

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2008 IF-IIc&IId
février 2008

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

1. Introduction
2. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
3. Développement lymphocytaire B et T
4. Conclusion

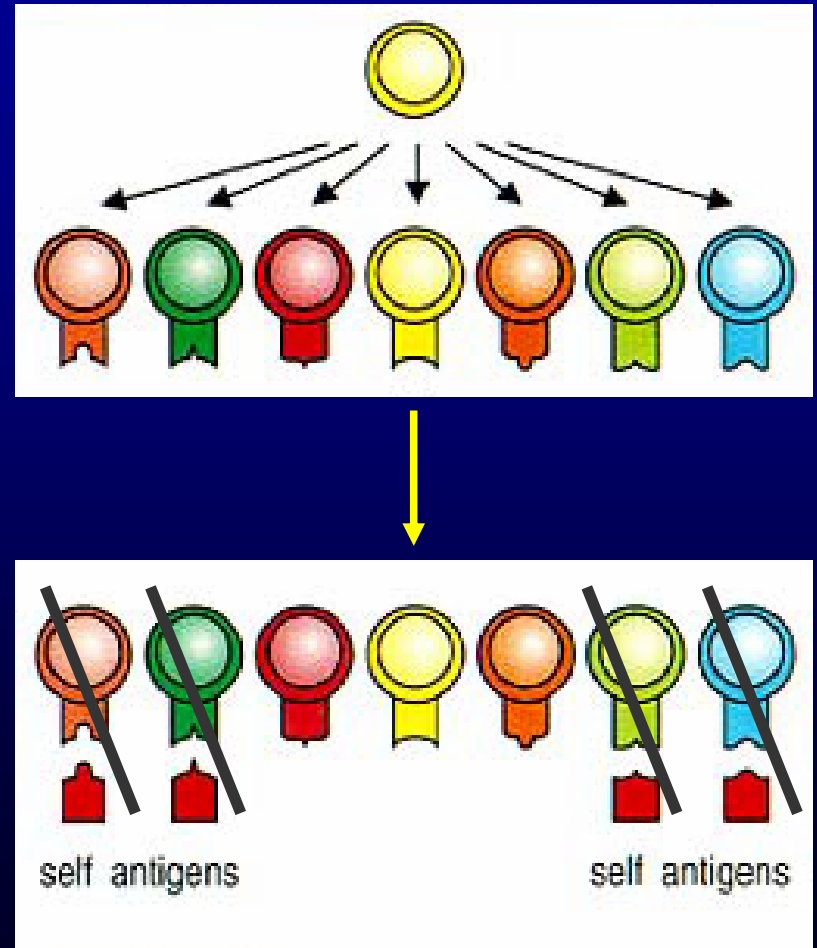
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

- 1. Introduction**
2. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
3. Développement lymphocytaire B et T
4. Conclusion

Théorie de la sélection clonale (1)

Burnet (1899–1985)

- Chaque lymphocyte exprime un type unique de récepteur spécifique d'antigène
- Les lymphocytes exprimant un récepteur dirigé contre un antigène du soi sont éliminés lors de la différenciation

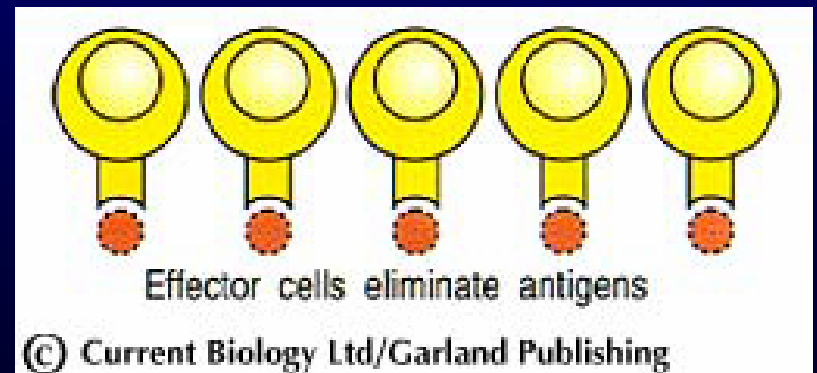


Théorie de la sélection clonale (2)

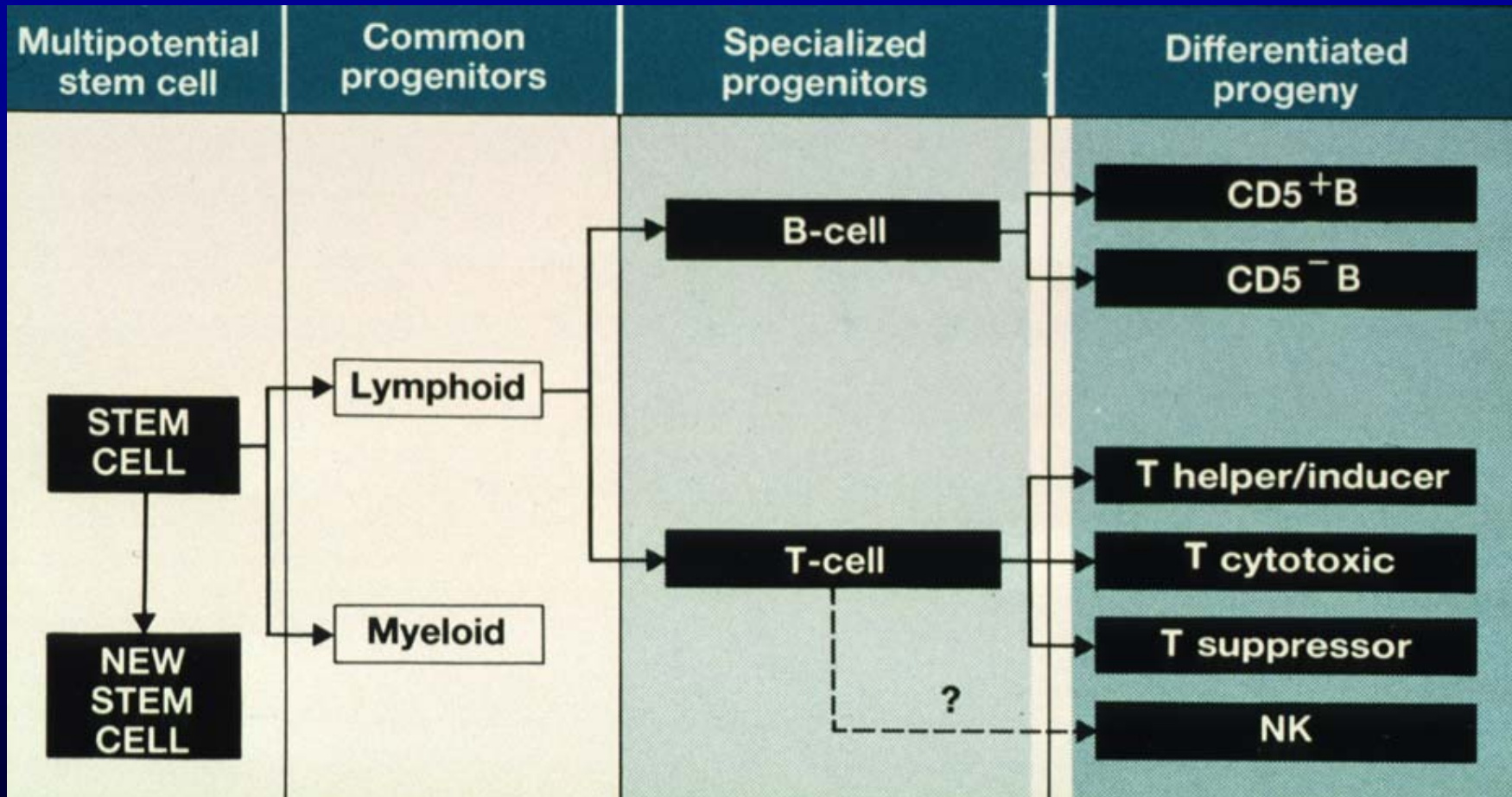
- La liaison avec une bonne affinité d'une molécule étrangère et d'un récepteur entraîne l'activation du lymphocyte



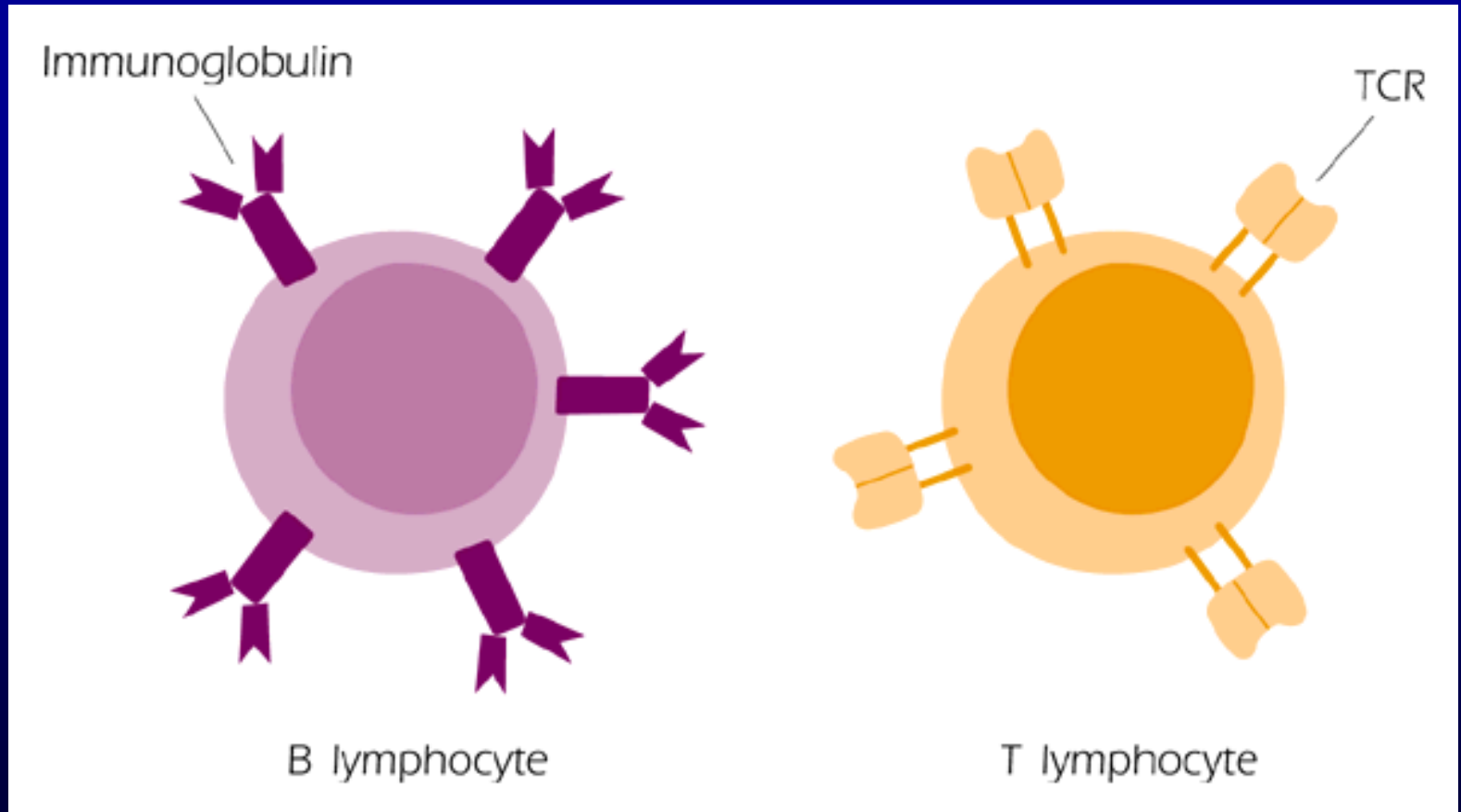
- Les cellules effectrices différenciées à partir d'un lymphocyte activé donné expriment des récepteurs de même spécificité



La lignée lymphocytaire

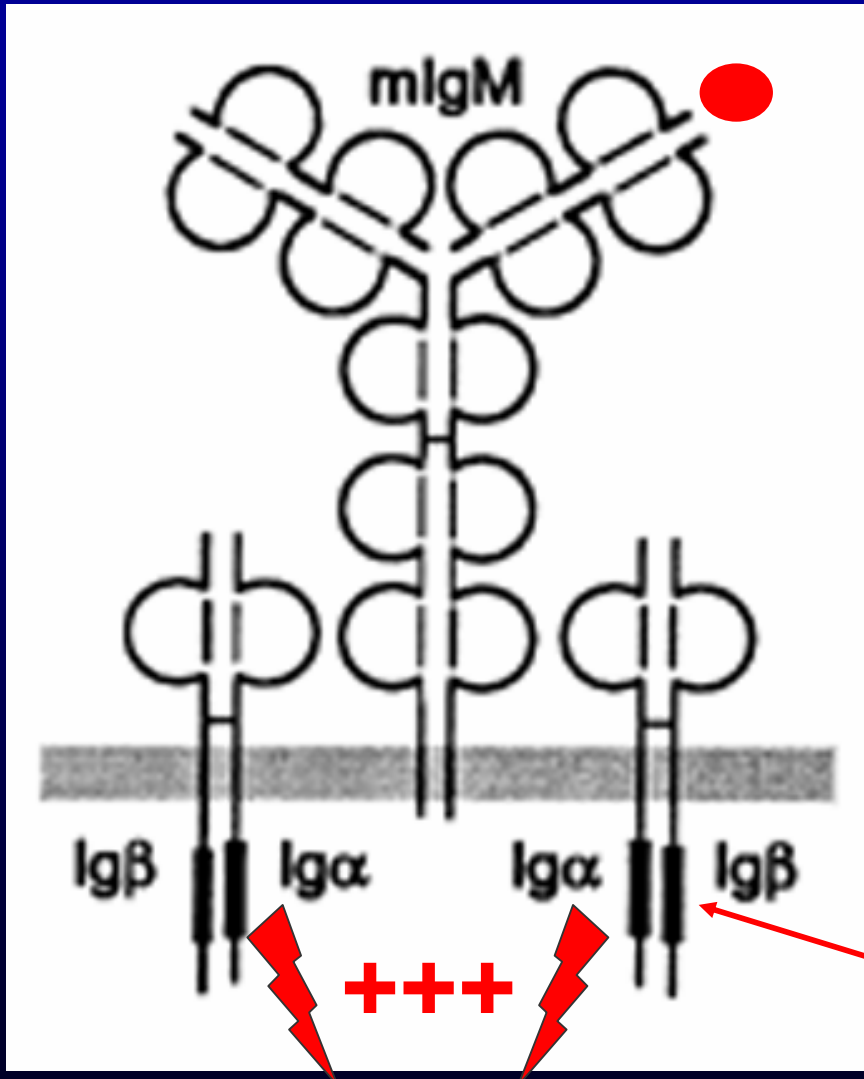


Les lymphocytes B et T



→ caractérisés par leur récepteur spécifique d'antigène

Transduction du signal BCR



Reconnaissance de l'antigène par l'Ig

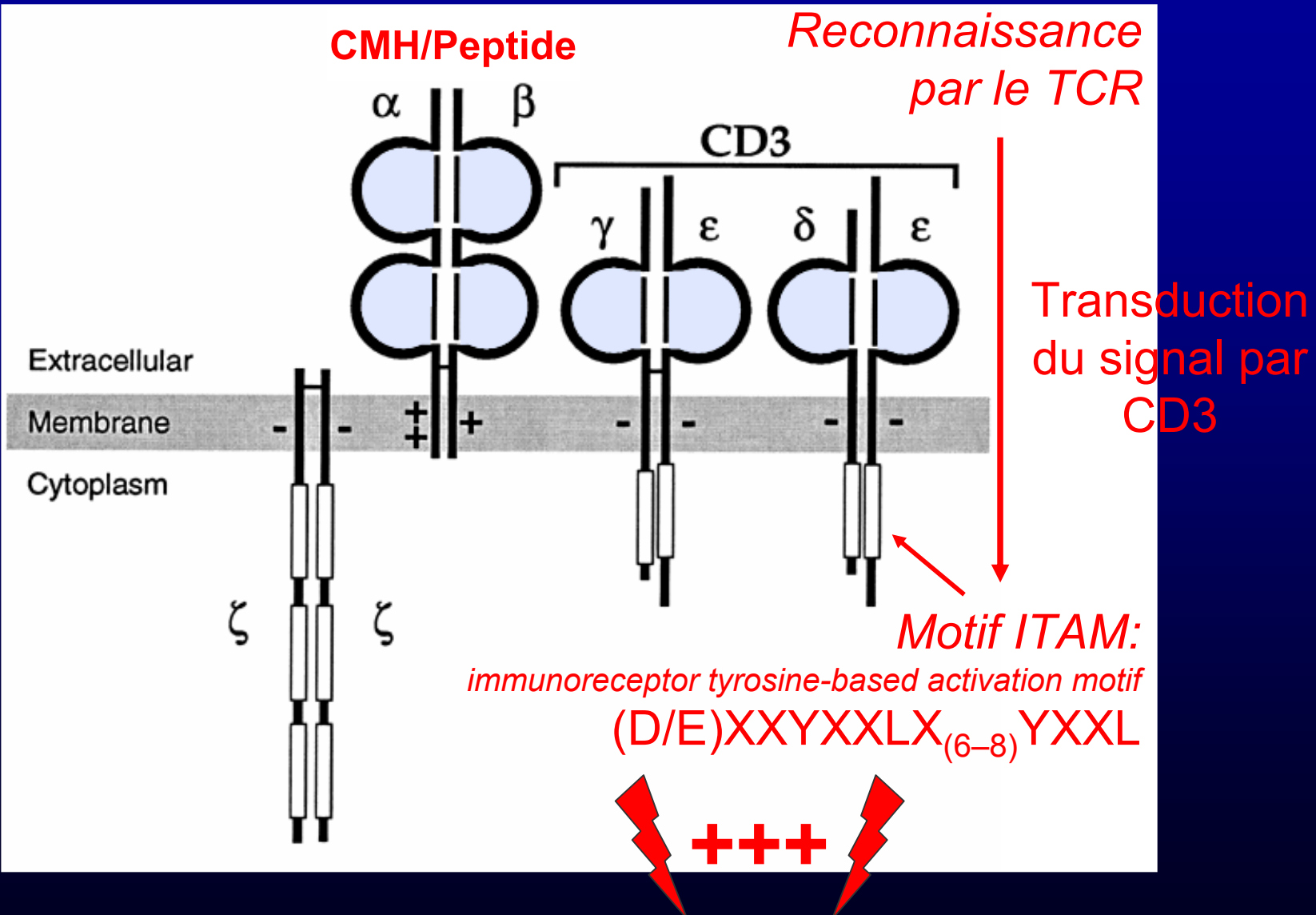
Transduction du signal par Igα/Igβ (CD79α/CD79β)

