

Développement lymphocytaire ; Réarrangements TCR/Ig

I.

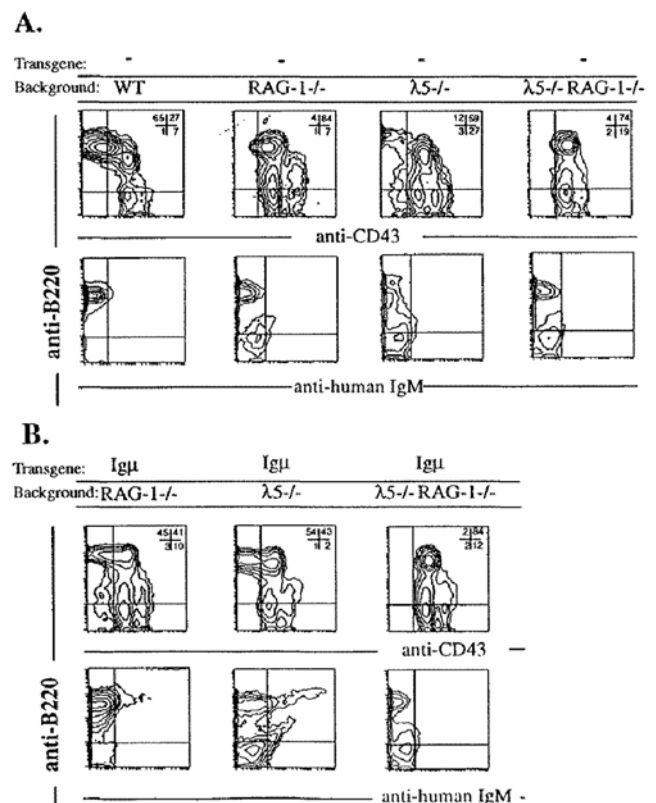
(d'après Papavasiliou, F. *et al.* (1996) *J.Exp.Med.* 184:2025)

Les auteurs de cette étude ont examiné le rôle de différents composants du récepteur pré-BCR dans le développement des cellules B. Ils ont introduit plusieurs transgènes d'immunoglobuline (Ig) dans des souris RAG-/-, $\lambda 5$ -/- et double mutantes (RAG-/- $\lambda 5$ -/-). Tous les transgènes sont des gènes réarrangés sous contrôle du promoteur VH et de l'enhancer IgH. Les résultats sont présentés sur les figures suivantes :

Figure 1 : Analyse par FACS des cellules de la moelle osseuse de souris âgées de 6 à 8 semaines.

- A. Souris sauvages (WT) et mutantes (RAG-/-, $\lambda 5$ -/- et double mutantes RAG-/- $\lambda 5$ -/-).
 B. Souris chez lesquelles on a introduit un transgène codant la forme membranaire de la chaîne μ humaine (Ig μ).

Les cellules ont été marquées par des anticorps anti-B220, anti-CD43 et anti-IgM humain (ne reconnaît que IgM humaine). Le pourcentage de lymphocytes présents dans chaque cadran est inscrit en haut et à droite pour les marquages B220/CD43.



- Question 1. Quel est l'effet de l'introduction du transgène Ig μ dans les mutants RAG-/-, $\lambda 5$ -/- et RAG-/- $\lambda 5$ -/- ?
- Question 2. Que suggèrent ces expériences quant aux éléments nécessaires à l'expression de la chaîne μ à la surface et quant à son effet sur le développement des cellules B ?
- Question 3. Donner les raisons qui ont conduit à l'utilisation des souris mutantes RAG-/-, $\lambda 5$ -/- et double mutantes RAG-/- $\lambda 5$ -/-.
- Question 4. D'après les résultats présentés aux Figure 3 et Figure 4 que peut-on conclure quant au rôle des chaînes légères dans l'assemblage, le transport et la fonction du récepteur pré-B ?

Figure 2 : Analyse de l'expression intracellulaire du transgène Ig μ humain dans les cellules B220⁺CD43⁺ de la moelle.

Après marquage avec les anticorps anti-B220 et anti-CD43, les cellules des souris utilisées à la **Figure 1** ont été fixées, perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-IgM humain.

