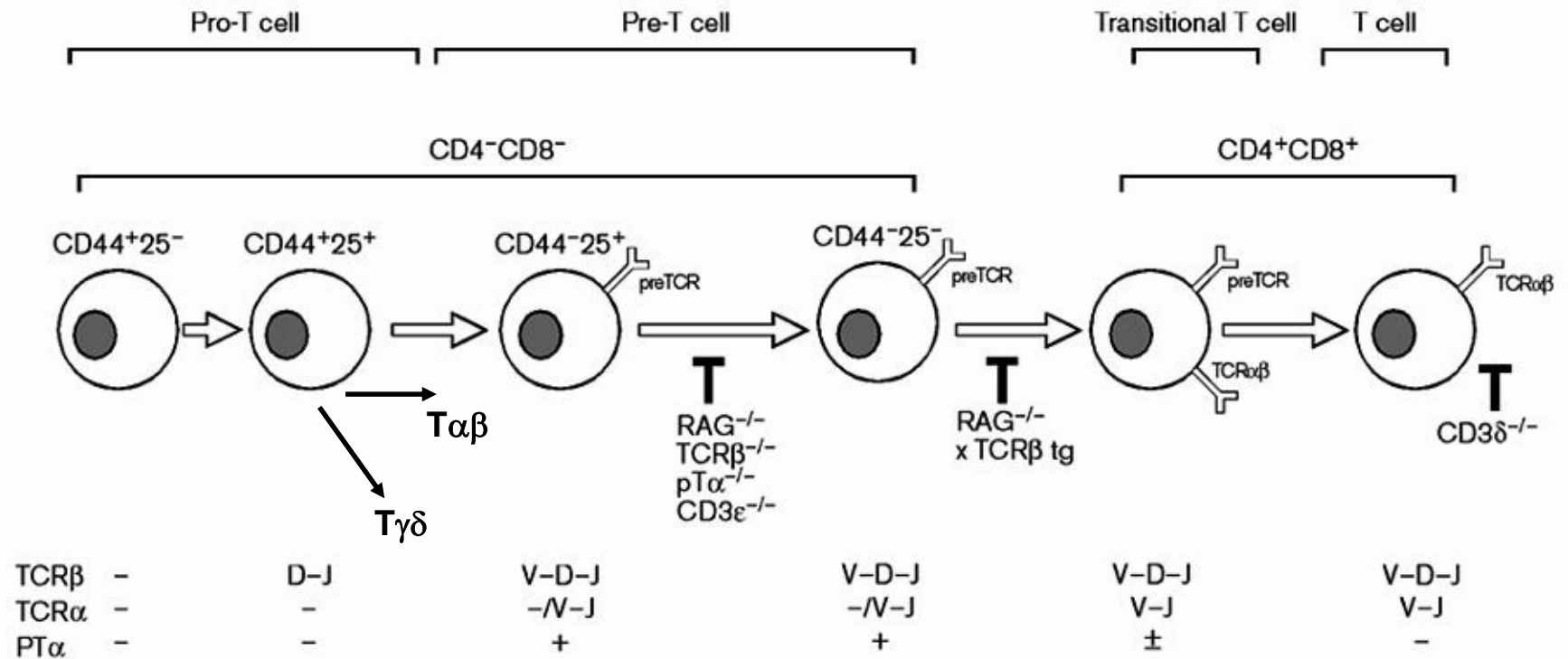
Mécanisme de la restriction au CMH (4)

Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



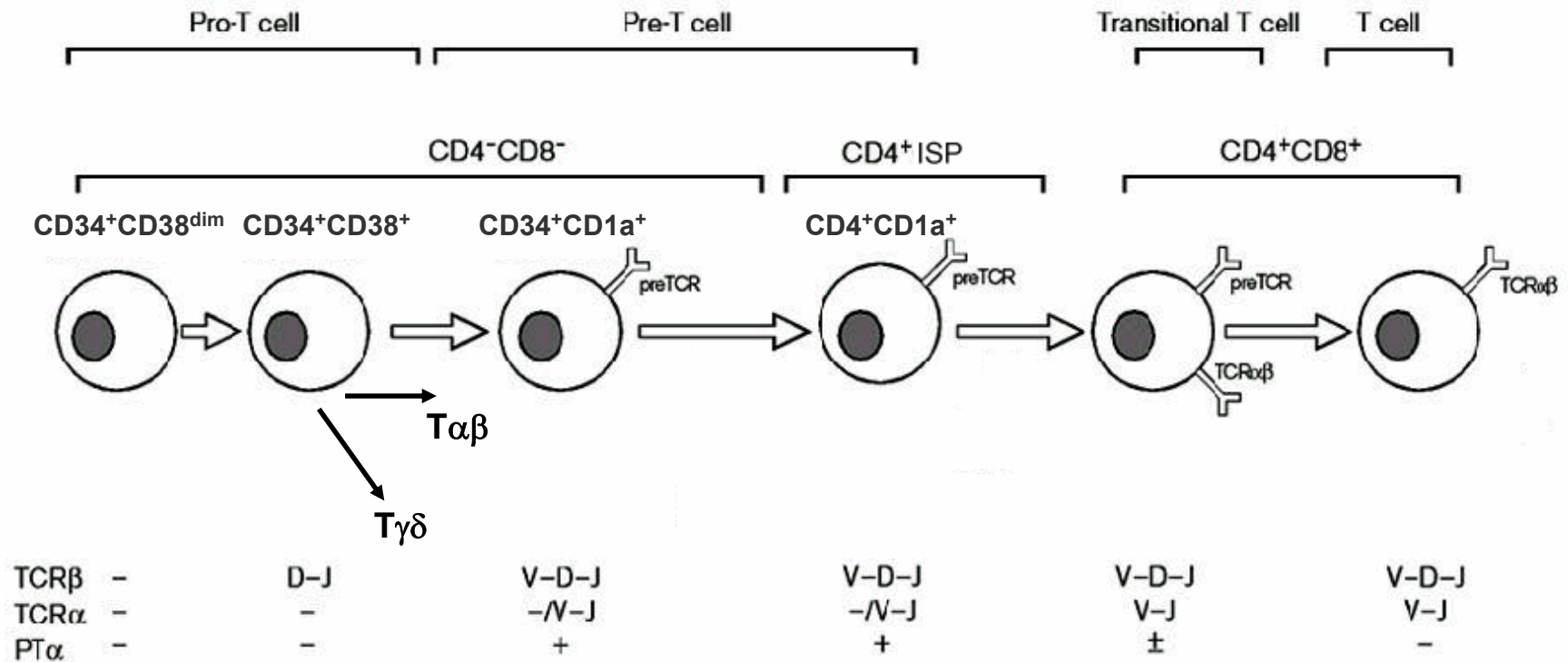
**Un signal persistant
promeut la
différenciation en
lymphocyte T CD4SP**