Motif ITAM:

immunoreceptor tyrosine-based activation motif

(D/E)XXYXXLX₍₆₋₈₎YXXL

Transduction du signal TCR/CD3

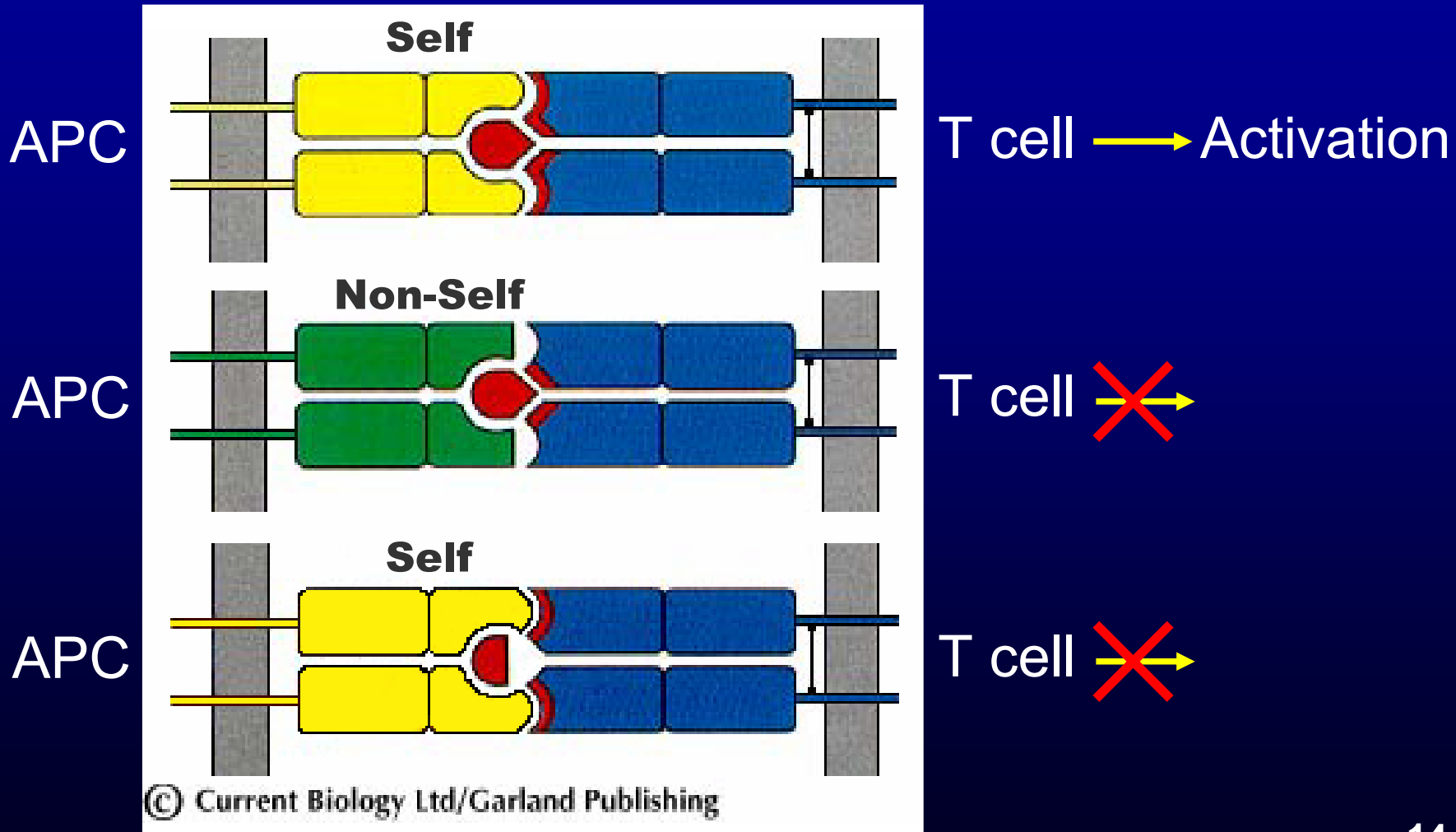


Reconnaissance par le TCR $\alpha\beta$

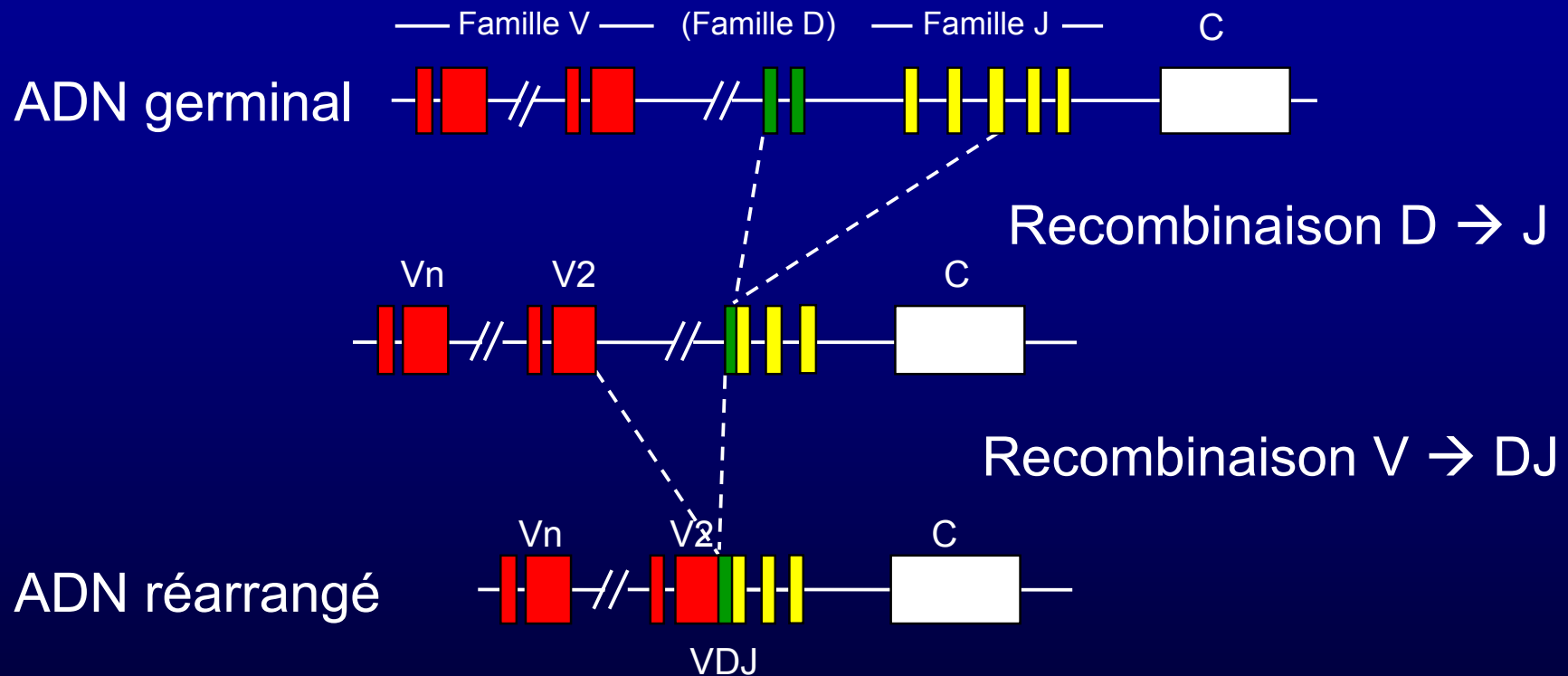
- A l'inverse des anticorps qui reconnaissent les protéines natives, le TCR reconnaît des petits *peptides*
 - produits de dégradation des protéines
 - présentés les molécules du MHC
- Pendant leur différenciation dans le thymus, les lymphocytes T sont “*éduqués*” pour reconnaître les molécules du CMH de l'organisme → *restriction par le CMH*

Restriction par le CMH

CMH TCR



Les régions variables d'Ig et de TCR sont créées pendant la recombinaison V(D)J



CDR3 = jonction V(D)J

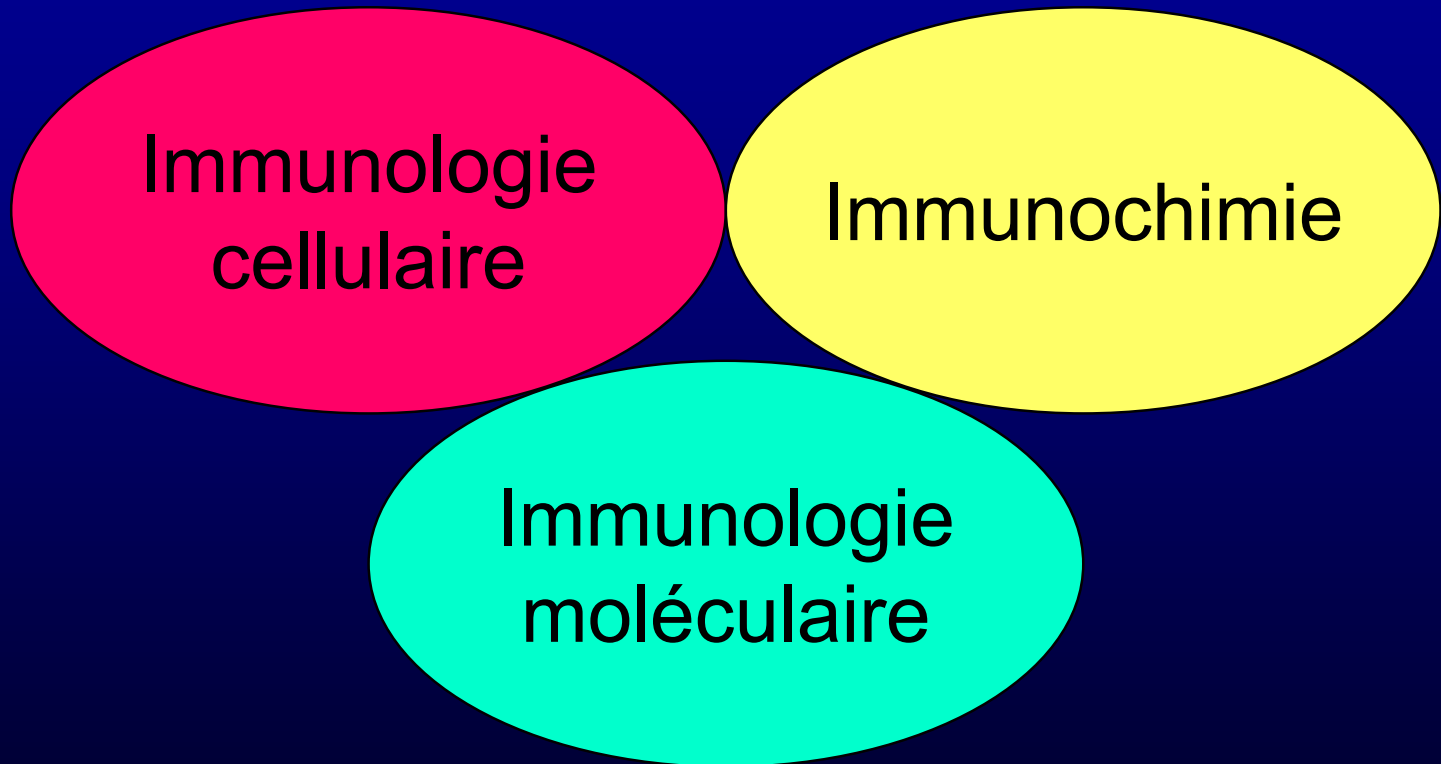
→ Contact avec l'antigène (Ig)

→ Contact avec le complexe CMH/peptide (TCR)

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

1. Introduction
2. **Moyens d'étude des populations lymphocytaires**
3. Développement lymphocytaire B et T
4. Conclusion

Moyens d'étude des populations lymphocytaires



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.

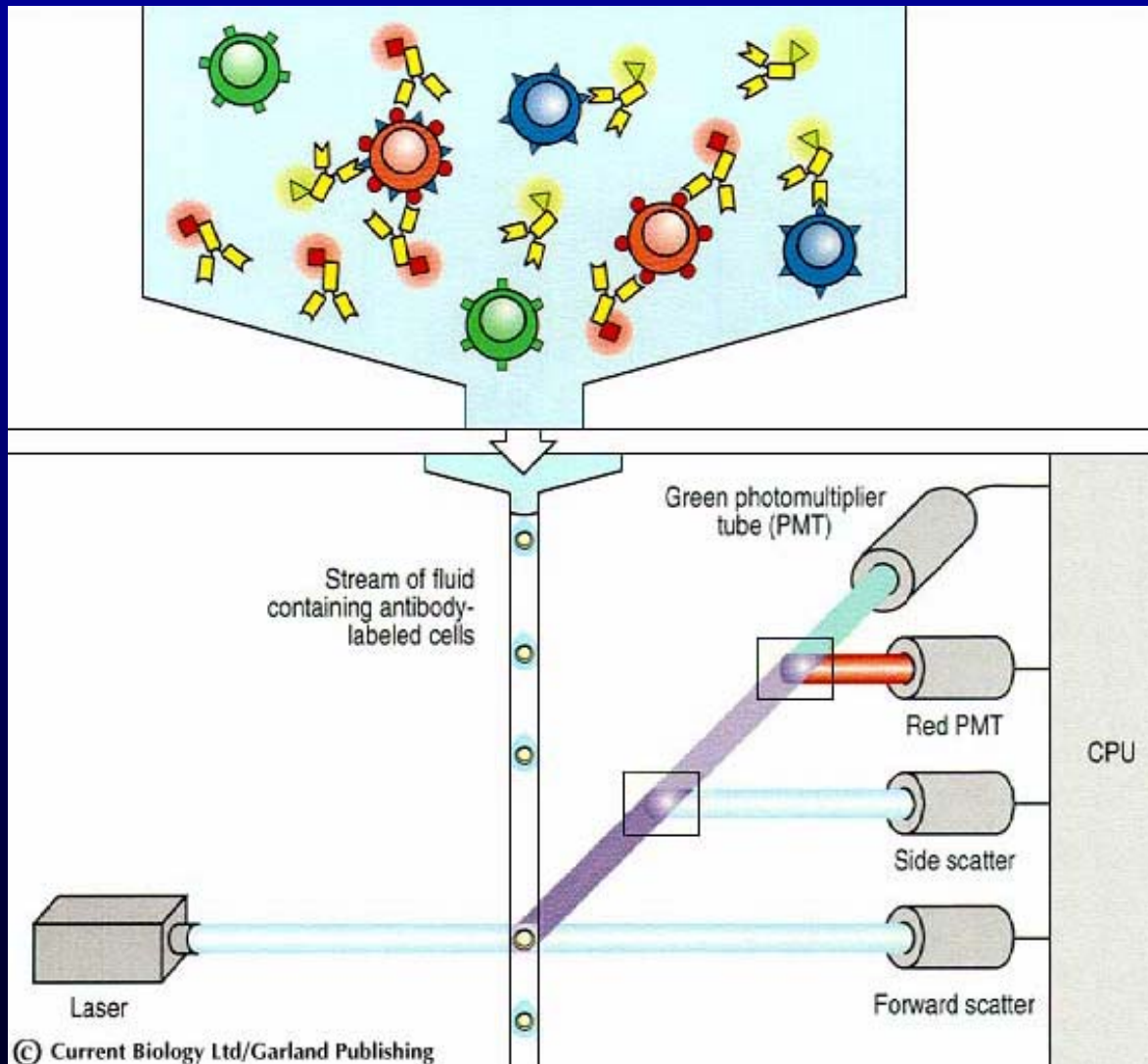
Marqueurs de différenciation T

- 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
- ...

