

# **Analyse de l'implication du gène *scotin* dans le développement thymique**

Par

Jean-François Tessier

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2008

III-1872



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
*ISBN: 978-0-494-43024-8*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 978-0-494-43024-8*

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

Le 11 janvier 2008

*le jury a accepté le mémoire de M. Jean-François Tessier dans sa version finale.*

*Membres du jury*

M. Viktor Steimle  
Directeur  
Département de biologie

M. Abdelaziz Amrani  
Codirecteur  
Département de pédiatrie - Université de Sherbrooke

M. Gilles Dupuis  
Membre  
Département de biochimie - Université de Sherbrooke

M. Benoît Leblanc  
Président-rapporteur  
Département de biologie

## SOMMAIRE

Les lymphocytes T sont essentiels aux fonctions du système immunitaire. Deux classes effectrices distinctes, les cellules T CD4 auxiliaires et les cellules T CD8 cytotoxiques, se développent dans le thymus. Les mécanismes de maturation des lymphocytes T dans cet organe se déroulent de façon très ordonnée et sont strictement régulés pour assurer l'homéostasie du système immunitaire. Dans le but de découvrir de nouvelles molécules impliquées dans ces processus de maturation, le groupe du Dr Steimle a effectué une étude transcriptomique sur des thymocytes de souris C57/BL6 en développement soit du stade DP immature au stade SP mature. Avec une approche de micropuces à ADN, plusieurs gènes ont été identifiés comme étant fortement modulés au cours des différentes étapes de maturation. Nous nous sommes intéressés à un transcrite nommé *scotin* qui est fortement modulé dans les cellules post-DP et qui a été associé à la sélection négative via nos analyses. L'expression de cette protéine dans le thymus est observée surtout chez les cellules semi-matures de type R3/R4 de la médulla. Le gène *scotin* possède 3 promoteurs internes qui permettent l'expression de 2 isoformes dans le thymus. Ceux-ci ont des fonctions différentes dans l'apoptose chez les cellules HeLa et leur localisation sub-cellulaire l'est aussi. L'expression de *scotin1* et de *scotin4* augmente avec la maturation des thymocytes, mais c'est *scotin4* qu'on retrouve en majorité à toutes les étapes du développement. Des DP qu'on induit chimiquement avec un signal mimant celui fourni par le TCR lors de la sélection négative ne montrent pas d'augmentation de la synthèse de *scotin*. Cependant, des lignées de thymomes ayant des réponses pro- et anti-apoptotiques face à ce même stimulus montrent une expression préférentielle de *scotin1* et *scotin4* respectivement. Si on inhibe la production des transcrits communs de *scotin* via shRNA chez ces lignées de thymomes, on inverse leur réponse face à la stimulation au PMA/Ionomycin et le ratio *scotin1/scotin4* est aussi inversé comparativement aux cellules mères. Ce dernier serait important pour le contrôle de la réponse apoptotique des thymomes. Nous croyons que les deux isoformes de *scotin* sont impliquées dans le développement thymique et ce, de façon indépendante l'une de l'autre.

## REMERCIEMENTS

Beaucoup de personnes m'ont aidé et soutenu tout au cours de mon passage dans le département de biologie de l'Université de Sherbrooke. Tout d'abord, un gros merci à mon superviseur Viktor Steimle qui m'a accueilli à bras ouvert et m'a très bien dirigé tant aux niveaux de l'apprentissage technique que théorique. Le temps qu'il m'a consacré, son dévouement pour la science et son humanité seront à jamais gravés dans ma mémoire!

Mes collègues de travail ont de même été un oasis de paix face aux problèmes quotidiens. Ils ont fourni une ambiance agréable et saine au déroulement de mes études. Merci Aline, Gabrielle, Maria, Rachel et Yves pour votre présence quotidienne. Un petit mot gentil pour Marianne et Valérie qui ont été des stagiaires sublimes....

Merci à Aziz Amrani, mon codirecteur de recherche, pour son aide technique de même que pour tous les services rendus au niveau de l'hébergement de nos souris *scotinE2*. Nos interactions ont toujours été d'un grand intérêt et des plus utiles pour moi.

Je ne peux passer sous le silence la collaboration avec le Dr Jean-Christophe Bourdon qui a toujours été généreux de son temps avec moi, même si nous étions séparés par quelques milliers de kilomètres. Nos discussions ont grandement contribué à faire avancer mon projet.

Aux Dr Benoît Leblanc et Dr Gilles Dupuis, je vous souhaite le plus grand des succès dans vos projets futurs et merci de m'avoir si bien écouté et d'avoir été mes conseillers au cours de ma maîtrise. Et un gros merci à tous les membres du personnel du département de biologie, j'ai rarement travaillé dans une ambiance aussi plaisante, entouré de personnes si dévouées et humaines! Je voudrais remercier particulièrement Manon Dufrene, Caroline Bergeron et Gilles Grondin qui m'ont grandement aidé au niveau de la culture cellulaire, de la manipulation des souris et de la microscopie respectivement.

Je ne peux pas oublier ma famille qui m'a si bien soutenu au long de mon cheminement et tous mes amis qui sont si importants à mes yeux! Merci aux membres de la communauté d'Ultimate de Sherbrooke qui m'ont bien diverti et à mes divers colocs qui m'ont enduré, surtout celui à qui l'on doit la réalisation des clips du matin.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>I</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>V</b>
<b>TABLES DES TABLEAUX.....</b>	<b>VI</b>
<b>TABLES DES FIGURES .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le système immunitaire .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Reconnaissance des antigènes par les cellules T.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Structure et biosynthèse du TCR .....	4
1.2.2 Le CMH et la présentation antigénique.....	5
<b>1.3 Les stades de différenciation des cellules T et les marqueurs membranaires lymphocytaires.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Développement thymique précoce .....	8
1.3.2 Développement thymique tardif .....	8
<b>1.4 Migration des précurseurs thymiques et développement des thymocytes .....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Morphologie et fonction du thymus .....	9
1.4.2 Étapes de migration des thymocytes et rôles des chimiokines dans ce processus.....	10
1.4.3 Visualisation en trois dimensions (3D) de la migration thymique .....	11
<b>1.5 Les mécanismes de sélection thymique .....</b>	<b>12</b>
1.5.1 Rôles des TEC corticaux et médullaires dans le développement thymique.....	13
1.5.2 Transmission différentielle des signaux de sélection positive et négative via le TCR .....	14
1.5.3 Mécanisme de sélection positive .....	17
1.5.5 Mécanismes de sélection négative (délétion clonale) .....	19
1.5.5.1 bim.....	20
1.5.5.2 nur77 .....	21
1.5.5 Mécanismes du choix de lignée (lineage decision) .....	22
<b>1.6 Identification de gènes candidats importants dans les mécanismes de différenciation tardifs des thymocytes .....</b>	<b>24</b>
1.6.1 scotin .....	27
1.6.2 Autres études analysant les sélections thymiques à l'aide de micropuces à ADN .....	28
<b>1.7 But du projet .....</b>	<b>29</b>
<b>2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Matériels .....</b>	<b>30</b>
2.1.1 Lignées cellulaires utilisées .....	30
2.1.2 Souris .....	31
2.1.3 Anticorps .....	32
<b>2.2 Génotypage des souris <i>scotinE2</i> Knock out .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3 Tris cellulaires de thymocytes murins .....</b>	<b>35</b>
2.3.1 Tri cellulaire des sous-populations thymiques murines R1/R2, R3 et R4 .....	35
2.3.2 Tri cellulaire des sous-populations thymiques murines R1/R2 et R3/R4 .....	38
2.3.3 Tri cellulaire des thymocytes murins DP .....	40

2.4 Révélation de la Scotin sur des coupes de thymus de souris C57/BL6 enrobées dans la paraffine .....	41
2.5 Coloration intracellulaire de la Scotin chez les sous-populations thymiques R1/R2 et R3/R4 de souris C57/BL6 triées .....	42
2.6 Mesure de l'apoptose chez les différentes cellules et lignées cellulaires.....	43
2.7 Induction de l'apoptose chez les thymocytes double positif de souris C57/BL6 .....	43
2.8 Transfection des cellules HeLa avec les isoformes de <i>scotin</i> pour la mesure de l'apoptose.....	44
2.9 Immunofluorescence sur les cellules HeLa transfectées avec les isoformes de <i>scotin</i> ...	45
2.10 Génération de vecteurs rétroviraux shRNA contre diverses formes de <i>scotin</i> et création de lignées cellulaires stables pour leur expression .....	46
2.11 Western blot de Scotin à partir de cellules HeLa transfectées .....	48
2.12 Induction des lignées de thymomes RML11 et Bw5147 avec le PMA et l'Ionomycin	50
2.13 Extraction d'ARN, production d'ADNc et PCR quantitatif .....	50
<b>3 RÉSULTATS .....</b>	<b>52</b>
3.1 Expression protéique de Scotin dans le thymus et les thymocytes murins C57/BL6	52
3.2 Analyse générale de la souris <i>scotinE2</i> -/- .....	55
3.3 Isolement des sous-populations thymiques de souris C57/BL6 et analyses transcriptomiques .....	60
3.4 Analyse moléculaire de la souris <i>scotinE2</i> -/- .....	66
3.5 Essai d'induction de l'apoptose chez les thymocytes DP de souris C57/BL6 .....	67
3.6 Étude des fonctions et de la localisation cellulaire des isoformes <i>scotin</i> dans les cellules HeLa .....	71
3.7 Analyse de l'apoptose induite par un signal TCR fort chez des lignées cellulaires de thymomes .....	73
3.8 Génération de vecteurs shRNA ciblant Scotin .....	75
3.9 Analyse de l'apoptose chez les lignées stables de thymomes exprimant les shScotin ...	76
<b>4 DISCUSSION .....</b>	<b>80</b>
4.1 L'importance de <i>scotin</i> dans la différenciation thymique .....	80
4.2 Production de Scotin chez les thymocytes de souris C57/BL6 .....	82
4.3 Fonctions antagonistes de différentes protéines dans les mécanismes d'apoptose .....	82
4.4 Localisation sub-cellulaire des isoformes de <i>scotin</i> .....	85
4.5 Importance des isoformes <i>scotin</i> lors de la mort cellulaire induite des thymocytes immatures .....	86
4.6 Expressions et rôles des isoformes <i>scotin</i> lors de l'apoptose induite chez des lignées thymiques immortelles .....	90
4.7 Perspectives .....	95
4.8 Conclusion .....	97
<b>5 BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>98</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	:	ADN complémentaire
APC	:	<i>Antigen Presentating Cells</i> (Cellules présentatrices d'antigènes)
CCS	:	<i>Cosmis Calf Serum</i>
CMH	:	Complexe majeur d'histocompatibilité
DN	:	Double négatif
DP	:	Double positif
FACS	:	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
L-Glu	:	L-Glutamate
qPCR	:	PCR quantitatif
pCMH	:	Complexe peptide-CMH
PCR	:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pen	:	Pénicilline
PFA	:	Paraformaldéhyde
PKC	:	Protéine Kinase C
PMA	:	Phorbol myristate acétate
Oligos	:	Oligonucléotides
shRNA	:	ARN formant des épingles à cheveux
SP	:	Simple positif
Strep	:	Streptomycin
TCR	:	<i>T Cell Receptor</i> (Récepteur des cellules T)
TEC	:	<i>Thymic Epithelial Cells</i> (Cellules épithéliales du thymus)
Tg	:	Transgénique
U.V.	:	Ultraviolet
Wt	:	Phénotype sauvage ( <i>wild type</i> )

## TABLES DES TABLEAUX

1	Anticorps primaires.....	32
2	Anticorps secondaires .....	33
3	Amorces pour le génotypage des souris <i>scotinE2</i> délétées .....	34
4	Séquence des shRNA contre les isoformes de <i>scotin</i> .....	46
5	Amorces pour le dosage des ARNm par PCR quantitatifs.....	51

## TABLES DES FIGURES

1	Reconnaissance des complexes pCMH par les cellules T.....	5
2	Étapes du développement des thymocytes visualisés par les marqueurs membranaires.....	7
3	Schéma du développement thymique dans le temps et dans l'espace au niveau du thymus .....	10
4	Modulation de <i>nur77</i> et de <i>scotin</i> chez un modèle murin de sélection positive.....	26
5	Représentation et séquence protéique de Scotin.....	27
6	Localisation de Scotin au niveau du thymus murin.....	52
7	Coloration intracellulaire de Scotin dans les sous-populations thymiques .....	54
8	Analyse phénotypique des thymocytes des souris <i>scotinE2</i> <i>-/-</i> .....	56
9	Expression protéique de Scotin chez les différentes souches murines <i>scotinE</i> ..... 2.	57
10	Organisation génomique du gène <i>scotin</i> .....	59
11	Tris cellulaires multi-paramétriques des sous-populations thymiques .....	61
12	qPCR pour <i>bim</i> et <i>nur77</i> chez les sous-populations triées .....	64
13	qPCR pour les isoformes de <i>scotin</i> chez les sous-populations triées.....	65
14	Analyse des ARNm produits par les souris <i>scotinE2</i> <i>-/-</i> .....	66
15	Induction de l'apoptose via un signal TCR fort chez les DP .....	68
16	qPCR pour <i>bim</i> et <i>nur77</i> sur les DP induits par un fort signal TCR.....	69
17	qPCR pour les isoformes des <i>scotin</i> sur les DP induits par un fort signal TCR.....	70
18	Transfection des HeLa avec les isoformes de <i>scotin</i> .....	71
19	Localisation sub-cellulaire des isoformes de Scotin chez les cellules HeLa transfectées. ....	72

20	Apoptose chez des lignées de thymomes RML11 et Bw5147 induites via un signal TCR fort.....	73
21	qPCR pour <i>scotin</i> chez les thymomes induits avec un stimulus mimant un signal TCR fort .....	74
22	Test de l'efficacité des shRNA Scotin chez les cellules HeLa.....	76
23	Induction de l'apoptose via un stimulus mimant un signal TCR fort chez des lignées de thymomes exprimant des shRNA contre les isoformes <i>scotin</i> de manière stable.	77
24	qPCR pour les isoformes de <i>scotin</i> chez les lignées de thymomes qui expriment de façon stable des shRNA et qui ont été induites avec le PMA et l'ionomycin.....	78

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 Le système immunitaire

La défense contre les pathogènes et les molécules étrangères chez les organismes vertébrés est assurée par le système immunitaire. Ces fonctions sont assurées par un ensemble de cellules spécialisées et de molécules biologiques solubles (complément, cytokines). On peut diviser le système immunitaire en deux branches dont les rôles sont distincts. Tout d'abord, le système immunitaire inné s'occupe de la défense primaire contre les agresseurs grâce à des récepteurs (ex : *Toll Like Receptor*) permettant la reconnaissance de motifs structuraux communs aux bactéries ou aux virus (Kawai et Akira, 2006; Meylan et Tschopp, 2006). C'est en fait la première ligne de défense de l'organisme. Le système immunitaire adaptatif va permettre une action qui est plus ciblée envers l'agresseur et qui s'affine avec le temps. Ultimement, la branche adaptative éliminera l'infection et empêchera une récurrence en générant des cellules mémoires. Dans le but d'avoir une immunité contre un univers presque illimité de pathogènes, notre système immunitaire requiert une coopération étroite entre ses branches innées et adaptatives (Medzhitov et Janeway, 1998). Au coeur du système de défense adaptatif, on retrouve deux types cellulaires principaux qui gèrent ses fonctions. Ce sont les lymphocytes B et T qui permettent de mettre en place une réponse focalisée envers les envahisseurs ou les cellules dysfonctionnelles. Chaque lymphocyte exprime un récepteur membranaire qui reconnaît un seul épitope antigénique. Lorsque cet antigène spécifique est lié par le récepteur, cela entraîne l'activation des lymphocytes. Un grand potentiel de reconnaissance des antigènes est généré grâce à différents mécanismes de recombinaisons somatiques dans les séquences génomiques des récepteurs. Cela permet une grande spécificité de la réponse immunitaire. La fonction principale des cellules B est la production d'anticorps qui sont les formes solubles du récepteur des cellules B (BCR). Ces lymphocytes sont responsables de l'immunité humorale et peuvent agir en tant que cellules présentatrices

d'antigènes (APC). Les lymphocytes T ont des capacités effectrices plus diversifiées via le récepteur des cellules T (TCR) présent exclusivement à la surface membranaire. Il y a deux types de TCR fonctionnels qui sont produits selon la nature des chaînes protéiques qui composent l'hétérodimère du récepteur. Cela génère des cellules T de classes distinctes. On différencie les cellules exprimant un TCR $\alpha\beta$  de celles exprimant un TCR $\gamma\delta$ . Ces dernières sont impliquées dans l'élimination des infections bactériennes (Born et al., 2006). Dans ce mémoire, nous traiterons seulement des cellules ayant un TCR $\alpha\beta$ . Ces cellules sont divisées en deux catégories fonctionnelles qu'on distingue par l'expression des co-récepteurs membranaires CD4 et CD8. Les cellules T 'helper' (CD4) ont la capacité de diriger l'action des autres cellules du système de défense par l'intermédiaire d'interactions cellules-cellules et par la production de cytokines. Il y a aussi un autre niveau de diversité chez les cellules T CD4. Ces lymphocytes se différencient en plusieurs sous-classes effectrices. Les CD4 Th1 stimulent les fonctions des macrophages et des cellules T cytotoxiques alors que les CD4 Th2 favorisent la production d'anticorps par les lymphocytes B. Les cellules T CD4 régulatrices (Treg) ont un pouvoir immunosuppresseur envers les autres lymphocytes T (Itoh et al., 1999; Baecher-Allan et Hafler, 2006). Elles expriment le marqueur de surface CD25 à l'état naif ce qui permet de les différencier des autres cellules T CD4. Pour leur part, les cellules T cytotoxiques (CD8) vont éliminer directement les cellules aberrantes de l'organisme qu'elles soient infectées, cancéreuses, etc (Janeway et al., 2006).

