

Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2009 IF-IIc&IId
février 2009

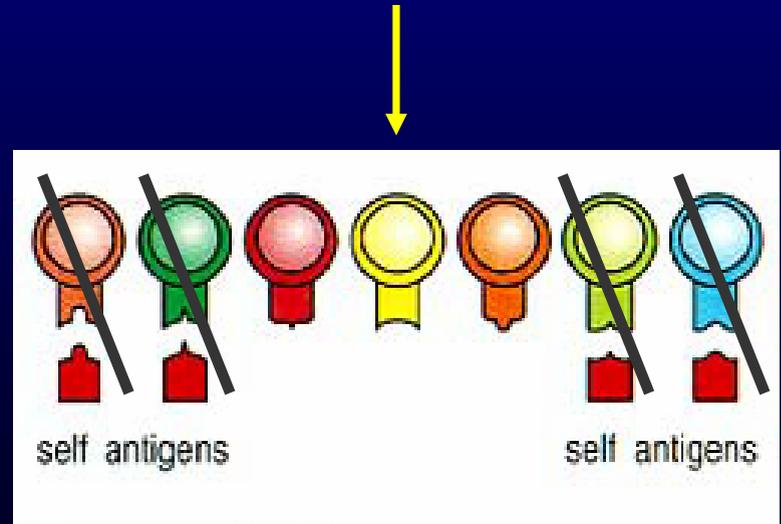
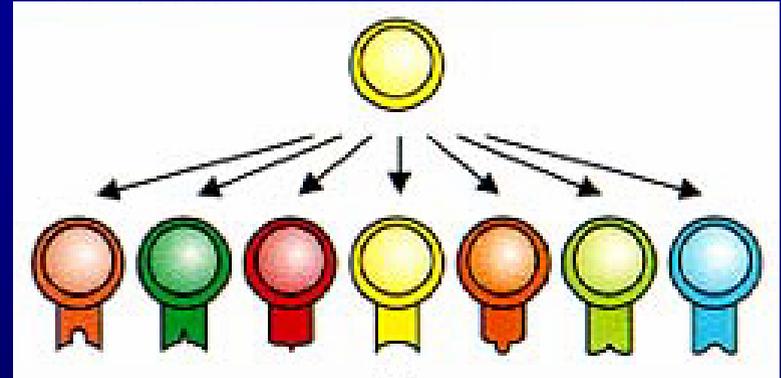
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

- 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

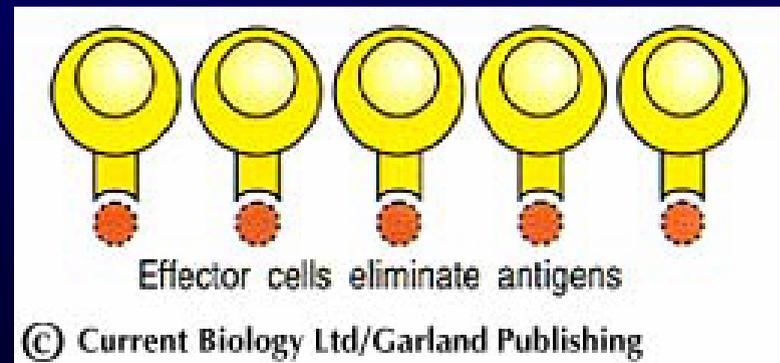


Théorie de la sélection clonale (2)

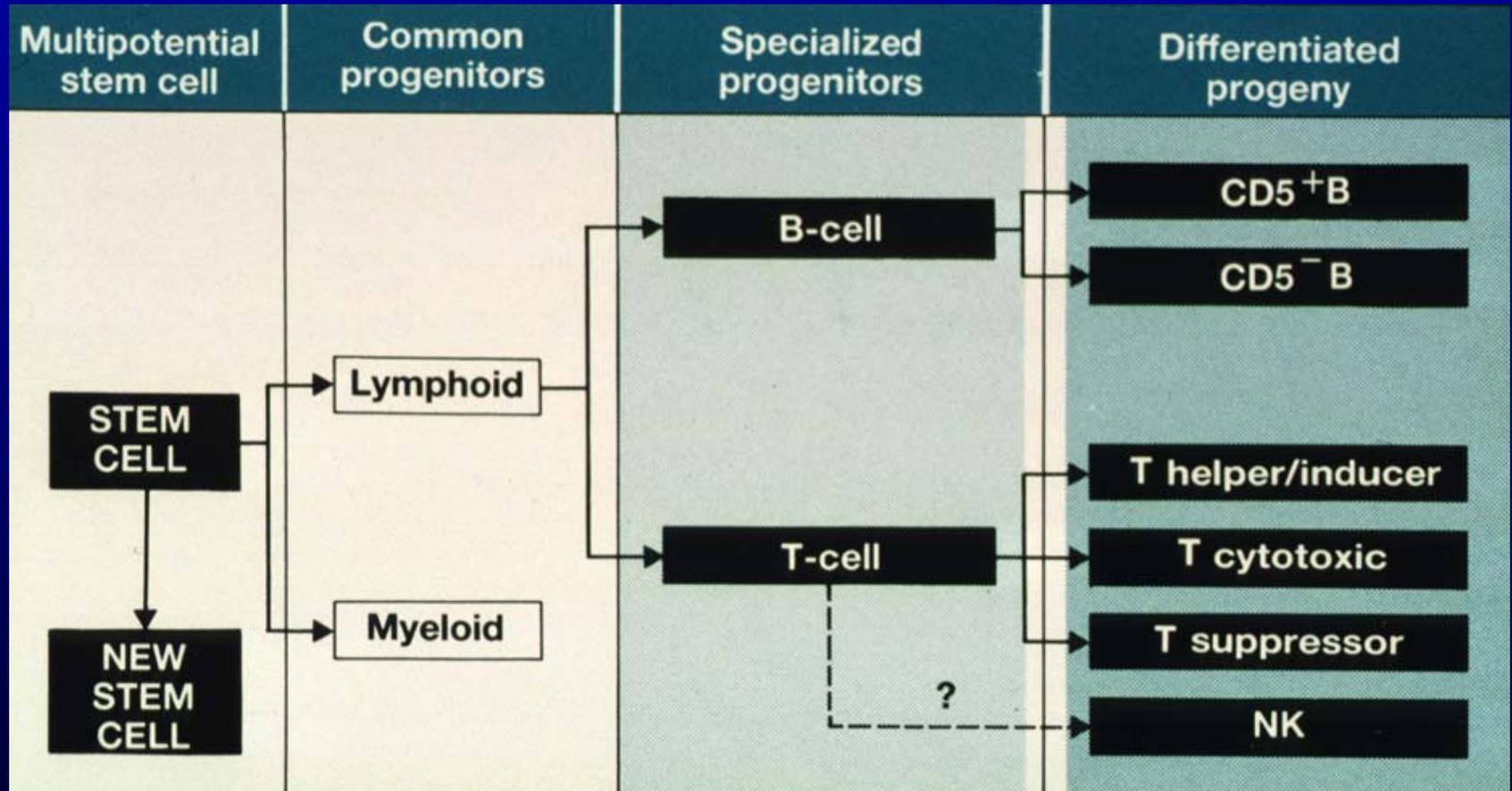
- La liaison avec une bonne affinité d'une molécule étrangère et d'un récepteur entraîne l'activation du lymphocyte



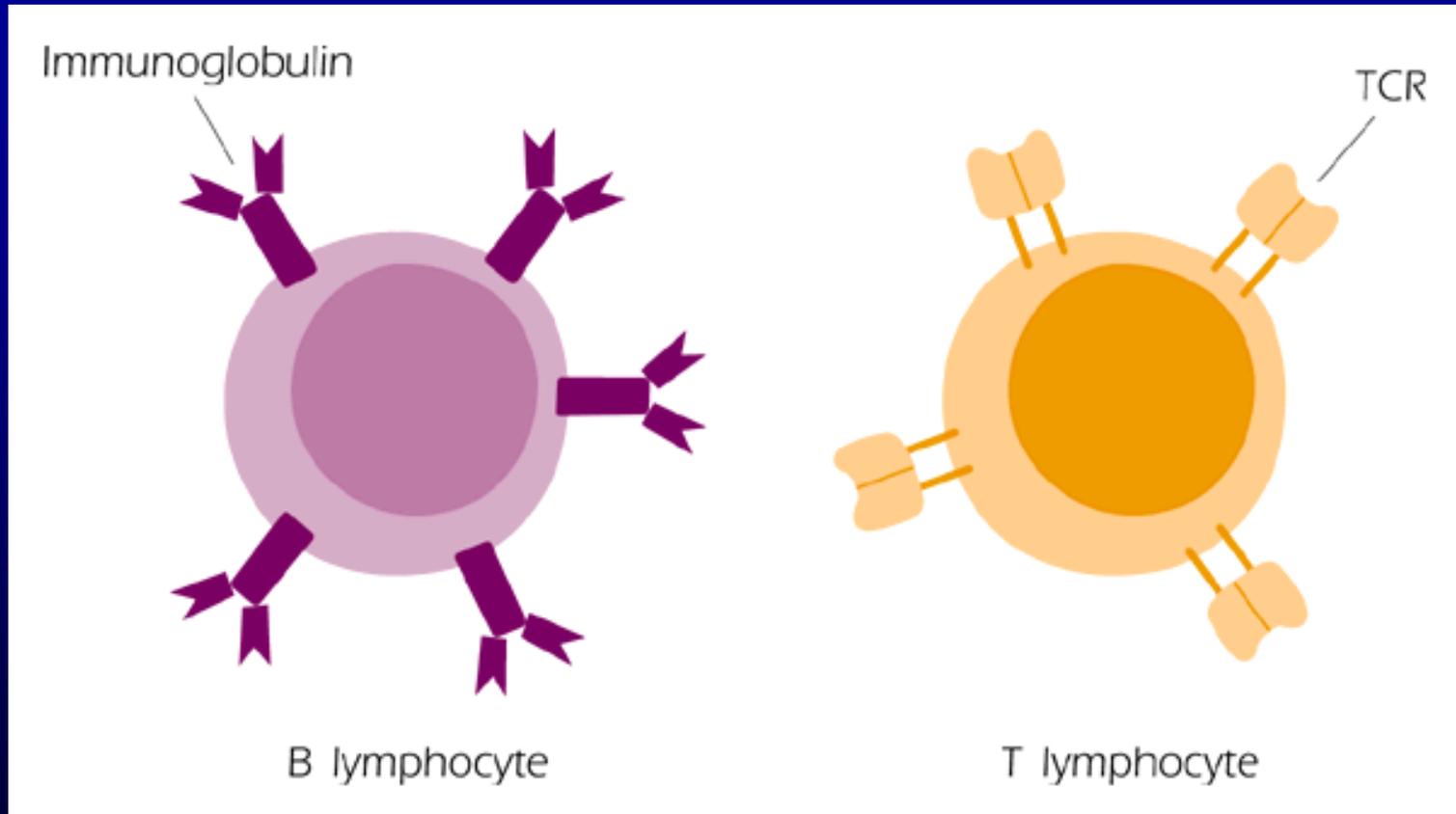
- Les cellules effectrices différenciées à partir d'un lymphocyte activé donné expriment des récepteurs de même spécificité