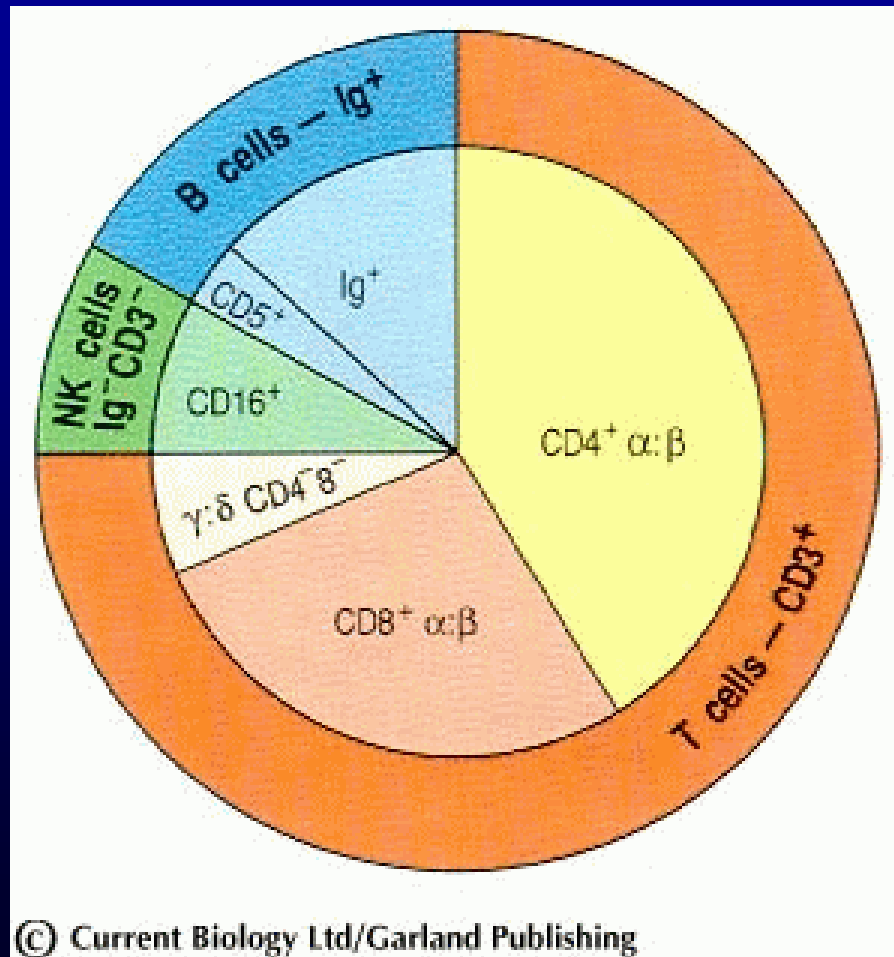
Marqueurs de différenciation B

- 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)



Distribution lymphocytaire du sang périphérique humain (PBL)

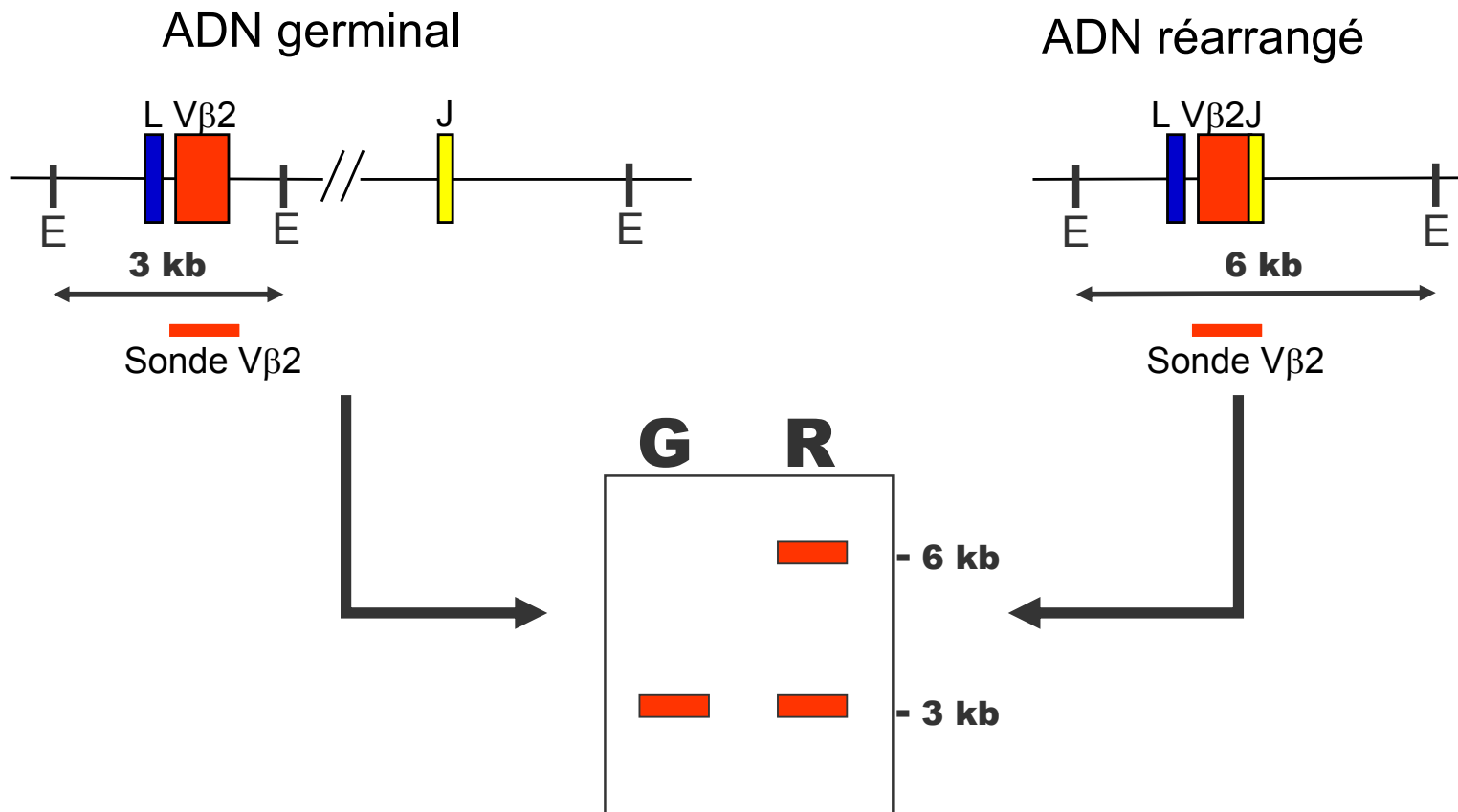


Outils de biologie moléculaire

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

Détection des réarrangements (1)

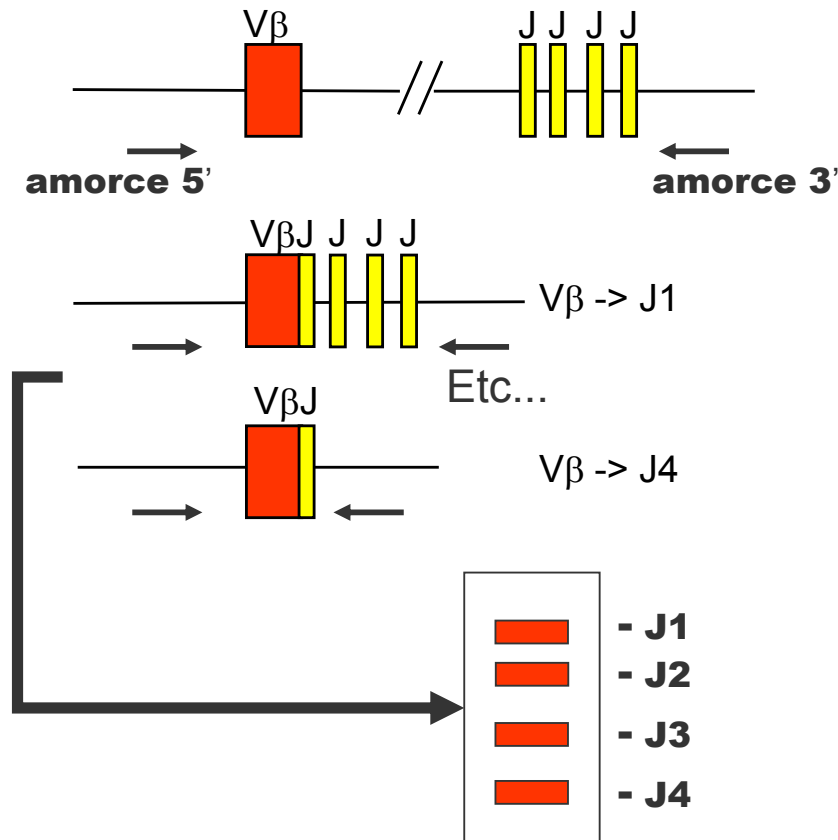
- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par Southern blot.



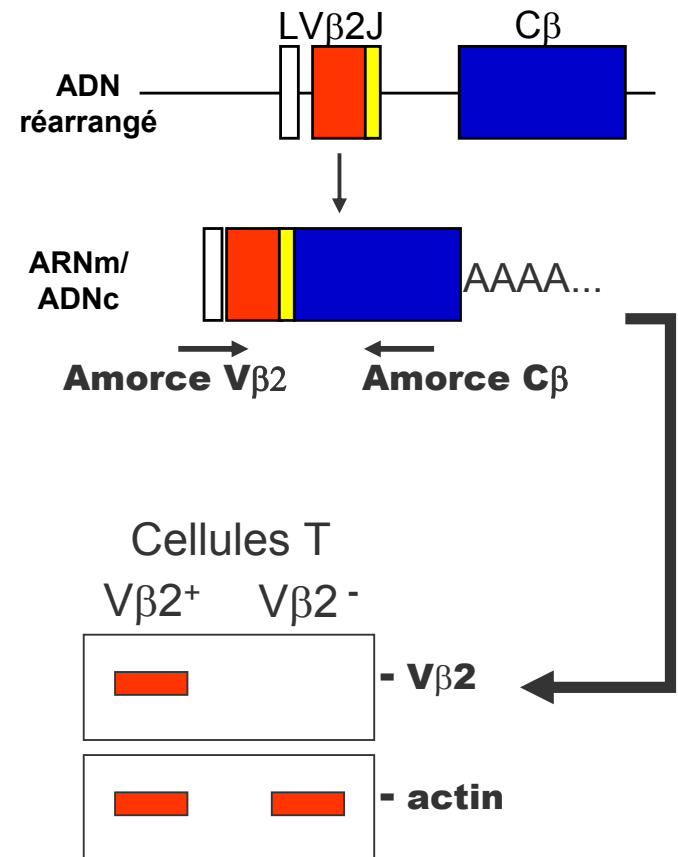
Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR au niveau ADN ou ARN.

ADN



ARN



Utilisation des animaux génétiquement modifiés

- Transgenèse
- 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

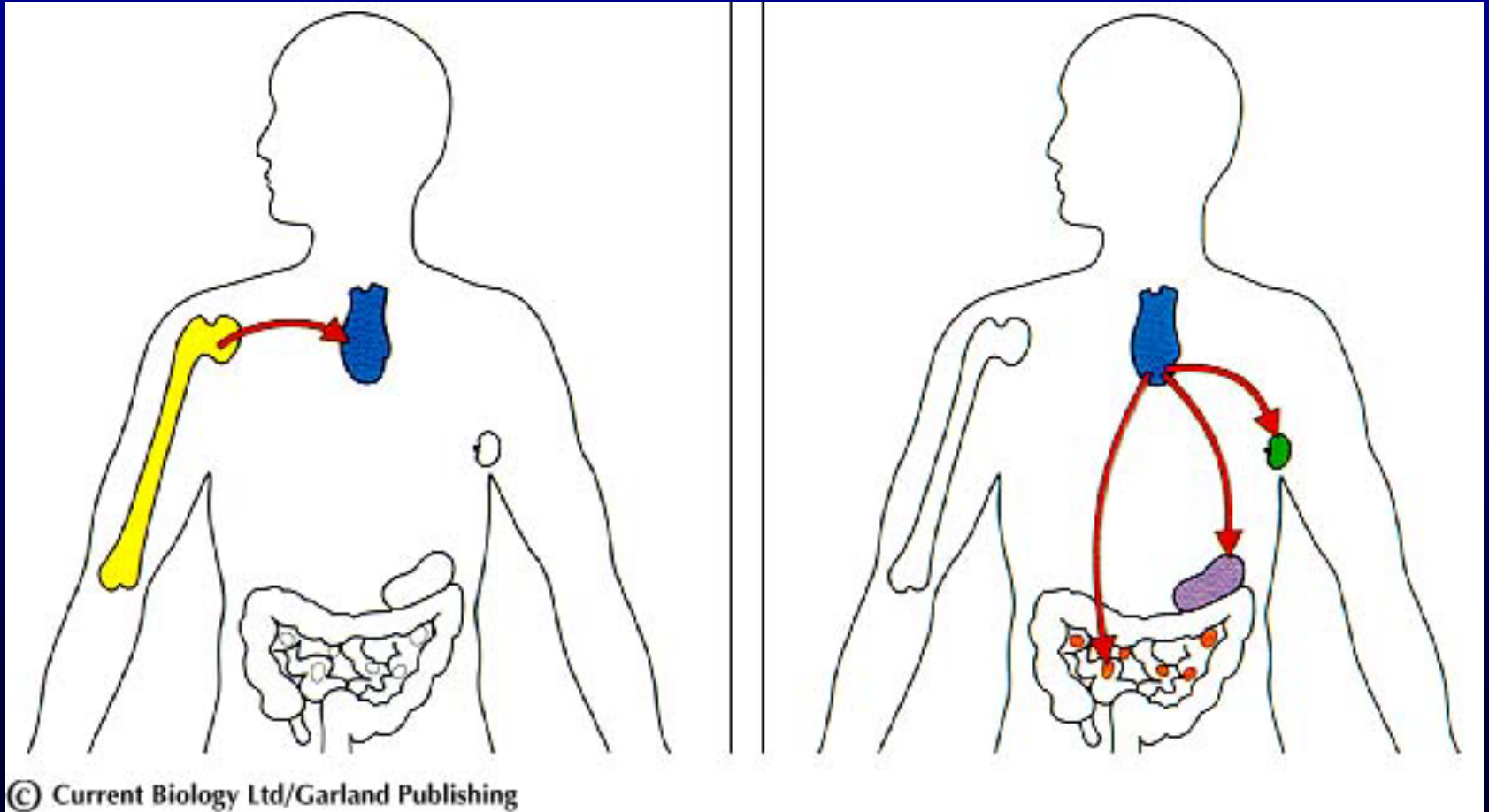
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

1. Introduction
2. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
- 3. Développement lymphocytaire B et T**
4. Conclusion