Les précurseurs des lymphocytes sont produits dans la moelle osseuse comme toutes les cellules sanguines. Les deux types de lymphocytes se développent dans des tissus lymphoïdes primaires différents. Alors que les précurseurs des cellules B effectuent la totalité de leur maturation dans la moelle osseuse, les précurseurs des cellules T (thymocytes) la débutent au même endroit, mais la terminent dans le thymus, un petit organe situé dans la cage thoracique, juste au-dessus du cœur (Miller, 1961). La reconnaissance par le TCR est bien différente de celle du BCR. Ce dernier reconnaît les antigènes solubles alors que le TCR a une double spécificité face à l'antigène et au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Pour qu'il y ait signalisation via le TCR, l'antigène doit être présenté sous forme peptidique en complexe avec une molécule de CMH à la surface des cellules (pCMH). Il y a une autre distinction importante entre les deux récepteurs des lymphocytes. Pour pouvoir se développer adéquatement, les thymocytes doivent exprimer un TCR capable de reconnaître un peptide du 'soi' dans le thymus. Chez les cellules B, les BCR pouvant lier un antigène du 'soi' permettent la délétion du clone lymphocytaire en question. Comme les peptides présentés par le CMH au niveau du thymus sont dérivés d'un antigène du corps, les processus de développement auxquels les cellules T font face sont extrêmement sélectifs. En effet, le TCR doit acquérir la capacité de distinguer les molécules du 'soi' des molécules étrangères. Cette capacité est développée grâce à un ensemble de processus appelé tolérance centrale (Gallegos et Bevan, 2006). La rencontre de différents types cellulaires spécialisés du stroma thymique est nécessaire à la réussite de deux processus physiologiques d'une importance capitale pour la production de cellules T fonctionnelles. En effet, la fonctionnalité du TCR est vérifiée par sa capacité à reconnaître des complexes peptides du soi-CMH (pCMH) à la surface des cellules du stroma (Starr et al., 2003). Pour que les précurseurs survivent, ils doivent recevoir un signal via la *sélection positive* et cela implique qu'ils doivent interagir faiblement avec un complexe pCMH dans le thymus. Sans cette reconnaissance, les thymocytes enclenchent un processus d'apoptose appelé *mort par négligence*. Donc, les thymocytes doivent être capables de lier un antigène du 'soi'. Cette étape franchie, le potentiel auto-réactif des cellules est testé par la *sélection négative* et il y a élimination des cellules réagissant trop fortement contre les pCMH. La majorité des précurseurs sont détruits, car ils ne réussissent pas à produire de TCR capable de reconnaître un pCMH avec une affinité moyenne pour les molécules du 'soi' (Marsden et Strasser, 2003). Malgré toutes les étapes de contrôle associées à la tolérance centrale ayant lieu dans le thymus, certaines cellules T réactives face à des antigènes du 'soi' réussissent à survivre et à se rendre dans les organes périphériques. D'autres mécanismes, nommés globalement tolérance périphérique, existent et empêchent ces cellules de causer des dommages dans l'organisme. On parle alors d'ignorance immunologique, d'anergie des lymphocytes T, de compartimentalisation des cellules T ou de cellules Treg (Parham, 2003; Janeway et al., 2006).

## 1.2 Reconnaissance des antigènes par les cellules T

### 1.2.1 Structure et biosynthèse du TCR

Le TCR est une glycoprotéine hétérodimérique membranaire composée d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une  $\beta$ . Chacune de ces sous-unités est constituée d'une région variable et d'une région constante. Les régions variables se situent dans la partie amino-terminale du récepteur alors que les régions constantes sont dans la partie carboxy-terminale. Le site de liaison à l'antigène est situé dans la partie distale des régions variables des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (Garcia et al., 1999). Au niveau de la population de cellules T, ce site présente une forte hypervariabilité de séquences et les lymphocytes T ont un immense potentiel de reconnaissance des molécules étrangères grâce à cette diversité. L'énorme variabilité des sites de liaison du TCR est générée par des mécanismes de recombinaisons somatiques complexes au niveau des gènes des chaînes variables. En effet, des réarrangements géniques, nommés recombinaison V(D)J, doivent avoir lieu dans les loci codant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR avant qu'une cellule produise un TCR fonctionnel (Livak et Petrie, 2002). Lorsqu'il y a synthèse d'un tel récepteur, il sera exporté à la surface. Avant l'expression du TCR à la membrane cellulaire, il sera associé à six sous-unités protéiques dans le réticulum endoplasmique pour former le complexe de reconnaissance spécifique. Le récepteur produit doit être couplé de façon non-covalente au complexe CD3 qui comprend quatre protéines soit :  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\zeta$ . Elles sont retrouvées sous forme de trois dimères : CD3 $\epsilon\gamma$ , CD3 $\delta\epsilon$  et CD3 $\zeta\zeta$  (Sun et al., 2001). Cet ensemble correspond au complexe TCR fonctionnel. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR reconnaissent les pCMH et ce sont les protéines CD3 qui transmettent le signal vers l'intérieur. Les domaines cytoplasmiques des protéines CD3 contiennent de nombreux motifs de transduction du signal, comme les ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), pouvant être phosphorylés sur certains résidus. Avec les co-récepteurs

CD4 et CD8, ces motifs sont impliqués dans la transmission du signal suivant la liaison du TCR alors que les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  n'ont pas de rôle connu dans la signalisation intracellulaire (Germain, 2001).

### 1.2.2 Le CMH et la présentation antigénique

La liaison du TCR est dite restreinte au CMH (Zinkernagel et Doherty, 1974). Comme on l'a déjà mentionné, en plus de lier l'antigène, le récepteur doit reconnaître spécifiquement la molécule de CMH sur laquelle le peptide se situe pour qu'il y ait attachement et signalisation intracellulaire par la suite (Figure 1). Les allèles du CMH sont fortement polymorphes entre les individus d'une population et si on transfère des cellules exprimant des CMH distincts de ceux de l'hôte, elles peuvent être reconnues comme 'étrangères'. Les problèmes de rejet de greffes lors des transplantations sont un bon exemple de l'effet de cette diversité sur la reconnaissance par les cellules T. Les lymphocytes T d'un individu sont sélectionnés pour reconnaître les molécules de CMH présentes à la surface de ses propres cellules.

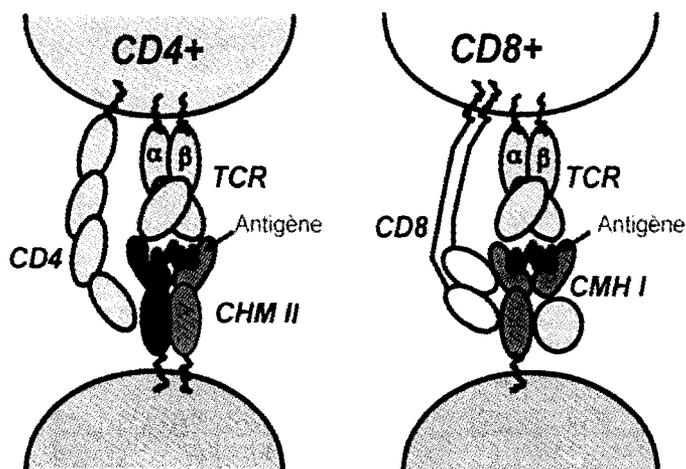


Figure 1. Reconnaissance des complexes pCMH par les cellules T. Le récepteur des cellules T a une double spécificité de reconnaissance. Il doit fixer le CMH et le peptide lié à celui-ci. Les CMH de classe I sont exprimés à la surface de toutes les cellules nucléées alors que le CMH de classe II ne l'est que par les APC. Les co-récepteurs permettent de stabiliser l'interaction en liant le CMH.

On retrouve deux classes de CMH qui auront des rôles de présentation distincts. Le chargement des peptides sur ces deux types de molécules s'effectue dans des compartiments intracellulaires différents. Le CMH I est retrouvé à la surface de toutes les cellules nucléées. Son rôle est de présenter les peptides qui sont générés lors de la dégradation des pathogènes intracellulaires dans le cytosol par le protéasome puis qui sont transportés au réticulum endoplasmique. Les molécules de CMH II ne sont exprimées que par les cellules spécialisées dans la présentation d'antigène, les APC. Ces cellules ingèrent et dégradent les microorganismes extracellulaires et les peptides dérivés sont apprêtés dans le lysosome et les compartiments d'endocytose. Les molécules de CMH I et II ne présentent les peptides qu'à une classe de cellules T en particulier selon le co-récepteur que celles-ci expriment. En effet, le CMH I ne peut être lié que par les cellules T CD8 et le CMH II que par les CD4. C'est le processus de choix de lignée (*lineage decision*) au niveau du thymus qui permet la production de cellules T ayant des fonctions différentes. En se liant aux molécules de CMH, les co-récepteurs apportent une stabilisation additionnelle à la liaison du TCR à son ligand (Janeway et al., 2006).

### **1.3 Les stades de différenciation des cellules T et les marqueurs membranaires lymphocytaires**

Tout au long de leur maturation, les divers signaux cellulaires transmis aux précurseurs lymphocytaires permettent leur passage à travers différentes étapes de développement. Cela se traduit phénotypiquement par l'expression de diverses protéines membranaires. Il devient alors possible de suivre le développement des thymocytes en observant le changement d'expression de protéines de surface caractéristique aux différents stades de maturation. Grâce à la cytométrie de flux, qui permet un marquage cellulaire avec plusieurs molécules fluorescentes simultanément, on peut subdiviser le développement thymique en étapes distinctes selon le phénotype membranaire des sous-populations. Il y a plusieurs types de

marqueurs lymphocytaires, mais les plus utilisés pour suivre la maturation des thymocytes sont les co-récepteurs CD4 et CD8 (Figure 2A). Cependant, Barthlott *et al.* ont démontré qu'il était possible de diviser le développement thymique en cinq stades différents grâce au marqueur d'activation CD69 et au TCR (Barthlott *et al.*, 1997). On les classifie de R1 à R5 selon l'expression de ces deux molécules de surface (Figure 2B). La progression via ces stades représente la voie majeure de différenciation des cellules T (Barthlott *et al.*, 1997).

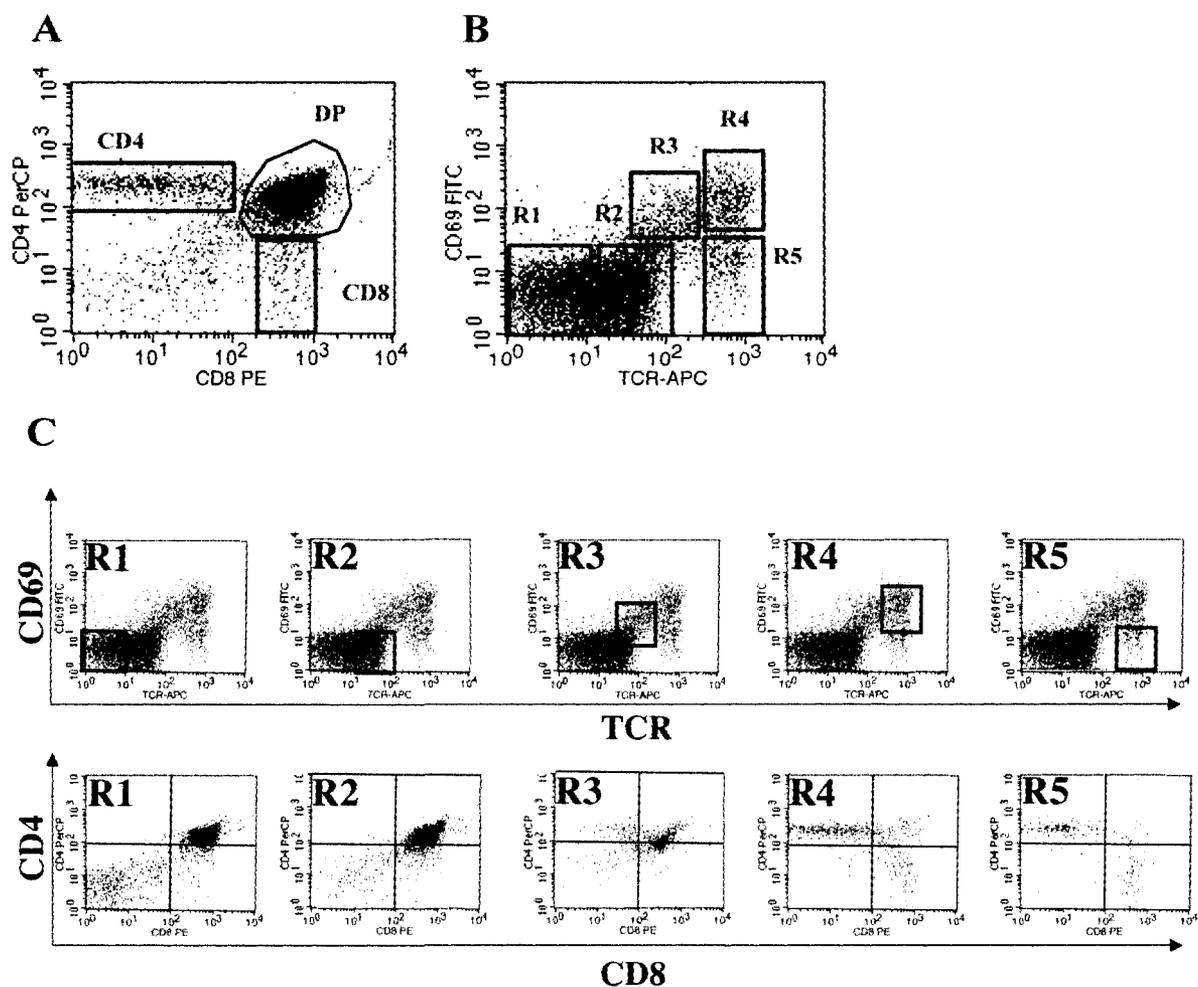


Figure 2. Étapes du développement des thymocytes visualisés par les marqueurs membranaires. La maturation des thymocytes suivie par FACS à l'aide de marqueurs de surface comme les co-récepteurs CD4 et CD8 (A). Les molécules CD69 et TCR permettent de diviser le passage des DN vers les SP CD4 et CD8 en cinq étapes distinctes (B) du stade R1 vers R5. On peut voir la coloration simultanée de CD69 vs TCR en parallèle avec l'expression de CD4 vs CD8 (C). On remarque l'apparition des cellules CD4+CD8faible chez les R3.

### ***1.3.1 Développement thymique précoce***

Lorsque les précurseurs lymphocytes T pénètrent dans le thymus, ils n'expriment aucun des co-récepteurs glycoprotéiques. Ils sont double négatif (DN) et n'expression ni CD69 ni TCR. Ces cellules sont au stade R1 selon la classification de Barthlott *et al.* Les loci  $\beta$  et  $\alpha$  du TCR sont réarrangés successivement via la recombinaison V(D)J au début de la maturation aux stades DN et DP respectivement (Livak et Petrie, 2002). Ces processus sont strictement régulés et comportent plusieurs points de contrôle pour assurer leur bon déroulement. Tout d'abord, les cellules DN réarrangent la chaîne  $\beta$  du locus TCR. Il y a ensuite expression à la surface cellulaire d'un récepteur composé de la chaîne  $\beta$  fonctionnelle et d'une chaîne  $\alpha$  de substitution (préT $\alpha$ ) qui sont associées au complexe CD3. L'expression de ce pré-TCR à la membrane amène la prolifération de ce clone thymique tout en arrêtant le réarrangement de la chaîne bêta (von Boehmer et Fehling, 1997). Ce processus est appelé sélection- $\beta$ . Il y a alors induction de l'expression des deux co-récepteurs CD4-CD8 simultanément et les cellules passent au stade double positif (Alam et al.) (Alam et al., 1996). L'étape suivante consiste à réarranger le locus de la chaîne  $\alpha$ . Ces sont les DP qui l'effectuent et lorsque cela est fait, ceux-ci expriment un TCR $\alpha\beta$  complet à leur surface (Livak et Petrie, 2002). On est alors au stade R2 de phénotype CD69<sup>-</sup> et TCR<sup>faible</sup>. Les cellules incapables d'effectuer des réarrangements productifs ne reçoivent aucun signal de survie et entrent en apoptose via un phénomène appelé mort par négligence. Ces cellules seront phagocytées par les macrophages du thymus (Werlen et al., 2003).