Différenciation thymique: souris



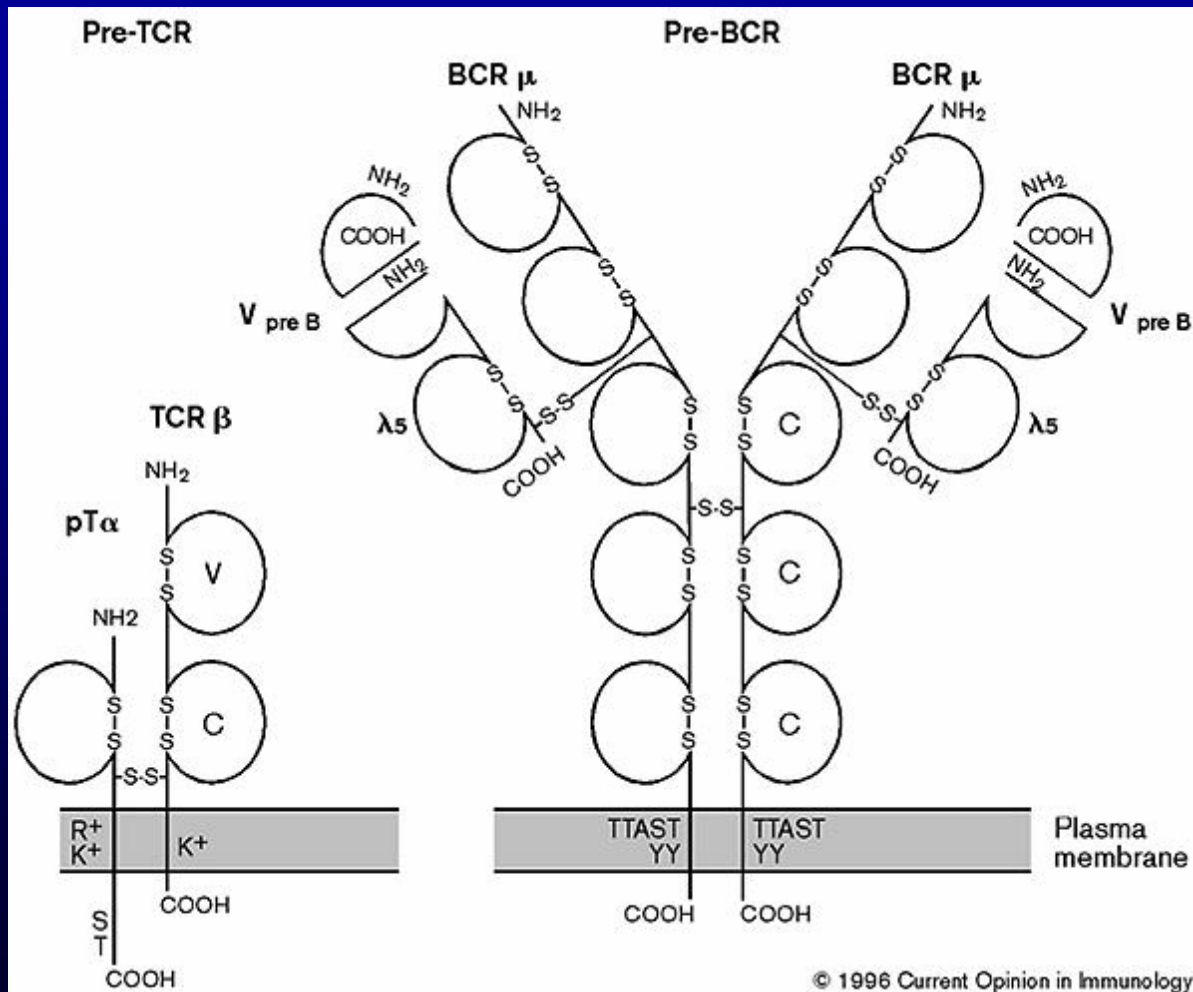
© 1996 Current Opinion in Immunology

Différenciation thymique: homme



© 1996 Current Opinion in Immunology

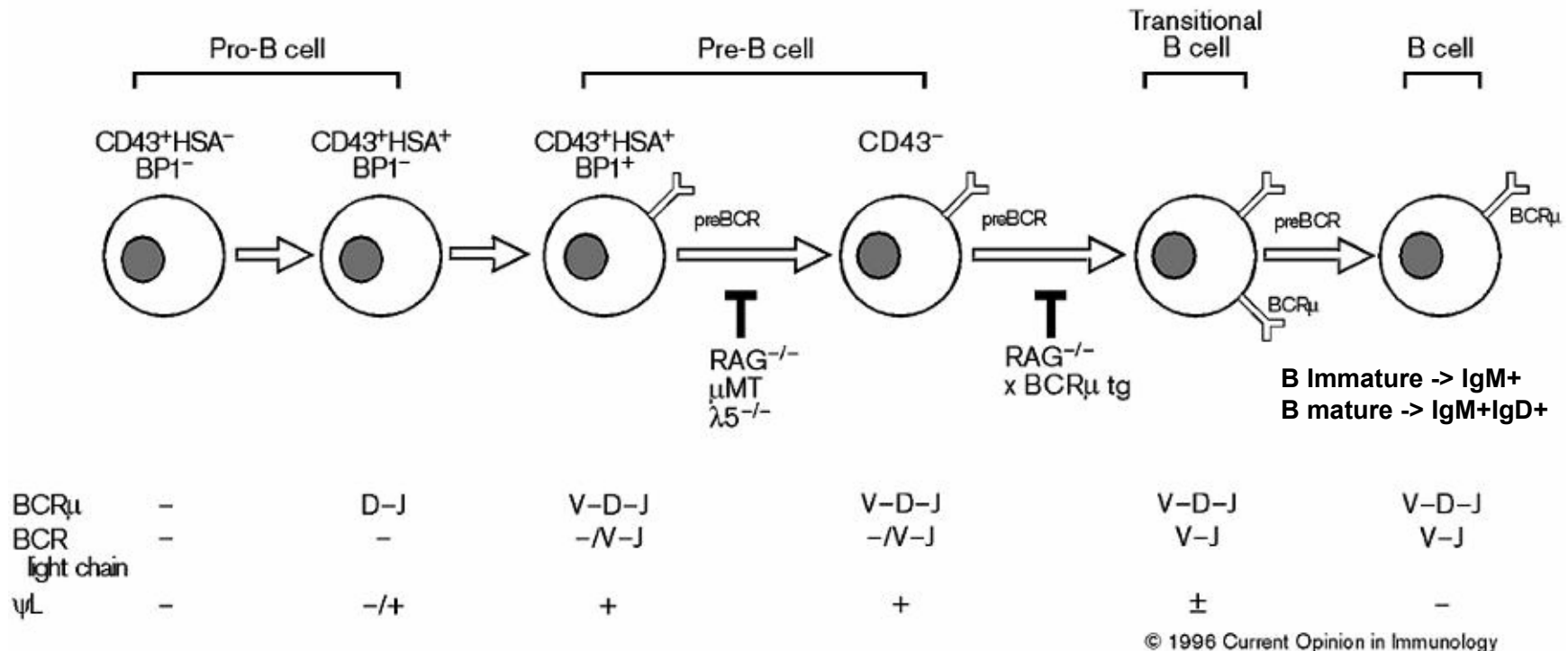