La lignée lymphocytaire

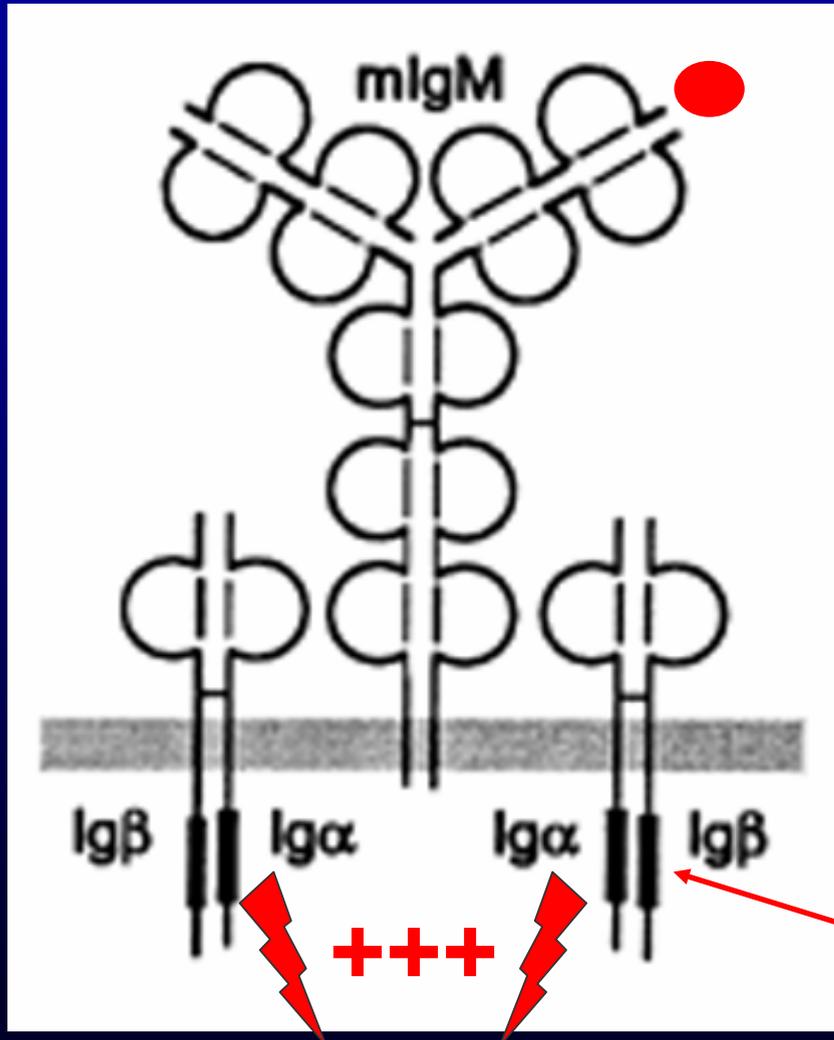


Les lymphocytes B et T



→ 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

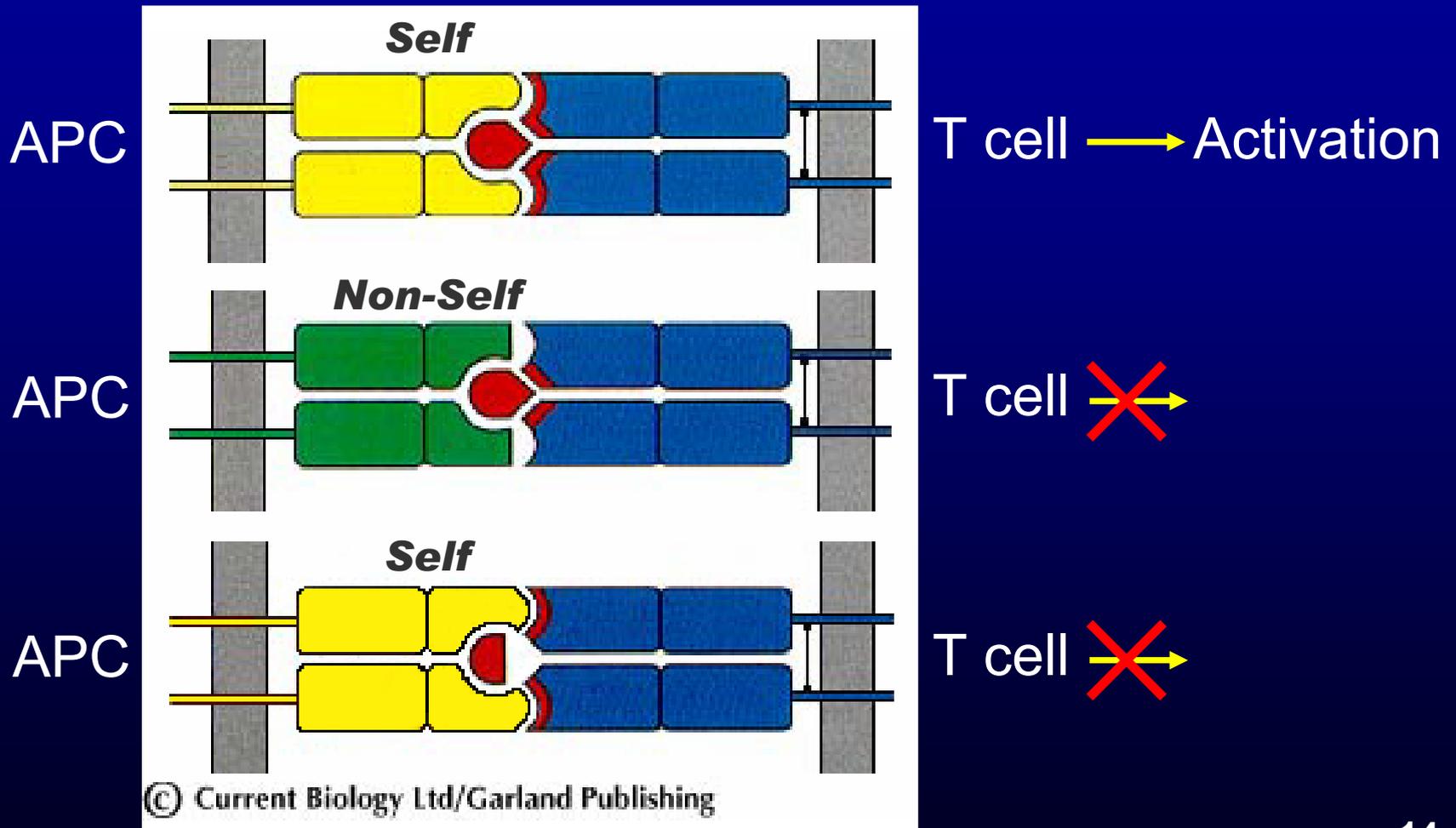
$(D/E)XXYXXLX_{(6-8)}YXXL$

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

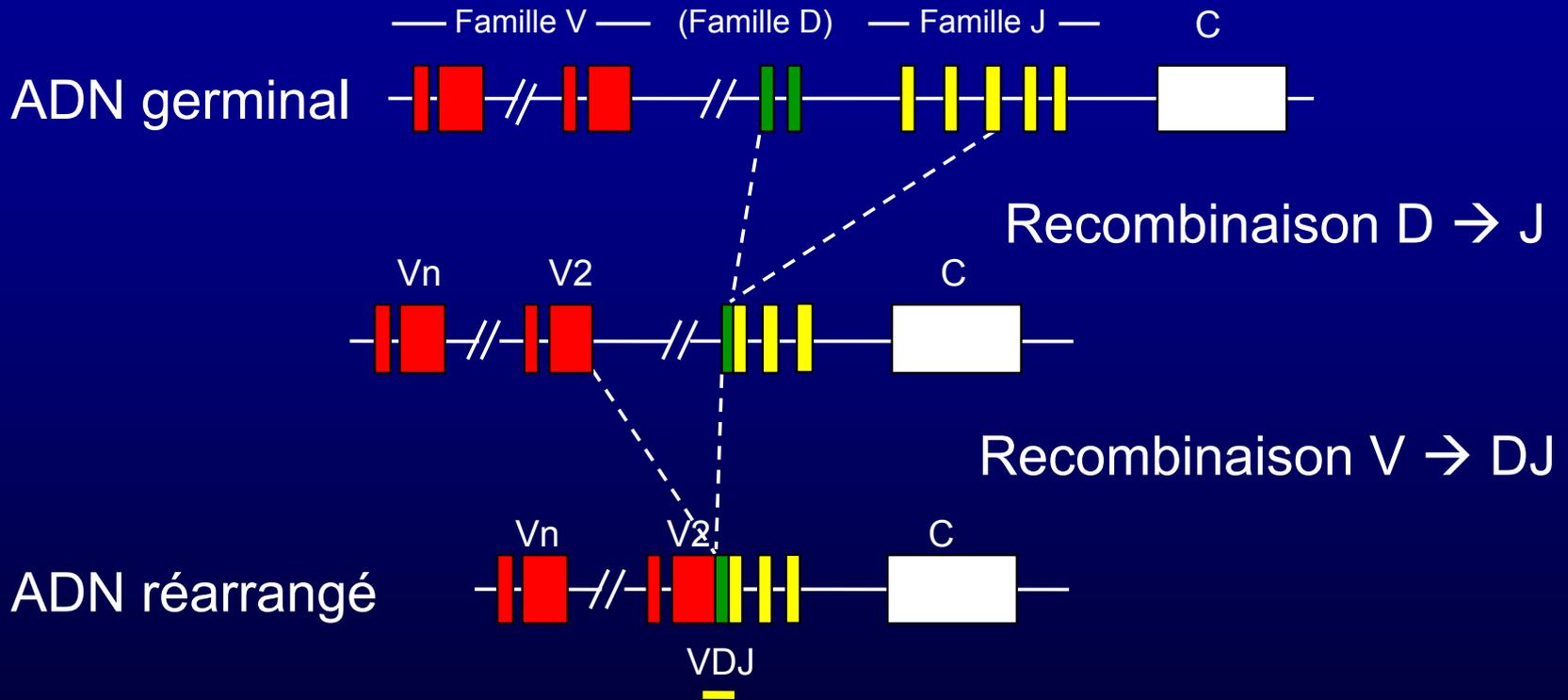
CMH TCR



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)

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

Immunologie
cellulaire

Immunochimie

Immunologie
moléculaire

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.

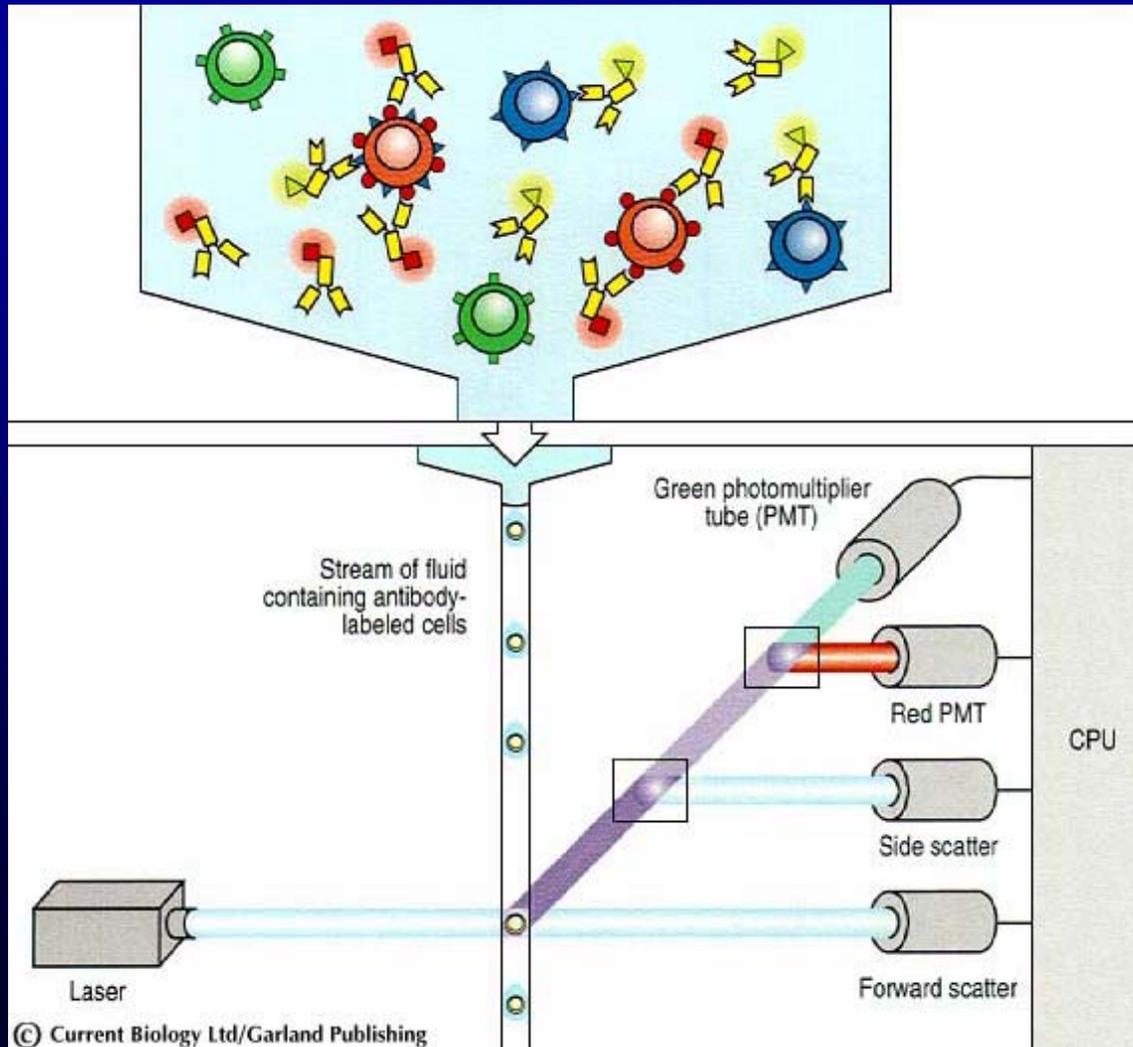
Marqueurs de différenciation T

- 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
- ...