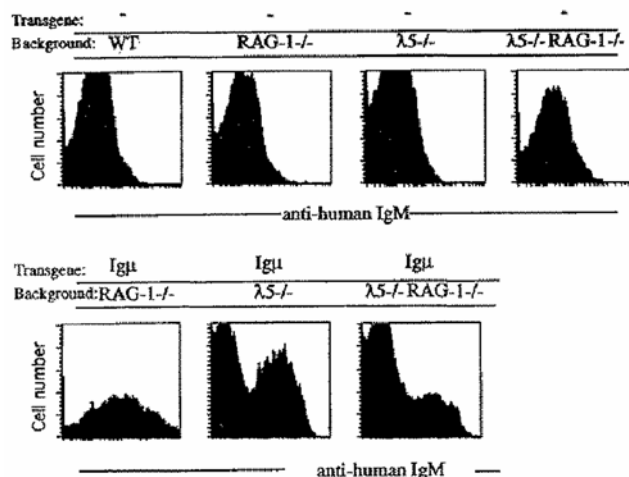


Figure 3 : Analyse du complexe pré-BCR par des expériences d'immunoprécipitation.

Des lignées de précurseurs B immortalisées par le virus d'Abelson ont été obtenues à partir de la moelle de souris de type sauvage (WT), mutantes (RAG-/-), (λ 5-/-) et (RAG-/- λ 5-/-) ainsi que de souris mutantes exprimant le transgène Ig μ humain : (m μ RAG-/-), (m μ λ 5-/-) et (m μ RAG-/- λ 5-/-). Les complexes Ig ont été immunoprécipités avec un immunosérum anti-IgM humain et analysés par la technique de Western blot. Les protéines ont été révélées avec des anticorps anti-IgM humain (hIgM) ; anti-Ig α (Ig α) et anti-Ig β (Ig β). s.f. : forme membranaire ; c.f. : forme cytoplasmique. Après surexposition, on voit apparaître sur un blot une bande correspondant à la forme membranaire (s.f.) de la protéine Ig β dans la 1^{ère} piste (m μ λ 5-/-).

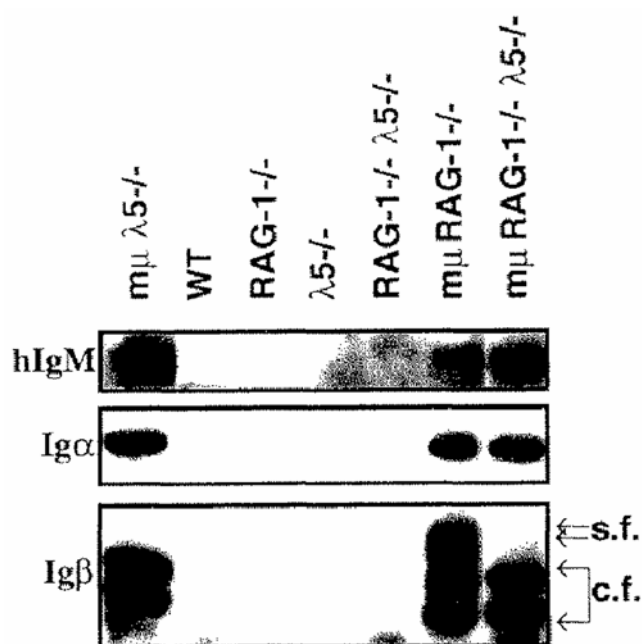
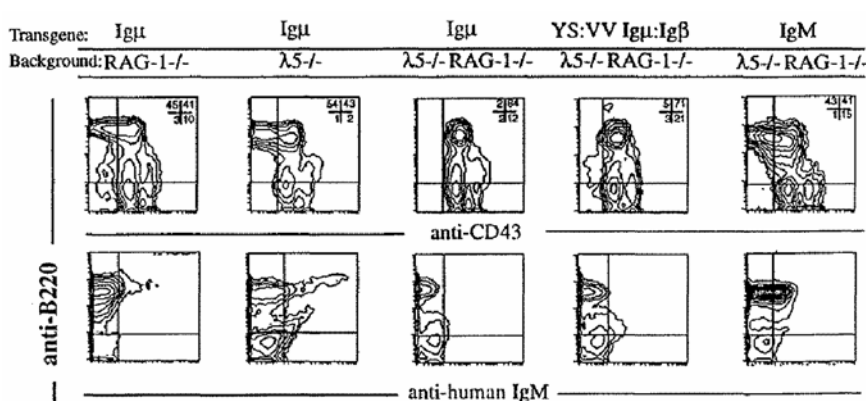


Figure 4 : Analyse par FACS des cellules de la moelle provenant de souris mutantes dans lesquelles on a introduit soit le transgène Ig μ comme précédemment, soit un transgène YS:VV Ig μ :Ig β codant pour une protéine chimérique Ig μ -Ig β , soit un transgène IgM codant pour une immunoglobuline complète (Ig μ /Ig κ).