Caractérisation du pré-BCR



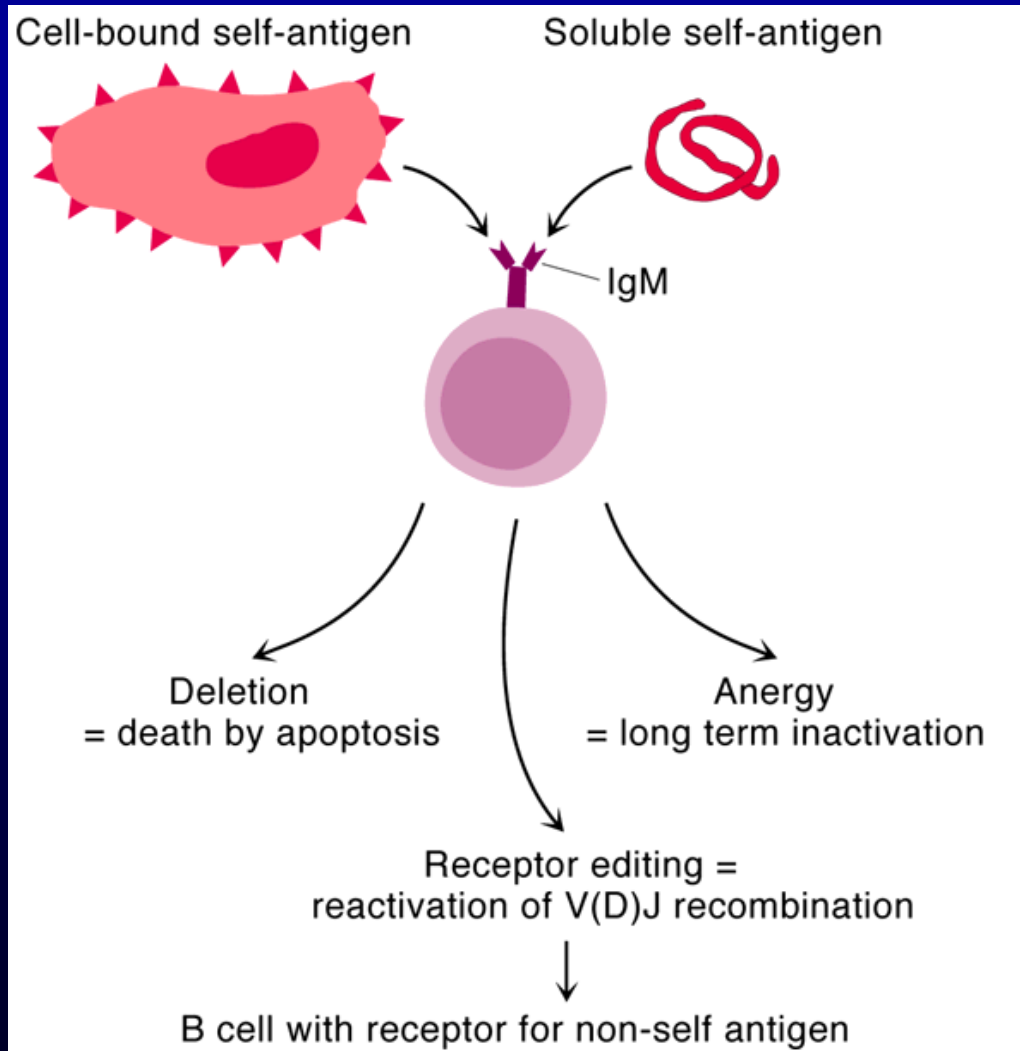
Rôle du pré-BCR

- *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

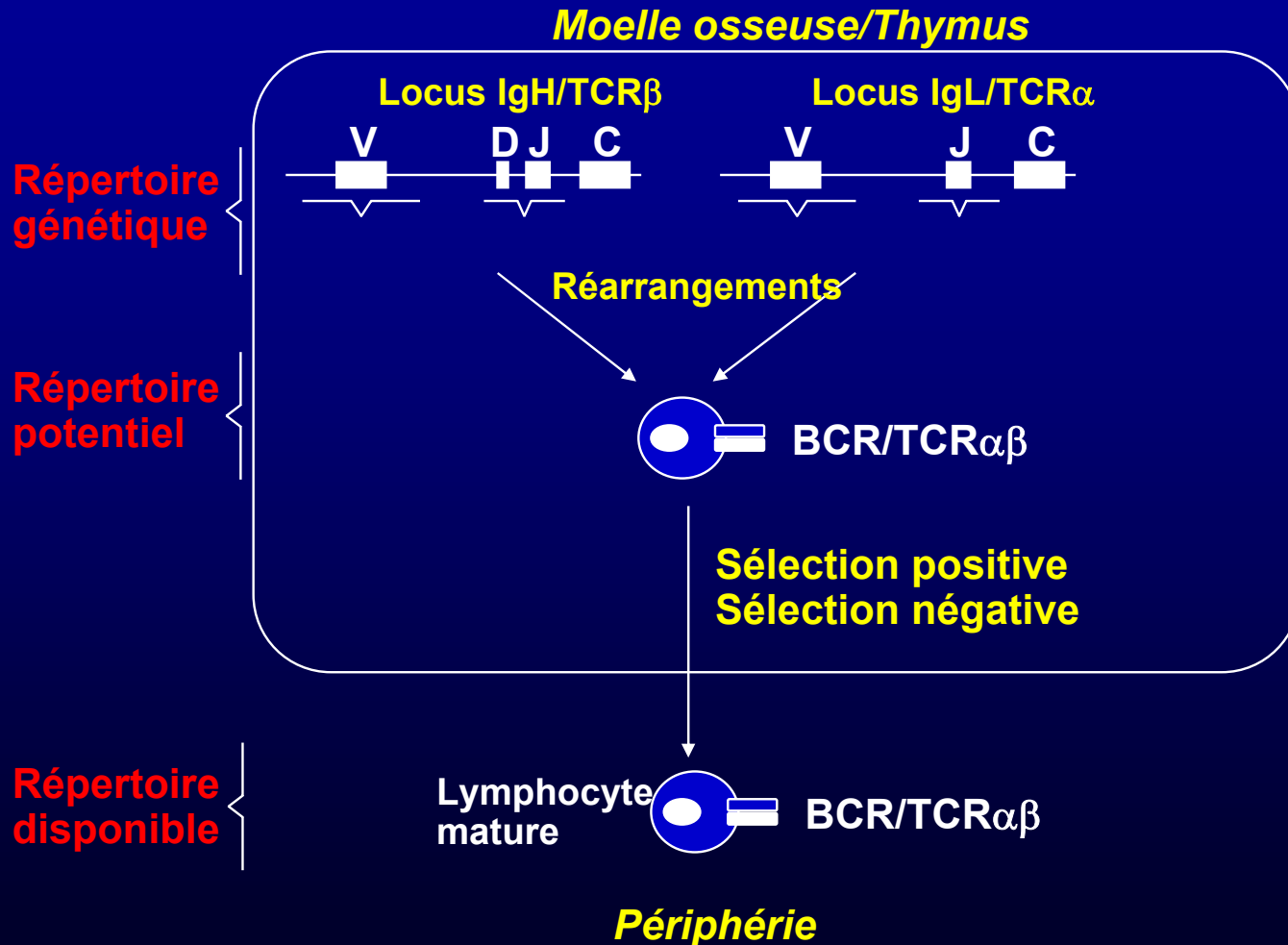


Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

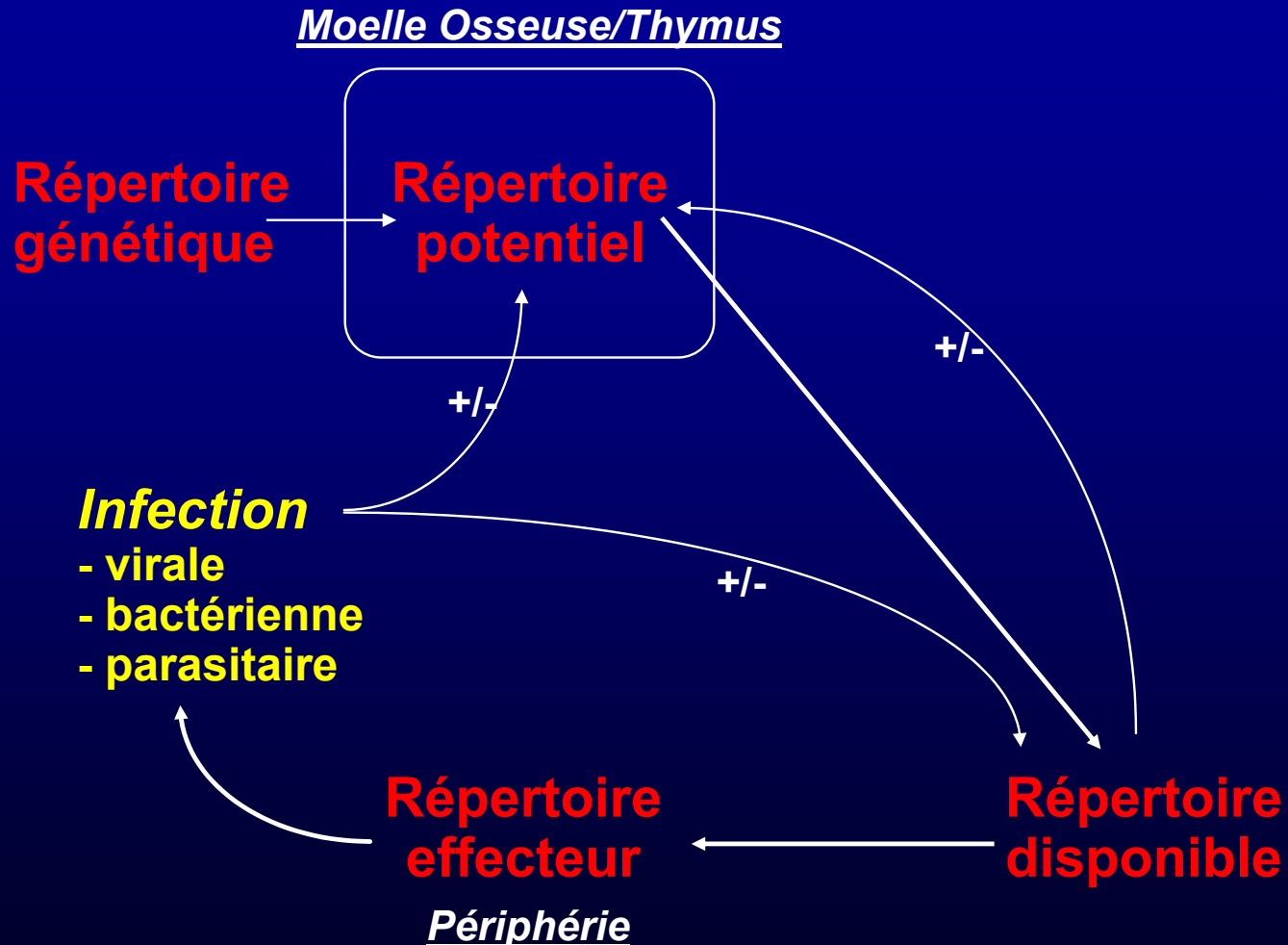
1. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
2. Développement lymphocytaire B et T
3. Sélection des répertoires

