

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2009 IF-IIc&IId
février 2009

1

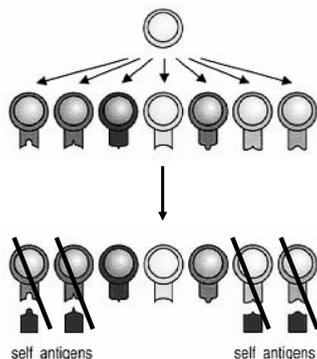
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

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

3

Théorie de la sélection clonale (1) Burnet (1899–1985)

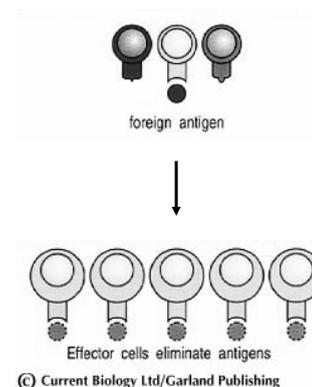
- Chaque lymphocyte exprime un type unique de récepteur spécifique d'antigène
- Les lymphocytes exprimant un récepteur dirigé contre un antigène du soi sont éliminés lors de la différenciation



6

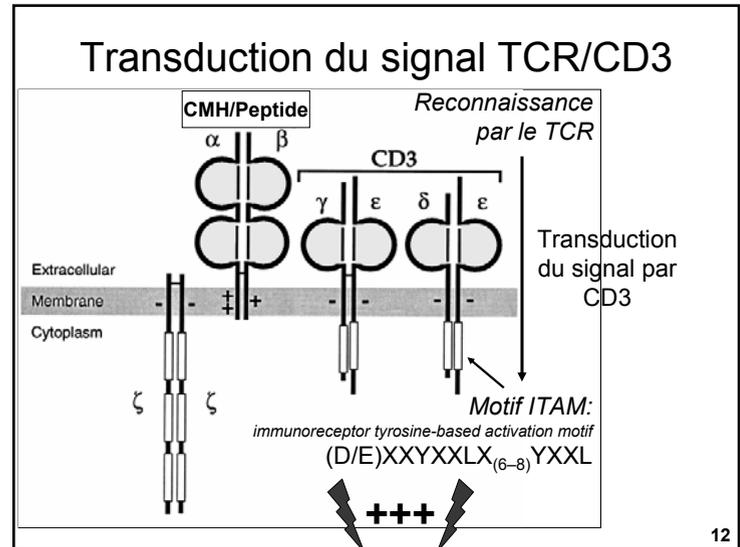
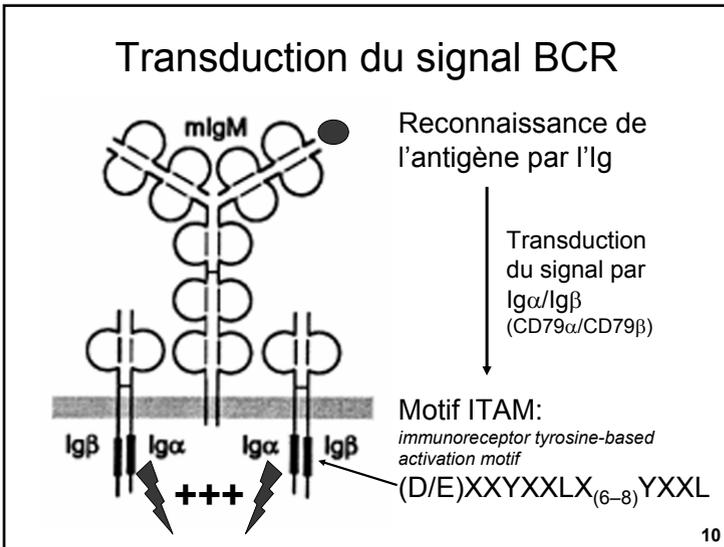
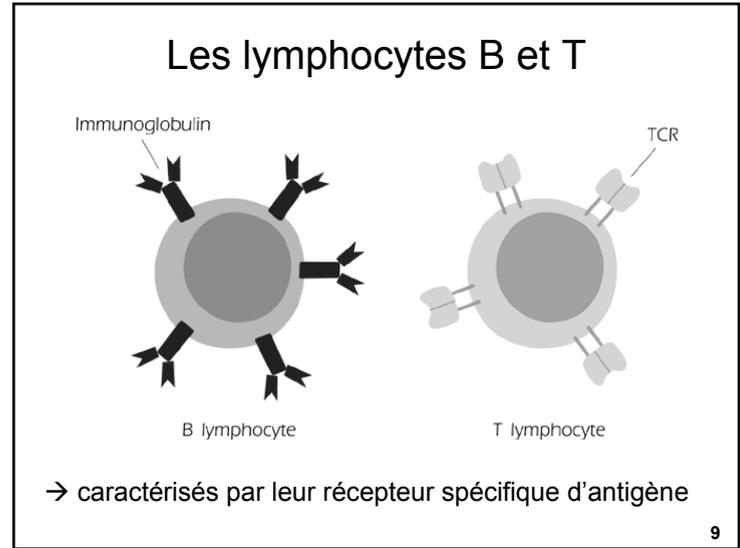
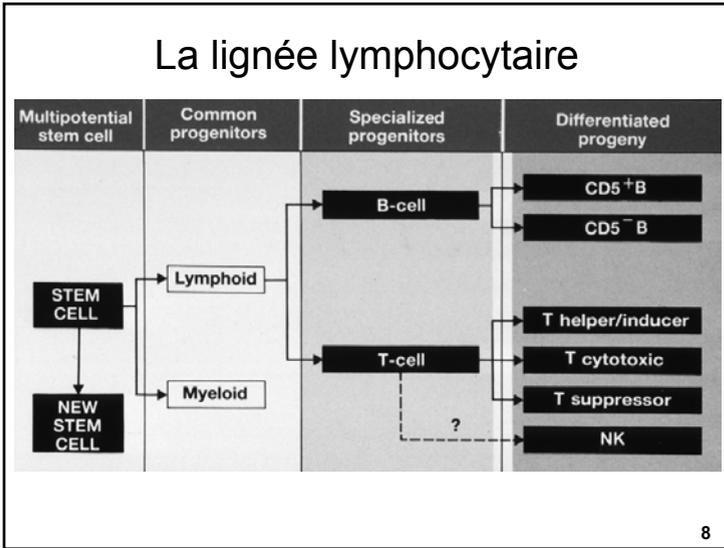
Théorie de la sélection clonale (2)

- 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 donnent des récepteurs de même spécificité