Voir la légende de la figure 1 pour les détails expérimentaux. N.B. : après introduction des transgènes YS:VV Ig μ :Ig β et IgM, on observe la présence de chaîne μ transgénique dans le cytoplasme des précurseurs de la moelle.



Question 5. Donner un titre qui résume les points essentiels de ces expériences.

II. Rôle de *Notch1* dans le développement T

(d'après Wolfer, A. et al. (2002) *Immunity* 16:869)

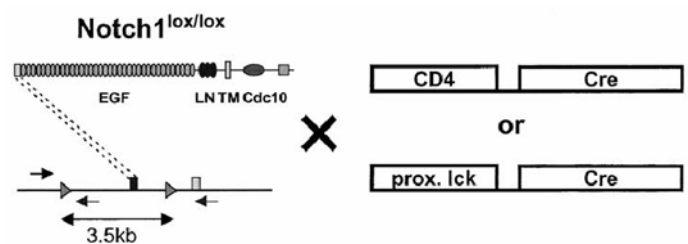
Les protéines Notch sont des récepteurs transmembranaires intervenant dans les choix de différenciation cellulaire chez plusieurs organismes. Leurs domaines extracellulaires contiennent des motifs de type EGF (*epidermal growth factor*) impliqués dans des interactions avec leurs ligands. Le domaine intracellulaire est clivé lors de la reconnaissance du ligand et transféré dans le noyau où son hétérodimérisation avec RBP-J κ (*recombinaison signal sequence binding protein* pour J κ) convertit RBP-J κ de sa forme répresseur en activateur de transcription ; ceci conduit à la transcription des gènes cibles.

Notch1, *Notch2* et *Notch3*, comme les ligands *Jagged1*, *Jagged2* et *δ -like-4*, sont exprimés sur les thymocytes et l'épithélium thymique. Pendant le développement lymphoïde, la signalisation par Notch1 est essentielle pour le choix de différenciation d'un précurseur bipotent T/B vers le lignage T ; son rôle dans les étapes postérieures du développement T ($\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$; CD4 vs. CD8) reste controversé. Les expériences présentées ci-dessous apportent des précisions quant au rôle de *Notch1* aux différentes étapes du développement thymique.

Une souris *Notch1*^{lox/lox}, obtenue précédemment a été croisée avec des souris transgéniques pour la recombinaise Cre sous le contrôle des promoteurs de CD4 ou de p56^{lck}. Les constructions utilisées sont schématisées sur la Figure 5. L'inactivation de *Notch1* chez ces souris est étudiée par PCR dans différentes sous-populations thymiques comme montré sur la Figure 6.

Figure 5 : Constructions utilisées pour obtenir l'inactivation conditionnelle de *Notch1*

Des souris *Notch1*^{lox/lox} ont été croisées avec des souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de CD4 (*CD4-Cre*) ou de p56^{lck} (*lck-Cre*) (à droite). L'organisation génomique schématisée du locus *Notch1*^{lox/lox} est montrée à gauche ; l'exon codant pour le peptide leader (rectangle noir) est flanqué de deux séquences loxP (triangles gris) suivies des exons codant pour les motifs EGF (rectangle gris). Les flèches indiquent la position des amorces utilisées pour détecter la délétion de la région de 3.5 kb contenue entre les deux sites loxP.

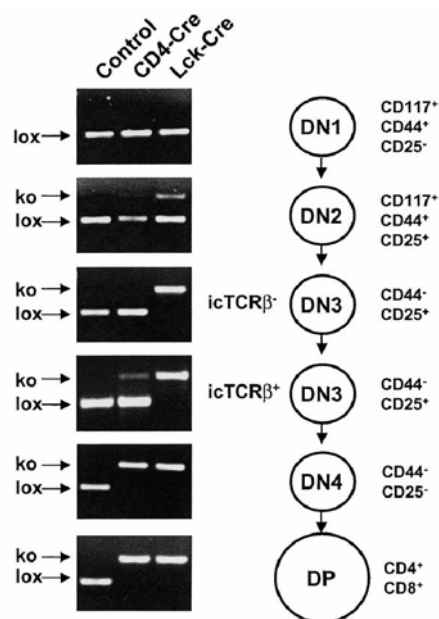


Question 1. Expliquer pour quelle(s) raison(s) ces différentes constructions ont été utilisées.

Question 2. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 6.