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

Notions de répertoires (1)



Notions de répertoires (2)



Peptides agonistes, antagonistes (1)

Peptide ligand altéré (APL)

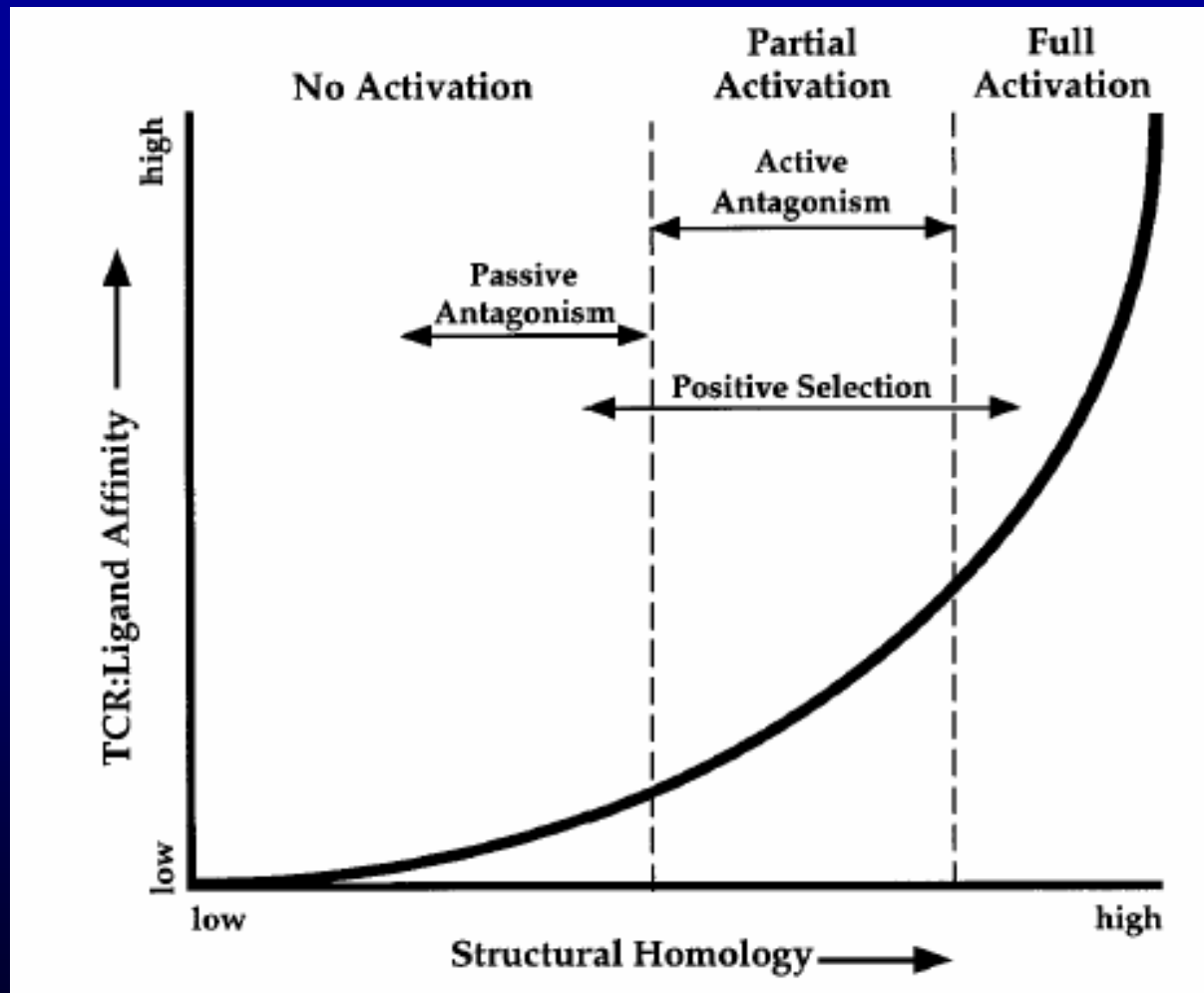
= peptide analogue d'un peptide immunogène

Agoniste → Conserve certaines fonctions d'activation

Antagoniste passif → Compétition pour le CMH

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

Peptides agonistes, antagonistes (2)