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

7

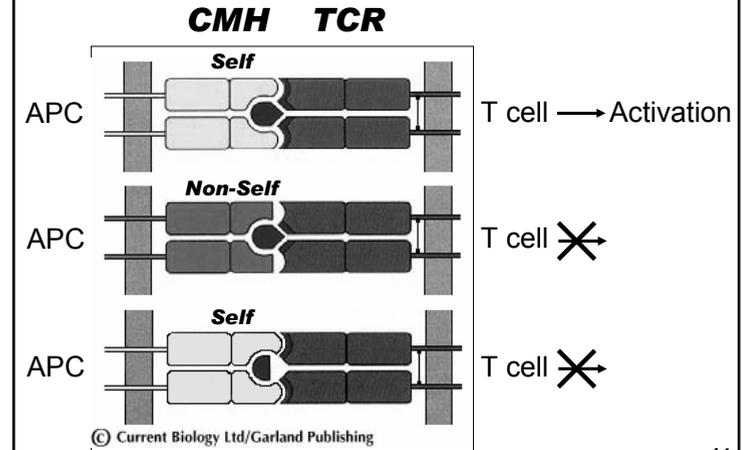


Reconnaissance par le TCR $\alpha\beta$

- 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*

13

Restriction par le CMH



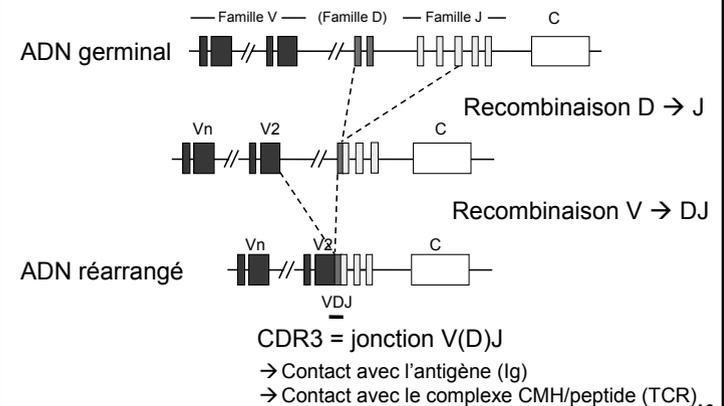
14

Reconnaissance par le TCR $\gamma\delta$

- Intermédiaire entre anticorps et TCR $\alpha\beta$ en structure et fonction
- Reconnaît l'antigène de différentes manières:
 - reconnaissance restreinte par le CMH
 - présentation par des molécules du CMH non classiques (class Ib, CD1)
 - reconnaissance directe de l'antigène
 - reconnaissance d'antigènes non-peptidiques (lipides, glycolipides, phospholipides)

15

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



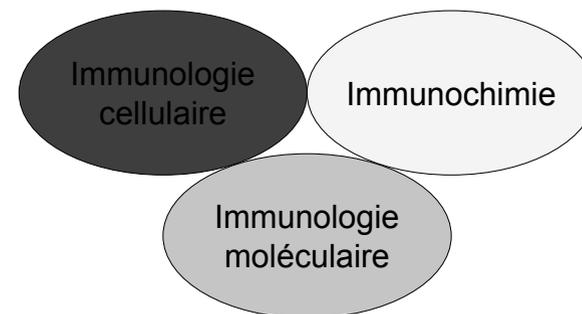
16

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

18

Moyens d'étude des populations lymphocytaires



19

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:
 - *transgènèse*: introduction d'un gène supplémentaire dans le génome
 - *Inactivation génique (knock-out)*: inactivation ciblée d'un gène par recombinaison homologue

20

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.

21

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
- ...

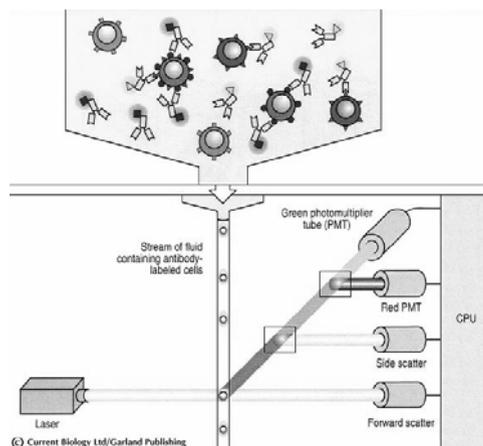
22

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)
- ...