### ***1.3.2 Développement thymique tardif***

Les cellules R2 qui sont capables de lier un pCMH complémentaire à leur TCR passent au stade R3 (TCR<sup>intermédiaire</sup> et CD69<sup>+</sup>). Comme CD69 est exprimé lorsqu'il y a transmission d'un

signal intracellulaire via le TCR (Yamashita et al., 1993), les R3 sont les premières cellules à montrer un signe de liaison. À ce stade, le patron d'expression des co-récepteurs CD4 et CD8 est plus complexe (Figure 2C). Nous y reviendrons à la section 1.5.5. Au stade R4, l'expression de CD69 et du TCR est à son plus haut niveau. Les premières cellules simple positif (SP) pour CD4 ou CD8 sont alors détectables, car l'expression d'un des deux co-récepteur a été arrêtée à ce moment. La maturation se termine avec la baisse d'expression membranaire de CD69. On est alors au stade R5 et les thymocytes sont TCR<sup>fort</sup> et CD69<sup>-</sup>. Finalement, chez la souris, ces cellules passent 14 jours dans le thymus après avoir acquis leur phénotype mature CD4 SP ou CD8 SP (Hayday et Pennington, 2007). On croit que ces SP continuent à tester la capacité de liaison de leur TCR face aux pCMH du soi (Hayday et Pennington, 2007).

## **1.4 Migration des précurseurs thymiques et développement des thymocytes**

### ***1.4.1 Morphologie et fonction du thymus***

Le thymus fournit un micro-environnement très organisé permettant le développement complet des cellules T (Anderson et Jenkinson, 2001; Starr et al., 2003). Le stroma thymique contient des cellules épithéliales thymiques (TEC), des macrophages, des cellules dendritiques et des fibroblastes. Les TEC entourent les thymocytes en développement et les guident dans ce processus (Anderson et Jenkinson, 2001). On peut diviser le thymus en deux parties morphologiques distinctes. Une coloration cellulaire nous permet de bien différencier les régions thymiques. Il y a le cortex, ayant une forte densité cellulaire, qui contient les cellules immatures DN et DP alors que la médulla est la région où se concentrent les cellules plus matures SP. Cette dernière contient beaucoup moins de cellules que le cortex.

### 1.4.2 Étapes de migration des thymocytes et rôles des chimiokines dans ce processus

Les précurseurs thymiques entrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire (Figure 3 (1)). Ils migrent vers la région sub-capsulaire (Lind et al., 2001) et ils sont alors de phénotype DN pour CD4 et CD8 (Figure 3 (2)). CXCR4 est impliquée dans cette relocalisation, car chez une souche de souris déficiente pour cette chimiokine dans le thymus exclusivement on observe un arrêt de la différenciation au stade DN et les précurseurs ne peuvent pas migrer vers la région sub-capsulaire (Plotkin et al., 2003).

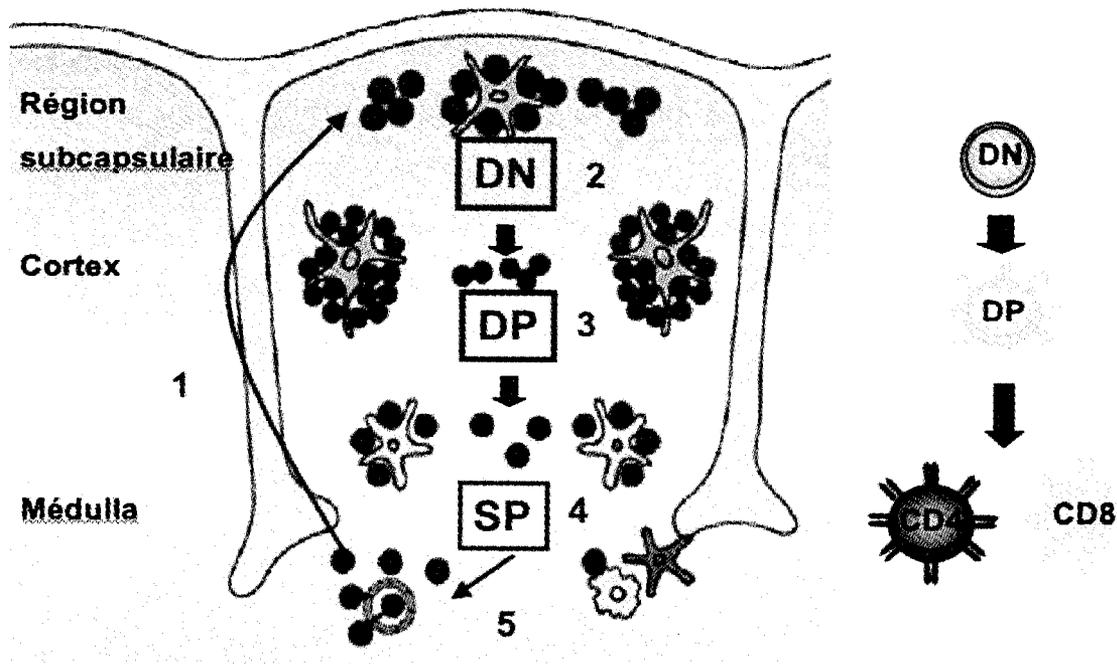


Figure 3. Schéma du développement thymique dans le temps et dans l'espace au niveau du thymus. Les précurseurs lymphocytaires arrivent de la moelle osseuse via la circulation sanguine. Ils se dirigent alors vers la région sub-capsulaire du thymus (1). À ce stade, les cellules sont appelées double négatif, car elles n'expriment aucun des co-récepteurs CD4 ou CD8 (2). Elles réarrangent leur chaîne TCRβ et expriment un préTCR à la membrane. Cela fournit un signal de survie qui permet aux thymocytes de passer au stade double positif (3). À ce moment, ils réarrangeront la chaîne alpha du TCR et produiront un TCRαβ complet. Les cellules subiront par la suite les mécanismes de sélection positive, sélection négative de même que le choix de lignée qui permettra de produire des cellules CD4 et CD8 simple positive (4) fonctionnelles qui seront exportées vers la périphérie (5) (modifiée de Janeway 2003).

Les cellules DN continuent leur maturation et reviennent vers le cortex où le réarrangement des gènes du TCR est terminé et permet le passage au stade DP (Figure 3 (3)). La plupart des cellules contenues dans le cortex meurent par négligence (Goldrath et Bevan, 1999). Cependant, certains thymocytes de type DP reçoivent un signal de survie grâce à une interaction avec un pCMH présenté par les cellules du stroma thymique. C'est la *sélection positive* et elle provoque l'augmentation de l'expression du récepteur CCR7 à la surface des DP (Figure 3 (3)). Comme les TEC médullaires produisent beaucoup de CCR7L, le ligand de CCR7, les cellules en développement se dirigent vers cette région pour terminer leur maturation et subir la *sélection négative* (Figure 3 (4)). Si on mute CCR7, les DP ne migrent plus vers la médulla et les SP se développent dans le cortex (Ueno et al., 2004). Au cours de la transition du stade DP vers le stade SP, les thymocytes synthétisent le récepteur S1P<sub>1</sub>. Cette molécule est présente en forte concentration dans le sang et elle stimule l'exportation des lymphocytes T matures (Figure 3 (5)) (Matloubian et al., 2004). La sortie des cellules T matures constitue la dernière étape du développement (Rosen et al., 2003). Seul un petit nombre de cellules ayant survécu aux étapes de développement dans le thymus peuvent quitter celui-ci. Ces cellules circulent dans le sang pour se rendre dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, tissus lymphatiques associés aux muqueuses). Les zones riches en cellules T de ces tissus forment des sites spécialisés où les cellules T naïves peuvent être activées par leur antigène spécifique pour entreprendre la dernière phase de leur développement et devenir des cellules effectrices (Parham, 2003; Janeway et al., 2006).

#### ***1.4.3 Visualisation en trois dimensions (3D) de la migration thymique***

Les premières études sur les déplacements des thymocytes ont été effectuées en culture cellulaire ou sur des tissus fixés. L'avenue de la microscopie biphotonique a permis de faire plusieurs avancés dans le domaine de la migration *in vivo*. Cette méthodologie permet la

visualisation des cellules dans un organe entier non fixé sans endommager les tissus (Bousso et al., 2002). Elle a permis de résoudre plusieurs questions concernant la migration des thymocytes et les interactions qu'ils ont avec les cellules stromales dans leur environnement naturel. Dans le cortex, la majorité des thymocytes immatures visualisés bougent lentement et de façon aléatoire. Ces thymocytes arrêtent fréquemment leur mouvement pour interagir avec les cellules stromales. La reconnaissance du CMH sur les cellules stromales augmente le temps de contact (Bousso et al., 2002). En effet, sur un fond génétique CMH qui n'est pas compatible, les thymocytes font moins d'arrêt pour interagir. On observe aussi un petit groupe de cellules qui se déplacent rapidement vers la médulla. La fréquence de ces cellules migrant rapidement corrèle avec la fréquence des cellules en sélection positive (Witt et al., 2005). De plus, il a été démontré que l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium est essentielle et suffisante pour amener l'arrêt du mouvement des thymocytes (Bhakta et al., 2005). Donc, lorsque les thymocytes corticaux lient un pCMH à la surface d'une cellule stromale, ils augmentent leur concentration de calcium intracellulaire, puis s'immobilisent. Si le ligand rencontré permet la transmission d'un signal de sélection positive, le calcium intracellulaire va diminuer et les thymocytes migrent vers la médulla (Bhakta et al., 2005).

### **1.5 Les mécanismes de sélection thymique**

C'est grâce au processus de présentation antigénique via les molécules de CMH au niveau du thymus que les cellules T deviennent fonctionnelles et qu'elles développeront leur spécificité. Après avoir effectué des réarrangements efficaces pour produire un TCR membranaire, ce récepteur doit être testé pour vérifier son potentiel de reconnaissance des pCMH exprimés par les cellules stromales du thymus (TECs et cellules dendritiques). La majorité des thymocytes DP expriment un TCR qui est incapable de lier un complexe pCMH et meurent par négligence (Werlen et al., 2003). Les thymocytes qui sont capables d'une interaction avec

un pCMH recevront un signal qui mènera à leur différenciation (sélection positive) ou à leur mort par apoptose (sélection négative) selon la force de la liaison (Starr et al., 2003). Finalement, la liaison du pCMH avec son complexe TCR-co-récepteur correspondant sur les thymocytes dirige le processus de choix de lignée lymphocytaire.

### *1.5.1 Rôles des TEC corticaux et médullaires dans le développement thymique*

Les compartiments thymiques sont définis par la présence de différents types de TEC qui forment des régions spécialisées dans certaines étapes de maturation et de sélection des lymphocytes T. La maturation des cellules est concomitante avec la migration des thymocytes dans ces différentes régions du thymus. En conséquence, les thymocytes à diverses phases de leur maturation sont retrouvés dans des zones précises du thymus et rencontrent des cellules spécialisées pour leur fournir des signaux de développement adéquats (Lind et al., 2001). Il faut spécifier que l'interaction lympho-stromale des cellules du thymus est bidirectionnelle. C'est-à-dire que les thymocytes en développement aident aussi à la maturation des cellules stromales (van Ewijk et al., 1994). On parle de 'crosstalk' et une déficience dans le développement des TEC médullaires (mTEC) est accompagnée de maladies du système immunitaire (Boehm et al., 2003). En évaluant la capacité de stimulation des différentes cellules du stroma thymique face aux cellules T naives, il a été démontré que ce sont les TEC qui ont le rôle prédominant dans les mécanismes de sélection (Gray et al., 2006). Du point de vue fonctionnel, les TEC corticaux (cTEC) chapeautent la sélection positive alors que les mTEC sont responsables en grande majorité de la sélection négative (Hanahan, 1998; Kyewski et Derbinski, 2004)

### *1.5.2 Transmission différentielle des signaux de sélection positive et négative via le TCR*

Différents modèles ont été proposés pour expliquer la capacité des cellules T à transmettre un signal intracellulaire indiquant une liaison avec un pCMH. Selon un de ces modèles, les peptides apportent des modifications conformationnelles dans le complexe TCR et celles-ci sont transmises aux protéines CD3 (Janeway, 1995; Krosgaard et al., 2003). Cependant, les analyses par cristallographie ne soutiennent pas ce modèle, car à l'exception d'une étude (Kjer-Nielsen et al., 2003), aucun changement de conformation du TCR n'a été noté. Un autre modèle stipule que les pCMH induisent une agrégation des complexes TCR-CD3 à la membrane ce qui permet une phosphorylation massive des ITAM au niveau des chaînes cytoplasmiques du CD3 et crée un site où plusieurs molécules de signalisation possédant des domaines SH2 peuvent s'assembler. Le fait que des pCMH monomériques solubles ne soient pas capables d'induire un signal TCR, contrairement à des pCMH oligomériques, supporte cette vision (Boniface et al., 1998; Cochran et al., 2000). Récemment, ces deux concepts ont été associés (Minguet et al., 2007). En effet, l'agrégation des complexes TCR-CD3 lors de la liaison au pCMH induit un changement conformationnel des queues cytoplasmiques des chaînes CD3 $\epsilon$  sans affecter la structure du TCR $\alpha\beta$  (Gil et al., 2002). Cette modification permet la liaison de la protéine adaptatrice Nck au niveau du CD3 $\epsilon$ . Nck serait important pour la réorganisation de l'actine et la formation de la synapse immune avec les APC. Ce changement de conformation est réversible après la dissociation du pCMH et il est nécessaire, mais non suffisant à la signalisation via le TCR. Il est intéressant de noter que la majorité des thymocytes chez un modèle murin de sélection négative présente ce changement dans la structure de CD3 $\epsilon$  (Risueno et al., 2006).

Les mécanismes de sélection sont basés sur la reconnaissance de courtes séquences peptidiques de façon très spécifique. Des études ont démontré que le changement d'un seul acide aminé chez un peptide qui lie fortement le TCR cause une diminution de  $2 \times 10^4$  fois

du potentiel d'attachement chez la séquence modifiée (Kersh et al., 1998). Le temps de liaison du peptide au TCR est alors seulement cinq fois moins long. Pour analyser l'affinité des ligands conduisant soit à la sélection positive ou à la sélection négative, des études de spectroscopie de résonance plasmique de surface ont été faites sur ces différents ligands. On a découvert que les peptides menant à la sélection négative sont seulement trois fois plus avides face au TCR que ceux donnant le signal de survie (Alam et al., 1996). Ces données démontrent qu'il y a une forte corrélation entre l'affinité, le temps de liaison et le mécanisme de sélection enclenché par un pCMH donné. Donc, de petits changements au niveau du ligand conduisent à de grandes différences dans les réponses enclenchées. En plus d'être extrêmement sensible face à la séquence peptidique reconnue, la réponse du TCR est très rapide. La signalisation chez les cellules T enclenche la réponse calcique aussi peu que 15 secondes après la liaison du TCR au pCMH (Li et al., 2004).

Comme les deux signaux de sélection négative et positive passent par un seul et même récepteur, il doit y avoir une signalisation différentielle qui entre en jeu pour conduire au bon choix. Le modèle cinétique de signalisation propose que la distinction entre la survie et la mort des précurseurs thymiques est possible grâce au 'calcul' du temps de liaison des pCHM au TCR (McKeithan, 1995). En effet, les peptides conduisant à la sélection négative ont tendance à lier longtemps le TCR alors que ceux menant à la sélection positive ont une liaison plus éphémère. C'est la dissociation du ligand qui limite la durée de l'interaction (Matsui et al., 1994). En effet, de petites différences dans la longévité de l'association au TCR amènent de grandes divergences dans les signaux activés en aval. Pour démontrer ce fait, le groupe de Palmer a généré des peptides OVA (SIINFEKL) ayant des affinités distinctes pour le TCR de souris transgéniques (Tg) OT-I (Daniels et al., 2006). Cela a permis d'établir une hiérarchie de ligands selon leur capacité à induire la sélection négative ou positive. Des différences dans les signaux proximaux enclenchés par ces divers peptides ont été notées. Grâce à ces peptides modifiés, ils ont montré qu'à la limite d'avidité entre la sélection négative et positive, il y a des changements marqués dans l'activation et la

localisation sub-cellulaire de différentes molécules de signalisation, surtout de ERK (Daniels et al., 2006). Par exemple, les peptides menant à la sélection négative apportent une concentration plus forte de ZAP-70 phosphorylé à la membrane, ce qui permet la phosphorylation de LAT, cause le recrutement de Grb2-SOS et puis, active ERK à la membrane. Dans le contexte de la sélection positive, ZAP-70 et Grb2-SOS ne sont pas relocalisés à la membrane et même si ERK est active, elle n'est pas recrutée à la membrane plasmique. De son côté, JNK est phosphorylée par les deux types de peptides sélecteurs et sa forme active est retrouvée dans l'ensemble de la cellule. Donc, lors de la sélection négative, il y a une ségrégation dans la localisation cellulaire de ERK et JNK. Comme on le voit, la liaison du TCR par un peptide conduisant soit la sélection négative soit à la sélection positive n'amène pas l'activation d'une voie de signalisation unique. Cependant, il a été montré que ERK et JNK activées ont des rôles opposés dans les deux mécanismes de sélections thymiques (Dong et al., 2002; Alberola-Ila, 2003). JNK est essentielle à la sélection négative et son niveau d'activité en présence des deux types de peptides est le même (Rincon et al., 1998). On observe une différence de cinétique d'expression de ERK selon le type de ligands impliqués (Werlen et al., 2000). En présence d'un peptide de sélection négative, les thymocytes induisent une forte, mais courte activité de ERK alors que les peptides conduisant à la sélection positive vont produire une activité plus faible, mais soutenue de ERK (McNeil et al., 2005). Les voies que ERK activent au cours de ces deux mécanismes cellulaires ne sont pas bien connues. Pourquoi l'activité soutenue de ERK mène-t-elle à la sélection positive alors que lorsque JNK est active plus longtemps que Erk, on enclenche la sélection négative? On peut spéculer que la ségrégation subcellulaire de ERK et JNK influence ce processus et permet à JNK phosphorylée d'activer préférentiellement certains facteurs de transcriptions impliqués dans la sélection négative.