Figure 6 : Inactivation conditionnelle de *Notch1* au cours du développement thymique

La délétion de la région de 3.5 kb contenue entre les deux sites loxP a été déterminée par PCR (cf. position des amorces sur la Figure 5) pour les sous-populations thymiques indiquées (DN1–DN4 et DP), isolées chez des souris *Notch1*^{lox/lox} (control), *Notch1*^{lox/lox} x *CD4-Cre* (CD4-Cre), ou *Notch1*^{lox/lox} x *lck-Cre* (Lck-Cre) souris. L'amplification de l'allèle *Notch1* aboutit à un fragment de 350 bp (lox), tandis que l'allèle délété donne une bande de 470 bp (ko). Les thymocytes DN3 ont été triés en deux sous-populations précoces et tardives selon l'expression cytoplasmique pour la chaîne TCR β (icTCR β ⁻ ou icTCR β ⁺).



L'influence de *Notch1* sur la différenciation thymique est ensuite étudiée chez les souris *Notch1*^{lox/lox} x *lck-Cre* (dénommée *Notch1*^{-/-} dans la suite de l'exercice) par comparaison aux souris *Notch1*^{lox/lox} (control). Les résultats de l'analyse des sous-populations thymiques par cytométrie de flux chez ces souris sont présentés à la Figure 7.

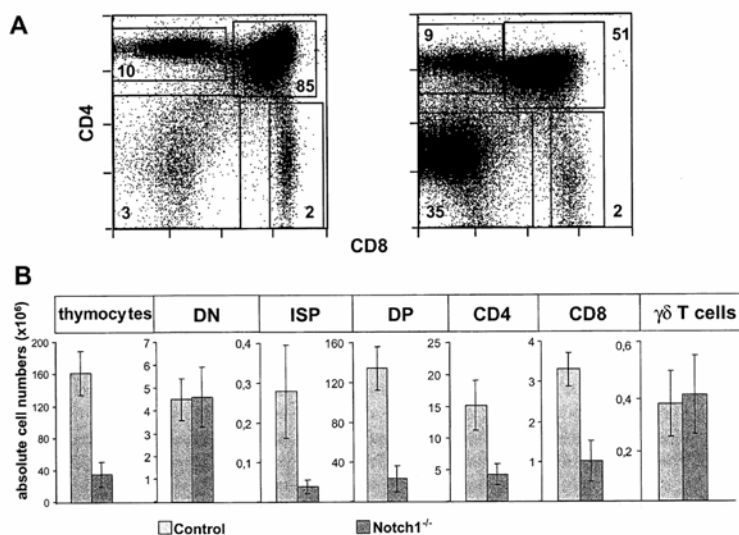
Question 3. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 7.

Question 4. Quelle(s) sous-population(s) sont-elles affectées par l'invalidation de *Notch1* chez les souris *Notch1*^{-/-} ?

Figure 7 : Sous-populations thymiques chez les souris *Notch1*^{-/-} et control

(A) Une analyse de cytométrie de flux des thymocytes des souris *Control* (à gauche) ou *Notch1*^{-/-} (à droite) est présentée pour les marqueurs CD4 et CD8. Les pourcentages de cellules CD4 SP, CD4⁺CD8⁺ (DP), CD8 SP, et CD4⁺CD8⁻ (DN) sont indiqués dans chaque cadran.

(B) Les nombres absolus de cellules ont été déterminés pour les thymocytes totaux et les différentes sous-populations de thymocytes décrites en (A), en plus des cellules ISP (CD4⁺CD8⁺CD3⁻) et les cellules T $\gamma\delta$ matures. Les écarts-types sont indiqués (n=20 pour chaque groupe).



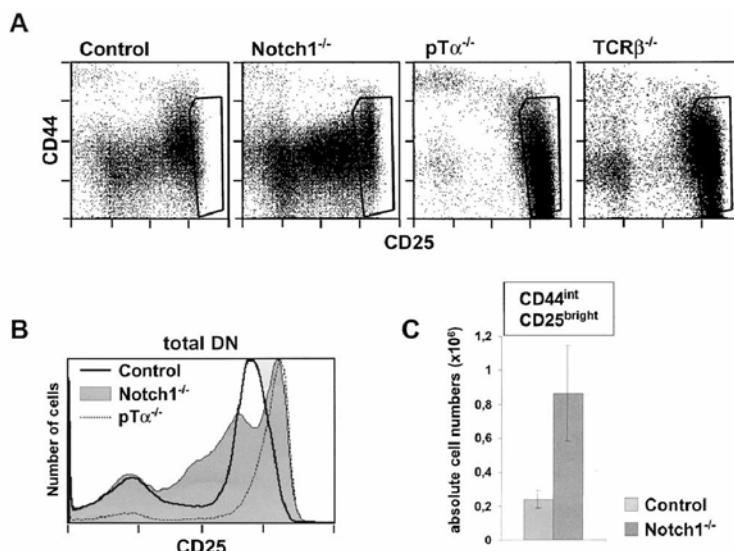
Afin de préciser le point de blocage du développement thymique observé chez les souris *Notch1*^{-/-}, la sous-population CD4⁺CD8⁻ (DN) est plus particulièrement étudiée chez ces souris par comparaison aux souris *Control* et à des souris déficientes pour pT α (pT α ^{-/-}) ou TCR β (TCR β ^{-/-}). Les résultats sont présentés à la Figure 8 :