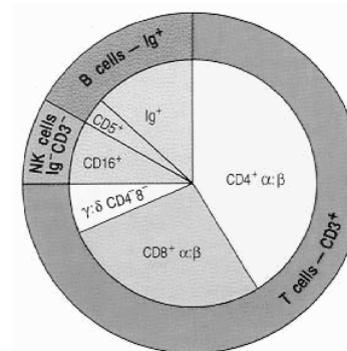
23

Cytométrie de flux (1)



24

Distribution lymphocytaire du sang périphérique humain (PBL)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

27

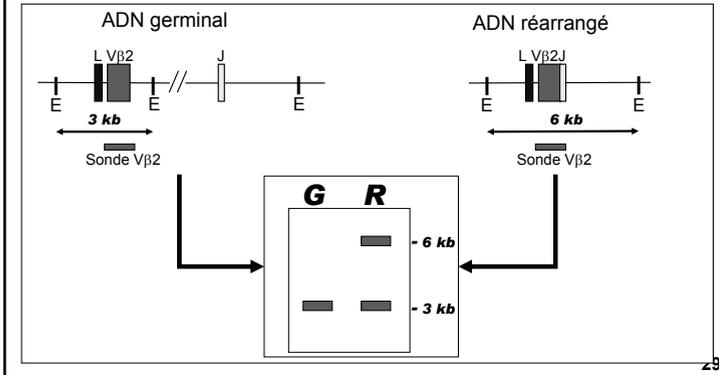
Outils de biologie moléculaire

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

28

Détection des réarrangements (1)

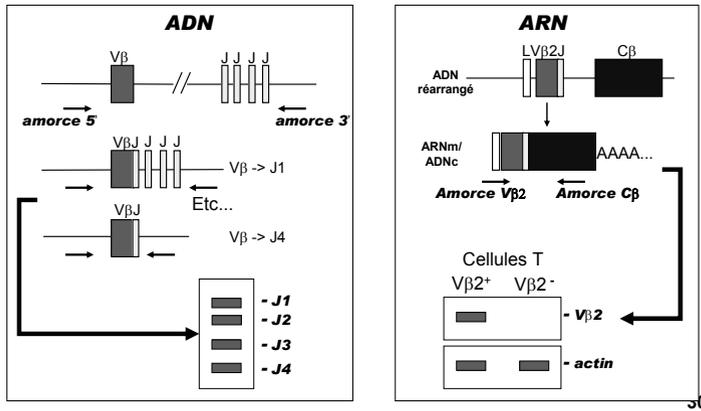
- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par Southern blot.



29

Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR au niveau ADN ou ARN.



30

Utilisation des animaux génétiquement modifiés

- Transgénèse
- Invalidation génique

31

Avantages de l'inactivation

- 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

42

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

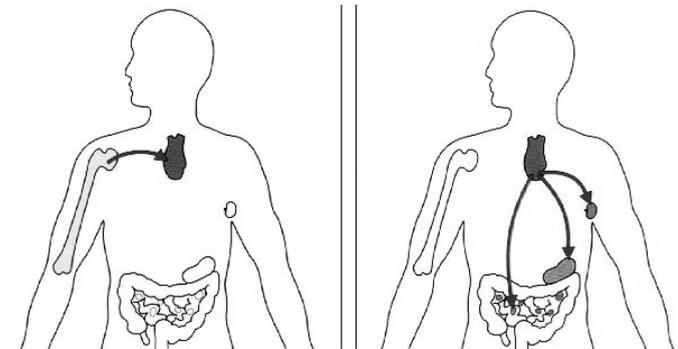
44

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

45

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

46

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

47

Architecture cellulaire du thymus

© Current Biology Ltd/Garland Publishing

48

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)*

49

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

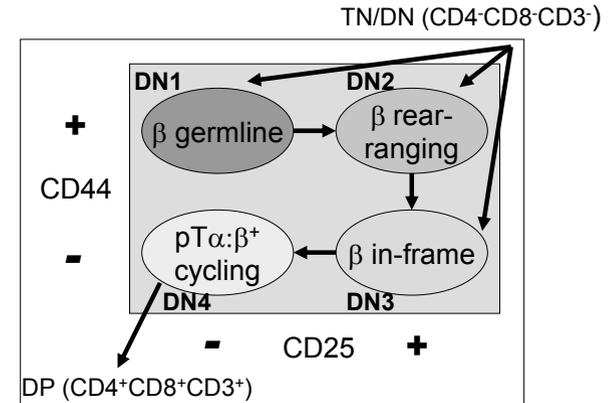
D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-190