Voici maintenant les processus moléculaires activés en aval de ces voies de signalisation et qui sont impliqués dans les événements de sélection.

### ***1.5.3 Mécanisme de sélection positive***

La sélection positive se déroule dans le cortex et est médiée par les complexes pCMH présents à la surface des cTEC. Ce processus permet de contourner la voie de ‘mort par défaut’ des thymocytes en maturation, notamment en augmentant la production de Bcl-2 (Linette et al., 1994; Strasser et al., 1994). Les cellules DP du cortex expriment faiblement le TCR. Elles représentent le répertoire ‘non sélectionné’ de thymocytes et c’est la population qui subira les mécanismes de sélection positive (Kisielow et al., 1988). En grande partie via l’étude de souris TCR transgéniques, on a découvert plusieurs molécules qui sont essentielles à ce processus. Une mutation dans un domaine de la chaîne alpha du TCR ( $\alpha$ -CPM) cause un déficit dans la sélection positive et est associée à une activation déficiente de Erk (Werlen et al., 2000). La voie de Ras/Erk est aussi importante. En effet, il y a un arrêt du développement thymique chez les souris mutantes pour Erk-1 et elles ne montrent aucun signe de sélection positive (Pages et al., 1999). C’est le facteur d’échange de guanine (GEF) RasGRP qui relie le TCR à la voie Ras/Erk dans la sélection positive. Les souris mutantes pour ce GEF sont déficientes pour ce processus (Dower et al., 2000). La voie Ras/Erk enclenchée lors de la sélection positive active ensuite le facteur de transcription Egr-1. Les souris surexprimant Egr-1 montrent une surproduction de cellules SP CD4+ et CD8+ et ce, même sur un fond génétique moins favorable à la sélection positive (Bettini et al., 2002). La protéine inhibitrice Id3 est aussi un joueur important dans les mécanismes de transcription mises en branle pendant la sélection positive. Les protéines Id lient les facteurs de transcription de la classe des *E proteins*, comme E2A, et empêchent leur activité. Dans le thymus, les protéines E2A et Id3 sont fortement exprimées. Il est intéressant de constater que la liaison du TCR cause une augmentation de l’expression de Id3 et une répression de l’activité de E2A (Bain et al., 2001). De plus, il a été démontré que des souris exprimant un Id3 inactif montrent un blocage dans la sélection positive (Rivera et al., 2000). En résumé, lorsque la sélection positive est initiée, le TCR activé lie RasGRP, qui enclenche la voie des MAPK Ras/Erk qui à son tour active le facteur de transcription Egr-1 qui apporte

l'expression de Id3 ce qui inactive E2A et permet la transcription de différents effecteurs de la sélection positive, par exemple Bcl-2 et NF- $\kappa$ B qui sont importants pour ce processus (Alberola-Ila, 2003).

L'importance de la spécificité de reconnaissance face au peptide lors de la sélection positive a été un sujet de débat intense (Hogquist et al., 1994; Jameson et al., 1994; Baldwin et al., 2004). Il a été démontré qu'en donnant des doses distinctes d'un peptide du 'soi' dit agoniste, c'est-à-dire qui induit la sélection négative, on peut sélectionner positivement les thymocytes spécifiques à ce peptide normalement auto-réactif (Sebzda et al., 1994). Donc, est-ce que les thymocytes en développement ont réellement besoin de reconnaître spécifiquement un peptide ou est-ce que le signal de sélection positive est indépendant de la nature de celui-ci? Une découverte récente faite par un groupe japonais permet de fournir une piste de réponse à cette question (Murata et al., 2007). Le protéasome est un complexe formé de plusieurs sous-unités protéiques essentielles à la dégradation des protéines et permettant la présentation des peptides par les molécules du CMH I. Chez les APC, on retrouve des sous-unités protéolytiques spécifiques qui forment l'immunoprotéasome et qui génèrent des peptides ayant un potentiel antigénique plus élevé que les complexes ubiquitaires normaux. Le groupe de Tanaka a découvert une nouvelle sous-unité catalytique de l'immunoprotéasome qui est exprimée exclusivement par les cellules corticales du thymus (Murata et al., 2007). Ils l'ont nommé  $\beta$ 5t et en complexe avec les protéines protéolytiques  $\beta$ 1i et  $\beta$ 2i de l'immunoprotéasome, elle forme le thymoprotéasome. Les souris déficientes en  $\beta$ 5t ont un défaut de développement des cellules T CD8+, qui sont diminuées de 80% par rapport aux souches normales (Wt), sans que cela n'affecte celui des CD4+.  $\beta$ 5t atténue l'activité protéolytique 'chymotrypsine-like' du thymoprotéasome comparativement à celle des autres types de protéasomes. Cela a pour effet de produire des peptides de plus faible affinité exprimés par le CMH I sur les cellules corticales, ce qui pourrait favoriser la sélection positive à ce niveau en fournissant un signal intracellulaire atténué lors de la liaison du TCR. De même, les protéases lysosomales nécessaires à la présentation par le CMH II sont

différentes dans les cellules de la périphérie et chez celles du thymus (Nakagawa et al., 1998). Les cellules corticales expriment la sous-unité lysosomale cathepsin L pour la présentation des peptides du 'soi' aux thymocytes CD4+ restreints au CMH II alors que c'est la cathepsin S qui est utilisée en périphérie par les APC. Ces deux sous-unités produisent des peptides différents à partir d'un même antigène. La délétion du gène de la cathepsin L chez la souris cause un défaut de la sélection positive des cellules T CD4. Donc, les peptides dérivés d'antigènes du 'soi' dans le cortex et ceux produits en périphérie ne sont pas de nature identique. Ces deux études indiquent que si on change le pool de peptides du 'soi' présentés aux thymocytes dans le cortex, on affecte la sélection positive. Alors, il se peut que la sélection positive soit effectuée via des peptides du 'soi' qui sont spécifiques au thymus et qui ne seront pas rencontrés hors de celui-ci. De plus, ces découvertes suggèrent qu'il doit y avoir une reconnaissance spécifique d'un peptide dans le thymus lors de la sélection positive.

#### ***1.5.5 Mécanismes de sélection négative (délétion clonale)***

Cette délétion vise à éliminer les cellules qui ont une affinité trop forte pour les antigènes du 'soi'. Des défauts dans le déroulement de la sélection négative causent des désordres immunitaires importants comme les maladies auto-immunes, les lymphomes, les leucémies, etc (Strasser, 2005). Ce sont les cellules dendritiques et les mTEC qui s'en chargent (Gallegos et Bevan, 2006). Ces dernières expriment des gènes dont l'expression est normalement restreinte à la périphérie (Derbinski et al., 2001; Derbinski et al., 2005). L'insuline est l'exemple le plus documenté de ce fait (Smith et al., 1997). Cette expression est rendue possible grâce au facteur de transcription Aire. Ce mécanisme permet de vérifier la réactivité des thymocytes en maturation face aux antigènes du 'soi' qui seront rencontrés dans le reste de l'organisme. L'importance de ce processus est démontrée par le développement de maladies auto-immunes lorsque le gène *Aire* est muté (Anderson et al., 2002). Cette déficience cause une altération de la présentation antigénique (Anderson et al.,

2005) et chez l'humain, provoque une maladie nommée syndrome auto-immun polyendocrine (APECED) (Nagamine et al., 1997; Aaltonen et Bjorses, 1999). La délétion thymique peut survenir à deux stades de différenciation des précurseurs lymphocytaires, soit au niveau des DP ou des cellules semi-matures CD4+CD8-HSA+ qui correspondent en fait au R3 de Barthlott *et al* (Kishimoto et Sprent, 1997; Cho et al., 2003). Ces dernières cellules sont en contact très étroit avec les APC de la région cortico-médullaire ce qui les rend une cible idéale pour la délétion clonale (Surh et Sprent, 1994). Ce mécanisme d'épuration est indépendant des voies d'apoptose via les récepteurs Fas et les 'death receptor' impliqués dans la mort des cellules T matures activées. Plusieurs membres de la famille Bcl-2 ont un rôle à jouer dans ce processus en affectant la perméabilité des mitochondries (Liu et al., 2003). La surexpression de Bcl-2 peut inhiber la sélection négative alors que celle de Bim la favorise (Villunger et al., 2004). Plusieurs molécules telles que PTEN, JNK et p38 ont été identifiées comme modulateurs du mécanisme de sélection négative. Cependant, les deux plus étudiées et caractérisées sont Bim et Nur77.

#### 1.5.5.1 *bim*

Bim est un membre de la famille Bcl-2. Il ne possède qu'un seul des domaines d'homologie (BH) partagé par les protéines de cette famille et fait donc partie de la sous-classe BH3-only. Le groupe de Strasser a montré qu'il est un régulateur essentiel de l'homéostasie des lymphocytes et qu'il est en quelque sorte un 'gardien' contre le développement de l'auto-immunité (Bouillet et al., 1999). En perdant 50% de l'activité de Bim chez la souris *bim+/-*, on observe déjà une déficience dans la sélection négative et le développement des thymocytes. En fait, l'apoptose induite des thymocytes via le TCR/CD3 nécessite la présence de Bim (Bouillet et al., 2002). Au moins trois isoformes de Bim sont produites via épissage alternatif soit Bim<sub>EL</sub>, Bim<sub>L</sub> et Bim<sub>S</sub>. Elles diffèrent dans leur potentiel pro-apoptotique (O'Connor et al., 1998). Il est à noter que Bax et Bak, deux membres pro-apoptotiques de la

famille Bcl-2, sont aussi essentiels à la mort cellulaire via le TCR (Rathmell et al., 2002). Les voies que Bim utilise pour conduire à l'apoptose ne sont pas connues. On spécule qu'il agirait en inhibant les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2 ou en activant le potentiel pro-apoptotique de Bax/Bak (Strasser, 2005). Comme les souris *Bak<sup>-/-</sup>Bax<sup>-/-</sup>* présentent les mêmes déficiences au niveau du système immunitaire que les souris *bim<sup>-/-</sup>* (Rathmell et al., 2002), la deuxième hypothèse semble plus attirante. Le groupe de Goodnow a démontré que la résistance à la délétion clonale des souris non obèse diabétique (NOD) est en partie due à un déficit d'induction de l'expression de Bim lors de la sélection négative (Liston et al., 2004).

#### 1.5.5.2 *nur77*

Le récepteur hormonal nucléaire Nur77 est aussi essentiel à ce processus. Le groupe de Winoto l'a étudié exhaustivement. Le niveau de *nur77* augmente fortement après la stimulation via le TCR chez les thymocytes immatures et on a montré que cette modulation à la hausse est nécessaire à l'induction de l'apoptose par le signal TCR (Liu et al., 1994). En fait, les deux voies majeures de signalisation induite par la liaison du TCR, la voie de la Protéine Kinase C (PKC) et la voie du calcium, convergent vers Nur77 (Dequiedt et al., 2005). Sa production est maintenant considérée comme un marqueur spécifique de la délétion clonale (Cho et al., 2003). Chez la souris, l'expression d'une forme 'dominante négative' de Nur77 cause une augmentation des cellules T matures alors que si on surexprime Nur77, on observe une apoptose massive des thymocytes (Calnan et al., 1995). Cependant, une souche murine déficiente en Nur77 ne montre aucune anomalie dans le processus d'apoptose via le TCR. De la redondance fonctionnelle avec Nor-1, un autre membre de la famille de récepteurs nucléaires orphelins, serait la raison de cette absence de phénotype (Cheng et al., 1997). L'expression de Nor-1 est tout aussi fortement augmentée que celle de Nur77 lors de l'apoptose induite par le TCR. Cependant, Nur77 n'est pas produit

significativement lors de la sélection positive (Cho et al., 2003). Le mode d'action qu'emploie Nur77 pour causer l'apoptose n'est pas connu. Il a été montré que sa liaison à l'ADN de même que sa fonction transcriptionnelle sont nécessaires à son action pro-apoptotique chez les thymocytes (Kuang et al., 1999). Cependant, d'autres études ont postulé que Nur77 est relocalisé à la mitochondrie où il interagit avec Bcl-2 et cause le relargage du cytochrome *c* vers le cytosol (Lin et al., 2004). Dans cette optique, il est intéressant de noter que les thymocytes DP et les cellules T matures augmentent toutes deux l'expression de Nur77 après un signal TCR. Cependant, les DP sont incapables d'hyperphosphoryler Nur77 suite à ce signal et la protéine n'est retrouvée qu'au noyau. L'hyperphosphorylation de Nur77 chez les cellules T matures stimulées induit sa relocalisation vers le cytosol, mais la production de Nur77 chez les cellules T activées ne cause pas leur apoptose (Cunningham et al., 2006). Ces résultats appuient l'hypothèse de la fonction transcriptionnelle de Nur77. Le contrôle de l'expression de Nur77 est en partie effectué via des mécanismes de remodelage de la chromatine. L'activation de Nur77 via le TCR amène une hyperacétylation locale des histones de son promoteur. HDAC7, une histone deacétylase de classe II spécifique au thymus, inhibe l'expression de Nur77 et agit aussi comme régulateur de l'apoptose chez les thymocytes (Dequiedt et al., 2003).

### ***1.5.5 Mécanismes du choix de lignée (lineage decision)***

La liaison du TCR au pCMH dépend en grande partie de la 'qualité' des interactions. La capacité du pCMH à interagir avec le bon co-récepteur est essentielle en ce sens, car cette liaison stabilise l'interaction et permet la transmission d'un signal optimal notamment, par le recrutement de molécules de signalisation comme Lck ou LAT à la membrane (Bosselut et al., 1999). Donc, pour qu'une cellule T assure adéquatement ses fonctions, le choix d'un co-récepteur ayant une spécificité pour un CMH identique à celle de son TCR est essentiel lors de la maturation des thymocytes. Deux théories initiales ont été proposées pour expliquer

cette décision, (Germain, 2002). Le modèle *stochastique* stipule que les précurseurs vont exprimer soit un co-récepteur CD4 ou un CD8 aléatoirement et que lors de leur interaction avec le CMH, il y aura une étape de sélection qui éliminera les cellules n'ayant pas de complémentarité entre le TCR et le CMH (Chan et al., 1993; van Meerwijk et Germain, 1993). Comme la liaison du TCR avec le CMH II sera moins efficace si le co-récepteur présent est le CD8, les cellules mourront dans cette situation. Le deuxième système proposé est le modèle *instructif* qui spécifie que les cellules T en développement reçoivent un signal alternatif suite à la liaison du TCR (Borgulya et al., 1991). Les cellules dont la liaison passe par le CMH II transmettent un signal qui mène à l'arrêt de la synthèse de CD8. Un modèle plus récent, celui du *signal cinétique*, postule que la durée du signal TCR affecte le choix de lignée (Brugnera et al., 2000; Liu et Bosselut, 2004). En effet, il a été démontré que les changements phénotypiques dans l'expression des co-récepteurs n'étaient pas aussi simples qu'une extinction d'un de ceux-ci après le choix de lignée (Lucas et Germain, 1996). Cela est bien représenté dans la Figure 2C. Tout d'abord, les DP exprimant un TCR arrêtent la production des deux co-récepteurs pour devenir CD4<sup>faible</sup>-CD8<sup>faible</sup>. Puis, il y a une ré-expression asymétrique de CD4 suivant les premiers signaux transmis par le TCR chez les DP et ce, peu importe que ceux-ci soient associés au CHM I ou au CMH II (Suzuki et al., 1995). Les thymocytes reprennent la synthèse de CD4 plus rapidement, ce qui donne des cellules CD4+CD8<sup>faible</sup>. C'est après ce stade que le choix de lignée aurait lieu. Le modèle cinétique stipule que, si les signaux fournis par le TCR et le co-récepteur persistent, il y a développement de CD4 SP. Si ces signaux cessent, il y a l'arrêt de la synthèse de CD4, ré-initiation de celle du CD8 pour mener vers la lignée CD8 SP. Au niveau moléculaire maintenant, il a été démontré que le facteur de transcription Th-POK est suffisant et essentiel pour l'engagement des précurseurs thymiques vers la lignée CD4 (He et al., 2005; Sun et al., 2005). Chez les souris HD<sup>-/-</sup>, dont la signalisation via le TCR de même que les mécanismes de sélection positive et négative sont adéquats, il y a une absence de cellules CD4 en périphérie (Dave et al., 1998). Cependant, le nombre de cellules T est normal et l'on observe une plus grande quantité de cellules CD8 pour compenser. Ce qui suggère une redirection des précurseurs vers la lignée CD8 plutôt qu'un arrêt du développement des CD4. Chez ces

souris, Th-POK a une mutation ponctuelle qui le rend non fonctionnel (Kappes et al., 2006). Ce facteur de transcription n'est pas exprimé avant le stade semi-mature CD4+CD8<sup>faible</sup>CD69+ et il est produit chez les thymocytes CD4 SP, mais non chez les thymocytes CD8 SP chez les souris normales (Wt). La surexpression de Th-POK chez les souris HD<sup>-/-</sup>, et même chez des souris Wt va générer des cellules T CD4 exclusivement. Sa production constitutive dirige le développement des cellules restreintes au CMH I vers la lignée CD4. Donc, la sélection positive enclenche un programme commun d'expression génique chez les thymocytes restreints soit au CHM I ou au CMH II, ce qui apporte initialement l'engagement vers la lignée CD8. Si la signalisation via le pCMH est soutenue, les précurseurs seront dirigés vers la lignée CD4 grâce à l'expression de Th-POK. Cela démontre que la sélection positive et le choix de lignée sont deux processus indépendants.