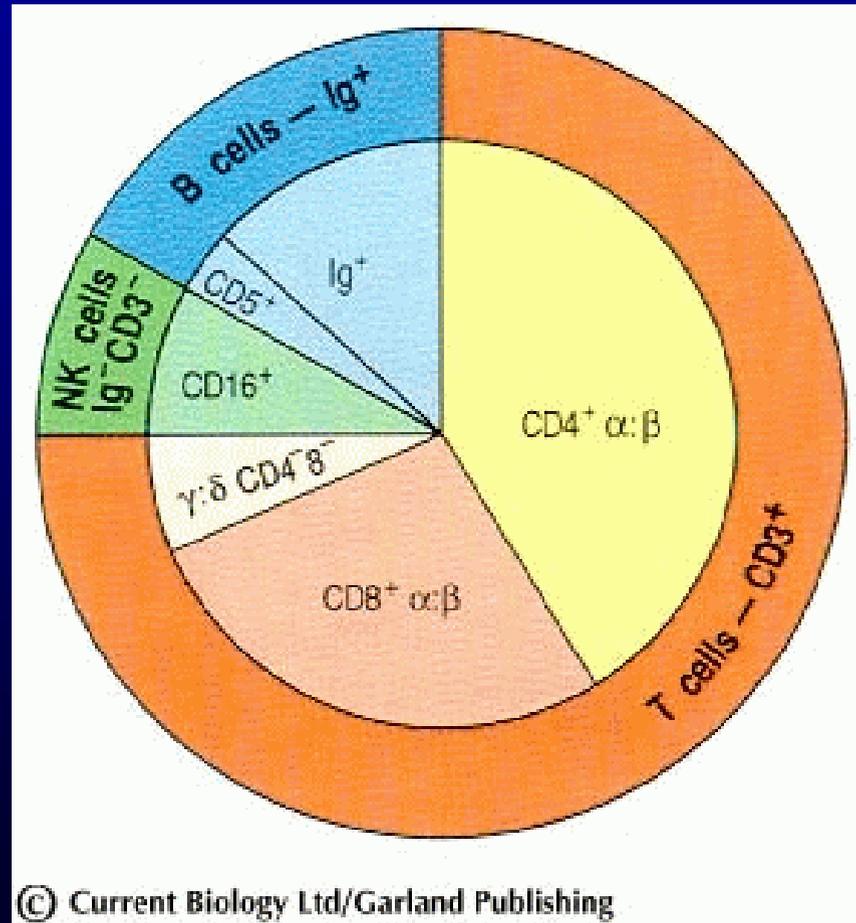
Marqueurs de différenciation B

- 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 $_{\alpha/\beta}$ molécules associées au BCR
- CD80 activation des cellules T (B7.1)
- ...

Cytométrie de flux (1)



Distribution lymphocytaire du sang périphérique humain (PBL)

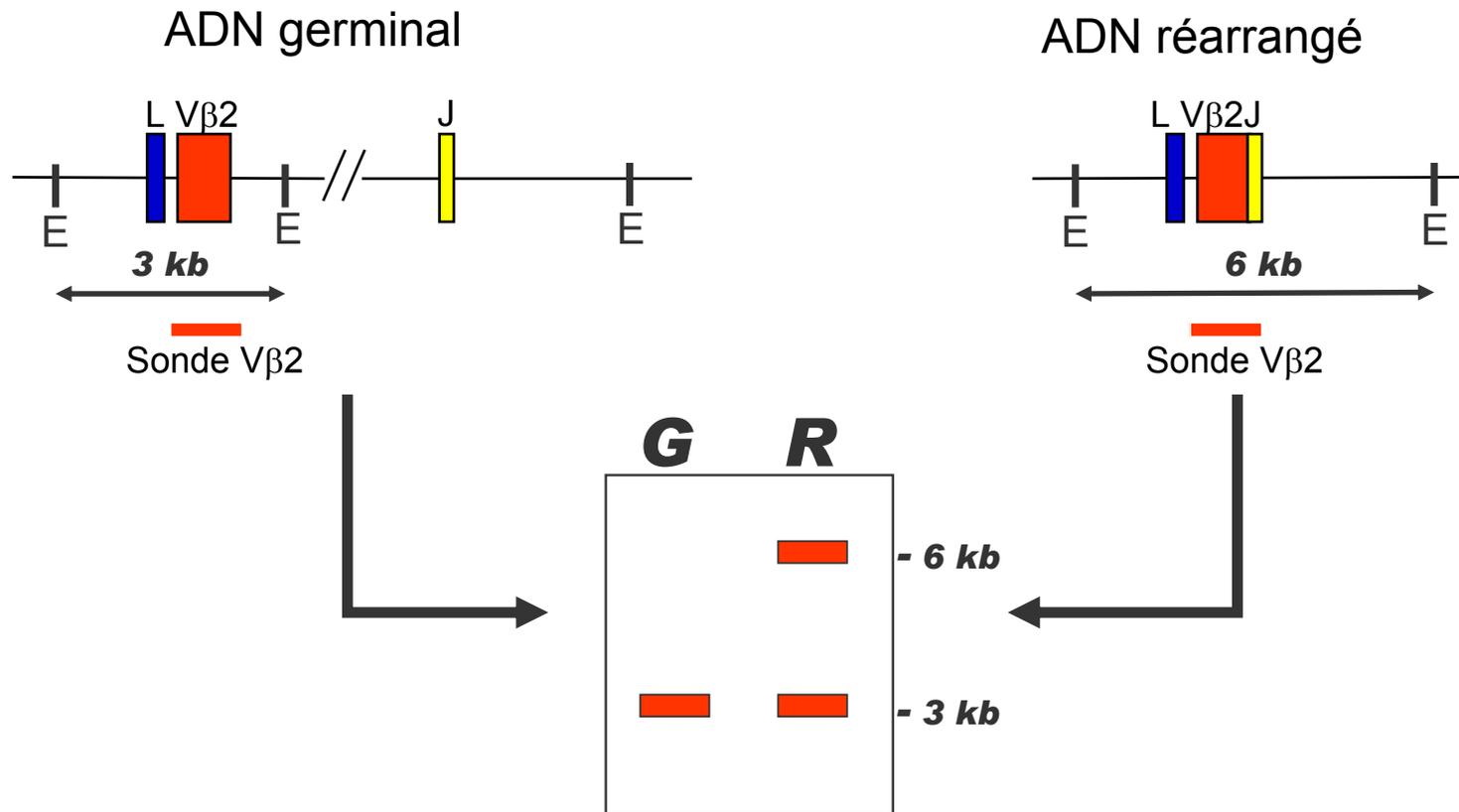


Outils de biologie moléculaire

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

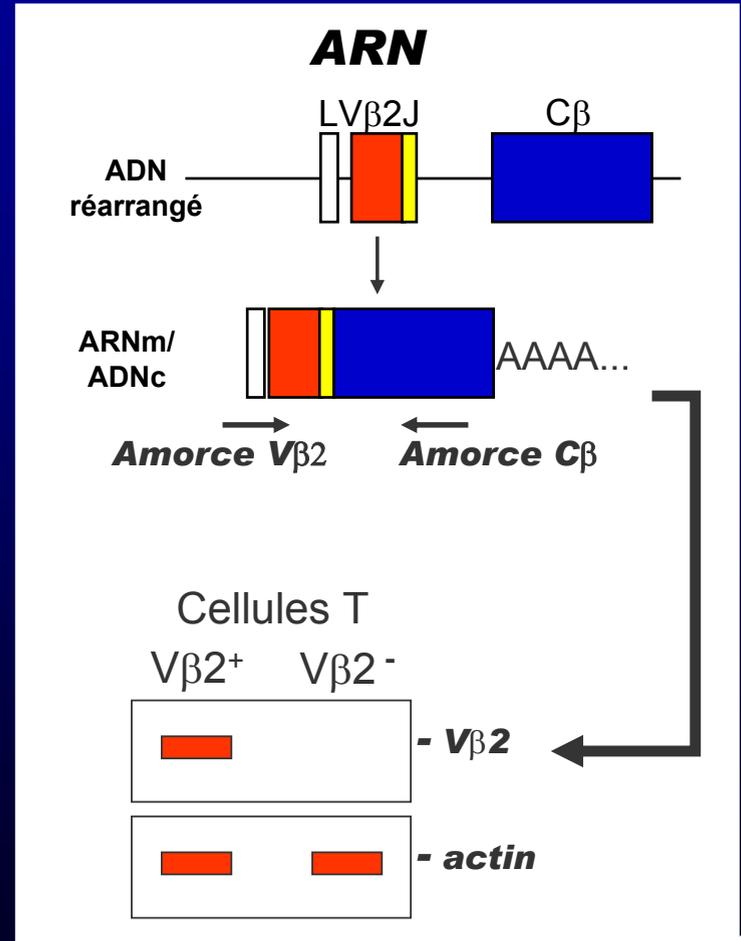
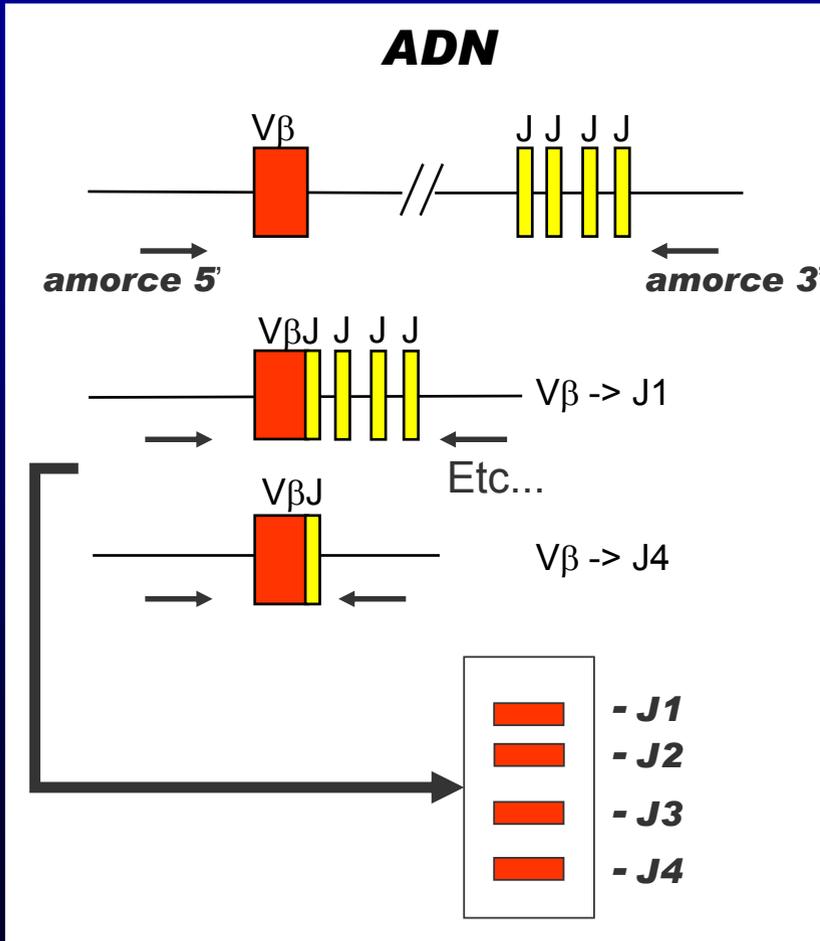
Détection des réarrangements (1)

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



Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR au niveau ADN ou ARN.



Utilisation des animaux génétiquement modifiés

- Transgénèse
- 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

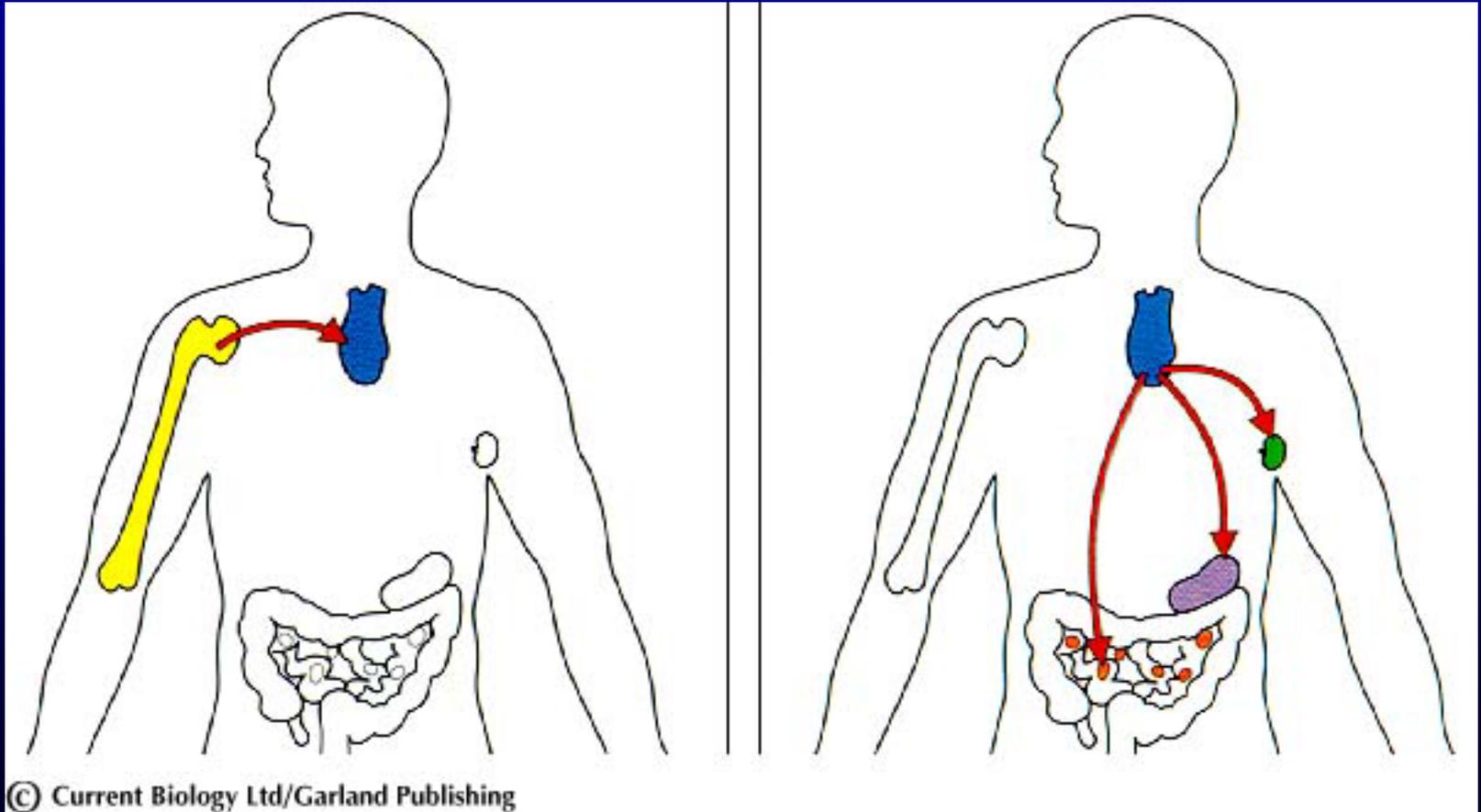
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