Rôle critique du pré-TCR

- pTα (gp33) exprimée tôt dans l'ontogénie et associée à CD3/TCRβ
- 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 TCRβ)
 - prolifération des thymocytes DP
 - induction des réarrangements TCRα

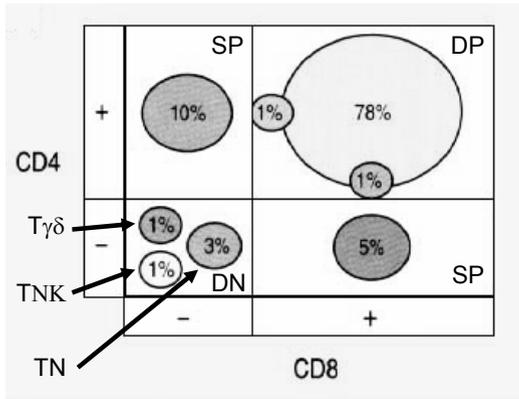
51

Différenciation des thymocytes (1)



52

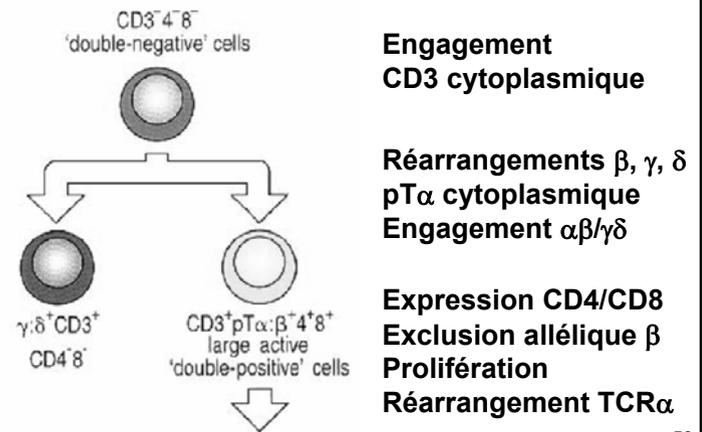
Différenciation des thymocytes (2)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

53

Différenciation des thymocytes (3)



56

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

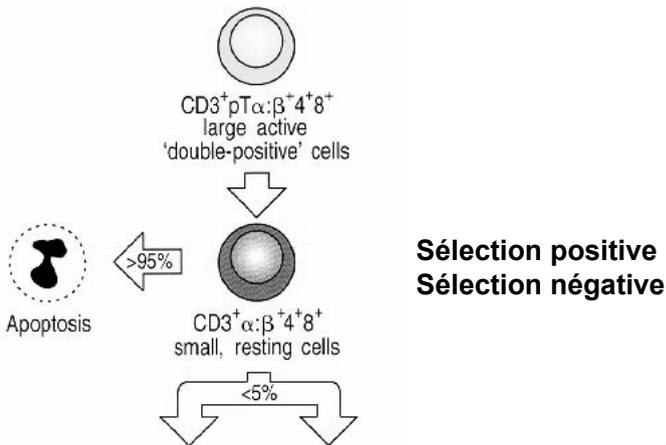
57

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%)

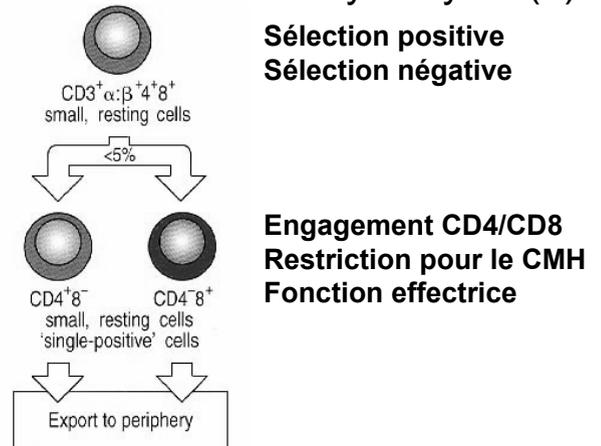
58

Différenciation des thymocytes (4)