### **1.6 Identification de gènes candidats importants dans les mécanismes de différenciation tardifs des thymocytes**

Une question centrale dans la compréhension du mécanisme de développement lymphocytaire est de savoir quels sont les signaux distaux que le TCR active pour permettre de différencier entre la maturation ou la mort des cellules en sélection. Malgré les découvertes dont nous avons discutées ci-dessus, il reste encore beaucoup d'inconnu dans ce domaine pour bien comprendre les événements moléculaires dirigeant les mécanismes de sélection qui se superposent dans les sous-populations thymiques. Comme la différenciation cellulaire est sous le contrôle de l'expression différentielle de gènes spécifiques, le groupe de recherche du Dr Steimle a émis l'hypothèse que les gènes dont la synthèse est modulée lors de la maturation des thymocytes sont importants, voir essentiels, pour ce processus. À l'aide d'un tri cellulaire des sous-populations thymiques R1 à R5 suivi d'une extraction de leur ARN et d'une analyse via micropuces à ADN (Affymetrix), une série de gènes dont l'expression était modulée lors des étapes tardives du développement thymique a été

identifiée (Knapp, 2003). Les DP sont considérés comme des cellules non sélectionnées et ont donc servi de population de comparaison. Le profil d'expression des ARNm des cellules plus matures R3, R4 et des SP CD4 ou CD8 a été comparé avec celui des DP. Avec ces expériences, plusieurs gènes intéressants dont l'expression était augmentée ou diminuée lors des transitions entre les différentes sous-populations ont été identifiés. Pour valider les résultats obtenus, la modulation de gènes connus pour leur implication dans le développement thymique a tout d'abord été vérifiée lors de la transition DP vers R3. Par exemple, l'expression des gènes *rag1/2*, qui permettent le réarrangement des chaînes du TCR, est diminuée (Turka et al., 1991) alors que la production du marqueur d'activation lymphocytaire *cd69* est augmentée. De même, on note une hausse du marqueur de sélection positive *mIAN-1* et de marqueurs de sélection négative tel *bim* et *Nur77*. Comme on le voit, les deux processus de sélection sont enclenchés lors de cette transition. Alors, la modulation d'un transcrite dans ces sous-populations ne peut pas être simplement associée à l'un ou l'autre de ces processus. Pour résoudre ce problème, des souris Tg, exprimant un type de TCR à spécificité unique sur l'ensemble de leurs cellules T, ont été utilisées. Tout dépendamment de l'affinité du TCR pour son ligand, un seul mécanisme de sélection sera possible dans le thymus de ces souris. Le groupe du Dr Steimle a utilisé la souris HA-TCR Tg comme modèle de sélection positive (Kirberg et al., 1994). C'est une souche murine qui exprime un TCR ayant une affinité modérée pour un peptide spécifique de l'hémagglutinin du virus de l'influenza, le peptide 111-119, présenté sur une molécule de CMH II I-Ed (souris ABII/Rag2<sup>-/-</sup>). Comme tous les lymphocytes T expriment la même molécule de TCR leur surface, la présence du CHM II complémentaire est essentielle à leur survie. Ces souris sont déficientes dans le gène de recombinaison *rag2* pour qu'il n'y ait pas de réarrangements géniques aux niveaux des chaînes  $\alpha$  du TCR endogène. Dans ce contexte génétique, tous les thymocytes subissent exclusivement le processus de sélection positive. Des tris cellulaires ont été effectués sur les sous-populations thymiques en développement et, contrairement à ce qu'on observait chez les souris C57/BL6, l'expression de *nur77* n'est pas modulé dans les sous-populations de la souche HA-TCR Tg (Figure 4A), alors qu'un gène comme *mIAN-1* l'est de façon identique entre les deux souches (données non présentées). Cela démontre que

la méthodologie utilisée est adéquate et qu'elle permet d'associer un gène donné avec un des mécanismes de sélection. Ces expériences ont mené à l'identification d'un transcrit fort intéressant (Figure 4B).

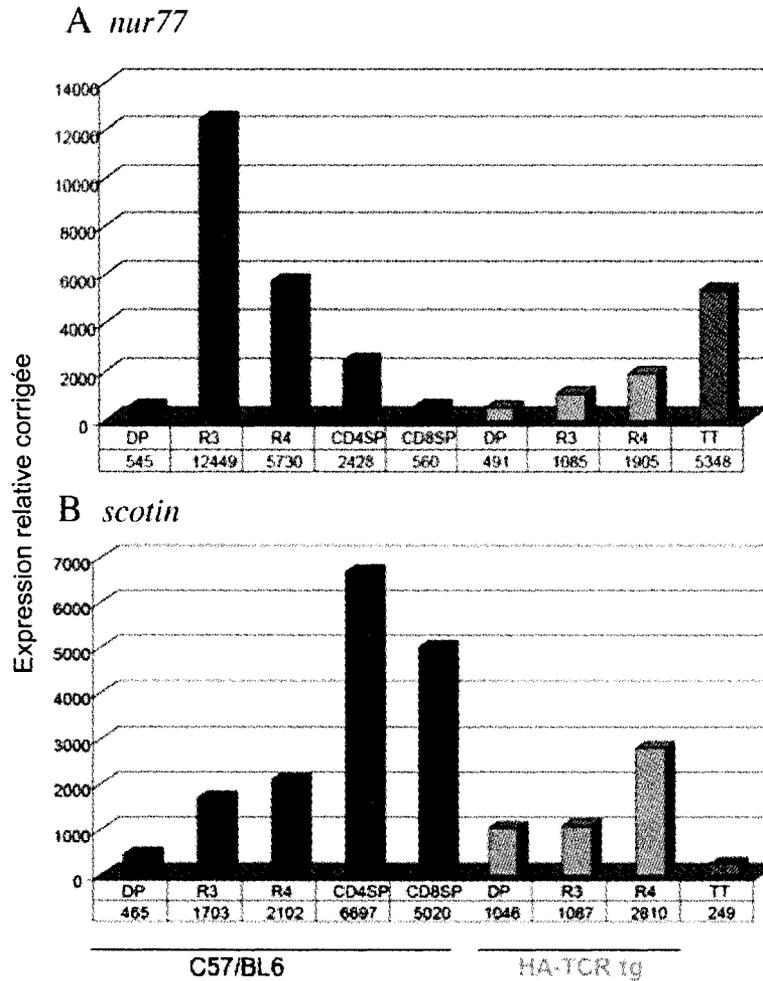


Figure 4. Modulation de *nur77* et de *scotin* chez un modèle murin de sélection positive.

Les sous-populations thymiques de souris C57/BL6 (foncé) et de souris HA TCR Tg (clair) ont été isolées à l'aide d'un trieur électronique. Des qPCR pour doser *nur77* (A) et *scotin* (B) ont été effectués sur les ADNc produits à partir de ces cellules. Les thymocytes totaux (TT) sont obtenus des souris C57/BL6 (tiré de Knapp 2003).

### 1.6.1 *scotin*

Ce gène, nommé *scotin*, a tout d'abord été identifié par le Dr Jean-Christophe Bourdon de l'Université de Dundee alors qu'il voulait découvrir des gènes transactivés par p53 (Bourdon et al., 2002). En réponse à l'exposition à des irradiations ionisantes, *scotin* est exprimée dans le thymus et la rate de souris p53+/+, mais pas chez les souris p53-/- . C'est une protéine transmembranaire de 25 kDa située au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire. La séquence protéique et les domaines fonctionnels de Scotin sont illustrés à la Figure 5.

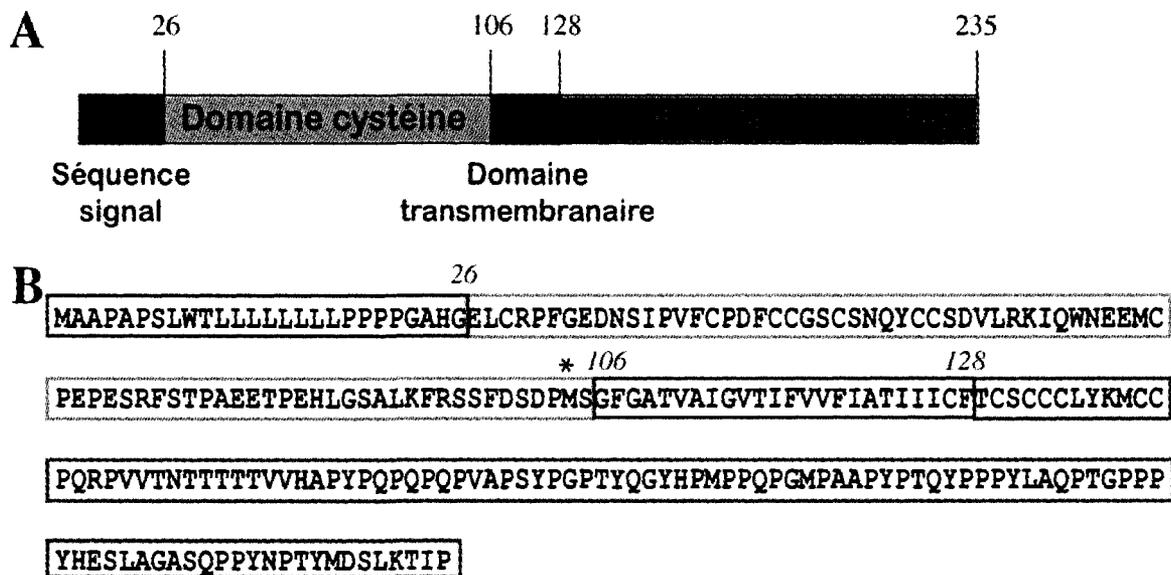


Figure 5. Représentation et séquence protéique de Scotin.

La protéine comprend (A) une séquence signal, un domaine transmembranaire, un domaine riche en résidus cystéine et un domaine riche en résidus proline. La position des acides aminés séparant les différents domaines protéiques est inscrite au-dessus de la figure. Scotin a un poids moléculaire de 25 kDa. Sa séquence protéique (B) est présentée. Scotin1 correspond à la forme complète de 235 acides aminés. L'astérisque représente le début de l'isoforme Scotin4 au niveau du domaine transmembranaire. Les domaines protéiques de la partie A sont encadrés.

Scotin induit l'apoptose lorsqu'exprimée de façon ectopique chez la lignée H1299 (Bourdon et al., 2002). De plus, lorsqu'on traite des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) pour stimuler la voie d'apoptose du 'ER stress' à l'aide d'un inhibiteur de la N-glycosylation (tunicamycin), on induit l'expression de Scotin. Si on inhibe sa synthèse via un ARN antisens, on empêche l'enclenchement de cette voie de mort. Lors de nos expériences de micropuces à ADN, *scotin* était fortement augmentée lors de la transition DP vers R3 et son expression restait soutenue chez les SP de C57/BL6. Tout comme ce qui était observé pour *nur77*, *scotin* n'est pas modulée chez les HA-TCR Tg. Donc, les caractéristiques de cette protéine, de même que son profil d'expression chez les sous-populations thymiques triées, nous ont poussés à émettre l'hypothèse que *scotin* est impliquée dans l'apoptose des thymocytes en sélection négative.

### ***1.6.2 Autres études analysant les sélections thymiques à l'aide de micropuces à ADN***

Au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche ont analysé le profil d'expression géniques des thymocytes en sélection en utilisant des micropuces à ADN. Utilisant différents modèles de souris Tg et différentes méthodes d'analyse de l'expression des transcrits, elles ont donné des résultats quelque peu divergents dans leur ensemble. Dans ce contexte, l'article le plus intéressant est certainement celui de Baldwin et Hogquist (Baldwin et Hogquist, 2007). Les auteurs ont utilisé une nouvelle version de la souris TCR Tg HY (HY<sup>cd4</sup>) qui exprime le TCR de façon plus physiologique (Baldwin et al., 2005). Ils ont comparé le profil d'expression des DP de souris mâles (sélection négative) avec celui des femelles (positive) et avec celui de souris sur un fond génétique ne permettant pas la sélection (contrôle sans sélection). Leur analyse a identifié certains gènes qui étaient modulés de façon identique à ce que nous observions avec nos expériences de micropuces sur les thymocytes en développement. Par exemple, tout comme nous, ils ont observé une augmentation des transcrits de *bim*, *gadd45b*, *ikB<sub>NS</sub>* et *nur77* dans le contexte de la sélection

négative. Cela valorise les résultats que nous avons obtenus avec les sous-populations thymiques triées représentant différent stade de maturation. De plus, ils ont fait une synthèse des données fournies par les différents articles utilisant une approche transcriptomique pour analyser le développement thymique au niveau moléculaire (Baldwin et Hogquist, 2007). Étonnamment, ce qui émane de cette comparaison est le fait que seulement deux transcrits sont modulés de façon identique lors de la sélection négative : *bim* et *nur77*. La nature des sous-populations utilisées pour les différentes analyses peut expliquer ces divergences. En effet, les auteurs ont tous utilisé des classes de thymocytes distinctes triées différemment pour faire leur étude. Par exemple, chez Baldwin *et al.*, les DP ont été analysés alors que dans un autre article, ce sont les cellules CD69+ TCR+ qui sont utilisées. Ces deux populations de thymocytes représentent des cellules à des stades de maturation différents. Nous reviendrons plus en détail sur cet article dans la discussion, car d'autres points intéressants en ont émané. Il faut dire que toutes ces études ont été effectuées avec des souris exprimant un TCR Tg. Notre approche est la seule, à notre connaissance, qui utilise des thymocytes normaux (Wt) pour l'analyse.