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

Questions

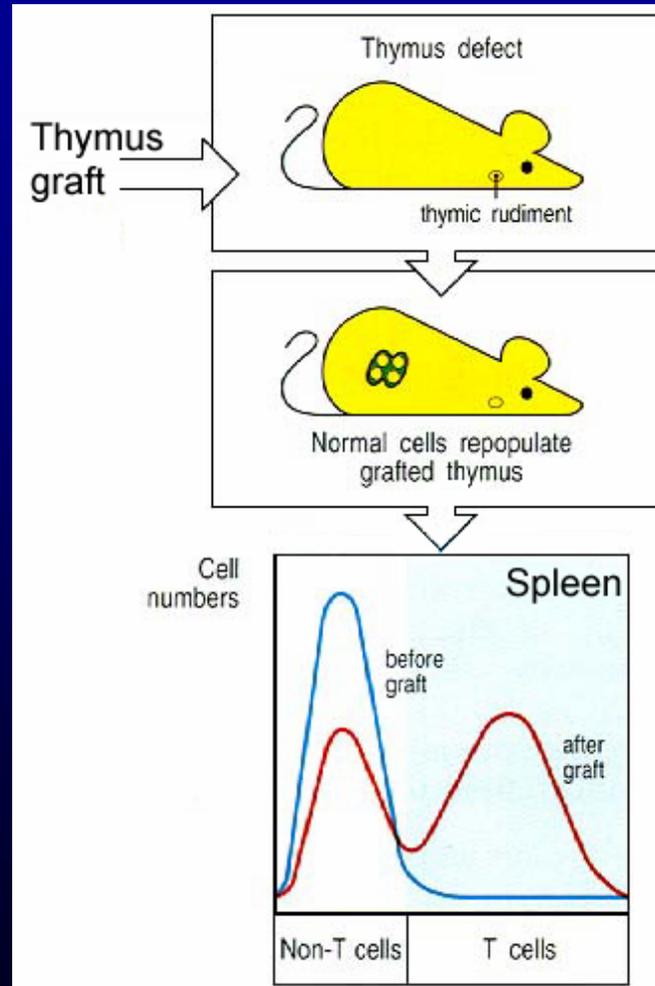
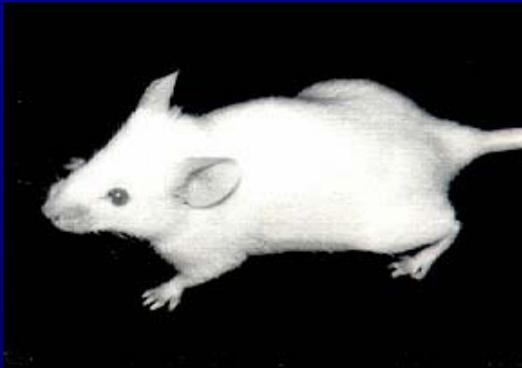
- Engagement des précurseurs communs vers les différentes lignées lymphocytaires
- Régulation de la taille des populations lymphocytaires
- Régulation de la recombinaison V(D)J
 - ◆ développement
 - ◆ spécificité tissulaire
 - ◆ spécificité de lignée
- Sélection des répertoires lymphocytaires

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus

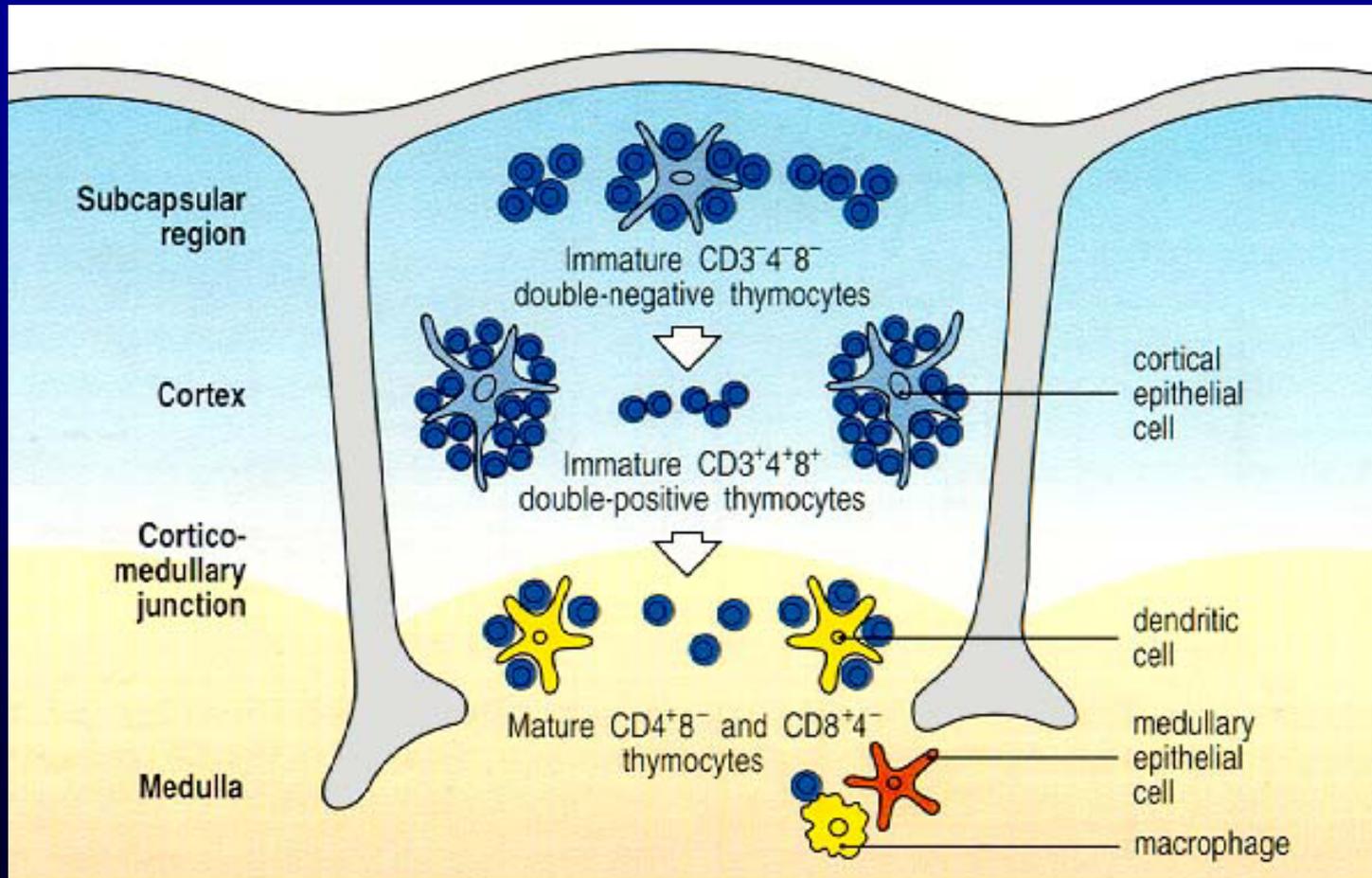


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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



Architecture cellulaire du thymus



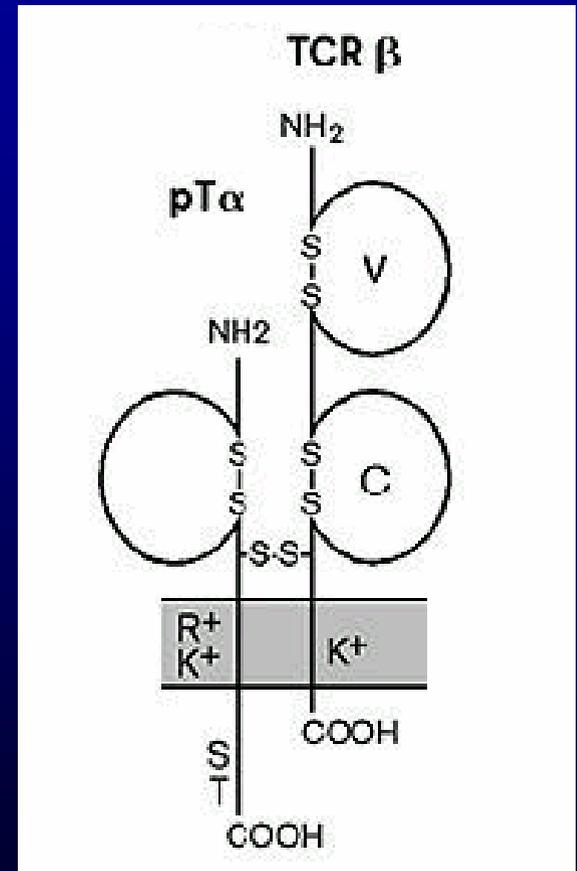
Stades de différenciation des thymocytes