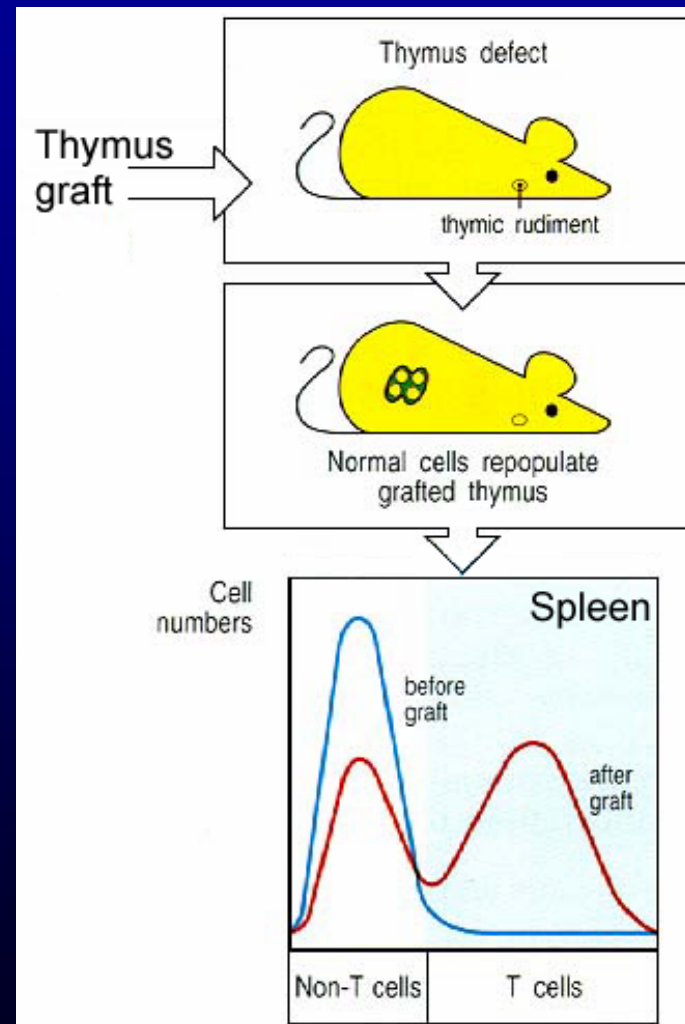
Questions

- 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

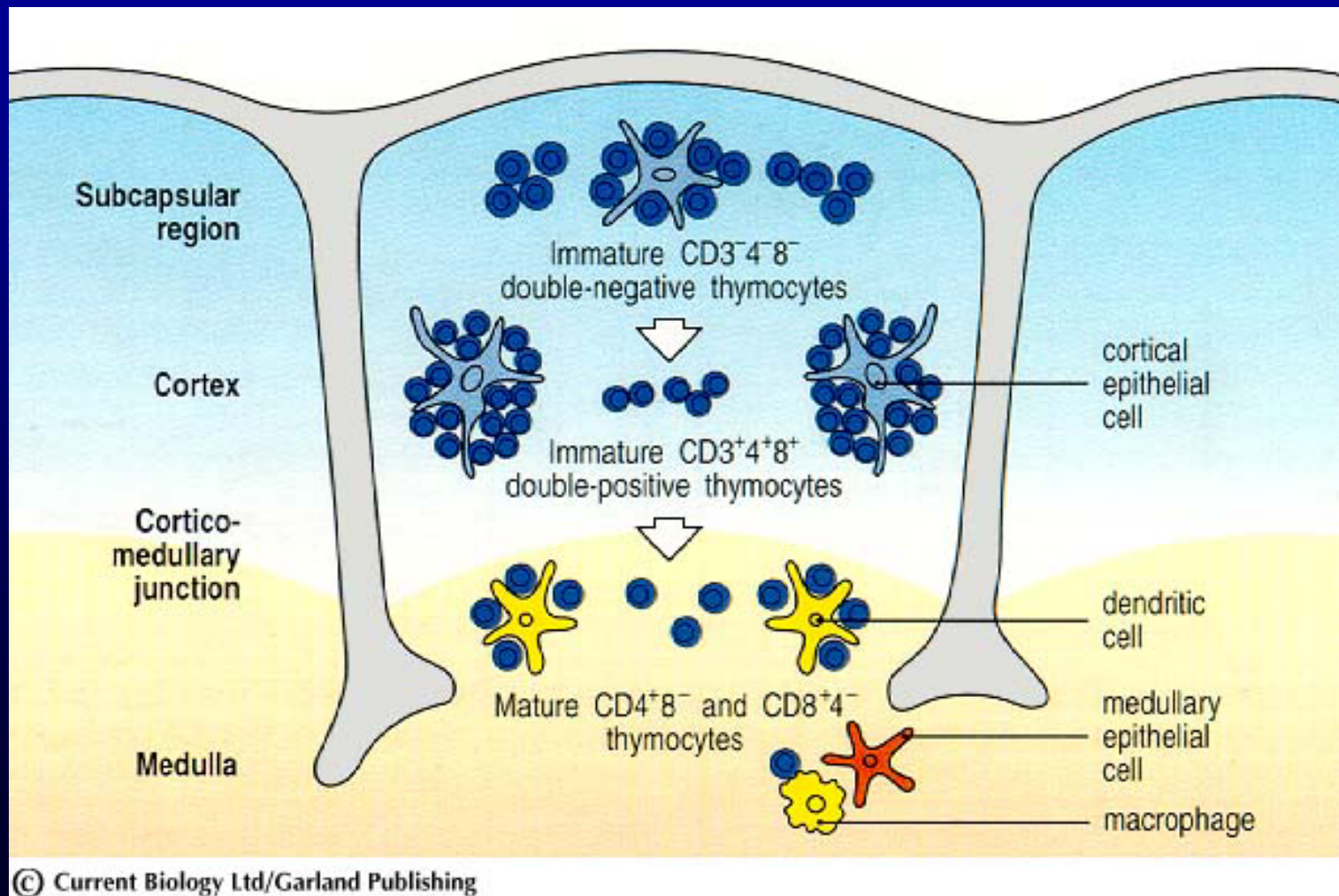
Les lymphocytes T se différencient dans le thymus



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



Architecture cellulaire du thymus



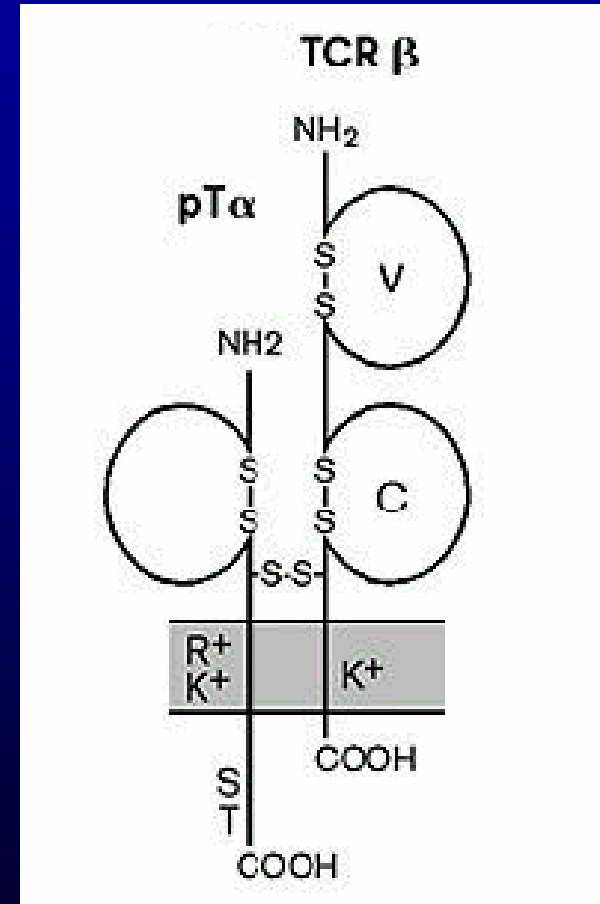
Stades de différenciation des thymocytes

- 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

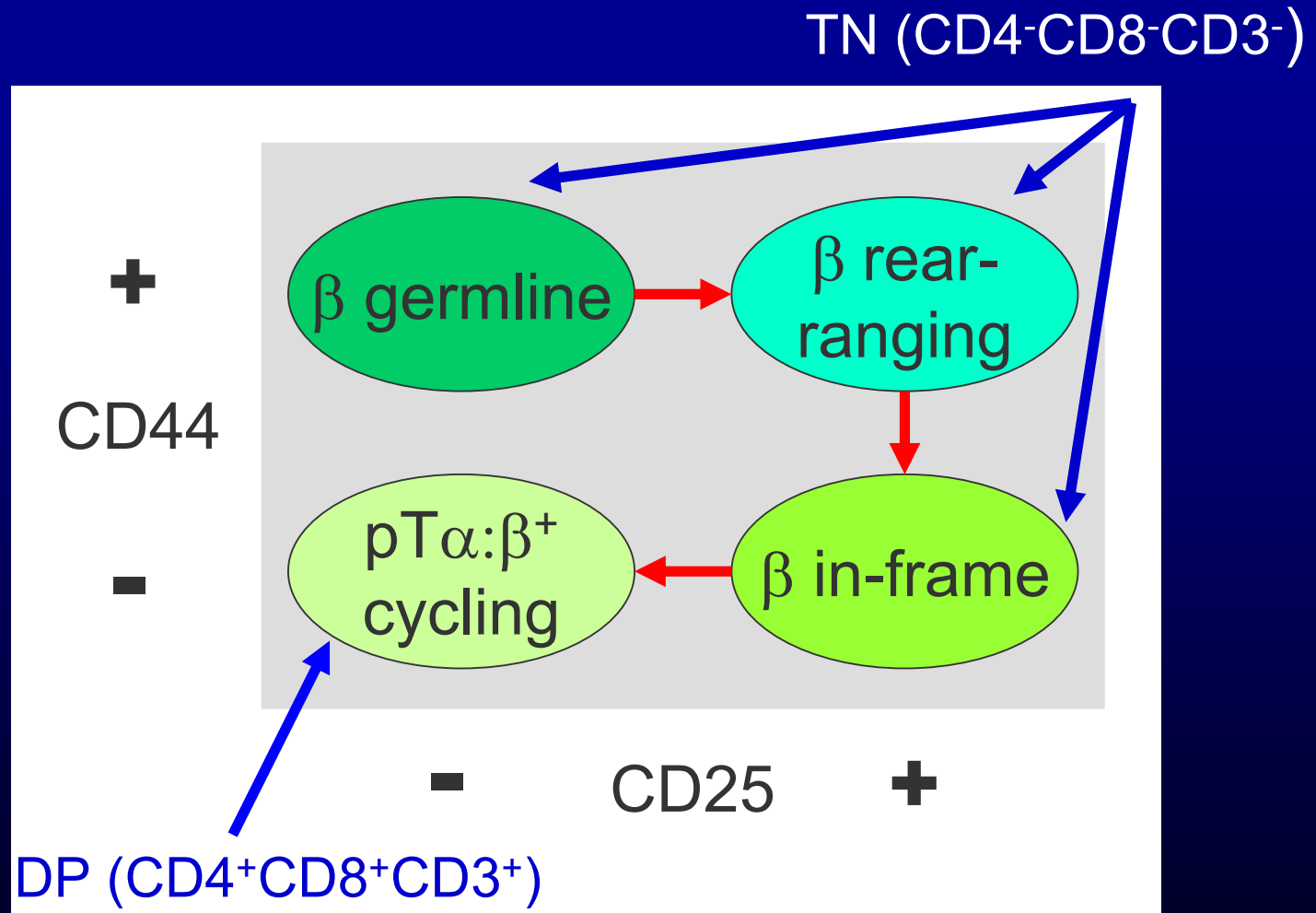
=> identification de la chaîne pT α



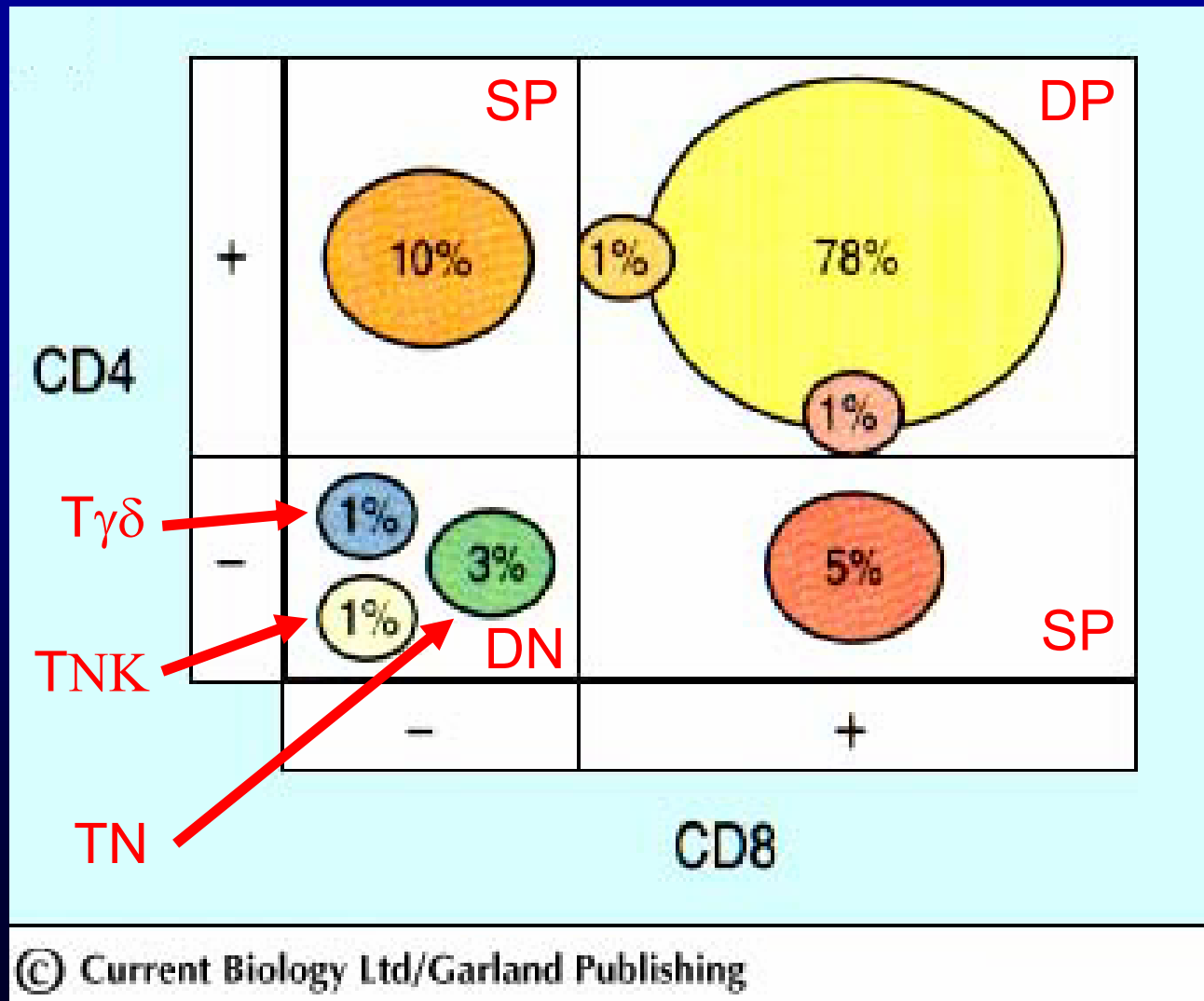
Rôle critique du pré-TCR

- 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

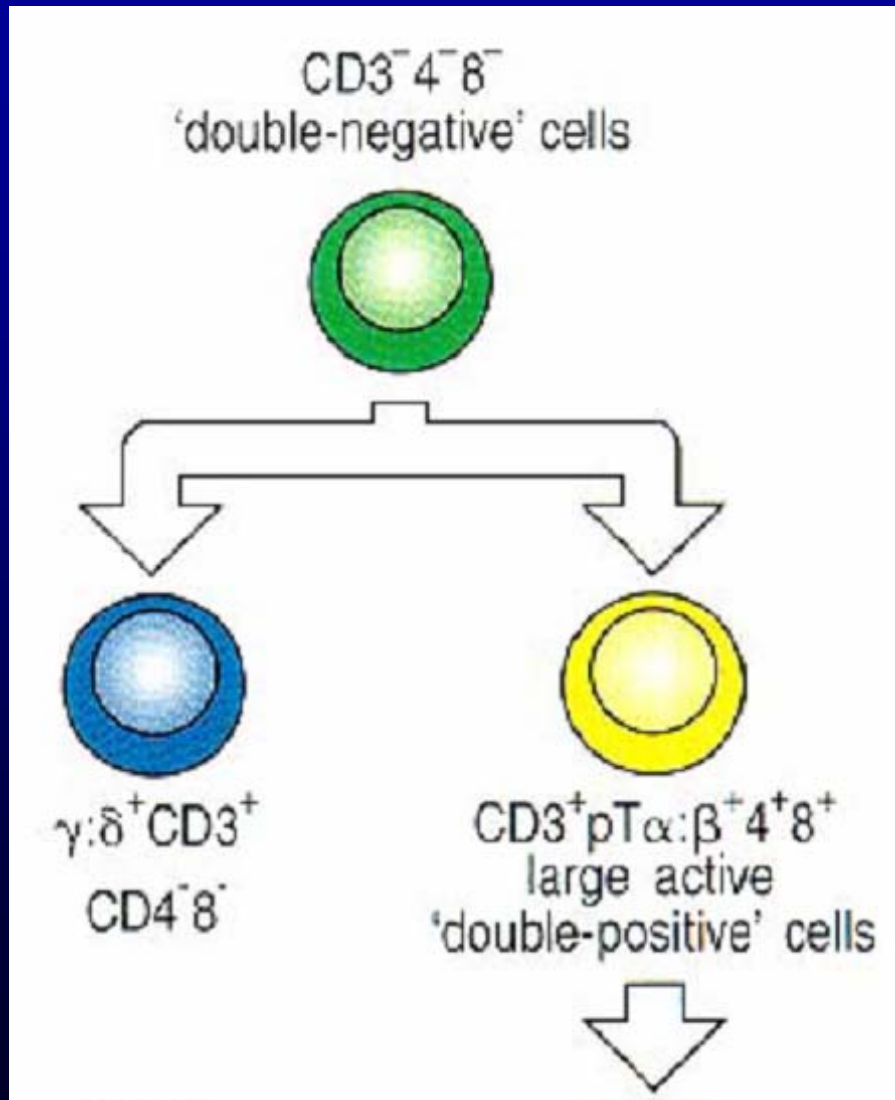
Différenciation des thymocytes (1)