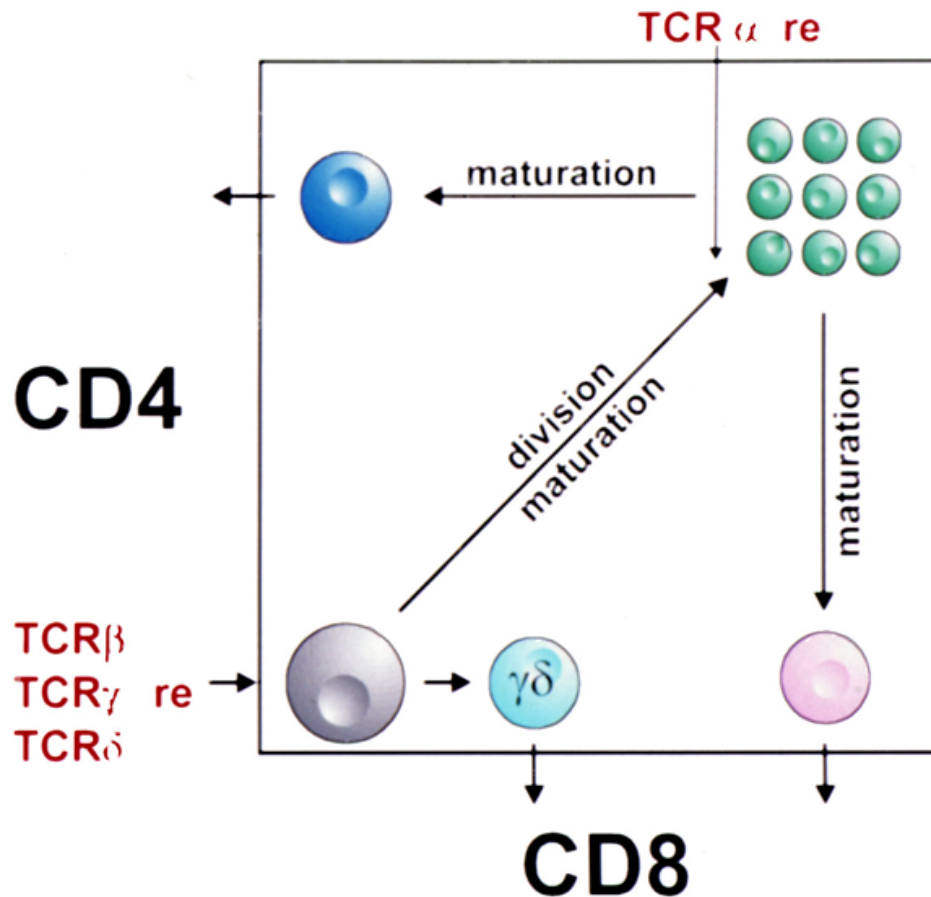


D'après Sloan-Lancaster et Allen (1996) Annu. Rev. Immunol. 14: 1-27.

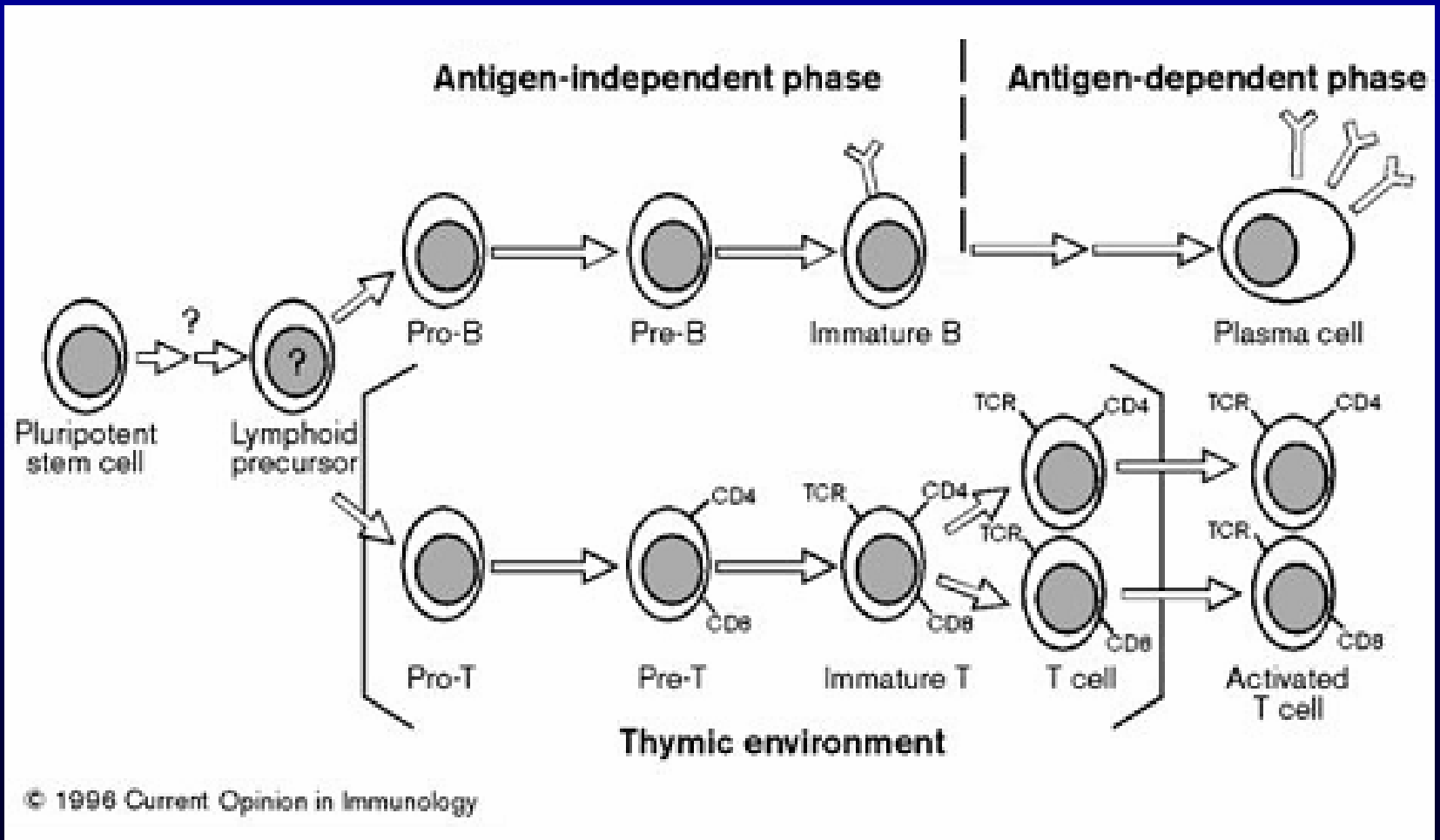
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Conclusion