- 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

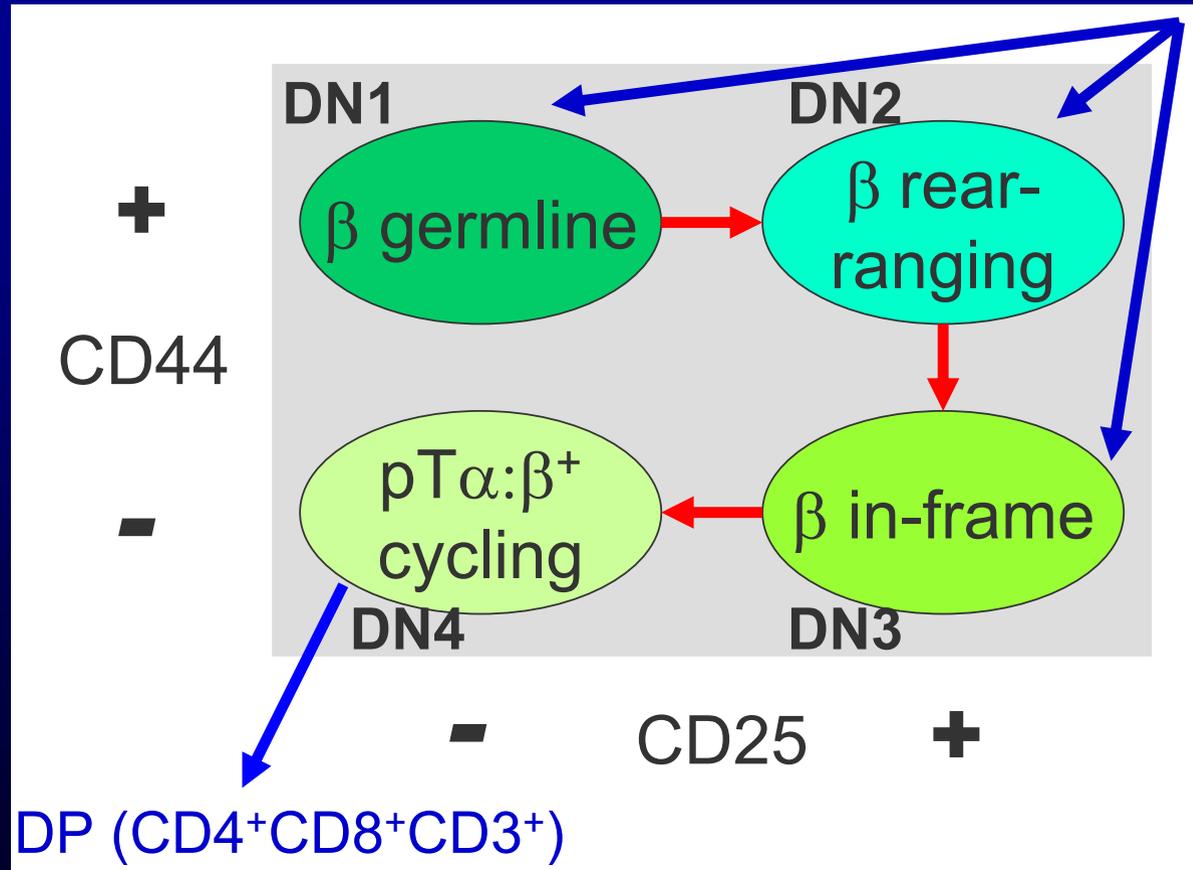


Rôle critique du pré-TCR

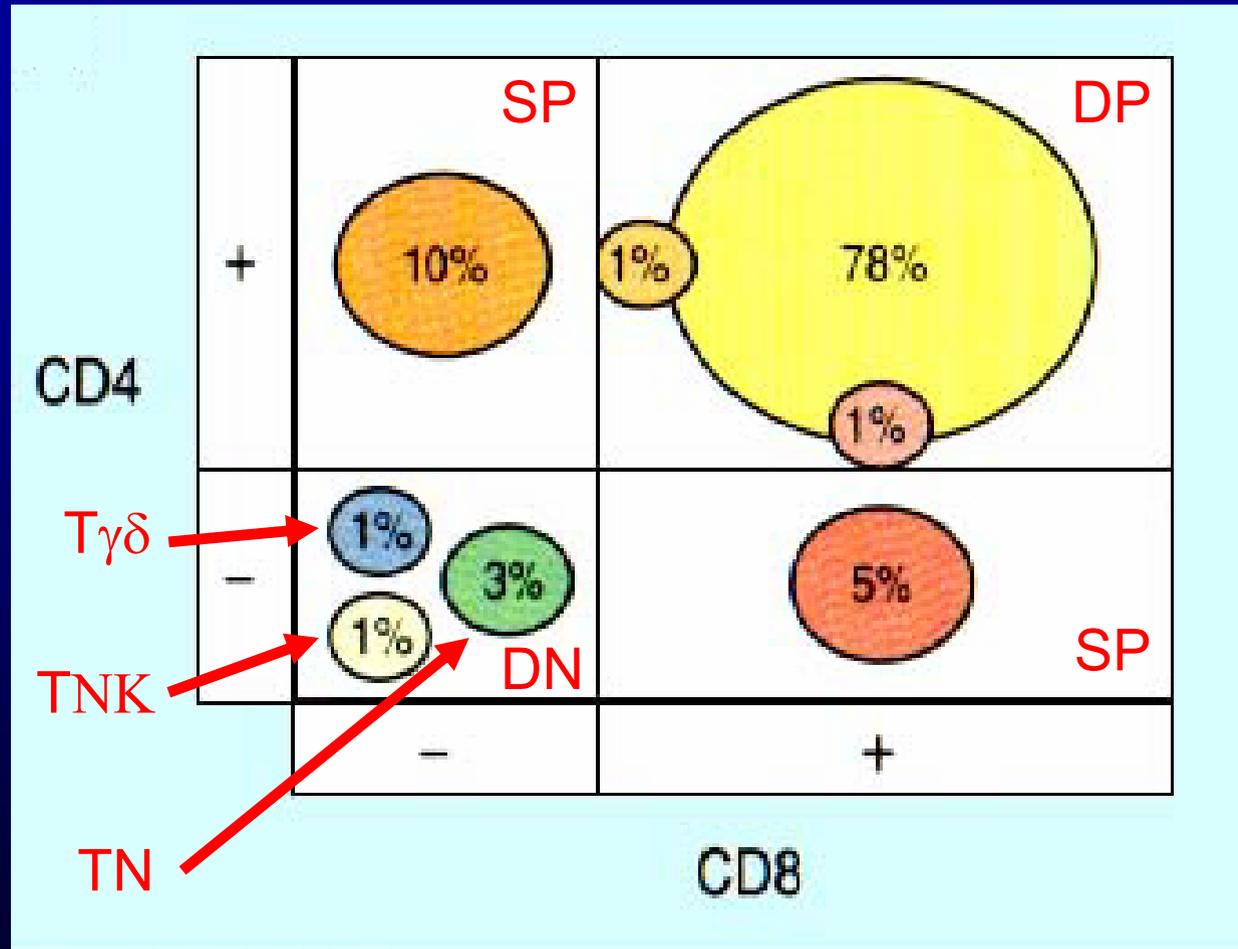
- pT α (gp33) exprimée tôt dans l'ontogénie et associée à CD3/TCR β
- L'expression du pré-TCR à la surface du thymocyte permet :
 - transition du stade double négatif CD4 $^-$ CD8 $^-$ (DN) vers le stade double positif CD4 $^+$ CD8 $^+$ (DP)
 - exclusion allélique (arrêt des réarrangements TCR β)
 - prolifération des thymocytes DP
 - induction des réarrangements TCR α

Différenciation des thymocytes (1)

TN/DN (CD4⁻CD8⁻CD3⁻)

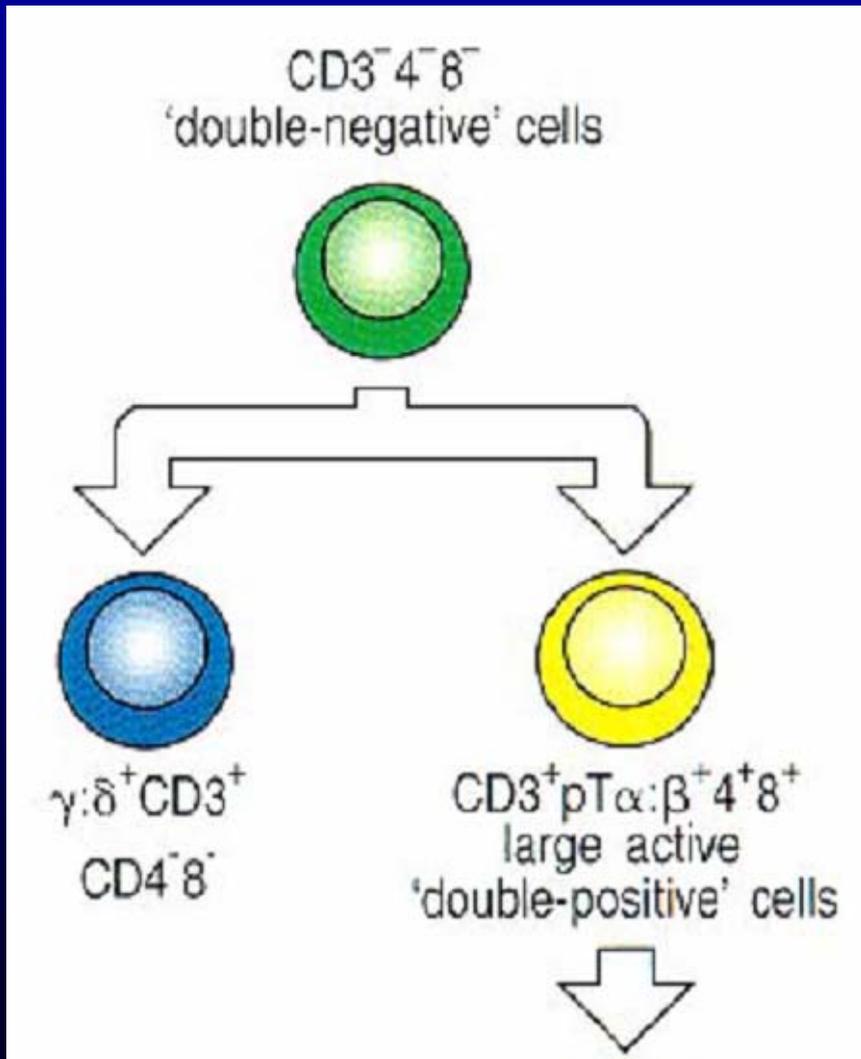


Différenciation des thymocytes (2)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

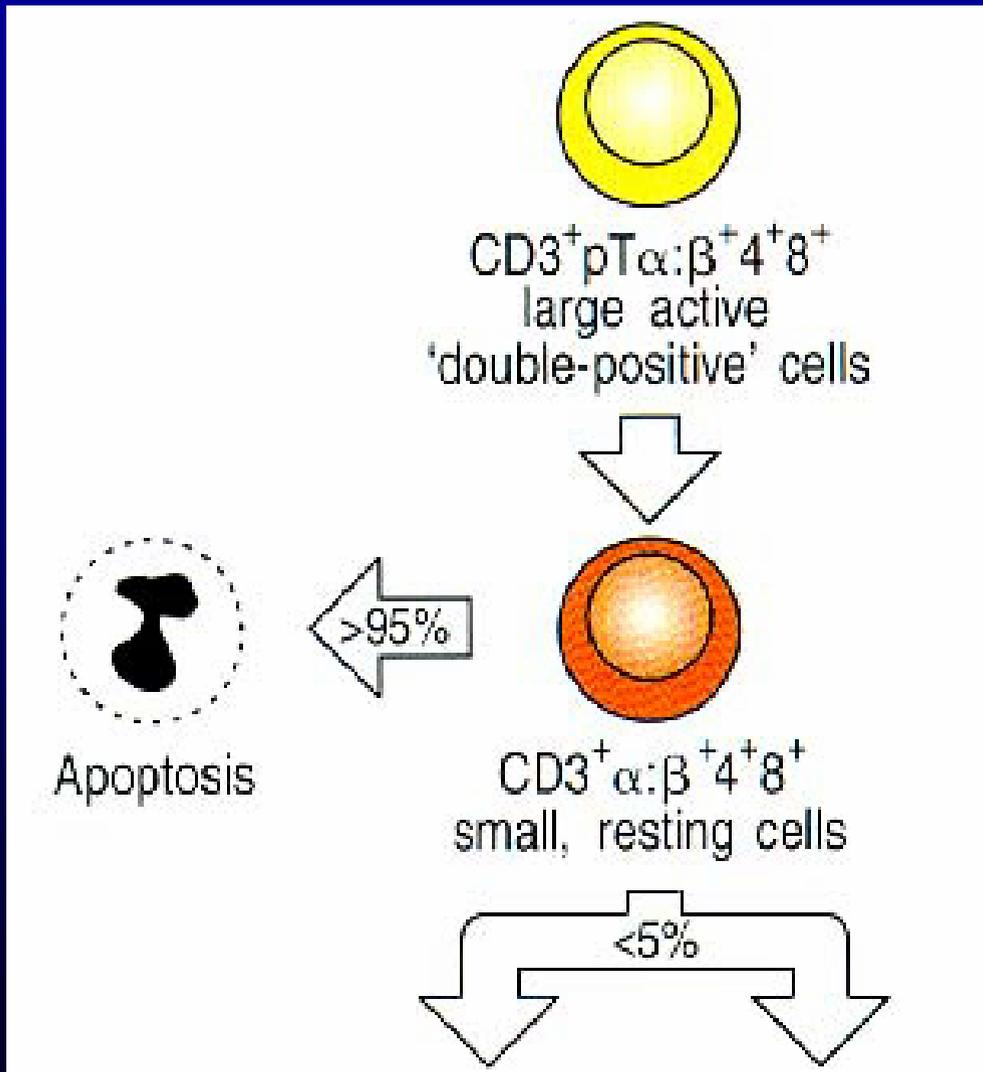
Exclusion allélique

- 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

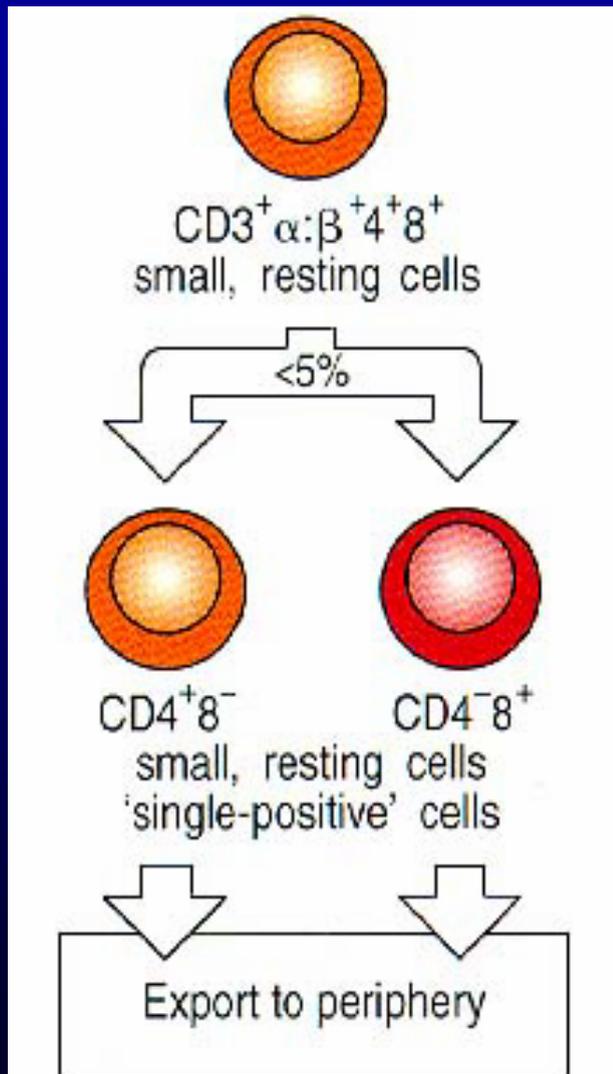
- TCR δ , TCR γ et TCR β réarrangent en même temps au stade pro-T
- Les réarrangements TCR α sont limités aux thymocytes pré-T DP engagés vers la lignée $\alpha\beta$ et exprimant TCR β
- A l'inverse de TCR β , les réarrangements TCR α ont lieu sur les deux chromosomes → l'exclusion allélique a lieu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