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

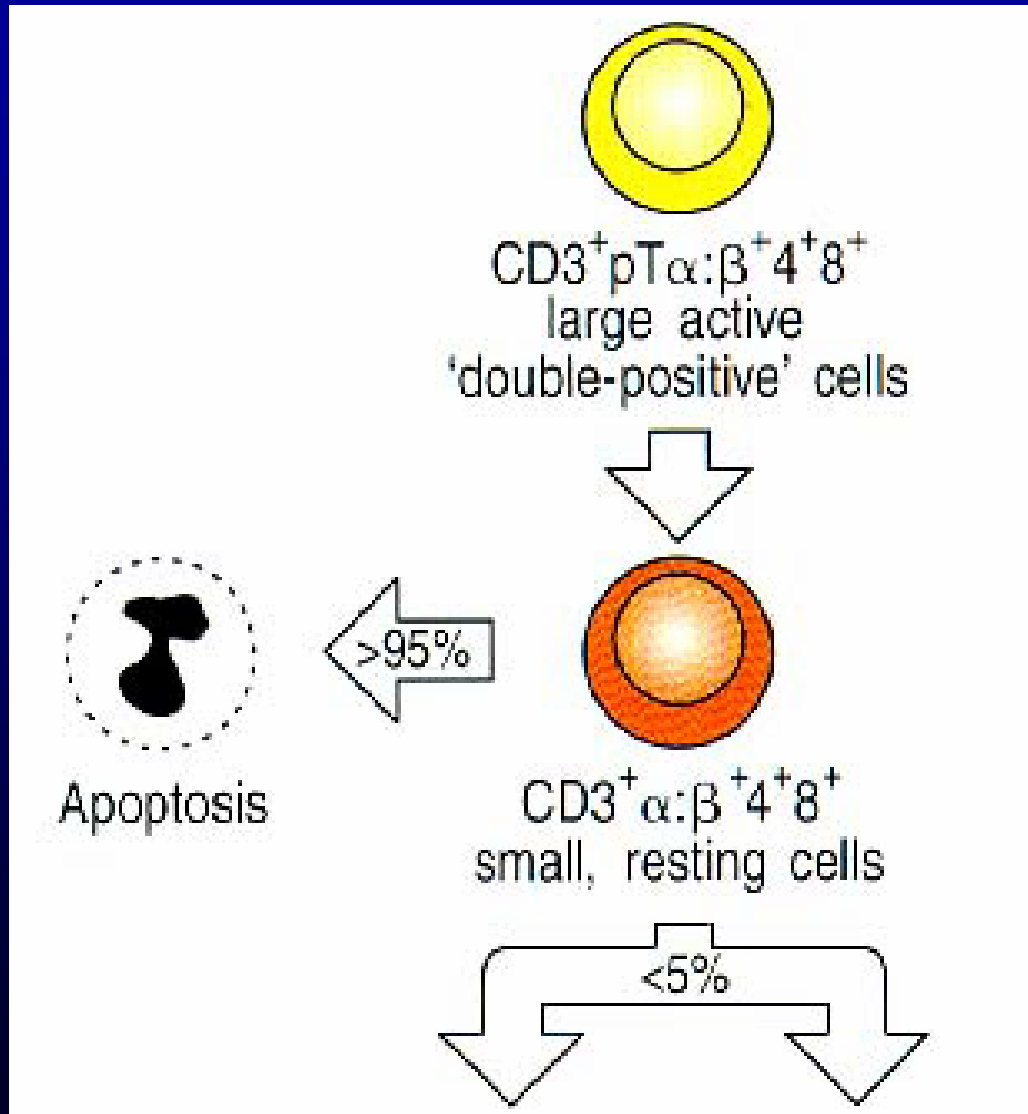
Exclusion allélique

- 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

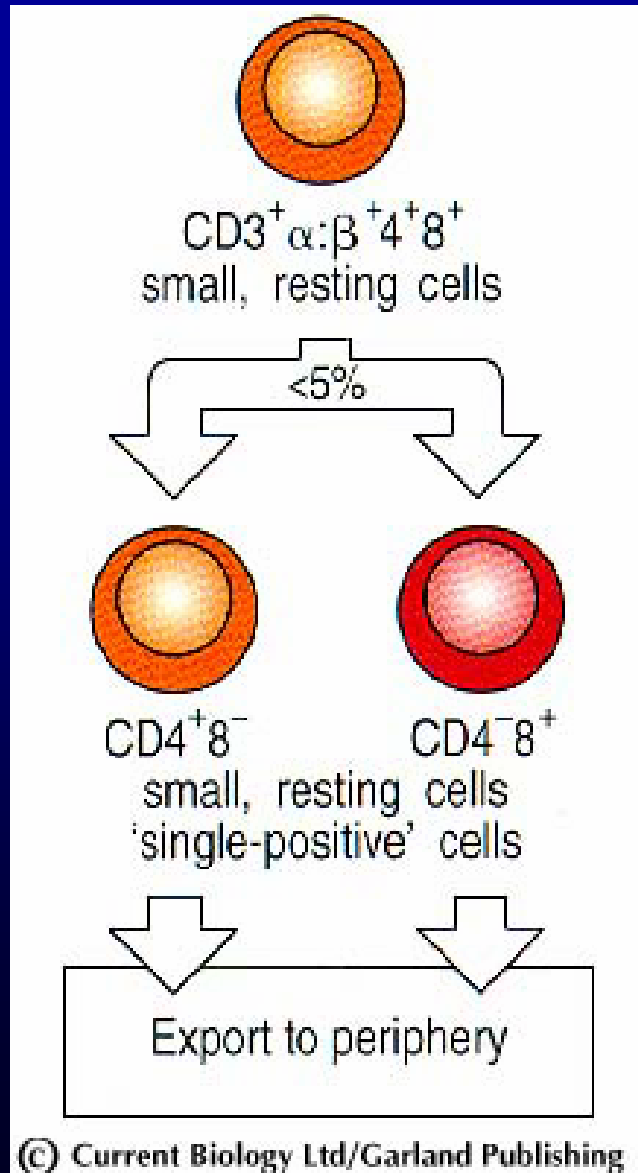
- TCR δ , TCR γ et TCR β réarrangent en même temps au stade pro-T
- Les réarrangements TCR α sont limités aux thymocytes pré-T DP engagés vers la lignée $\alpha\beta$ et exprimant TCR β
- A l'inverse de TCR β , les réarrangements TCR α ont lieu sur les deux chromosomes → l'exclusion allélique a lieu au stade post-transcriptionnel
- Très peu de double TCR β mais souvent double TCR α au niveau ARN (~30%)

Différenciation des thymocytes (4)



Sélection positive
Sélection négative

Différenciation des thymocytes (5)



Sélection positive
Sélection négative

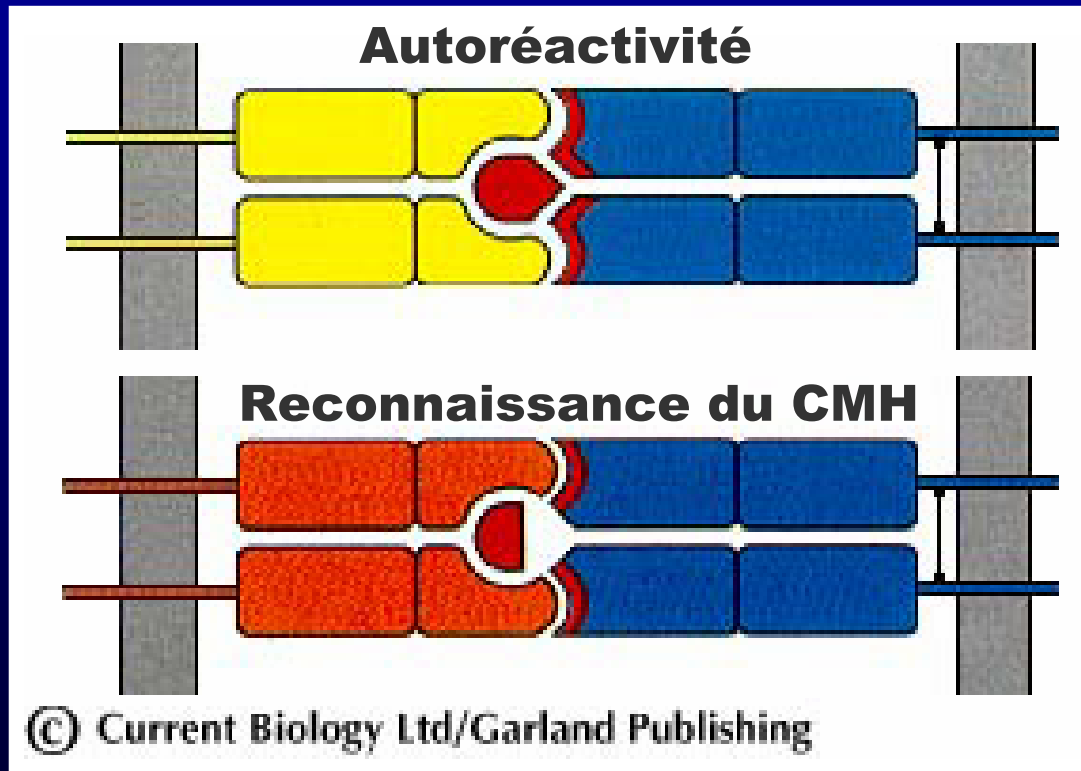
Engagement CD4/CD8
Restriction pour le CMH
Fonction effectrice

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

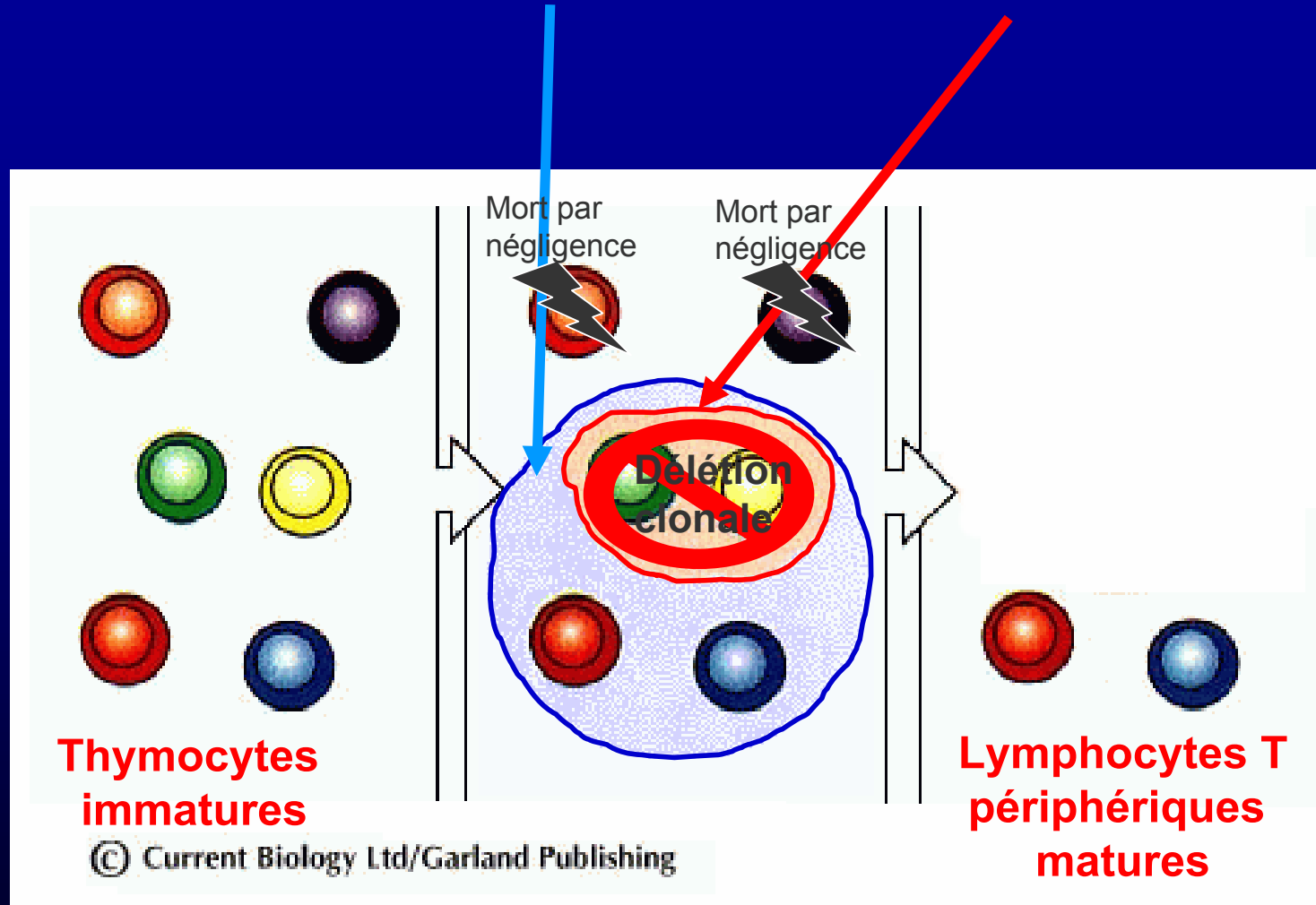


→ **Sélection négative**

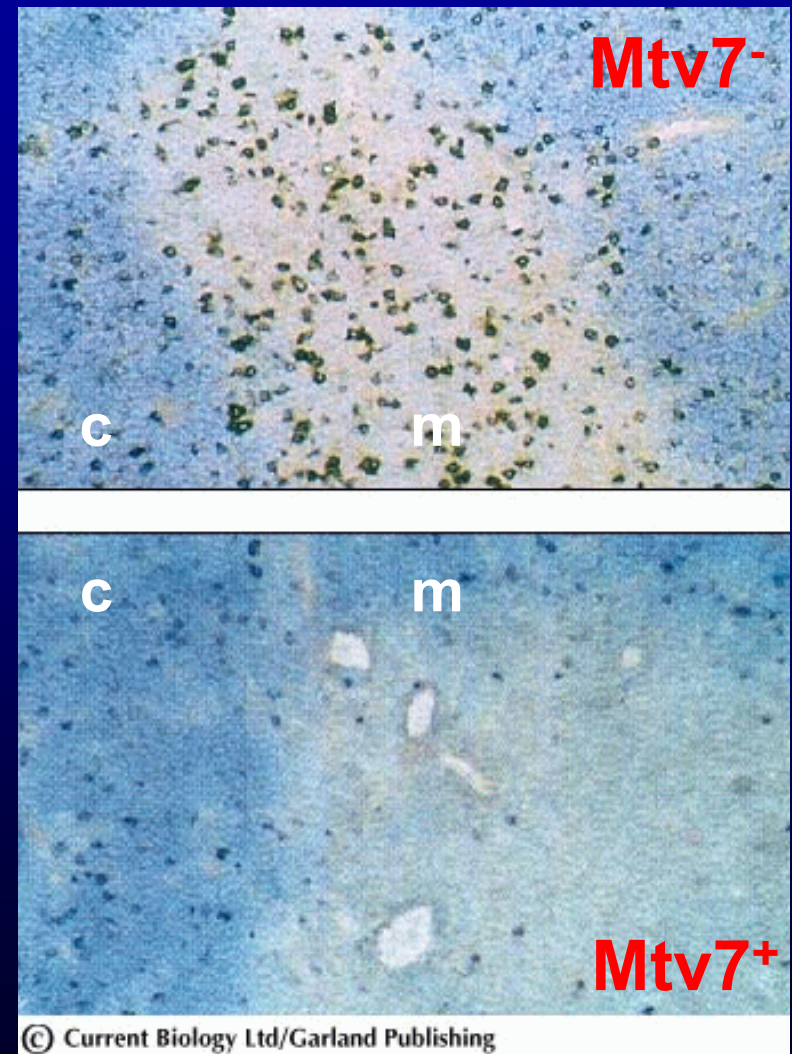
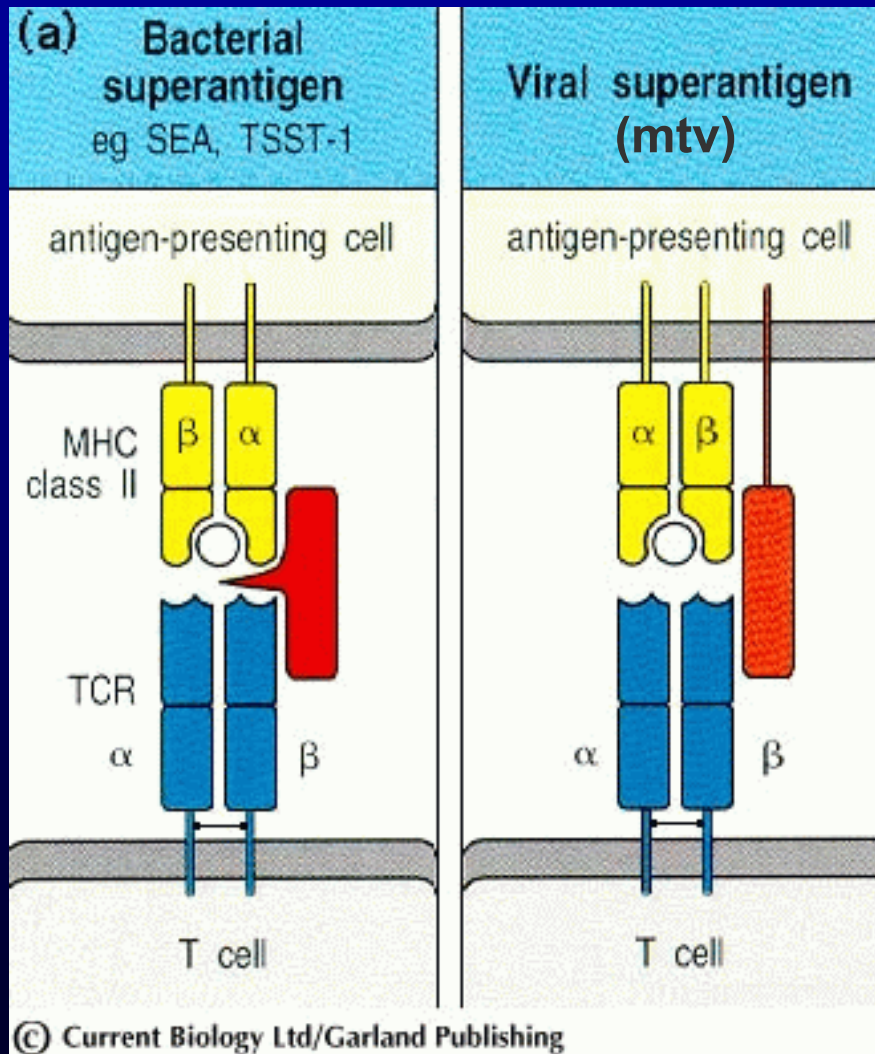
→ **Sélection positive**