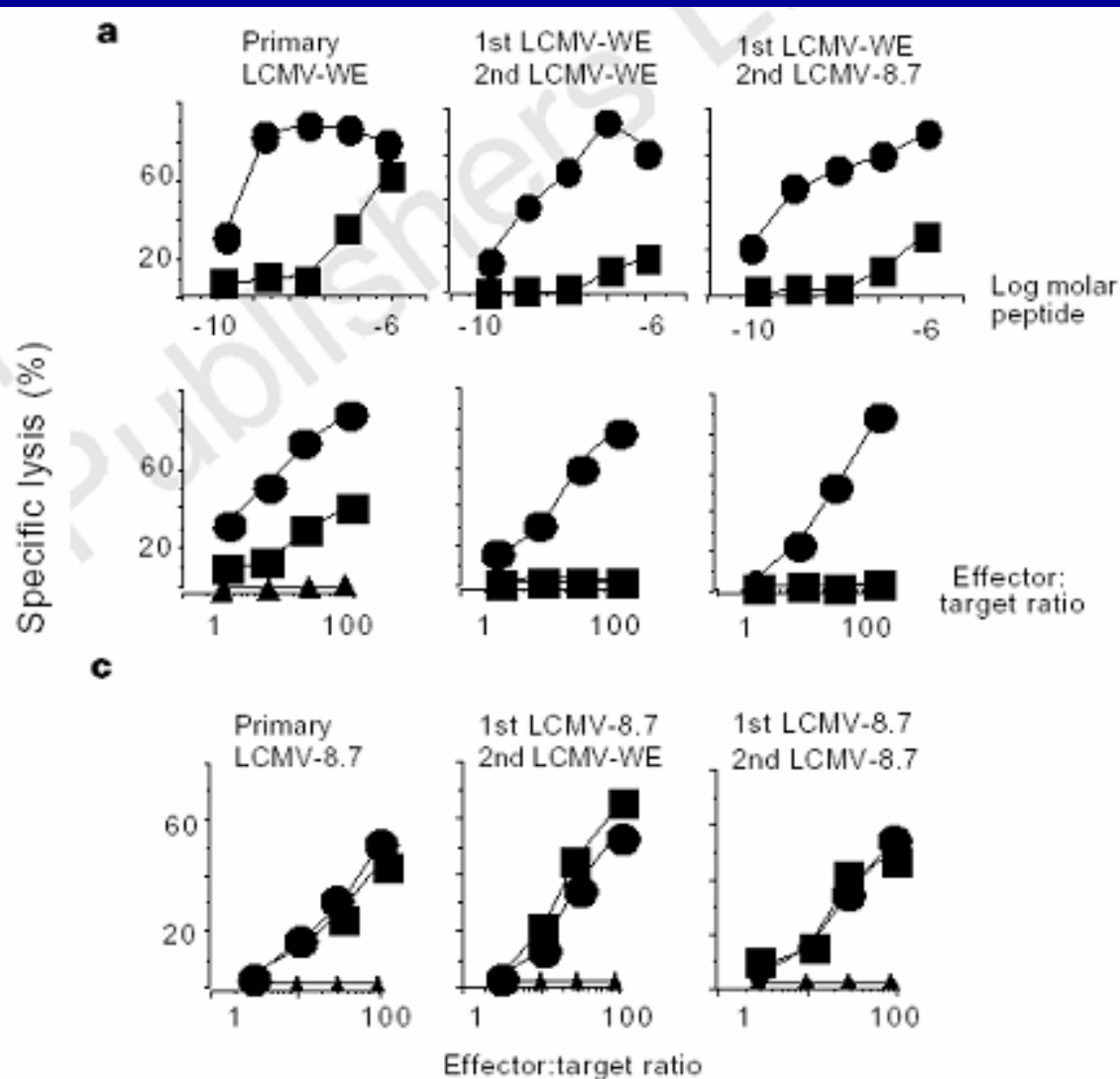
Rappel différenciation T



Parallèle différenciations B et T



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.

Questions/Discussion...