59

Différenciation des thymocytes (5)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

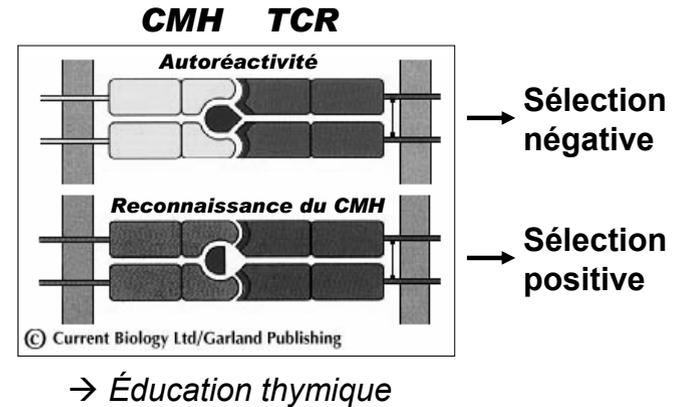
60

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

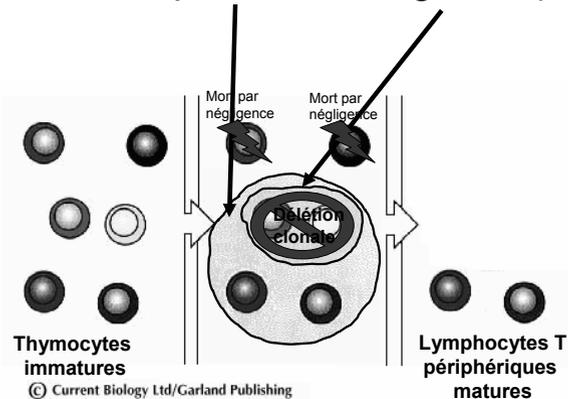
61

Sélections positive et négative (2)



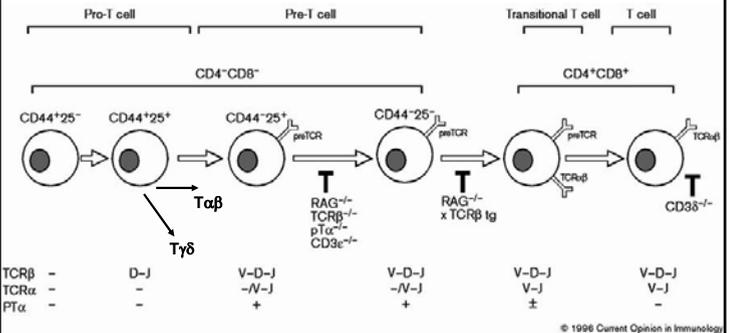
62

Sélections positive et négative (3)