→ *Éducation thymique*

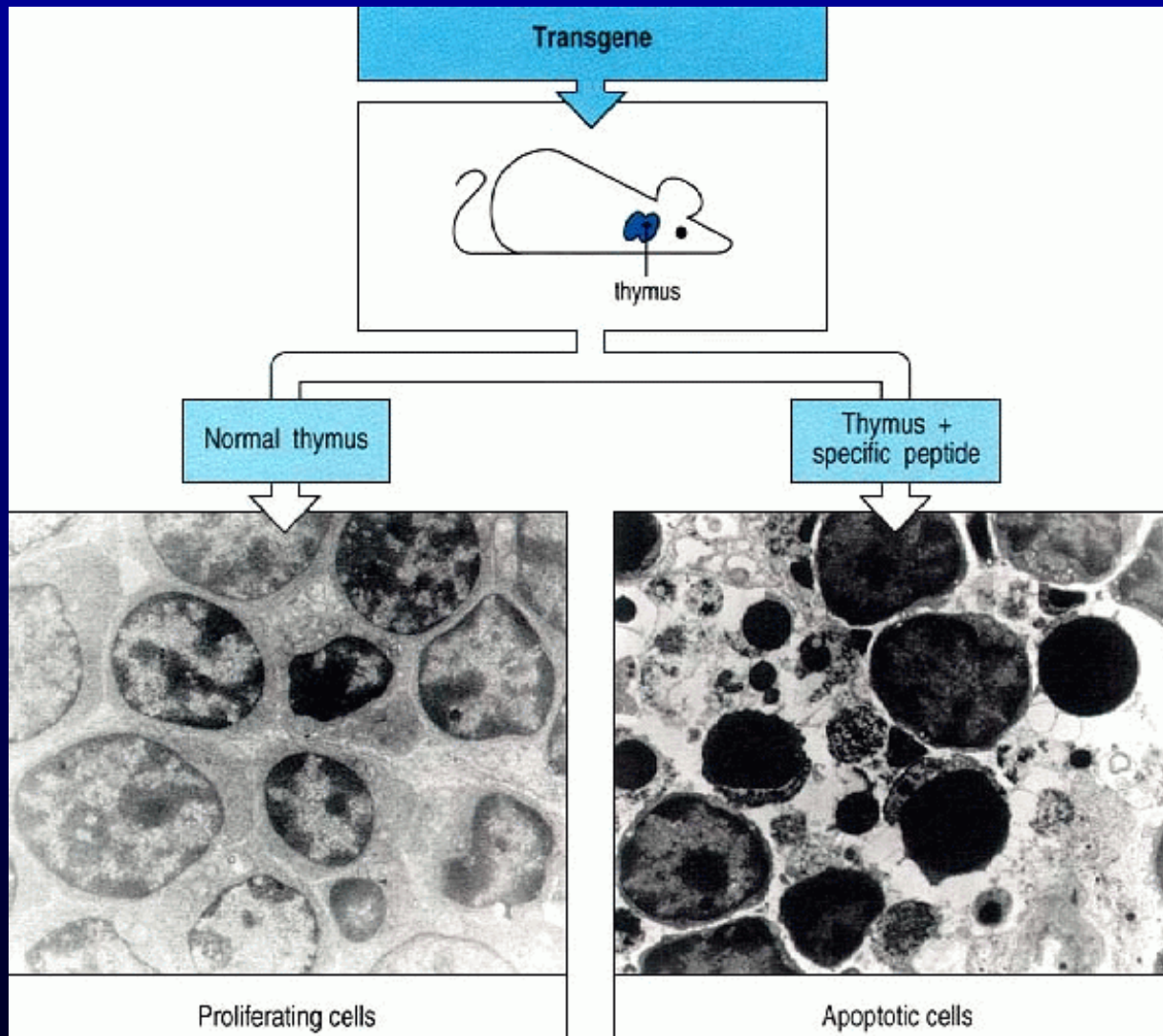
Sélections positive et négative (3)



Délétion clonale et superantigènes

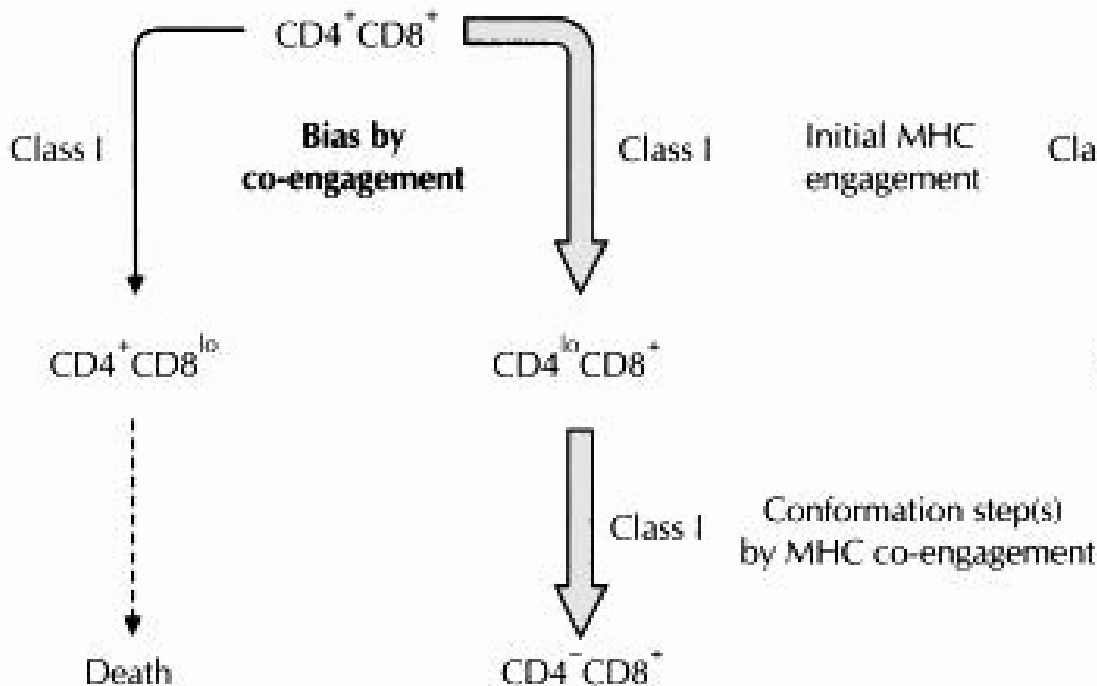


Délétion clonale et TCR transgénique

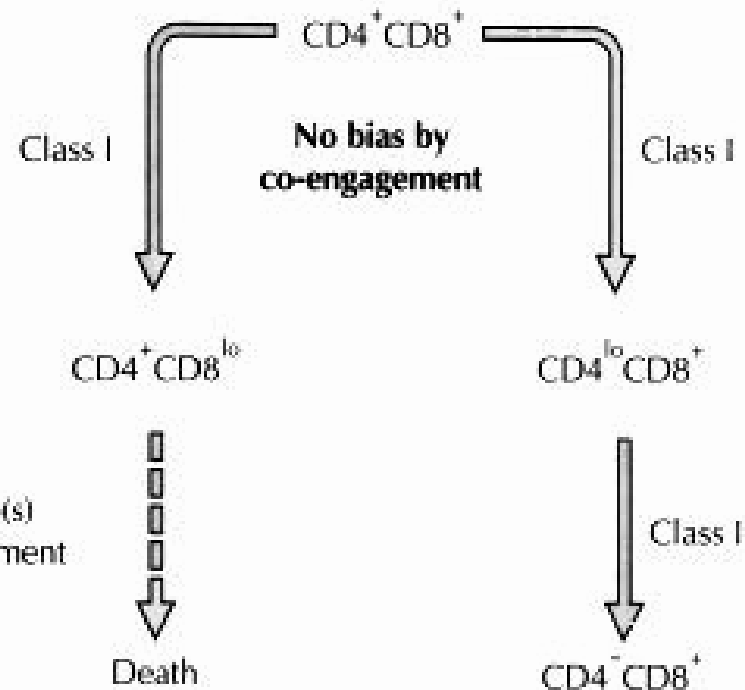


Mécanisme de la restriction au CMH (1)

(a) Instruction

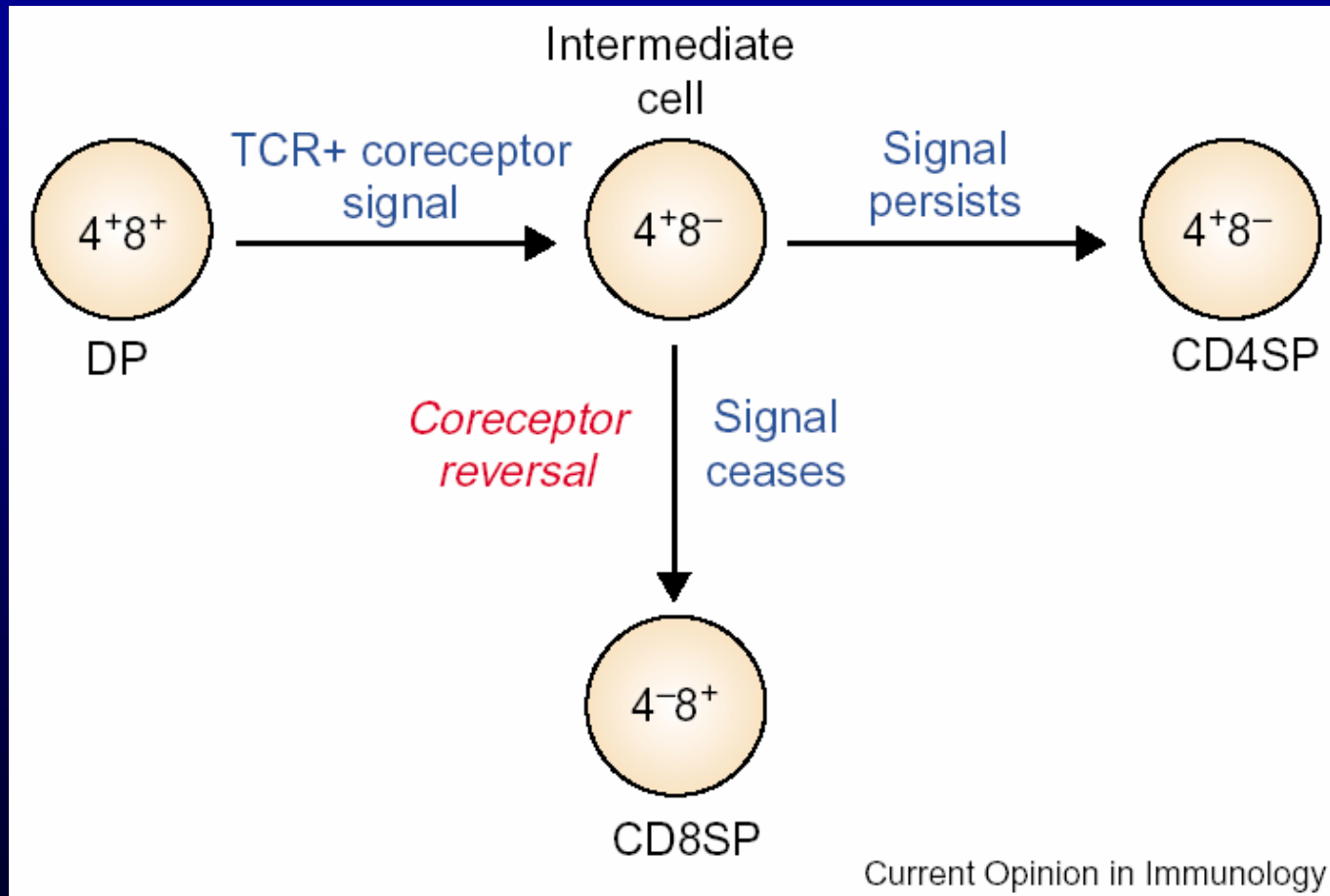


(b) Stochastic



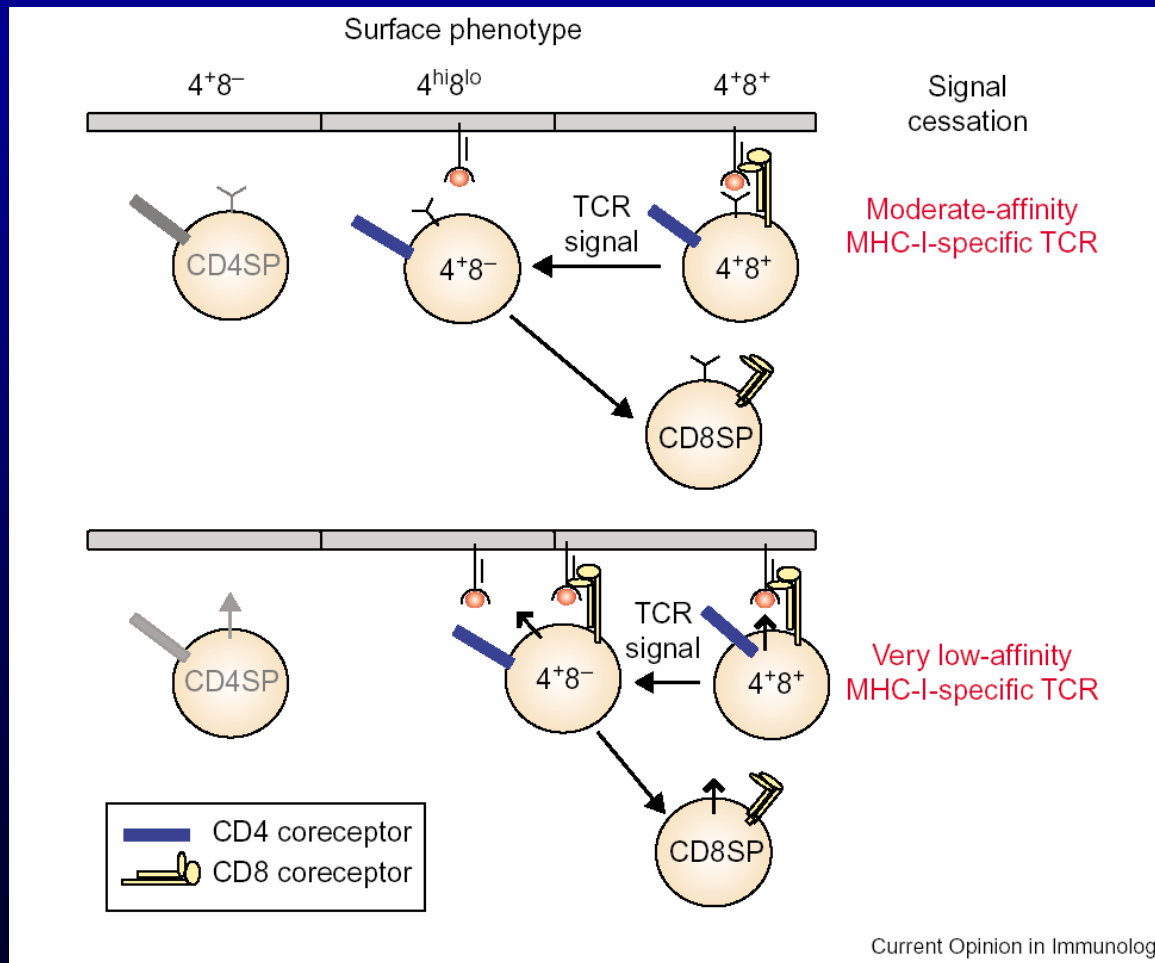
Mécanisme de la restriction au CMH (2)

Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



Mécanisme de la restriction au CMH (3)

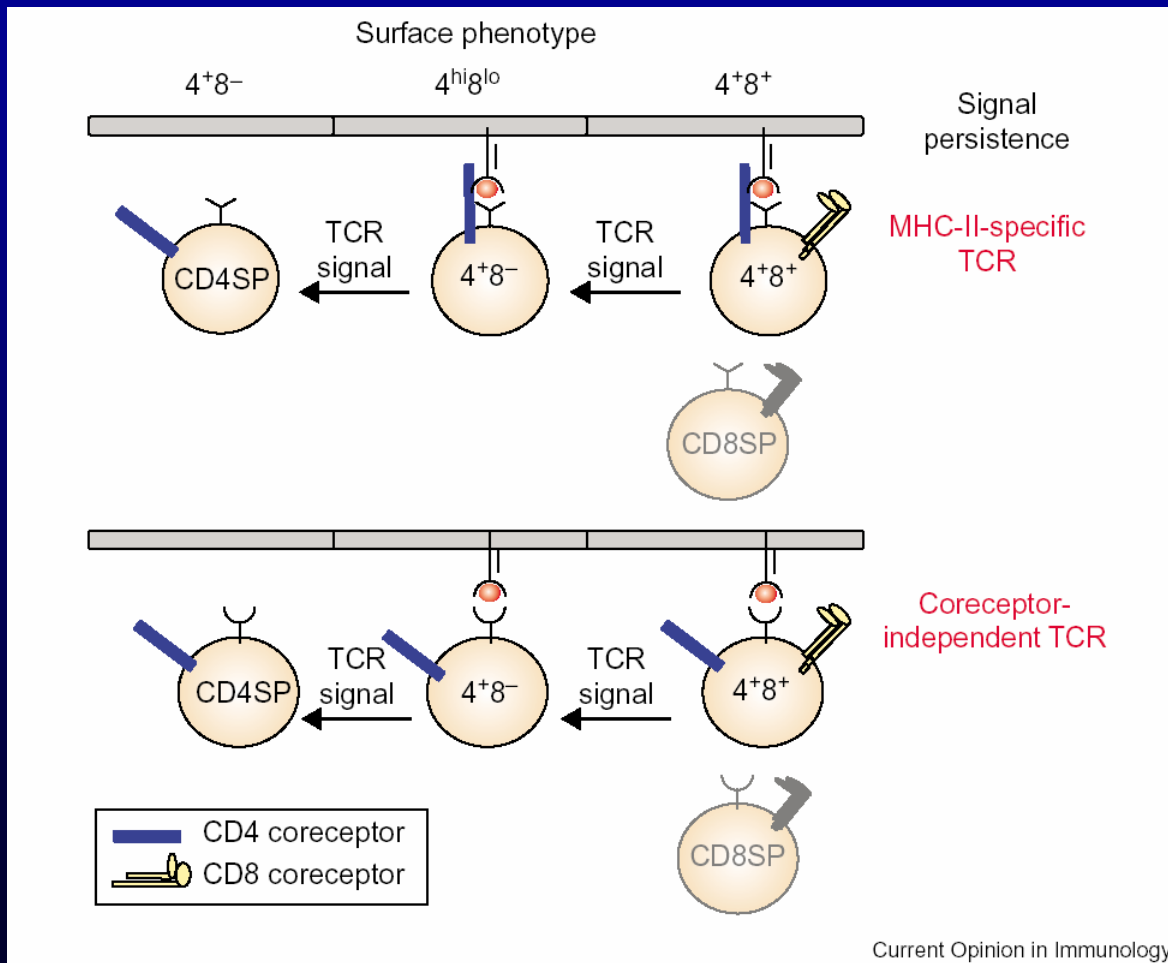
Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