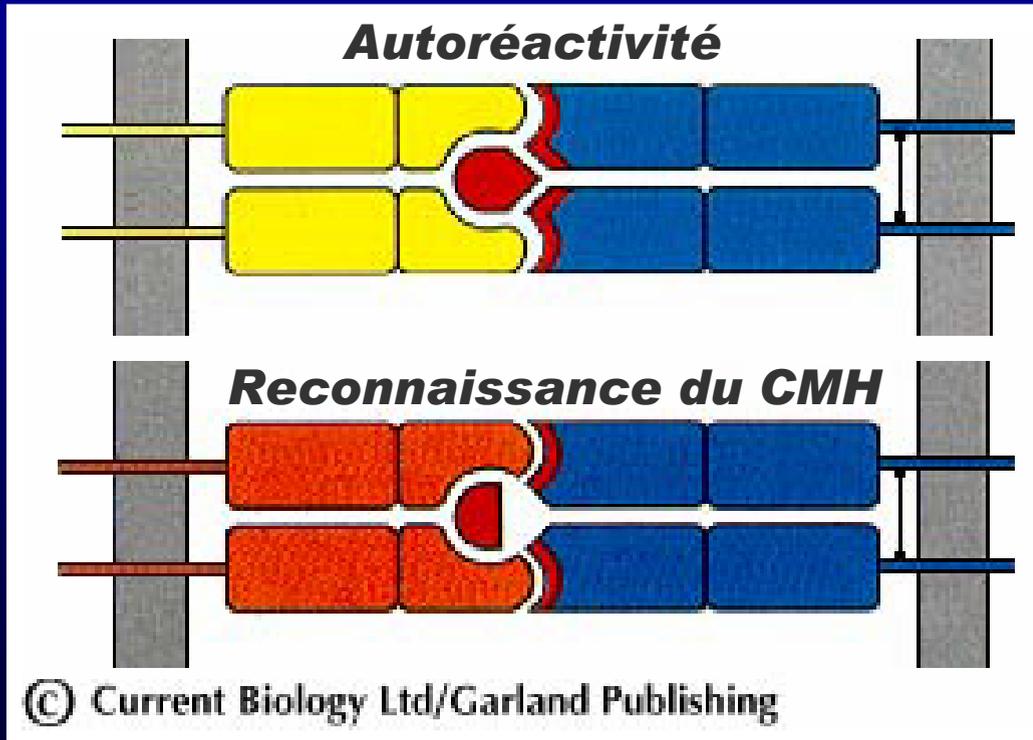
Engagement CD4/CD8
Restriction pour le CMH
Fonction effectrice

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

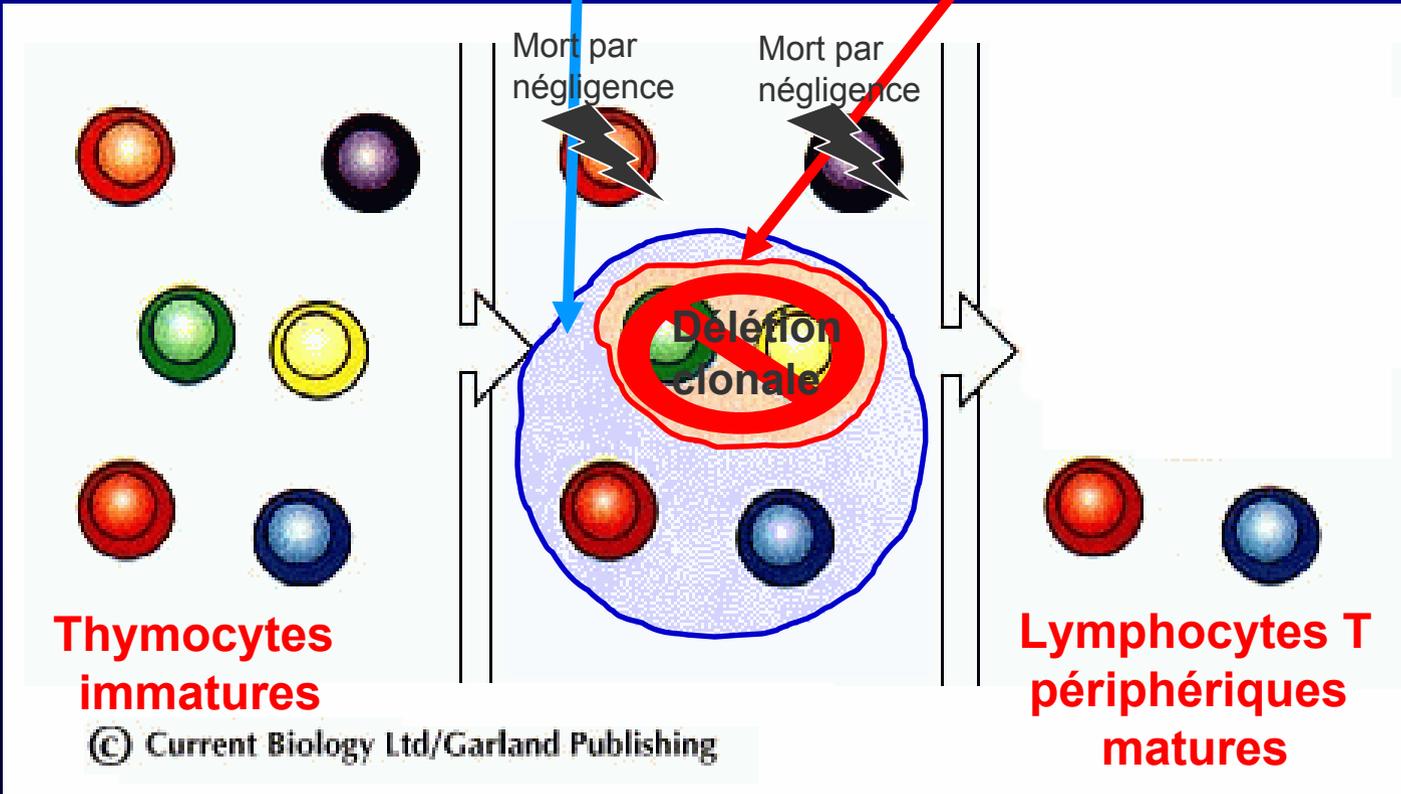


→ **Sélection négative**

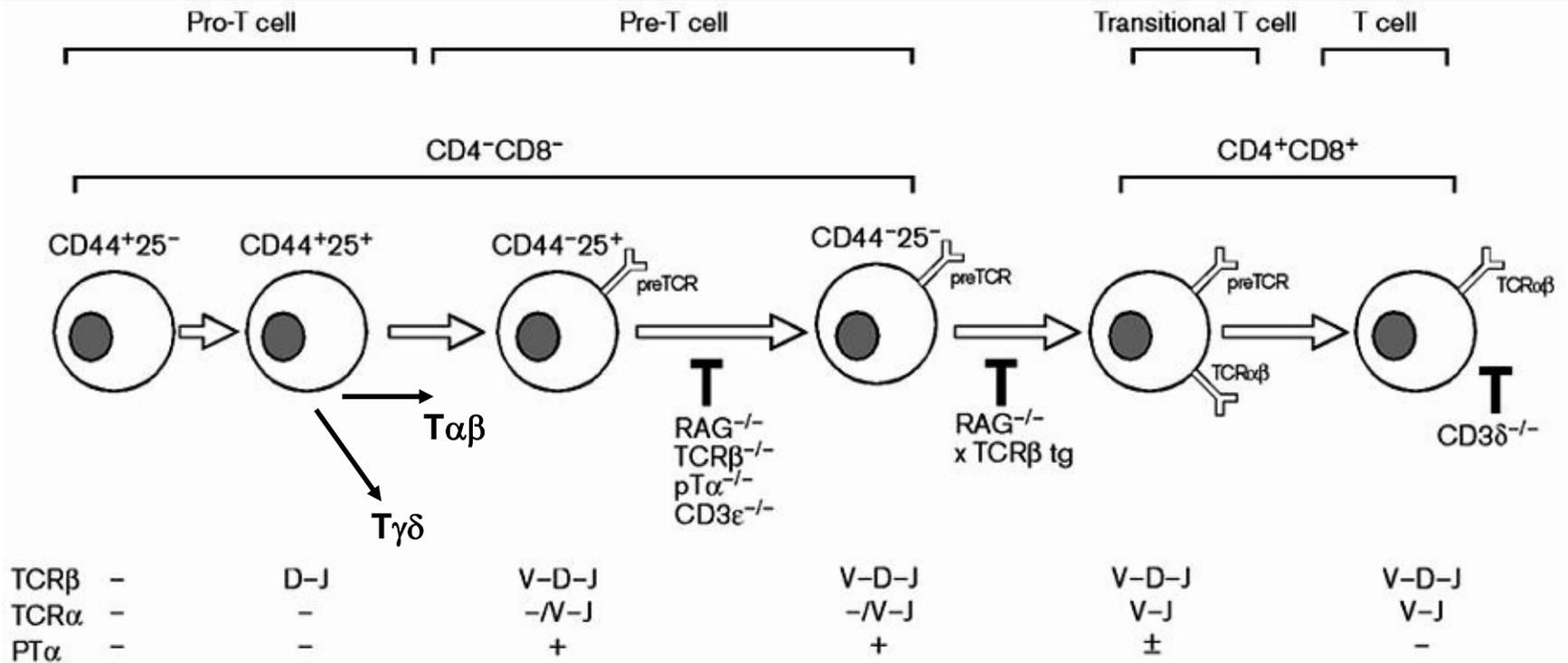
→ **Sélection positive**

→ **Éducation thymique**

Sélections positive et négative (3)