## **1.7 But du projet**

Le présent mémoire expose les données recueillies au cours d'un projet qui avait pour but d'obtenir des évidence fonctionnelles sur les rôles de *scotin* lors du développement thymique et d'aider à la caractérisation de cette protéine au niveau cellulaire.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Matériels

#### 2.1.1 Lignées cellulaires utilisées

##### *Bw5147*

Origine : lymphome thymique murin (ATCC TIB-47)

Phénotype : double négatif pour CD4 et CD8

Milieu de culture : DMEM (Dubelco Modified Eagle's Medium High Glucose 1X; Gibco) supplémenté avec Pen/Strep/L-Glu 1X (Wisent),  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,05% (Sigma), HEPES 2% (Gibco), CCS 10% déactivé (HyClone)

Conditions d'incubation : 37°C - 5% CO<sub>2</sub>

##### *RML11*

Origine : lymphome thymique murin

Phénotype : CD4 simple positif

Milieu de culture : DMEM supplémenté avec Pen/Strep/L-Glu 1X,  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,05%, HEPES 2% et CCS 10% déactivé

Conditions d'incubation : 37°C - 5% CO<sub>2</sub>

(Ehlers et al., 2003)

### *HEK 293T*

Origine : cellules embryonnaires humaines rénales (ATCC CRL-11268) contenant l'origine de réplication 'SV40 large T antigen'

Milieu de culture : DMEM supplémenté avec 5% de CCS et Pen/Step/L-Glu 1X

Conditions d'incubation : 37°C - 5% CO<sub>2</sub>

### *HeLa*

Origine : cellules épithéliales humaines du col de l'utérus prélevées d'un tissu cancéreux (ATCC CCL-2)

Milieu de culture : DMEM supplémenté avec 5% de CCS (HyClone) et Pen/Step/L-Glu 1X

Conditions d'incubation : 37°C - 5% CO<sub>2</sub>

### **2.1.2 Souris**

C57/BL6 (Charles River)

*scotinE2*<sup>-/-</sup> (Jean-Christophe Bourdon, Université de Dundee)

### 2.1.3 Anticorps

**Tableau 1. Anticorps primaires**

Anticorps	Conjugué	Clone	Espèce	Compagnie	Utilisation
Anti-CD8a	PE	Ly-2	Rat	BD Bioscience	FACS
Anti-CD4	PerCP Cy5	L3T4	Rat	BD Bioscience	FACS
Anti-CD69	APC	H1.2F3	Hamster	BD Bioscience	FACS
	PE	H1.2F3	Hamster	BD Bioscience	FACS
	Biotin	H1.2F3	Hamster	BD Bioscience	Tri cellulaire
Anti-TCR $\alpha\beta$	FITC	N/D <sup>1</sup>	N/D <sup>1</sup>	Pharmingen	Tri cellulaire
Anti-TCR chaîne $\beta$	APC	H57-597	Hamster	BD Bioscience	FACS
	Biotin	H57-597	Hamster	BD Bioscience	Tri cellulaire
Anti-CD25	Biotin	MEM -181	Souris	Serotec	FACS
Anti-KDEL	Aucun	10C3	Souris	Stressgen	Immunofluorescence indirecte
Anti Scotin (Jc105)	Aucun	Sérum polyclonal <sup>2</sup>	Lapin	Fournit par J-C Bourdon	Immunofluorescence indirecte

**Tableau 2. Anticorps secondaires**

Anticorps	Conjugué	Espèce	Compagnie	Utilisation
Anti-FITC	Microbilles	N/D <sup>1</sup>	Miltenyi	Tri cellulaire
Anti-Lapin IgG	Alexa-488	Chèvre	Molecular Probe	FACS
	Alexa-568	Chèvre	Molecular Probe	Immunofluorescence indirecte
	HRP	Chèvre	Pierce	Immunobuvardage
Anti-souris IgG	Alexa-488	Chèvre	Molecular Probe	Immunofluorescence indirecte
Streptavidin	APC	N/D <sup>1</sup>	BD Bioscience	FACS

1. Non Disponible

2. Généré par injection du peptide PYHESLAGASQPPYNPTYK qui correspond à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine Scotin murine (Bourdon et al., 2002)

## 2.2 Génotypage des souris *scotinE2* Knock out

Les souris *scotinE2* KO (non publié) nous ont été fournies gracieusement par le Dr Jean-Christophe Bourdon (Université de Dundee). Elles ont été élevées à l'animalerie de la Faculté de médecine et des sciences de la santé sous la supervision du Dr Abdelaziz Amrani. On a effectué le génotypage sur un échantillon d'oreille. Celui-ci a été immergé dans 30 µL de tampon de digestion (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, 0,5% SDS), on a ajouté 1 µL de protéinase K (10 mg/mL) et on a incubé une nuit à 55°C. Le lendemain, 465 µL d'eau ont été ajoutés. On a précipité les extraits (0,7 volume d'isopropanol, 0,4 M LiCl, 20 µg Glycogène), puis on les a lavés à l'éthanol 70%. Les culots ont été solubilisés dans 100 µL d'eau et par la suite, un PCR a été fait avec 4 µL des différents extraits d'ADN. Les PCR ont été effectués selon les indications présentées à la page suivante.

Mélange pour une réaction PCR :

Tampon Taq Pol*	2,5 µL	Scot-in-1F 100 ng/µl	0,69 µL
dNTPs 2 mM	2,5 µL	Sco-ex2-1R 100 ng/µl	0,69 µL
MgCl <sub>2</sub> 10 mM	4 µL	Neo-3' 100 ng/µl	0,69 µL
Bouillon LB	1 µL	Taq Polymerase (NEB)	0,13 µL
ADN	4 µL	5000 U/mL	
		H <sub>2</sub> O	9,3 µL

\* Composition : 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl

Les PCR ont été faits sur un appareil RoboCycler 40 (Stratagene) avec les cycles suivants :

96°C - 7 min	} 40 cycles
96°C - 1:15 min	
60°C - 1:15 min	
72°C - 1:15 min	
72°C - 5 min	

Les fragments amplifiés ont été analysés sur gels d'agarose 1 % pour déterminer les génotypes. Une bande à 366 pb était observable avec l'ADN des souris *scotinE2*<sup>-/-</sup>, une à 519 pb avec l'ADN des souris *scotinE2*<sup>+/+</sup> et ces deux bandes étaient visibles avec l'ADN des souris *scotinE2*<sup>+/-</sup>.

**Tableau 3. Amorces pour le génotypage des souris *scotinE2* délétées**

Primers	Séquence
Scot-in1-F	5'-TGAGGCAGAAGGGTAATCGCC
Scot-ex2-R1	5'-GGACTCTGGCTCAGGACACAT
Neo3'-F	5'-GGAAGACAATAGCAGGCAATGC

## 2.3 Tris cellulaires de thymocytes murins

Tous les tris cellulaires exposés ci-dessous sont basés sur l'expression différentielle du TCR et du CD69 lors de la maturation thymique.

### 2.3.1 Tri cellulaire des sous-populations thymiques murines R1/R2, R3 et R4

Un tri en deux étapes a été effectué pour cet isolement. Tout d'abord, on a séparé les thymocytes ayant une expression négative ou faible du TCR de ceux qui expriment fortement ce récepteur. Par la suite, les populations obtenues ont été triées selon l'expression de CD69 pour séparer les cellules positives pour ce marqueur de celles qui sont négatives. Les sous-populations qui ont été isolées sont les suivantes :  $CD69^{\text{négatif}}/TCR^{\text{négatif/faible}}$ , (R1/R2)  $CD69^{\text{positif}}/TCR^{\text{faible}}$  (R3),  $CD69^{\text{positif}}/TCR^{\text{fort}}$  (R4) et  $CD69^{\text{nulle}}/TCR^{\text{positif}}$  (R5). La dernière sous-population n'a pas été conservée. Voici, en détail, comment ces tris ont été effectués.

Deux souris femelles C57/BL6 ont été sacrifiées par euthanasie au  $CO_2$ . Tous les protocoles présentés dans ce mémoire se conforment aux normes et politiques du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et ont été acceptés par le Secteur santé sécurité en milieu de travail et d'étude (SSEMTE) de l'Université de Sherbrooke. On a extrait le thymus de façon à ce que le moins de sang possible ne soit répandu dans la cavité abdominale. Les thymocytes ont été récupérés en plaçant le thymus dans un Cell Strainer 40  $\mu\text{m}$  (BD Bioscience), en le découpant en lanières avec un scalpel puis en le broyant à l'aide du piston d'une seringue 1 mL (BD Bioscience). Ceci a été fait sur glace dans 10 mL de PBS/BSA 0,5% froid. Les thymocytes ont été comptés et  $3 \times 10^7$  cellules ont été centrifugées (300g, 7 min, 4°C). On a ensuite débuté par le tri basé sur les différents niveaux d'expression du TCR. On a

resuspendu les thymocytes dans une solution d'anticorps dilué dans du PBS 1X/BSA 0,5%.  
Voici les anticorps qui ont été utilisés :

- Anti-CD4 PerCP Cy5 (BD Bioscience) dilué 1/100
- Anti-CD8 PE (BD Bioscience) dilué 1/100
- Anti-CD69 biotin (BD Bioscience) dilué 1/100
- Anti-CD69 APC (BD Bioscience) dilué 1/100
- ***Anti- $\alpha\beta$  TCR FITC (Pharmlingen) dilué 1/500***

Des tests préliminaires ont été faits pour trouver la bonne quantité d'anti-TCR à utiliser pour permettre la liaison des cellules exprimant le TCR fortement uniquement. Cette mise au point s'est avérée utile pour les autres tris. De plus, des échantillons ont été conservés à chaque étape du protocole pour suivre la purification par cytométrie de flux avec le FACS Scan (BD Biosciences). L'analyse des marquages a été effectuée avec le logiciel CellQuest.

On a incubé la suspension cellulaire pendant 30 minutes sur glace, puis on a lavé une fois au PBS 1X/BSA 0,5%/EDTA 2mM. Le culot a alors été solubilisé dans 200  $\mu$ L d'une solution d'anti-FITC Multi Sort Microbeads (Miltenyi) préalablement dilué 1/12,5 dans du PBS/BSA/EDTA. On a incubé les cellules 15 minutes sur glace. Pendant ce temps, une colonne MACS LD (Miltenyi) a été équilibrée avec 3 mL de PBS/BSA/EDTA. Cette dernière a été placée sur l'aimant séparateur MACS. On a ajouté 500  $\mu$ L de PBS/BSA/EDTA aux cellules marquées. Par après, on a déposé la suspension cellulaire sur la colonne MACS LD, on a laissée écouler et puis on a récupéré le liquide dans un tube 5 ml en polystyrene (BD Bioscience). La colonne a été lavée 2 fois avec 1 mL de PBS/BSA/EDTA. Les trois fractions qui constituaient la partie négative du tri (TCR négatif/faible) ont été combinées. On a déposé 1 mL de PBS/BSA/EDTA sur la colonne et on a forcé les cellules de la fraction

positive (TCR fort) à quitter les billes en appliquant une pression à l'aide du piston fourni par Miltenyi. Les cellules des deux fractions récupérées ont été mises dans un Falcon 15 mL pour les centrifuger (300g, 7 min, 4°C). Pendant ce temps, on a équilibré une colonne MACS MS (Miltenyi) et une colonne MACS LD (Miltenyi) avec du PBS/BSA/EDTA. Les culots obtenus sont solubilisés dans 500 µL de PBS/BSA/EDTA. Le tri négatif a été recommencé comme précédemment sur une colonne MACS LD avec la fraction TCR faible. Pour la fraction TCR élevé solubilisée, on l'a déposé sur la colonne MACS MS. Cette dernière a été lavée trois fois avec 500 µL de PBS/BSA/EDTA. La fraction positive de ce tri a été récupérée en déposant 1 mL de PBS/BSA/EDTA sur la colonne, puis en poussant à l'aide du piston. Alors, après ce deuxième tri, les cellules triées provenant de la fraction négative obtenue avec la colonne MACS LD (TCR faible) et de la fraction positive de la colonne MACS MS (TCR fort) ont été centrifugées (300g, 7 min, 4°C). On a solubilisé les culots dans 150 µL (TCR faible) et 100 µL (TCR fort) de IMag Steptavidin Particules Plus-DM (BD Bioscience) pour le tri utilisant CD69. Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 4°C. On a ajouté 900 µL de PBS 1X/BSA 0,5% aux deux suspensions cellulaires puis, les tubes ont été placés sur un aimant Magnetic Separation Rack (NEB) pour 8 min à 4°C. Des tubes eppendorfs de 2 ml ont été utilisés, cela facilite les manipulations sur l'aimant. Les surnageants ont été enlevés doucement. À partir de cette étape, les cellules ont été traitées différemment.

*-Pour la fraction négative du tri Miltenyi (TCR faible)*

Les billes magnétiques ont été conservées, elles contenaient les cellules R3. On a effectué 3 lavages avec 1 mL de PBS 1X/FBS 3% sur ces billes magnétiques. Pour ce qui est du premier surnageant qu'on a obtenu après l'incubation sur l'aimant, on l'a placé dans un tube 2 mL qu'on a centrifugé (300g, 6 min, 4°C) et par la suite, on a ajouté 150 µL de IMag Steptavidin Particules Plus-DM (BD) au culot. On l'a incubé 30 minutes à 4°C, puis on a récupéré les cellules négatives à l'aide de l'aimant comme indiqué plus haut. Cette fraction contenait les cellules R1/R2 double positive. On a centrifugé les deux fractions triées ici

(300g, 6 min, 4°C) et puis, on a ajouté 600 µL de Lysis buffer + β-mercaptoéthanol du kit RNA Absolutely (Stratagene) aux culots. Ces lysats d'ARN ont été conservés à -80°C et ils ont servi lors des études ultérieures par qPCR.

*-Pour la fraction positive du tri Miltenyi (TCR fort)*

On a effectué 3 lavages avec 1 mL de PBS 1X/BSA 0,5% sur les billes IMag. Les billes ont lié les cellules R4 semi-matures. Après les lavages, 600 µL de Lysis buffer + β-mercaptoéthanol du kit RNA Absolutely (Stratagene) ont été ajoutés aux billes récupérées avec l'aimant NEB. Les lysats d'ARN ont été conservés à -80°C et ils ont servi lors des études ultérieures par qPCR.

### ***2.3.2 Tri cellulaire des sous-populations thymiques murines R1/R2 et R3/R4***

Pour obtenir les cellules R1/R2, nous avons déplété une solution de thymocytes de toutes les cellules qui expriment soit le TCR fortement ou CD69. Pour récupérer les sous-populations R3/R4, nous avons isolé les cellules exprimant le TCR et CD69. Une souris femelle C57/BL6 de 3 à 10 semaines a été sacrifiée par axphyxie au CO<sub>2</sub>. Nous voulions séparer les thymocytes en deux groupes de cellules : les immatures et les matures. Les thymocytes ont été récupérés et marqués dans 100 µL de PBS 1X/FBS 3% contenant les anticorps suivants :

<b><i><u>R1/R2</u></i></b> :	anti-CD69 biotin (BD bioscience)	1/100
	<b><i>anti-TCR chaîne β biotin (BD bioscience)</i></b>	<b><i>1/500</i></b>
	anti-CD69 PE (BD bioscience)	1/100
	anti-TCR chaîne β APC (BD bioscience)	1/100

<u>R3/R4</u> :	anti-CD69 biotin (BD bioscience)	1/100
	<b><i>anti-TCR chaîne <math>\beta</math> biotin (BD bioscience)</i></b>	<b><i>1/100</i></b>
	anti-CD69 PE (BD bioscience)	1/100
	anti-TCR chaîne $\beta$ APC (BD bioscience)	1/100

Ces marquages ont été effectués dans des tubes séparés avec  $1 \times 10^7$  thymocytes pour chacune des conditions. Les cellules ont été incubées 30 minutes sur glace et lavées une fois au PBS/FBS. Les culots cellulaires lavés ont été solubilisés avec 100  $\mu$ L de IMag Streptavidin Beads (BD Biosciences) puis, incubés pour 30 minutes sur glace. On a ajouté 900  $\mu$ l de PBS/FBS et on a placé les cellules sur l'aimant de NEB pour 15 minutes à 4°C. Les cellules pour les tris des R1/R2 et des R3/R4 ont été traitées différemment à partir de cette étape.

Pour le tri des R1/R2, la fraction positive obtenue après l'incubation sur l'aimant a été jetée. Le surnageant a été centrifugé puis resuspendu avec du PBS/FBS. On a répété l'étape de liaison sur les IMag Streptavidin Beads (BD Biosciences) comme exposé ci-dessus et on a conservé la fraction négative. Ces cellules ont été centrifugé et pour la coloration de la protéine Scotin (voir protocole 2.5).

Pour le tri R3/R4, on a jeté le surnageant obtenu après l'incubation sur l'aimant et on a conservé le culot. Les cellules étant liées aux billes magnétiques peuvent être retenues avec l'aimant de NEB. Ce dernier a donc été utilisé pour laver trois fois les cellules avec 1 mL de PBS/FBS. Celles-ci ont été conservées pour la coloration de la protéine Scotin (voir protocole 2.5).

### **2.3.3 Tri cellulaire des thymocytes murins DP**

Nous avons isolées les cellules R1/R2, qui sont presque exclusivement DP, comme exposé à la section 2.3.1. Une souris femelle C57/BL6 âgée entre 3 et 10 semaines a été sacrifiée par asphyxie au CO<sub>2</sub>. Les thymocytes ont été récupérés et marqués dans du PBS 1X/FBS 3% comme suit :

- anti-CD4 PerCP Cy.5 (BD bioscience) 1/100
- anti-CD8a PE (BD bioscience) 1/100
- anti-CD69 biotin (BD bioscience) 1/100
- ***anti-TCR chaîne  $\beta$  biotin (BD bioscience) 1/500***

Le marquage a été effectué sur glace pour 30 minutes. On a lavé les cellules 2 fois au PBS/FBS et on les a solubilisées dans 100  $\mu$ L de IMag Streptavidin Beads. On les a incubées 30 minutes sur glace, on a ajouté 900  $\mu$ L de PBS/FBS et on a placé le tube sur l'aimant de NEB pour 15 minutes à 4<sup>0</sup>C. Après ce temps d'incubation, le surnageant contenait les cellules DP. On les a récupérées, lavées puis, solubilisées de nouveau dans 100  $\mu$ L de IMag Streptavidin Beads (BD Bioscience). Les étapes d'incubation sur l'aimant ont été recommencées une autre fois et puis, les cellules obtenues ont été exposées au PMA et à l'ionomycin (voir protocole 2.8).