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

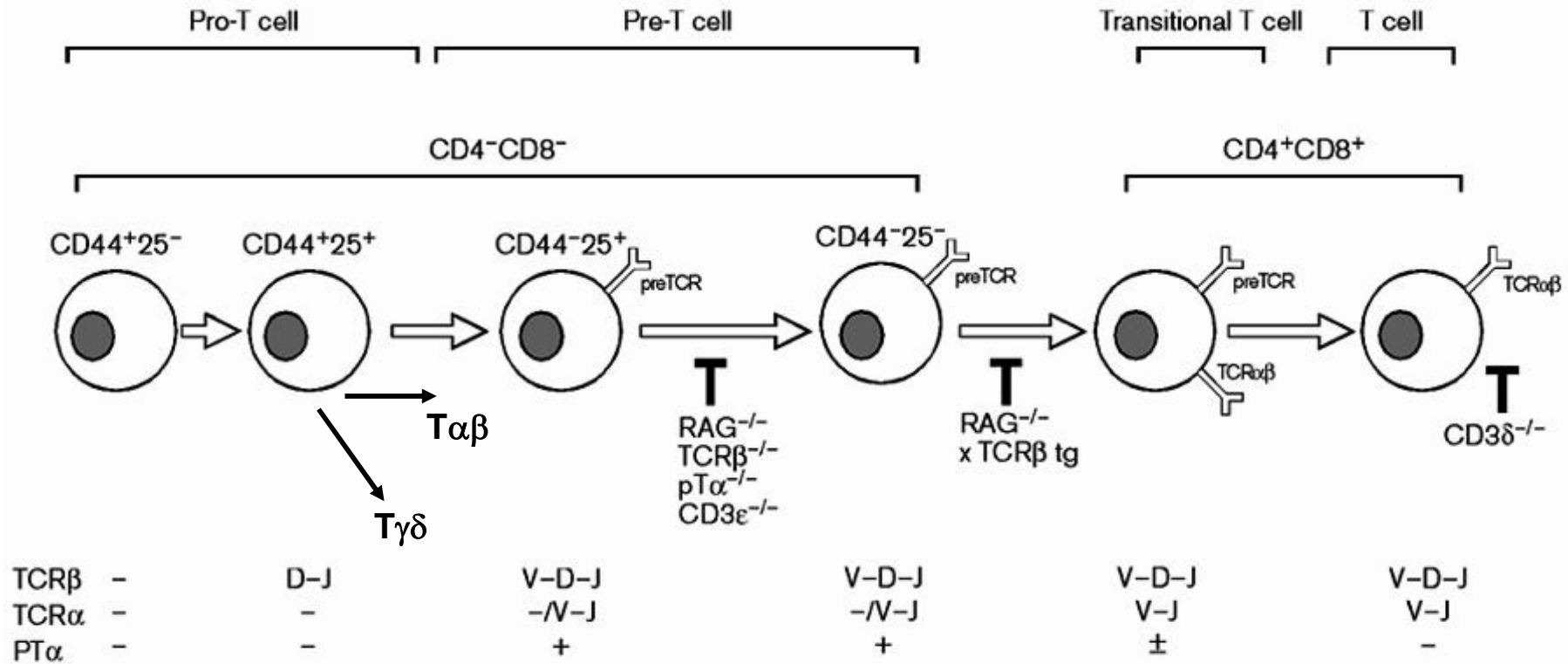
Mécanisme de la restriction au CMH (4)

Modèle cinétique d'engagement CD4/CD8



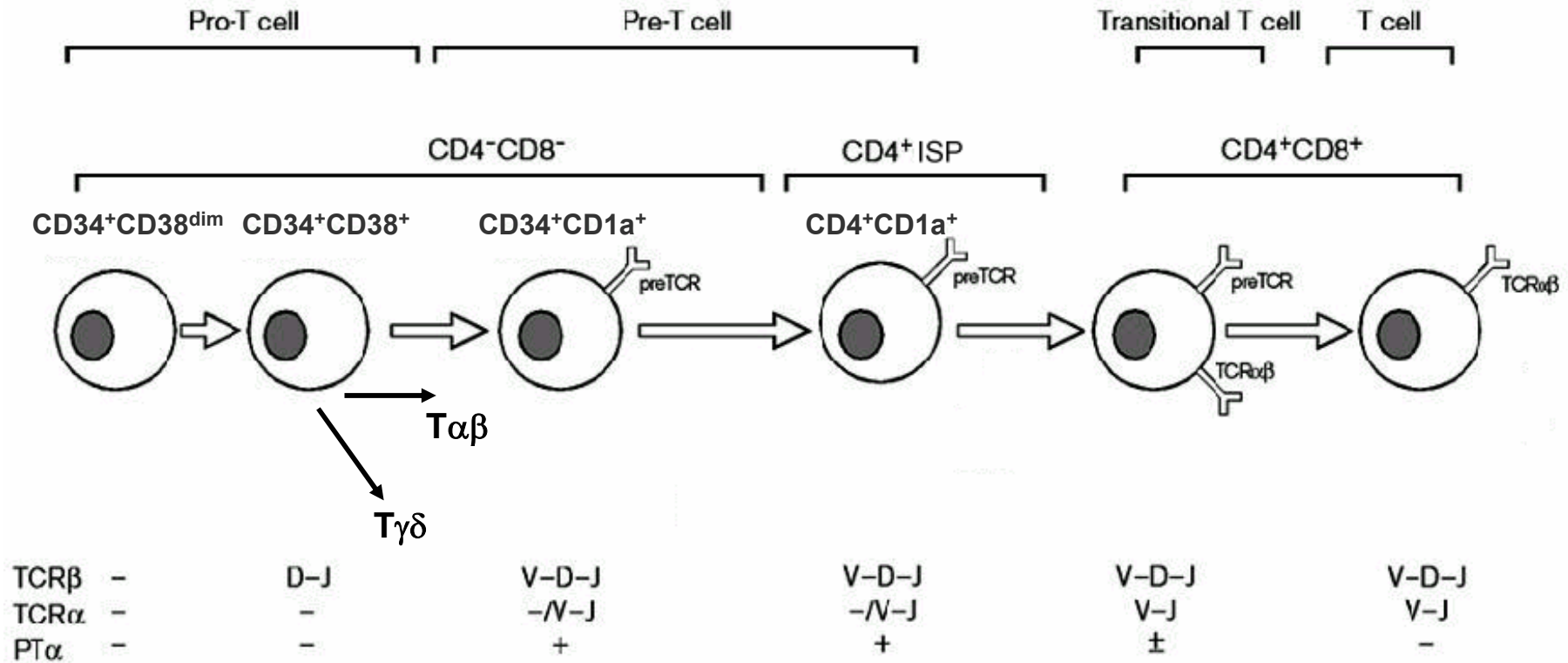
**Un signal persistant
promeut la
différenciation en
lymphocyte T CD4SP**