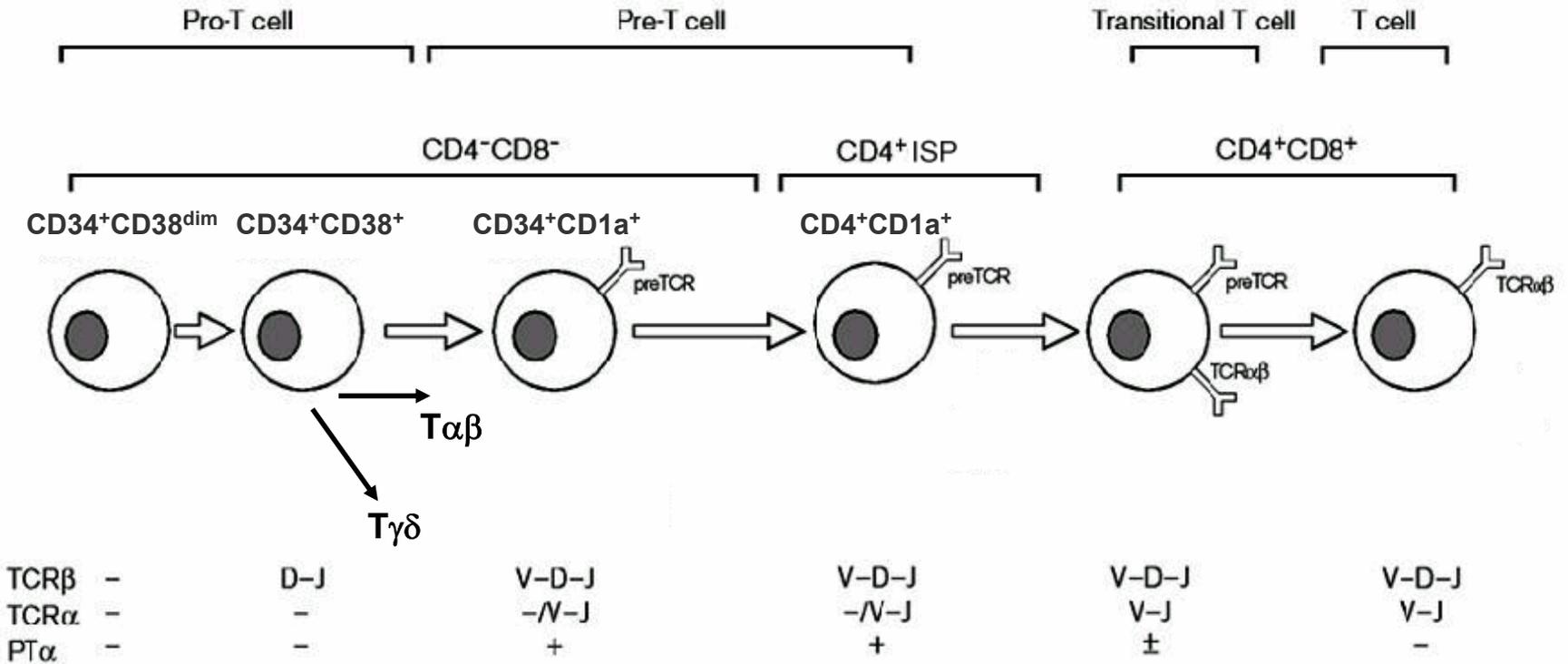


Différenciation thymique: souris



© 1996 Current Opinion in Immunology

Différenciation thymique: homme

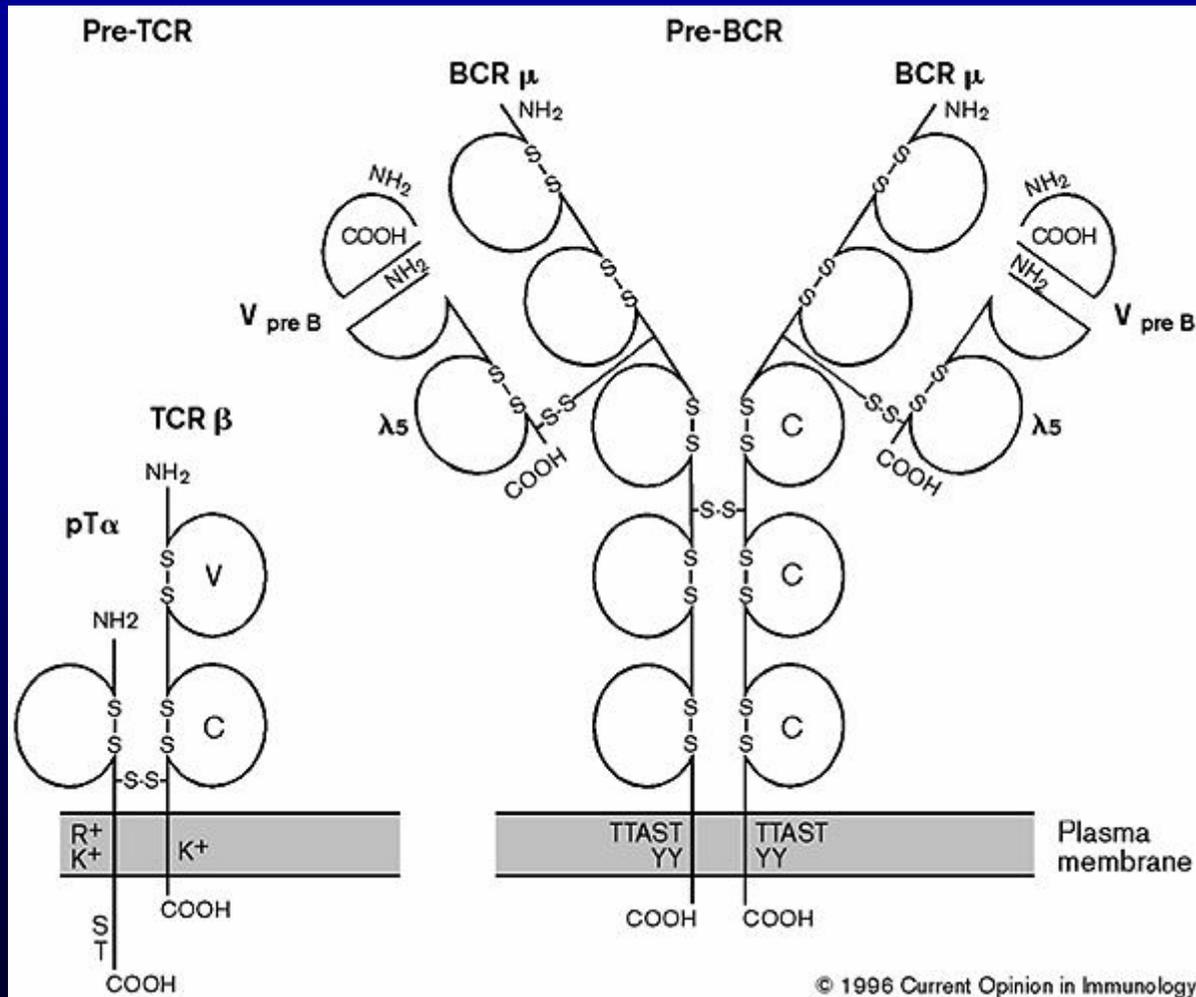


© 1996 Current Opinion in Immunology

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

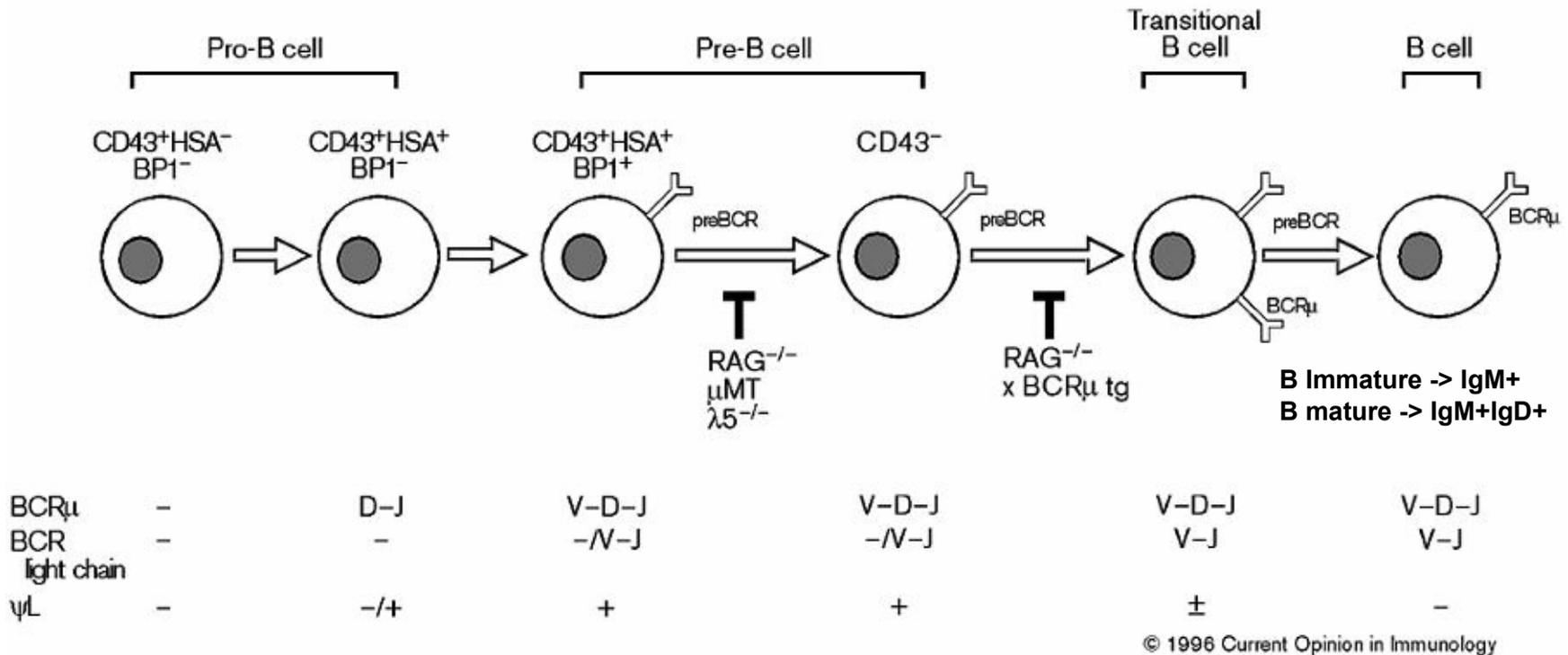
Caractérisation du pré-BCR



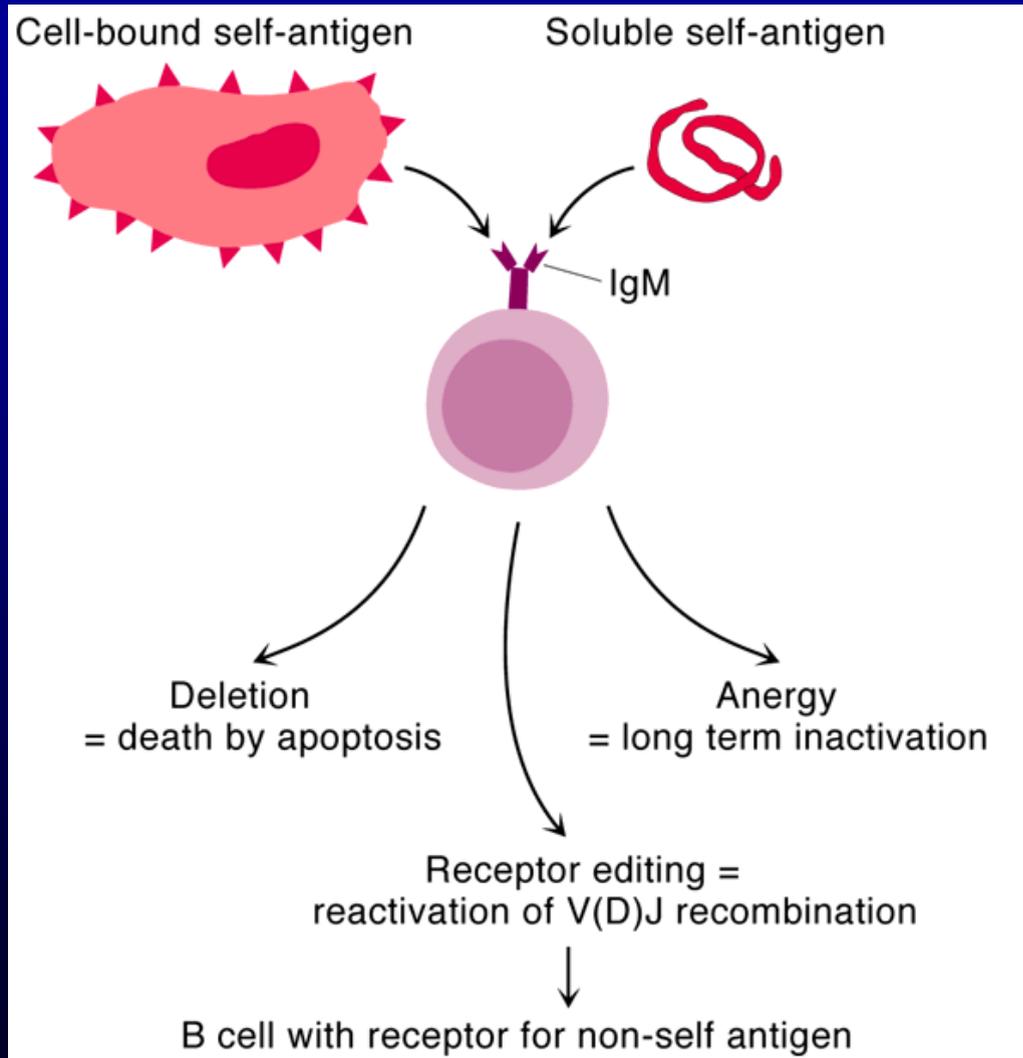
Rôle du pré-BCR

- *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



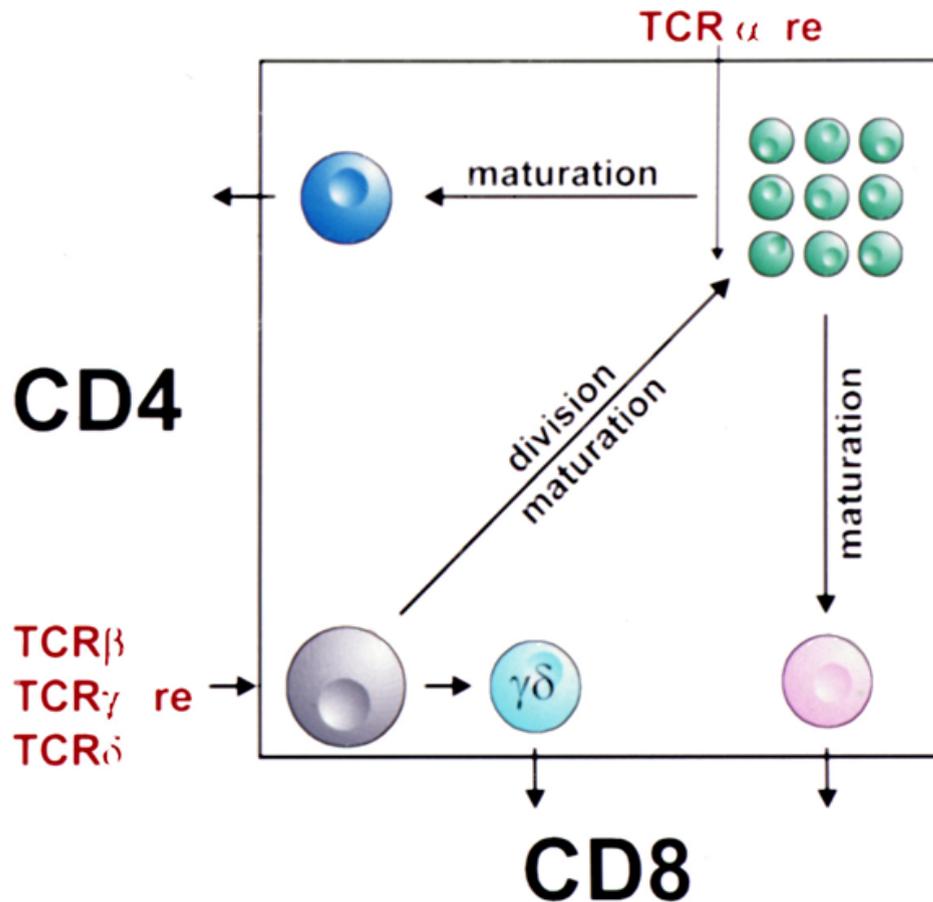
Sélection des lymphocytes B



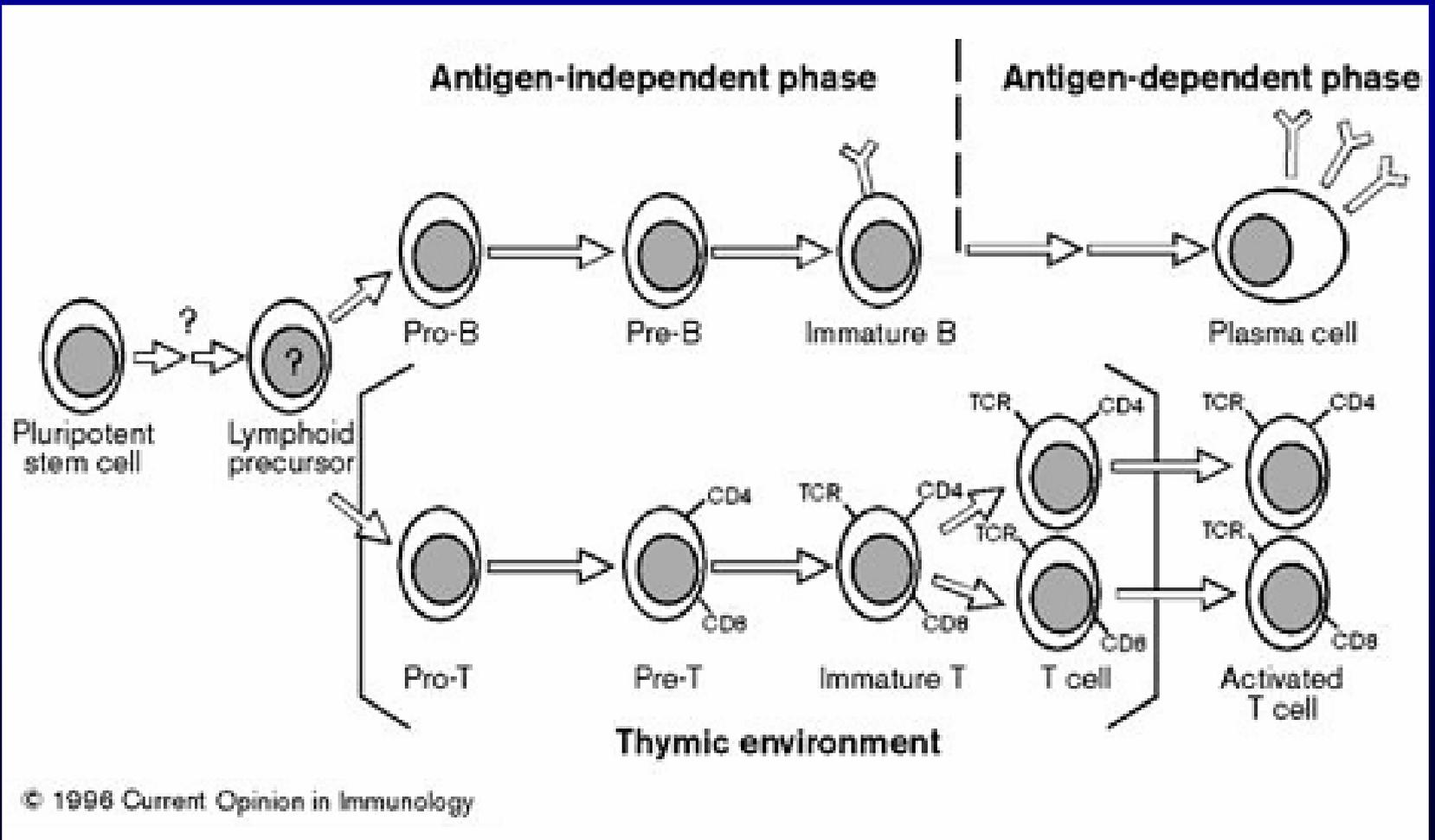