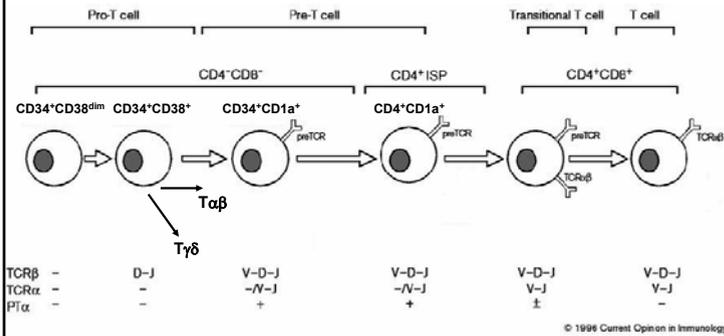
63

Différenciation thymique: souris



D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-190

Différenciation thymique: homme



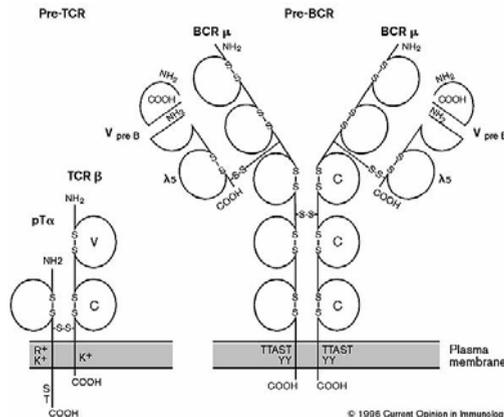
D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-195

Développement T chez l'homme (2)

- Dès huit semaines de gestation, on observe la synthèse de chaînes TCR β en même temps que la colonisation du thymus par des précurseurs T
- Les premières cellules $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ apparaissent en même temps
- Le répertoire T est en place dès la fin du premier trimestre de gestation

76

Caractérisation du pré-BCR



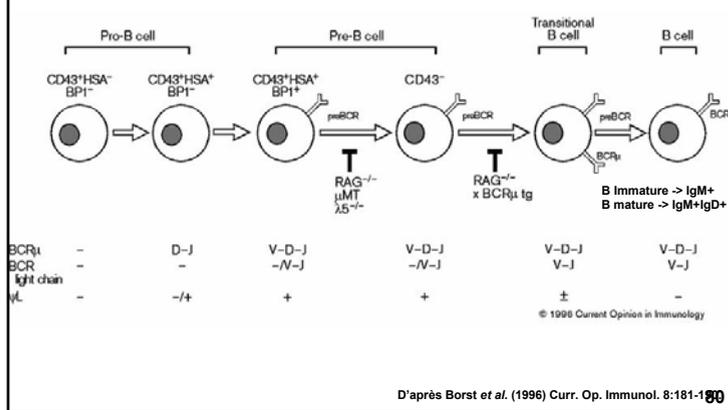
D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-195

Rôle du pré-BCR

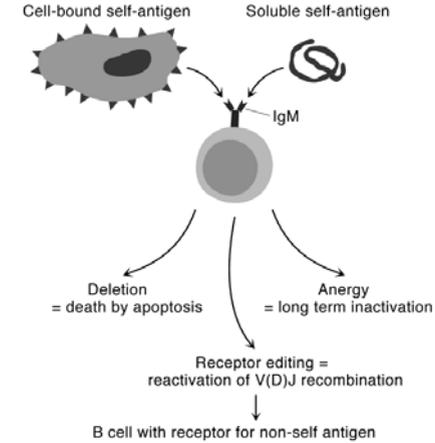
- *Exclusion allélique:* Un réarrangement IgH productif sur un locus IgH entraîne l'arrêt de la recombinaison V(D)J sur l'autre locus
- Une seule chaîne IgH produite par cellule B, en accord avec la théorie de sélection clonale
- *Prolifération des cellules pré-B:*
- Enrichissement en réarrangements productifs
- *...Induction des réarrangements IgL:*
- Production d'une Ig complète

79

Différenciation des lymphocytes B



Sélection des lymphocytes B

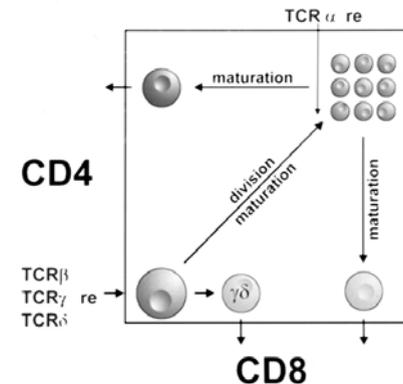


Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

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

82

Rappel différenciation T



83