Différenciation thymique: souris



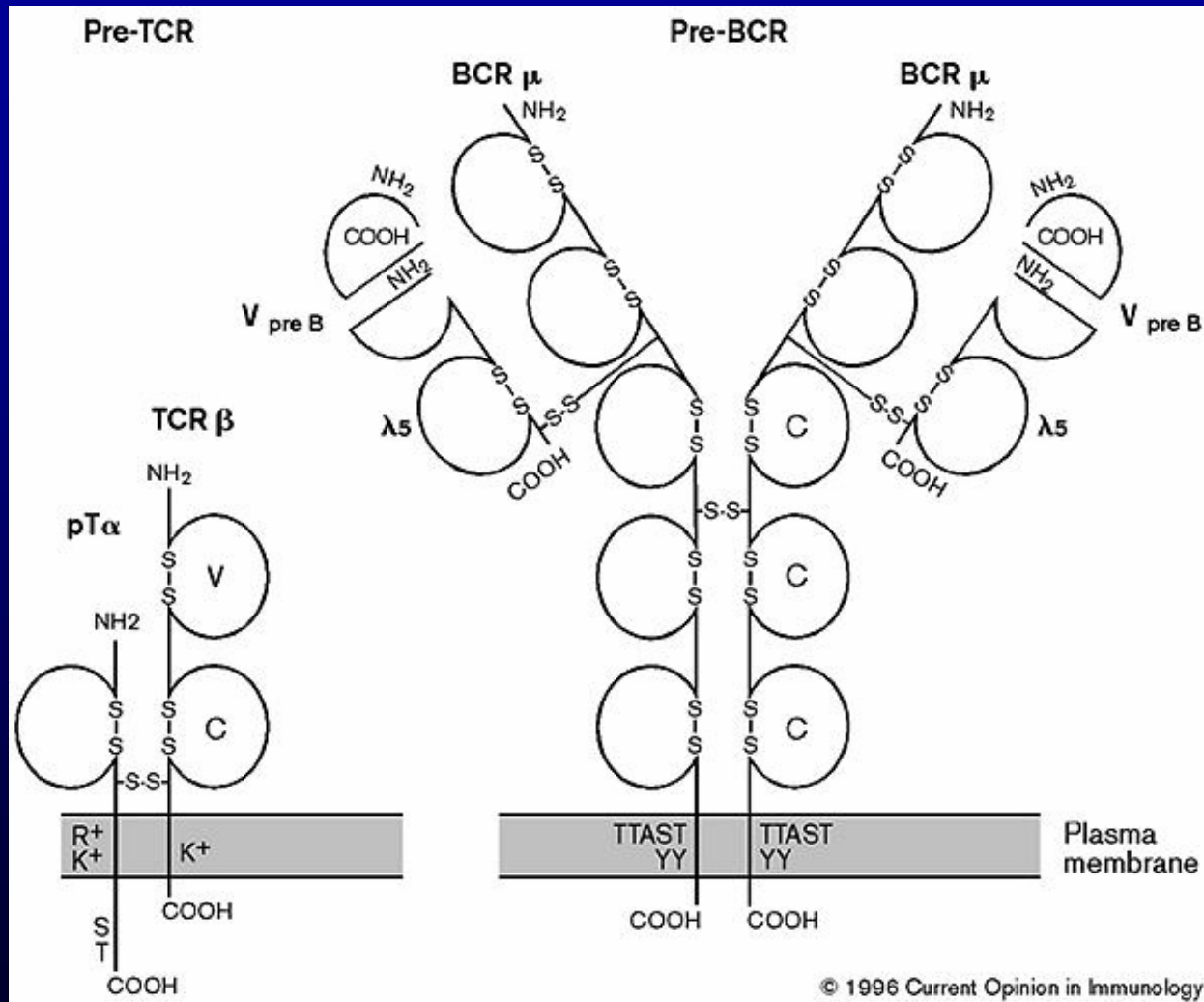
© 1996 Current Opinion in Immunology

Différenciation thymique: homme



© 1996 Current Opinion in Immunology

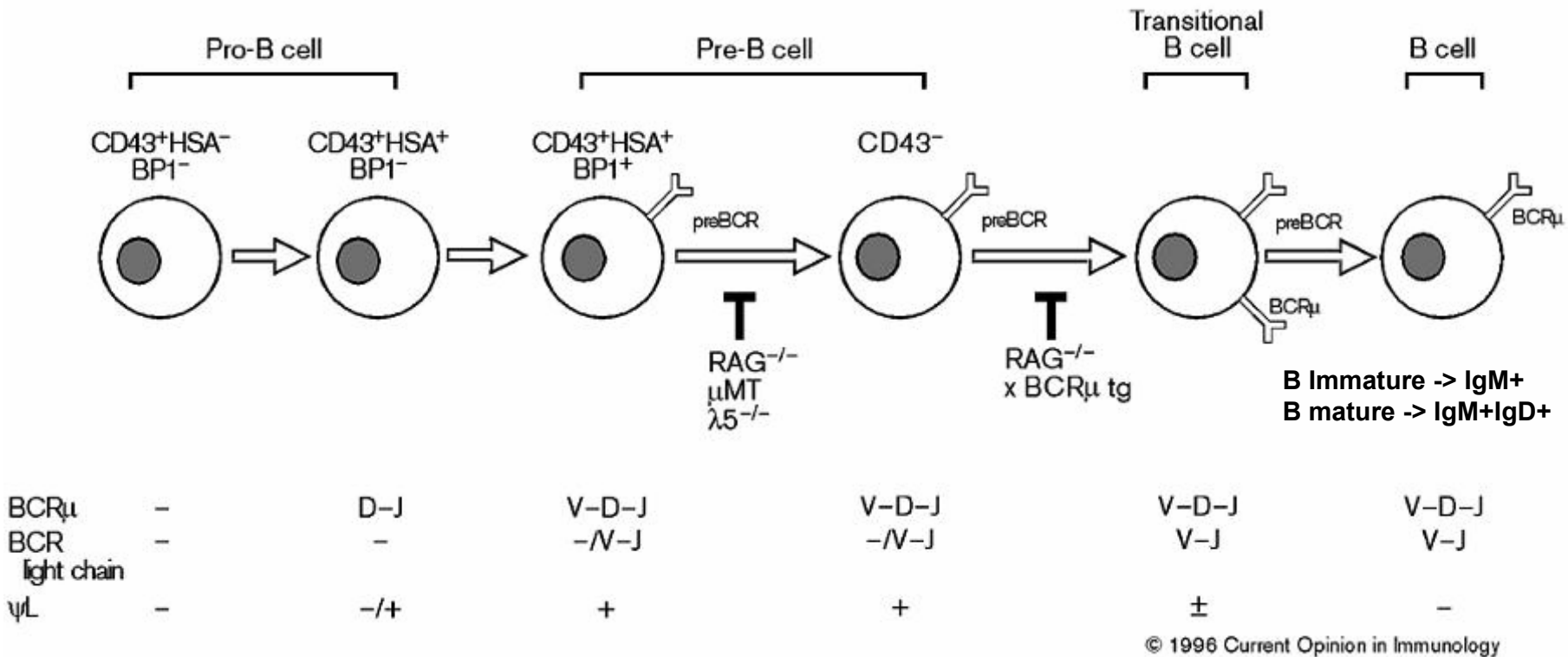
Caractérisation du pré-BCR



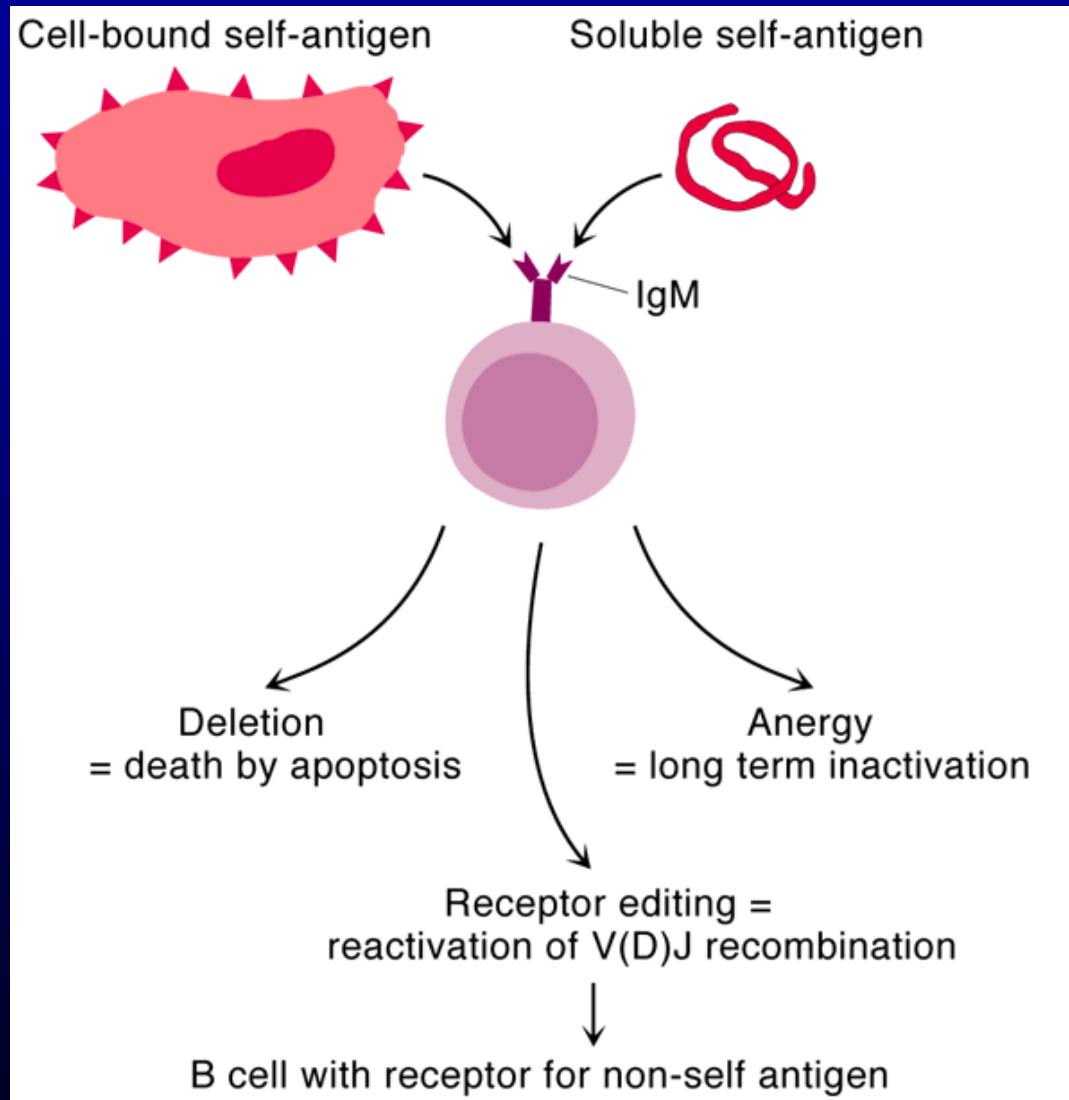
Rôle du pré-BCR

- *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



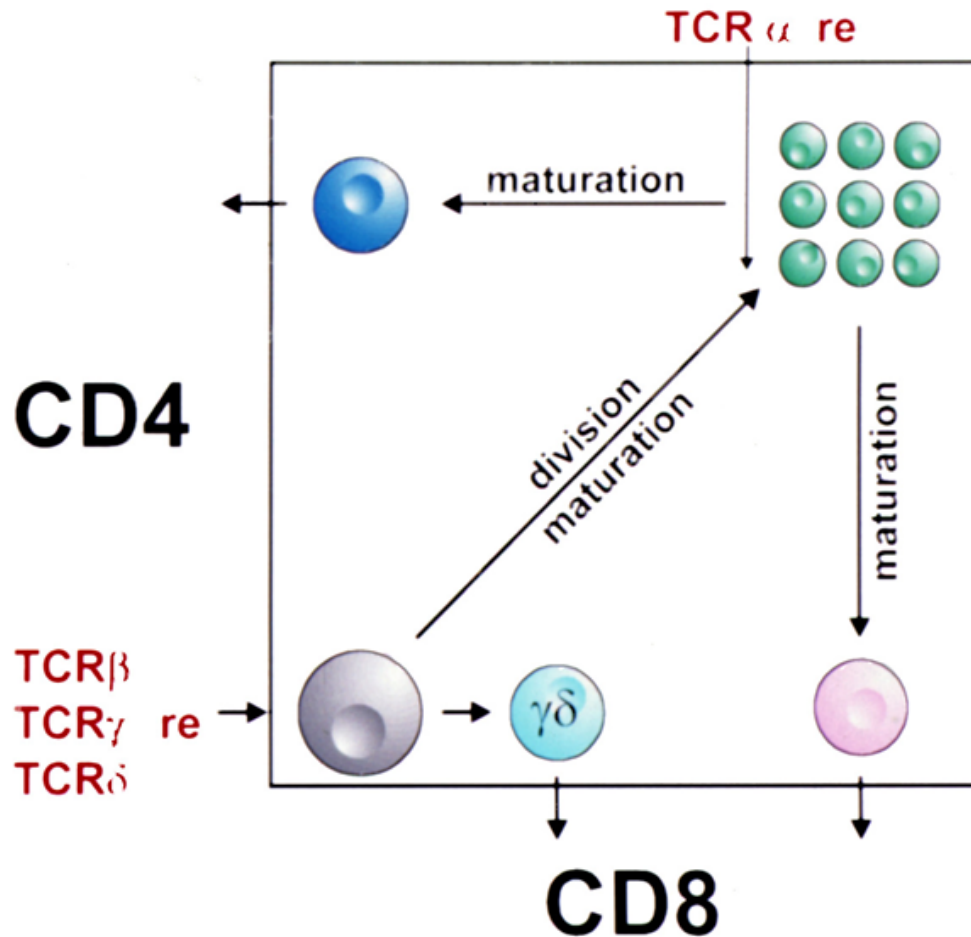
Sélection des lymphocytes B



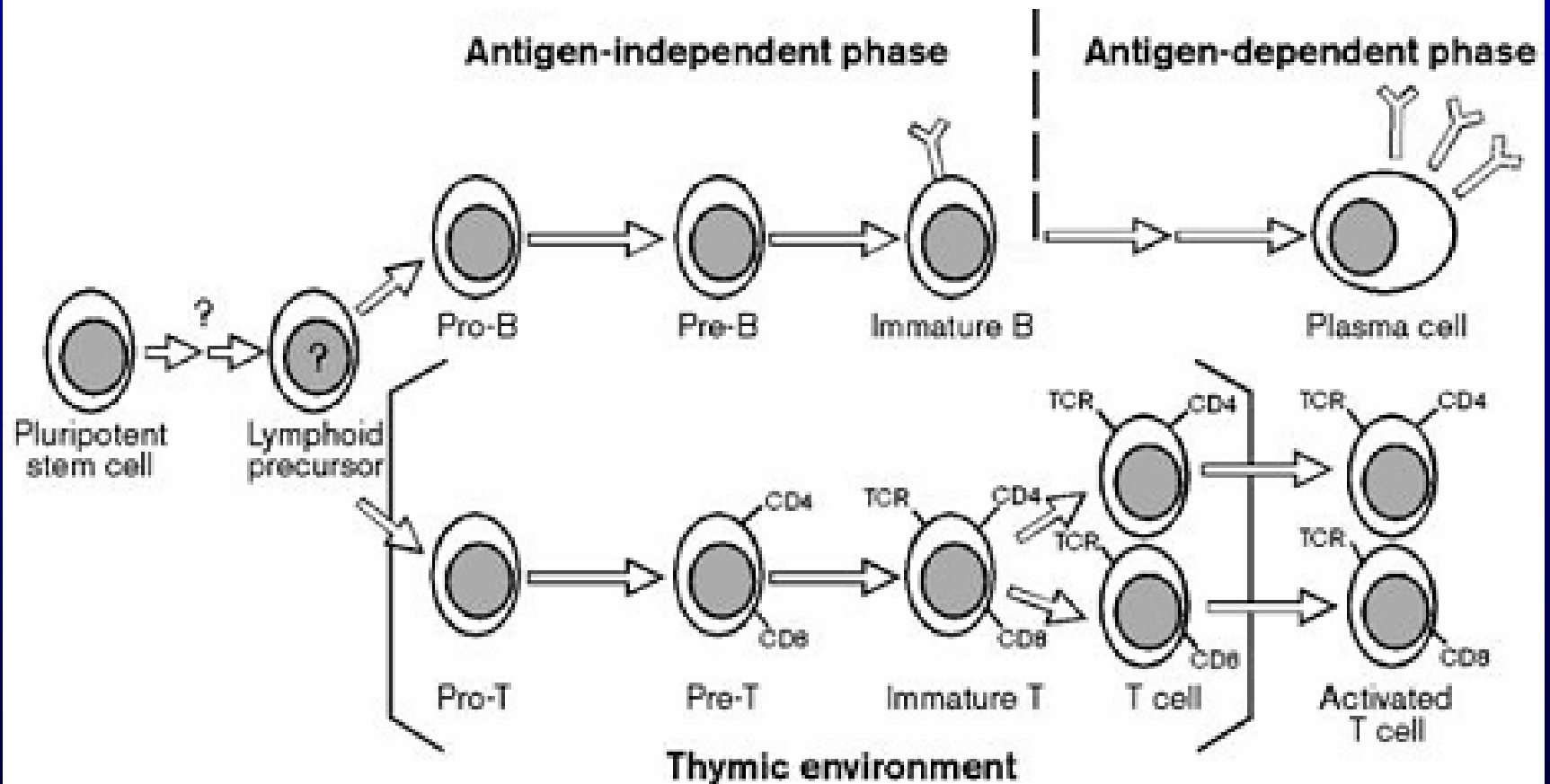
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

1. Introduction
2. Moyens d'étude des populations lymphocytaires
3. Développement lymphocytaire B et T
4. **Conclusion**

Rappel différenciation T



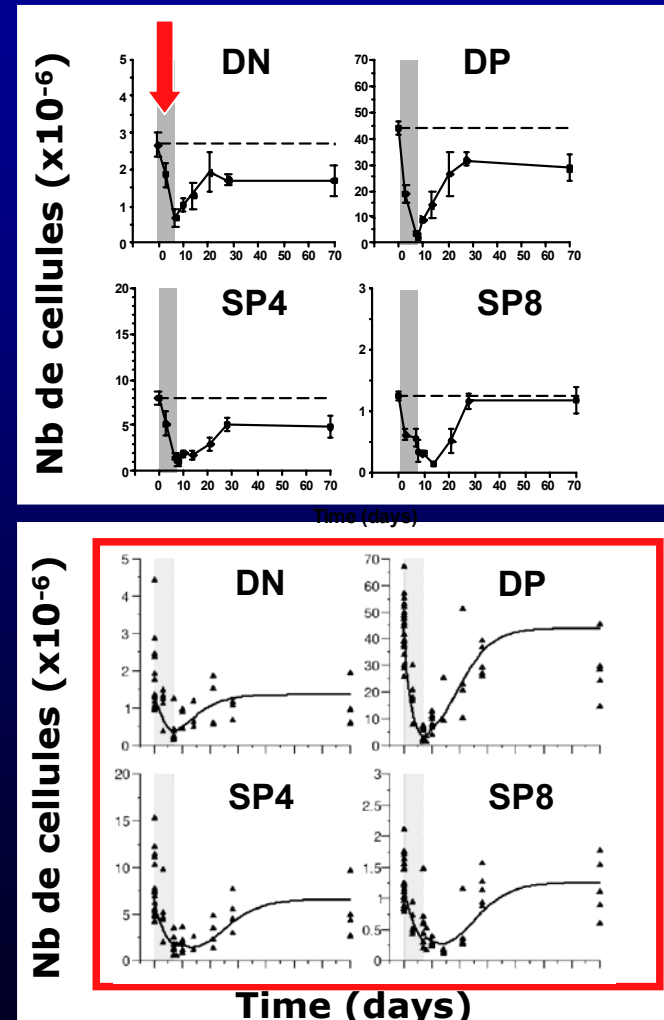
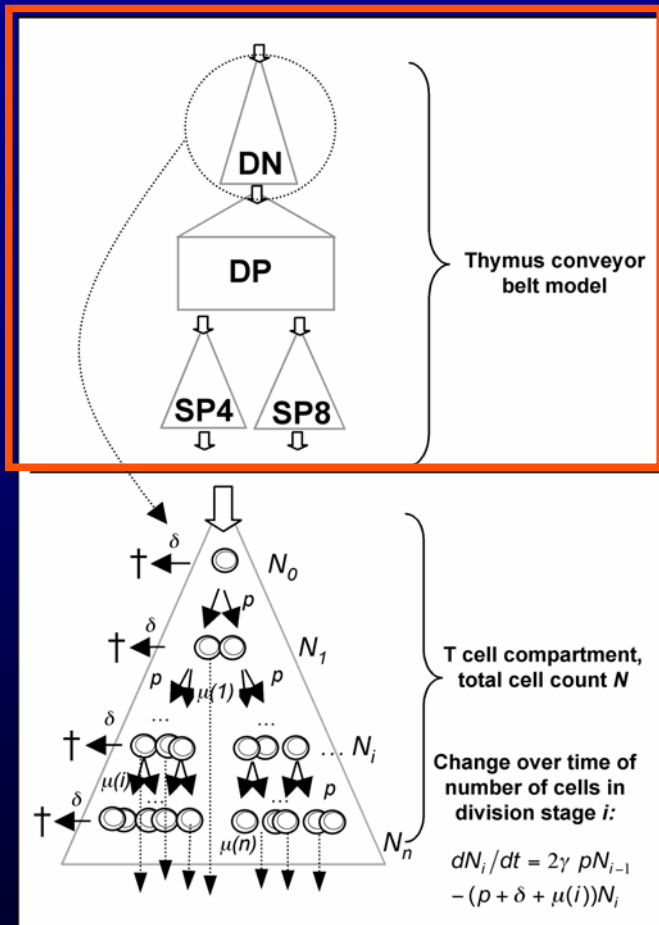
Parallèle différenciations B et T



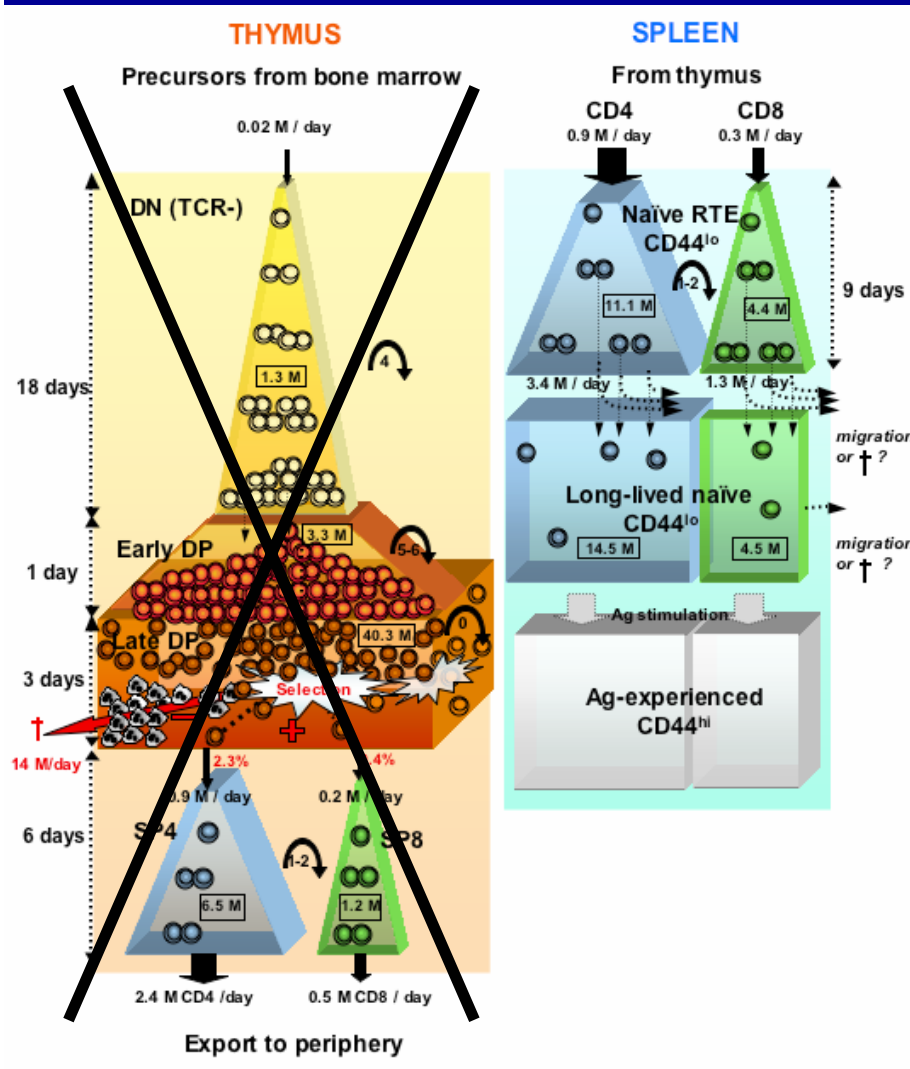
© 1996 Current Opinion in Immunology

Modélisation de la différenciation T

Données expérimentales obtenues après déplétion transitoire (7j) des cellules T en division



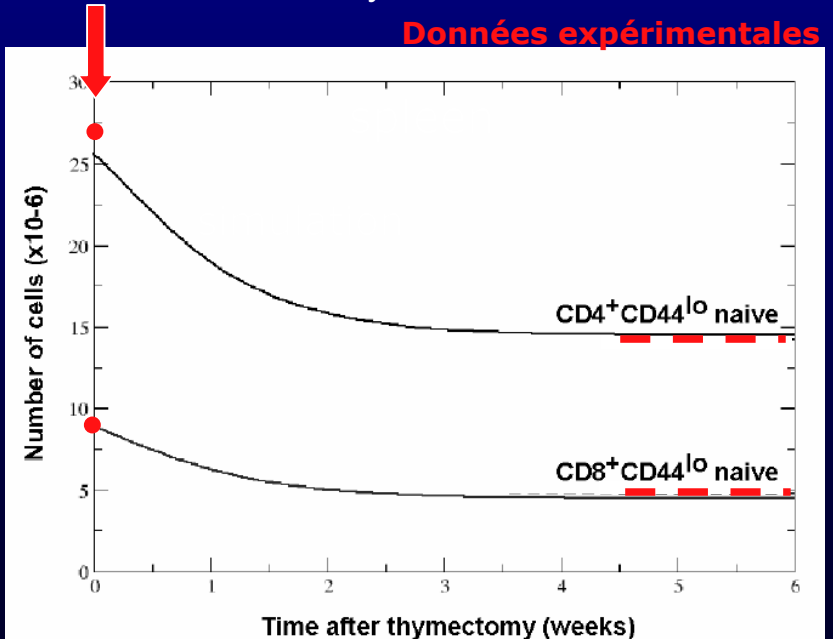
Modélisation de la différenciation T



➤ Modèle quantitatif de la dynamique cellulaire des thymocytes et des splénocytes à l'homéostasie

➤ 56 paramètres quantitatifs: flux cellulaires, temps de résidence, export, import, prolifération, mortalité, temps & espace, sélection, expansion

➤ Simulation d'une thymectomie



Modélisation de la différenciation T