## **2.4 Révélation de la Scotin sur des coupes de thymus de souris C57/BL6 enrobées dans la paraffine**

Une souris femelle C57/BL6 a été sacrifiée à l'aide du CO<sub>2</sub>. On a prélevé le thymus et on l'a immergé dans une solution de PBS/paraformaldéhyde (PFA) 4%. L'enrobage et les coupes au microtome ont été effectués par Mr François Desharnois du service d'Histologie et de Pathologie du CHUS. Les coupes étaient d'une épaisseur de 5 µm.

Pour la coloration de Scotin avec l'anticorps Jc105 (gracieusement fourni par Dr Bourdon) sur des coupes en paraffine, il a fallu procéder à une restitution des antigènes qui pouvaient être modifiés par la PFA. D'abord, il a fallu prétraiter les lames pour enlever l'enrobage à la paraffine. Toutes les incubations se déroulaient à la température de la pièce si non-spécifié. Le TBS 1X provenait d'une solution stock TBS 10X (Tris base 1M, NaCl 1,5M pH 7.5).

On a immergé séquentiellement les lames dans les solvants suivants:

- 3 fois 3 minutes dans xylène 100%
- 3 fois 2 minutes dans éthanol 100%
- 1 fois 3 minutes dans éthanol 90%
- 1 fois 3 minutes dans éthanol 80%
- 1 fois 3 minutes dans éthanol 70%
- 1 fois 3 minutes dans éthanol 50%
- 1 fois 2 minutes dans eau

Par la suite, les cellules ont été perméabilisées. On a déposé quelques millilitres de TBS-Triton-Saponine (TBS 1X, Triton X-100 0,5%, Saponine 0,1%) pour recouvrir la coupe, on a incubé 15 minutes puis, on a trempé les lames 2 fois 2 minutes dans l'eau. Dans un

autocuiseur (cocotte-minute), les lames ont été immergées dans une solution de *Heat Induce Epitope Retrieval* (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) pour 9 minutes dans une eau en ébullition. Après ce traitement, on a trempé les coupes 2 minutes dans l'eau. On a déposé assez de TBS-Glycine (TBS 1X, Glycine 0,4M) pour recouvrir la coupe et on a incubé 10 minutes. Par la suite, du TBSB (TBS 1X, BSA 1%, lait en poudre 1%) a été ajouté et on a incubé 30 minutes pour le blocage. L'anticorps primaire est le Jc105. La journée avant le marquage, on a dilué celui-ci 1/1000 dans le TBSB puis on l'a déplété de sa non spécificité en utilisant un extrait protéique de cellules HeLa sous forme de poudre d'acétone. On a déposé 100 µL de la dilution sur la coupe et on l'a incubée 120 minutes. Les lames ont été lavées 3 fois 3 minutes avec 100 µL de TBS 1X. On a incubé 60 minutes en présence de 100 µL de la solution d'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin Alexa 568; Molecular Probe) qui avait été préalablement dilué 1/500 dans le TBSB. Les lames ont été lavées 3 fois 3 minutes avec 100 µL de TBS 1X. Les noyaux ont été colorés avec une solution de Sytox Green (Molecular Probe) diluée 1/25 000 dans le TBS 1X. Les lames ont été lavées 2 fois 3 minutes avec de l'eau. Ensuite, il a fallu les recouvrir d'une lamelle. Pour cela, il a suffi de placer une goutte de Prolong Anti-Fade (Invitrogen) sur les lames et d'y déposer une lamelle par après. On a laissé le tout sécher pendant 18-24 heures avant d'effectuer les observations à l'aide du microscope Olympus 1X70.

## **2.5 Coloration intracellulaire de la Scotin chez les sous-populations thymiques R1/R2 et R3/R4 de souris C57/BL6 triées**

Les cellules R1/R2 et R3/R4 triées et lavées (voir section 2.3.2) ont été solubilisées avec 250 µL de PBS 1X/ PFA 4% puis incubées pour 30 minutes à 4°C. On a ajouté par la suite 250 µL de PBS 1X/Triton 0,15% et on a incubé 18 heures à 4°C. La coloration intracellulaire de Scotin a été effectuée en plaque de 96 puits à fond conique (Corning). Les cellules fixées et

perméabilisées ont été transférées dans cette plaque. On les a lavées trois fois avec du PBS 1X/FBS 3% puis, on les a solubilisées dans la solution d'anticorps primaire Jc105 dilué 1/2500 dans le PBS/FBS. Par la suite, on a incubé les cellules pendant 2 heures sur glace. Les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS/FBS. On a incubé ces dernières avec l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin Alexa 488 (Molecular Probe) dilué 1/500 dans du PBS/FBS pour une heure sur glace. Les cellules ont été lavées de nouveau comme précédemment. Elles ont finalement été solubilisées dans du PBS/FBS et analysées au FACS Scan pour les marqueurs de surface CD69-TCR et pour Scotin intracellulaire.

## **2.6 Mesure de l'apoptose chez les différentes cellules et lignées cellulaires**

On a utilisé la trousse Apoptosis Detection Kit (Sigma) selon les instructions du manufacturier. On a diminué de moitié toutes les quantités de réactifs suggérées.

## **2.7 Induction de l'apoptose chez les thymocytes double positif de souris C57/BL6**

Nous avons basé notre protocole d'induction des thymocytes immatures sur celui suggéré par le groupe du Dr Verdin (Dequiedt *et al.*, 2003, Parra *et al.*, 2005). Après le tri, les DP ont été solubilisés dans du milieu de sélection (milieu RPMI 1640 (Gibco), PEN/Strep/L-Glu 1X,  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,35%, HEPES 2%, CCS 10% désactivé et déplété). Pour préparer ce milieu, on devait désactiver le complément dans le sérum en le chauffant pendant 15 minutes à 56°C, mais il devait aussi être déplété des glucocorticoïdes endogènes. Ceci a été effectué en ajoutant 0,05% de Dextran et 0,5% de charbon activé avant l'inactivation. Lorsqu'on a mis le CCS dans le milieu, on a dû filtrer ce dernier avec un filtre 0,2  $\mu$ m pour le stériliser. On a

déposé  $4 \times 10^6$  cellules par mL dans les puits d'une plaque 12 puits (Corning). Pour débiter l'induction, on a ajouté 10 ng/mL de PMA et 250 ng/mL d'ionomycin. Les cellules sont alors incubées à 37°C-5% CO<sub>2</sub>. Les DP ont été récupérés aux temps 0, 30 minutes, 1, 2, 4 et 8 heures dans le but de doser l'apoptose et de produire des lysats d'ARN avec la trousse RNA Absolutely (Stratagene). À titre de contrôle, des DP non induits ont été incubés et récupérés de façon identique à leur contre partie. L'apoptose a été dosée avec la trousse Apoptosis Detection (Sigma) comme exposé au protocole 2.5.

## **2.8 Transfection des cellules HeLa avec les isoformes de *scotin* pour la mesure de l'apoptose**

Le premier jour de transfection,  $3,5 \times 10^5$  cellules HeLa ont étéensemencées en pétri 60 mm (Starstedt). On les a laissées croître 24 heures. Les vecteurs d'expression pSVE Scotin (*scotin1*), pCIScot4.3 (*scotin4*) et EBS-NPL (contrôle vecteur vide) ont été utilisés. En suivant les indications du manuel d'instruction d'Invitrogen, 2,4 µg de plasmide ont été transfectés en présence de 6 µL de Lipofectamine 2000, le tout dilué dans du milieu sans sérum Opti MEM-I (Gibco). On a inclus 0,5 µg du plasmide hsCD25 dans le mélange comme contrôle de transfection. Après 18 heures, les cellules ont été lavées au PBS 1X et on a rajouté du DMEM supplémenté. Après 48 heures de transfection, les cellules ont été récupérées, marquées à l'aide de l'anticorps souris anti-CD25 humain biotin (Serotec) dilué 1/200, lavées au PBS/BSA 0,5% puis, incubées avec SA-APC 1/200 (BD Bioscience). Après cette coloration, on a dosé l'apoptose comme décrit précédemment (protocole 2.5). Seules les cellules exprimant CD25 ont été incluses dans le calcul du nombre de cellules annexinV positives.

## 2.9 Immunofluorescence sur les cellules HeLa transfectées avec les isoformes de *scotin*

Les cellules HeLa ont été ensemencées sur des lamelles de verres (Fisher, diamètre 15 mm) déposées dans une plaque 6 puits (Corning). On a effectué l'ensemencement à une densité de  $3,6 \times 10^5$  cellules par puits. Après 24 heures de croissance, on a transfecté les HeLa avec les isoformes de *scotin* en utilisant 2,4 µg de plasmides (pSVE Scotin pour *scotin1* ou pCI Scot4.3 pour *scotin4*) en présence de 6 µL de Lipofectamine 2000 selon les instructions du fabricant. Après 18 heures de culture, on a lavé les cellules au PBS 1X et on a ajouté du DMEM. Après 48 heures de transfection, les cellules ont été lavées une fois au PBS 1X puis fixées au PBS/PFA 4% pour 15 minutes à 4°C. On a lavé les lamelles avec du PBS 1X et on les a conservées à 4°C dans du PBS/PFA 0,4% jusqu'à utilisation. Toutes les manipulations pour le marquage aux anticorps ont été effectuées à la température de la pièce.

Les lamelles ont été lavées pour trois minutes selon la séquence suivante : PBS 1X, PBS 1X/Glycine 0,4M et PBS 1X. On a perméabilisé les cellules en déposant les lamelles sur une solution de PBS/Triton X-100 0,2% pendant 2,5 minutes. Les lamelles ont dû être lavées dans 3 mL de PBS 1X trois fois trois minutes. On a bloqué les lamelles en y déposant quelques gouttes de PBS 1X/FBS 3% et incubant pour 30 minutes. On a dilué les anticorps primaires dans cette même solution à une concentration de 1/1000 (lapin anti-Scotin C-terminale de souris; Jc105) et de 1/200 (souris anti-KDEL de souris; Stressgen). La solution de Jc105 a préalablement été déplétée avec un extrait protéique de cellules HeLa (poudre d'acétone). L'incubation a duré une heure. Les lamelles ont été lavées comme précédemment au PBS 1X. Les anticorps secondaires qui ont été utilisés sont le chèvre anti-lapin alexa 568 et le chèvre anti-souris alexa 488 (Molecular Probe). On a incubé une heure avec une solution diluée 1/500 dans du PBS/FBS pour les deux anticorps. Les lamelles ont été lavées au PBS 1X tel qu'exposé plus haut. Pour le montage sur les lames de microscope, on a déposé une goutte de ProLong Gold AntiFade avec Dapi (Molecular Probe), qui colore les noyaux en bleu, et on a déposé les lamelles sur cette goutte. Les lames devaient être séchées toute la nuit à la température de la pièce avant de les observer à l'aide du microscope Zeiss Imager.Z1.

## 2.10 Génération de vecteurs rétroviraux shRNA contre diverses formes de *scotin* et création de lignées cellulaires stables pour leur expression

Les vecteurs d'expression pour shRNA ont été produits à l'aide du système pSuperRetroPuro (Invitrogen). Le tableau 4 montre les séquences des différents oligos qui ont été synthétisés dans le but de générer les divers vecteurs.

**Tableau 4. Séquence des shRNA contre les isoformes de *scotin***

Nom du shRNA	Orientation	Séquence
ShRNA Scotin (E2)-211	Sens	5'GATCCCCGACAATTCGATCCCAGTGTTTCA AGAGAACACTGGGATCGAATTGTCTT TTTTC
	Antisens	5'TCGAGAAAAAAGACAATTCGATCCCAGTG TTCTCTTGAAACACTGGGATCGAATTGTCTG G
ShRNA Scotin (E5)-296	Sens	5'GATCCCCGTCCAGTGGAATGAGGAAATTT CAAGAGAATTCCTCATTCCACTGGATTTTT TC
	Antisens	5'TCGAGAAAAAATCCAGTGGAATGAGGAA ATTCTCTTGAAATTCCTCATTCCACTGGAC GGG
ShRNA Scotin (E2)-552	Sens	5'GATCCCCGCACCACAACACTACTACCGTGTTCC AAGAGACACGGTAGTAGTTGTGGTGTTTTTT C
	Antisens	5'TCGAGAAAAAACACCACAACACTACTACCGT GTCTCTTGAACACGGTAGTAGTTGTGGTGCG GG
ShRNA Scotin (E5)-560	Sens	5'GATCCCCGCTACTACCGTGGTTCATGCTTC AAGAGAGCATGAACCACGGTAGTAGTTTTT TC
	Antisens	5'TCGAGAAAAAACTACTACCGTGGTTCATG CTCTCTTGAAGCATGAACCACGGTAGTAGC GGG
ShRNA Contrôle (MARCH8)	Sens	5'GATCCCCGCAACATTTCTAAGGCTGGTTCA AGAGACCAGCCTTAGAAATGTTGCTTTTTTA T
	Antisens	5'CGATAAAAAAGCAACATTTCTAAGGCTGG TCTCTTGAACCAGCCTTAGAAATGTTGCGGG

Deux séries d'oligos ciblent *scotin1* et deux autres ciblent les transcrits communs de *scotin*. Les séquences des shRNA ont été obtenues à l'aide du programme siRNA Template Design Tool (Ambion). Un shRNA contrôle contre MARCH8 a aussi été utilisé aux cours de nos différentes expériences. Les oligos sens et antisens ont été appariés en les plaçant dans de l'eau bouillante pour 10 minutes et par la suite, en laissant l'eau revenir à la température de la pièce (environ 3-5 heures). Il a ensuite suffi de suivre les instructions d'Ambion pour la ligation des oligos shRNA dans les vecteurs pSuperRetroPuro.

Les transfections transitoires des cellules HeLa ont été faites comme exposé au protocole 2.8. On a inclus 2,0 µg du plasmide pSuperRetroPuro shRNA voulu et 0,5 µg de pSVE Scotin dans le mélange de transfection.

Pour la production des rétrovirus, les transfections des cellules HEK 293T ont été effectuées à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Dans un pétri 100mm (Starstedt), on aensemencé  $4,5 \times 10^5$  cellules HEK 293T. Après 24 heures, on a transfecté celles-ci avec un mélange de 30 µL de Lipofectamine 2000, 7,5 µg d'un des plasmides pSuperRetroPuro.shRNA (Scotin 211, Scotin 552 ou MARCH8) et 7,5 µg de pAmpho. Le mélange a été effectué dans 750 µl d'Opti-MEM-I. On a procédé comme pour toutes les autres transfections à la Lipofectamine 2000 (voir protocole 2.8 Le lendemain, le surnageant cellulaire a été récupéré, filtré sur 0,45 µm et on y a ajouté du polybrene (bromure d'hexadiméthrine; Sigma) à une concentration finale de 4 µg/mL. Ces surnageants ont été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  en aliquots de 1,5 mL.

Entre temps, des thymomes RML11 et Bw5147 ont été ensemencés à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules par T25 (voir protocole 2.11 pour le milieu utilisé). Le lendemain, on a enlevé le milieu de culture, ajouté 1,5 mL des suspensions rétrovirales et incubé les cellules 1 heure à  $37^\circ\text{C}$ . Cela fait, il a fallu ajouter 4 mL de milieu supplémenté contenant  $4 \mu\text{g/mL}$  de polybrene. Les cellules ont été infectées ainsi pendant 24 heures et on a ensuite procédé à la sélection via la puromycinD en ajoutant  $1 \mu\text{g/ml}$  à chaque pétri. Cette sélection a duré 3 jours. Par la suite, les cellules ont été passées et toujours cultivées en présence de  $500 \text{ ng/ml}$  de puromycinD.

### **2.11 Western blot de Scotin à partir de cellules HeLa transfectées**

Les extraits protéiques des cellules HeLa ont été effectués avec un tampon RIPA (NP-40 1%, EDTA 2 mM, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, deoxycholate de sodium 1%, vanadate de sodium 0,2 mM, fluorure de sodium 10 mM, Tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7.2, Complete mini (Roche) 1X). On a dissout les culots cellulaires dans ce tampon, on les a incubés 15 minutes sur glace, puis on les a centrifugés pour 15 minutes ( $13000g$ , 15 minutes,  $4^\circ\text{C}$ ). On a transféré les surnageants dans des tubes eppendorfs et on leur a ajouté 15% de glycérol final. On a effectué le dosage des extraits protéiques par spectrophotométrie (Ultrospec 2100 pro; Biochrom) à 595 nm grâce à la réaction de Bradford (BioRad). Les extraits ont été conservés à  $-20^\circ\text{C}$ .

Les extraits protéiques ont été dilués dans le tampon de chargement pour obtenir une concentration finale de 1X (Tampon de chargement 2X : Tris-HCl pH 6,8 125 mM, SDS 6%, glycérol 20%, bromophénol blue 0,02%). On a déposé  $25 \mu\text{g}$  des extraits protéiques de HeLa transfectées sur gel. Des gels de tris/tricine à 4% de bis-acrylamide pour le gel concentrateur et à 16% pour le séparateur ont été utilisés. Les réactifs nécessaires à la fabrication du gel ont

été mélangés dans le tampon pour gel (Tris-HCl 3M pH 8,45, SDS 0,3%). Ce dernier a été migré à l'aide de deux tampons. Dans le compartiment du haut, on avait un tampon 1X contenant de la tricine (10X ; Tris-HCl 1M, Tricine 1M, SDS 1%). Le bas du gel trempait dans un tampon tout autre (10X ; Tris-HCl 2M pH 8,9) qui devait être aussi utilisé à 1X. Les gels ont migré à 100V pour 3 heures.