Figure 8 : Analyse phénotypique des cellules CD4⁺CD8⁻ (DN) chez les souris *Notch1*^{-/-}

(A) Analyse en cytométrie de flux des thymocytes DN pour les marqueurs CD44 et CD25 chez les souris Control, *Notch1*^{-/-}, *pTα*^{-/-} et *TCRβ*^{-/-}. La fenêtre dessinée met en évidence l'accumulation de thymocytes DN3 CD44^{int}CD25^{bright}.

(B) Histogrammes des profils d'expression de CD25 pour la sous-population de thymocytes DN totale chez les souris Control (ligne pleine), *Notch1*^{-/-} (en gris), et *pTα*^{-/-} (pointillé).

(C) Nombres absolus de thymocytes CD44^{int}CD25^{bright} chez les souris Control (gris clair) et *Notch1*^{-/-} (gris foncé). Les écarts-types sont indiqués pour les souris Control (n=10) et *Notch1*^{-/-} (n=13).



Question 5. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 8.

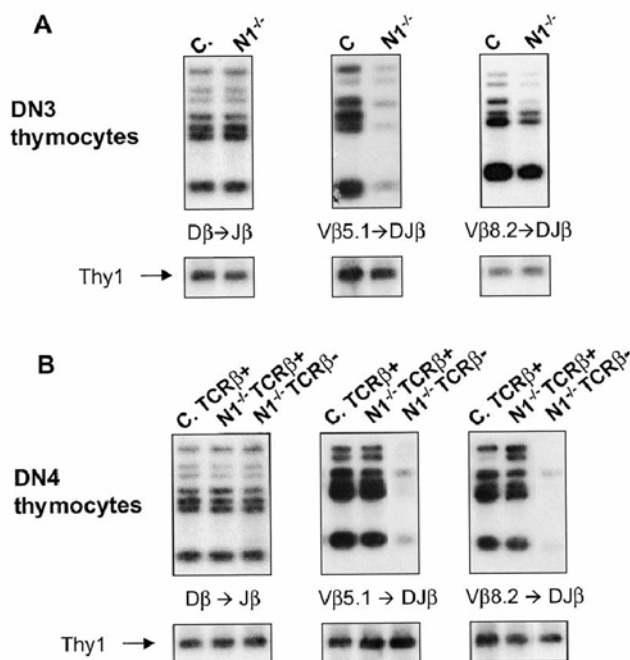
Question 6. A quel stade le blocage de la différenciation des thymocytes a-t-il lieu ?

La fréquence des réarrangements au niveau du locus *TCRβ* est étudiée au niveau de l'ADN génomique. Les résultats sont présentés sur la Figure 9 :

Figure 9 : Analyse des réarrangements *TCRβ*

(A) L'ADN génomique de thymocytes DN3 triés de souris Control (C.) ou *Notch1*^{-/-} (*N1*^{-/-}) a été analysé par PCR pour la présence de réarrangements Dβ-Jβ, Vβ5.1-Jβ et Vβ8.2-Jβ. Les produits d'amplification ont été révélés par la technique de Southern blot à l'aide d'une sonde Dβ2-Jβ2.6. Le gène témoin *Thy1* est révélé après PCR et hybridation avec une sonde *Thy1*.

(B) Les thymocytes DN4 de souris Control ou *Notch1*^{-/-} ont été triés pour l'expression cytoplasmique de la chaîne *TCRβ* (icTCRβ). Les réarrangements *TCRβ* ont été analysés comme précédemment pour les cellules DN4 des souris Control icTCRβ⁺ (C.TCRβ⁺), *Notch1*^{-/-} icTCRβ⁺ (*N1*^{-/-}TCRβ⁺) ou *Notch1*^{-/-} icTCRβ⁻ (*N1*^{-/-}TCRβ⁻).



Question 7. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 9.

Question 8. Quel serait l'effet de l'introduction d'un transgène codant une chaîne *TCRβ* réarrangée chez les souris *Notch1*^{-/-} ?