Différenciation des répertoires de lymphocytes B et T

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

Rappel différenciation T

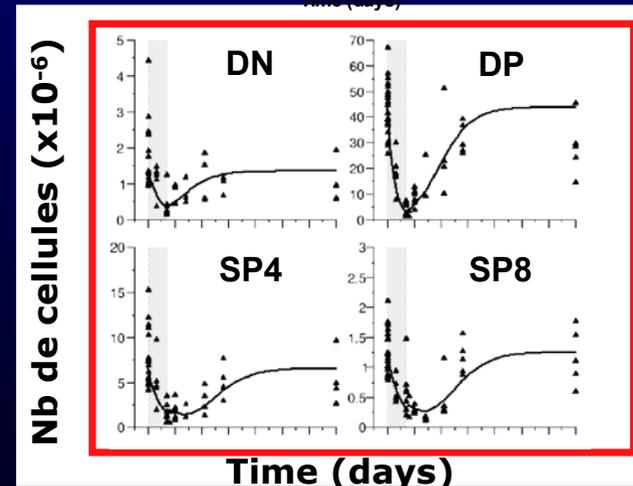
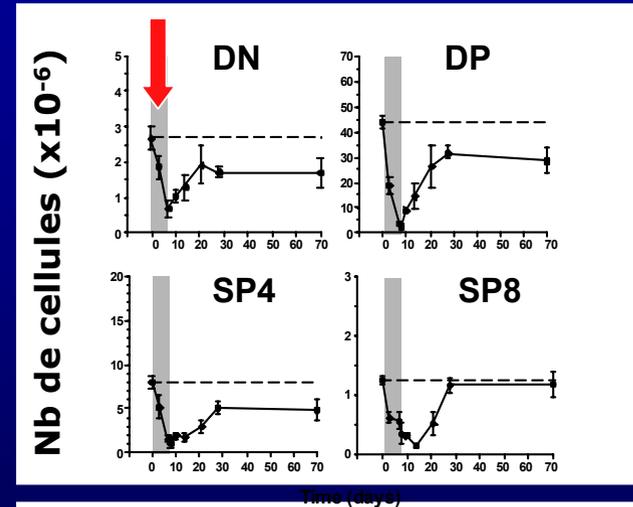
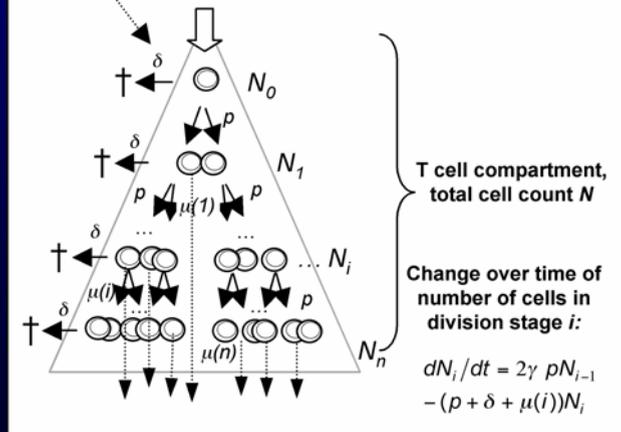
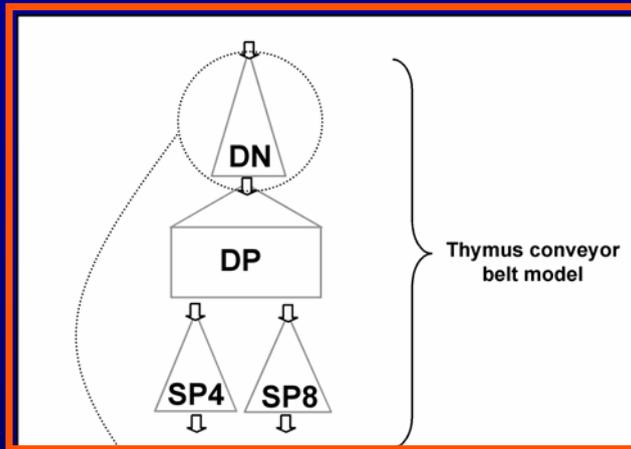


Parallèle différenciations B et T

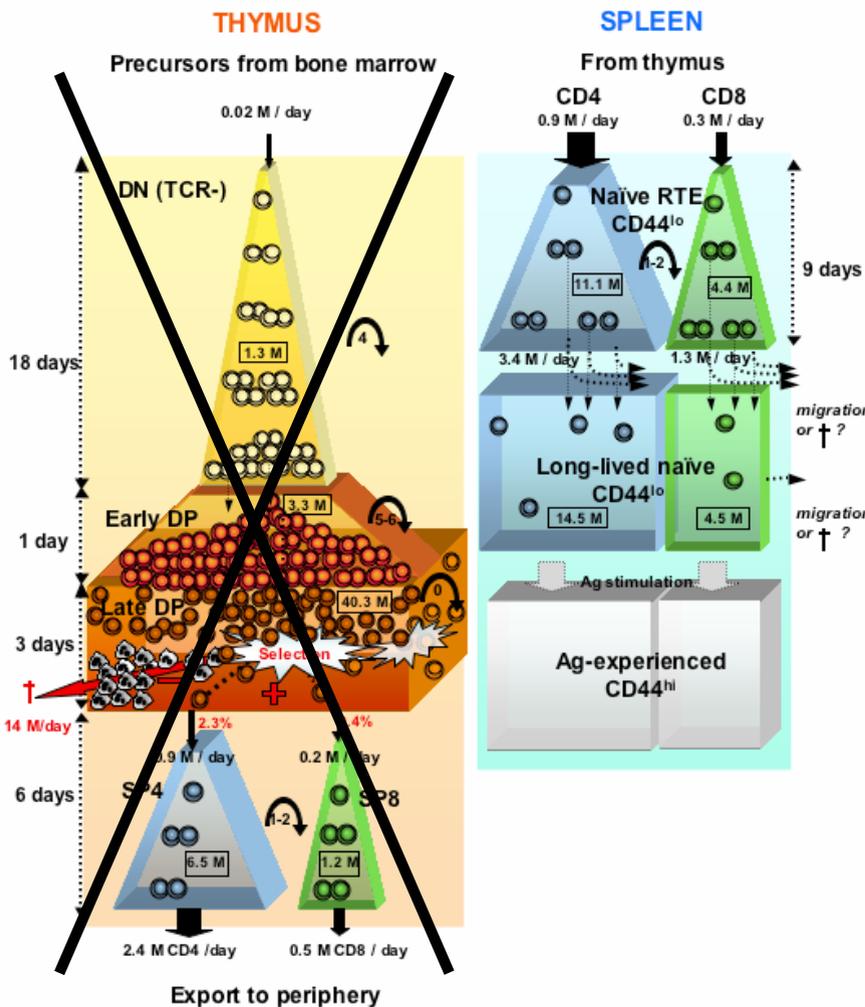


Modélisation de la différenciation T

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



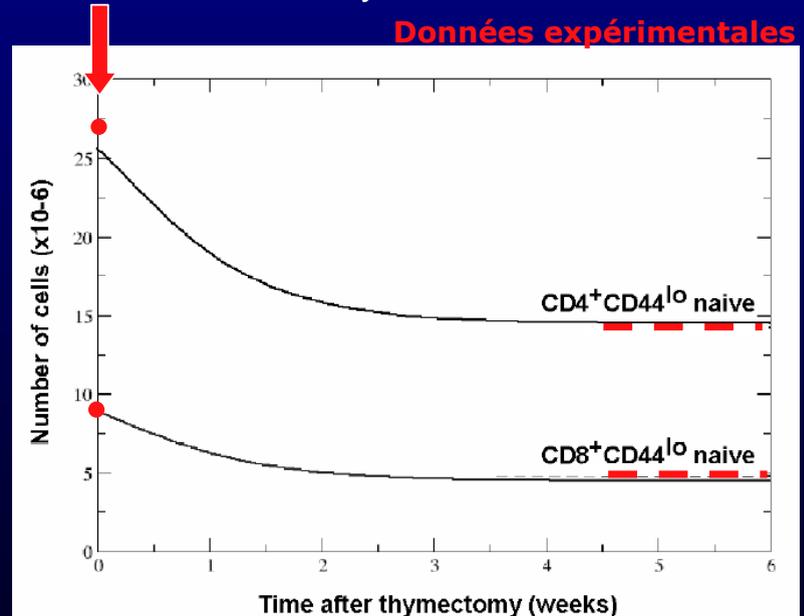
Modélisation de la différenciation T



➤ 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