On a préparé le transfert en faisant tremper le gel dans la solution de transfert (Tris base 48 mM, glycine 2,5 M, SDS 1%) pour 30 minutes avec agitation. Les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (Immuno blot PVDF membrane, Bio Rad). On l'a trempée successivement dans : méthanol 100% 30 secondes, eau distillée 2 minutes, tampon de transfert 15 minutes. Le transfert s'est effectué pendant 40 minutes à 10 V dans un Trans blot SD Semi-Dry Transfert Cell (Bio Rad). La membrane de PVDF a été conservée et on a procédé au blocage à l'aide de TBS 1X (Solution mère 10X : Tris base 0,5M, NaCl 1,5 M, pH 7,5) + Tween 20 0,1% + lait écrémé 5% pour une heure à la température de la pièce avec agitation. Par la suite, on a hybridé avec l'anticorps primaire Jc105 dilué 1/500 dans le liquide de blocage. Ce mélange a été préalablement déplété de sa non-spécificité à l'aide d'un extrait protéique de cellules HeLa (poudre d'acétone). L'hybridation avec Jc105 a été faite à 4<sup>0</sup>C pendant 18 heures et puis à la température de la pièce pour 1 heure, toujours sous agitation. On a lavé la membrane cinq fois sept minutes avec du TBS/Tween 20 0,1% en agitant. On a procédé à l'hybridation avec l'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin couplé au HRP; Pierce) dilué 1/2500 dans la solution de blocage. On a incubé une heure à la température de la pièce avec une agitation constante. On a fini en lavant cinq fois comme précédemment. Les membranes ont été révélées avec la solution West Dura (Pierce). Les films utilisés pour l'exposition proviennent de la compagnie Pierce ( CL-X Posure Film Clear Bleu X-Ray Film). Le développement des films a été effectué avec les solutions de Kodak (GBX developer and replenisher et GBX fixer and replenisher).

## **2.12 Induction des lignées de thymomes RML11 et Bw5147 avec le PMA et l'Ionomycin**

Le jour avant l'induction de l'apoptose, on aensemencé  $9 \times 10^5$  cellules des lignées RML11 et Bw5147 en T25 (Sarstedt) et on les a incubées pendant 18 heures. On a ensuite ajouté 10 ng/mL de PMA et 250 ng/mL d'ionomycin aux cellules tests. Les cellules ont été récupérées aux temps 0, 6, 12, 24 et 48 heures pour doser l'apoptose (voir protocole 2.) et pour faire des lysats d'ARN. Les inductions ont été faites tant sur les lignées mères que sur les lignées transfectées de façon stables avec les vecteurs shRNA.

## **2.13 Extraction d'ARN, production d'ADNc et PCR quantitatif**

L'ARN a été extrait avec la trousse Absolutely RNA mini prep kit (Stratagene). Une fois dosé au spectrophotomètre, on a précipité les ARN (2,5 volumes d'éthanol 100% froid, 0,4 M LiCl et 20 ug de glycogène) et on les a solubilisés dans 10 µL d'eau DEPC (RNase Free). Les ADNc ont été produits avec les réactifs du Expand Reverse Transcriptase kit (Roche). Pour ce faire, on utilisait 1,5 µg des ARN obtenus.

Les qPCR ont été effectués avec le Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Ici aussi, on utilisait la moitié moins de réactif que prescrit par la compagnie. Pour tout le reste, nous avons suivi les instructions du fournisseur. La réaction de PCR a été faite sur l'appareil Mx3000P (Stratagene). L'analyse a été effectuée avec le logiciel MxPro. Pour vérifier la nature des séquences amplifiées, nous avons déposé une partie de la réaction PCR sur gel d'agarose 1,2% pour s'assurer de la taille du produit. Les mêmes courbes standard ont été utilisées pour un gène donné à chaque expérience effectuée. Pour *bim*, *HPRT* et *nur77*, on utilisait des dilutions 1/5, 1/50 et 1/500 d'ADNc de la lignée cellulaire DO11.10,

car elle exprime une quantité facilement détectable de ces transcrits. Pour les différentes formes de *scotin*, nous avons cloné des parties spécifiques de leur séquence dans des plasmides pour doser le nombre de copies. En amplifiant  $10^7$ ,  $10^5$  et  $10^3$  copies de ces plasmides, il nous était possible de quantifier le nombre de transcrits présents dans un échantillon d'ADNc. Les valeurs obtenues pour chaque ADNc ont été corrigées en divisant la valeur d'expression du gène donné par la valeur d'expression de HPRT pour ce même échantillon.

Le tableau ci-dessous présente une liste des amorces utilisées pour le dosage des différents gènes. Ces amorces ont été générées grâce au programme Primer Select.

**Tableau 5. Amorces pour le dosage des ARNm par PCR quantitatifs**

Gènes	Orientation	Séquences
<i>bim</i>	Sens	5'- GGCCCTCGTCCACCCAATGTCT
	Antisens	5'- CCTTCGCCGTCGGGATTACCTT
<i>HPRT</i>	Sens	5'- GCT GGT GAA AAG GAC CTC T
	Antisens	5'- CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC
<i>nur77</i>	Sens	5'- ACC CCA CTA TTT GTC TTA TCC CTC CAG
	Antisens	5'- CCC CAC CCC TTC CTC CCA ACC
<i>scotin1</i>	E1/E2 F1	5'- CGCCTCCGGGTGCCCAT
	E4 R1	5'- GGGAATCCATGTAGGTCGGGTTGT
<i>scotin4</i>	e-alt2/E3 F1	5'- GCTTTAGTGTGCCCAAGAAGAGTA
	E4 R1	5'- GGGAATCCATGTAGGTCGGGTTGT
<i>scotin5</i>	e-sarf F1	5'- TCAGGAATGGGGAAGACTAAGGGATAAGA
	E4 R1	5'- GGGAATCCATGTAGGTCGGGTTGT
Transcripts communs de <i>scotin</i>	E4 F1	5'- ACCTGCTCCTGCTGCTGTCTGTAT
	E5 R1	5'- GGATGGTAGCCCTGGTATGTTGG

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1 Expression protéique de Scotin dans le thymus et les thymocytes murins C57/BL6

Différents résultats obtenus lors d'une étude préliminaire nous ont amenés à émettre l'hypothèse que Scotin est associée à la sélection négative (Knapp, 2003). Afin de connaître son profil d'expression protéique chez la souris, nous nous sommes penchés sur la production de Scotin au niveau du thymus à l'aide de l'immunofluorescence. Tout d'abord, nous avons effectué des coupes en paraffine de 5  $\mu\text{m}$  sur des thymus entiers de souris C57/BL6. En colorant ces coupes à l'aide du marqueur nucléaire Sytox Green (Figure 6A), il est possible de distinguer les différentes zones histologiques du thymus à un grossissement de 200 fois. Le cortex est la région qui est très riche en cellules, et on y voit donc une forte coloration verte (identifiée par un C dans la Figure 6).

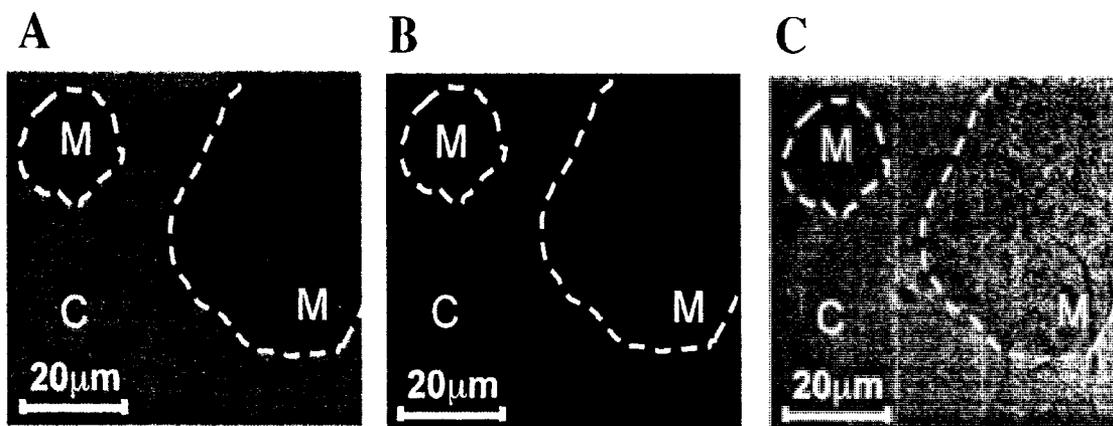


Figure 6. Localisation de Scotin au niveau du thymus murin.

Des coupes en paraffine de thymus de souris C57/BL6 ont subi une coloration nucléaire au Sytox Green (A) de même qu'un marquage de Scotin avec l'antisérum Jc105 suivi d'une hybridation avec un anticorps secondaire (B). Les régions du cortex (C) et de la médulla (M) sont identifiées sur les différentes images. La superposition des colorations est présentée (C).

La médulla est la région où la coloration verte est plus faible, où l'on retrouve moins de cellules (identifiée par un M dans la Figure 6). Les coupes en paraffine ont été colorées avec l'antisérum Jc105 qui reconnaît un épitope carboxy-terminal de Scotin (Bourdon et al., 2002). Un protocole spécial de réactivation des antigènes a dû être utilisé, car le PFA utilisé pour la fixation amène un pontage chimique réversible de l'épitope reconnu par Jc105 et l'antisérum ne peut plus le lier par après. Par un traitement à la chaleur en présence d'un chélateur de calcium, on a réussi à éliminer ce pontage et à marquer Scotin avec Jc105 sans devoir recourir aux coupes en congélation ou à toute autre méthode de fixation des tissus plus exigeantes que le PFA. L'observation de la coloration de la protéine Scotin à un grossissement de 200 fois montre que cette dernière est exprimée presque uniquement dans la médulla (Figure 6B). Si on effectue une superposition de la coloration nucléaire et de Scotin (Figure 6C), on ne voit que quelques rares cellules corticales qui émettent un signal pour cette dernière. Il est aussi à noter que la majorité, si ce n'est la totalité, des cellules médullaires expriment Scotin. Donc, cette protéine est fortement produite dans la région thymique qui contient les cellules les plus matures.

Dans le but de démontrer plus clairement quelles populations thymiques expriment la protéine Scotin, nous avons isolé les sous-populations thymiques à l'aide d'un marquage de surface avec des anticorps contre CD69 et le TCR couplés à la biotine puis, en les triant avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine (Figure 7). Les thymocytes ont aussi été marqués avec les anticorps contre les molécules de surface CD69 et TCR couplés à des fluorophores pour définir les sous-populations obtenues après l'isolement avec les billes magnétiques. Nous avons séparé les thymocytes en deux catégories de cellules soit CD69<sup>négatif</sup>-TCR<sup>faible</sup> (R1 et R2) et CD69<sup>positif</sup>-TCR<sup>positif</sup> (R3 et R4). Les figures 7B et C montrent que les cellules récupérées ainsi sont très pures pour les sous-populations désirées ( $\geq 90\%$ ). Après le tri, les cellules ont été fixées, perméabilisées au Triton X-100, colorées avec l'antisérum Jc105 suivi d'un marquage secondaire pour détecter l'expression de Scotin

par FACS (Figure 7D). Comme nous n'avions pas accès à un sérum pré-immunisation qui aurait servi de contrôle négatif, nous avons comparé l'expression de Scotin chez les populations thymiques par rapport à celle des thymocytes non triés. Ceux-ci montrent deux pics de fluorescence au FACS lors de la coloration intracellulaire de notre protéine d'intérêt.

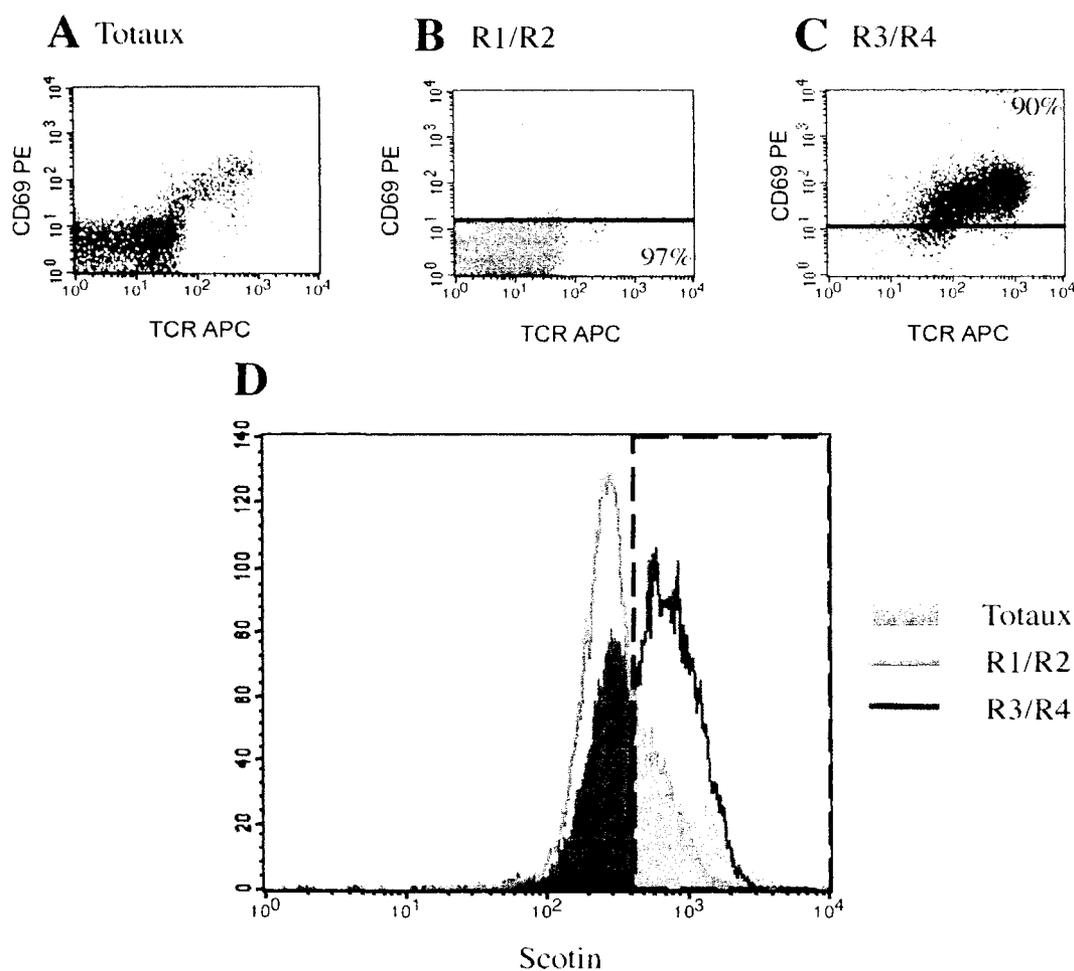


Figure 7. Coloration intracellulaire de Scotin dans les sous-populations thymiques. Les thymocytes de souris C57/BL6 sont colorés pour CD69 et pour le TCR (A). Ensuite, les populations immatures de types R1/R2 (B) et les populations mature R3/R4 (C) ont été triées grâce à ces marqueurs. Après perméabilisation des cellules, Scotin a été colorée dans ces populations de même que chez les thymocytes totaux (histogramme plein) en tant que référence (D). La zone encadrée correspond à l'expression forte de Scotin.

La zone encadrée dans la Figure 7D représente ce que nous définissons comme l'expression forte de la protéine Scotin détectée par FACS. Le signal à l'extérieur du cadre pourrait correspondre à une expression plus faible de Scotin ou pourrait être le bruit de fond causé par la coloration secondaire. Dû au manque de contrôle négatif, nous ne pouvons rien conclure avec certitude. Cependant, on voit que chez les cellules R3/R4, il y a un enrichissement en Scotin (Figure 7D). En fait, 86% de ces cellules sont situées dans la zone encadrée. L'expression chez les cellules immatures R1/R2 montre une légère baisse (29%) comparativement à celle des thymocytes totaux (38%). Ces colorations intracellulaires combinées à un marquage de surface appuient les résultats obtenus par immunofluorescence pour l'expression de Scotin dans le thymus. Tous ces résultats suggèrent que ce sont les cellules semi-matures/matures qui expriment le plus haut taux de Scotin tant au niveau du transcrit que de la protéine. Comme Scotin est fortement exprimée par les cellules thymiques qui subissent ou ont subi les mécanismes de sélection, cette molécule pourrait être importante dans le développement des thymocytes. Cependant, que ce soit par FACS ou bien par immunofluorescence, la majorité des cellules matures expriment Scotin. Notre hypothèse de départ associait une expression de Scotin avec l'avènement de la sélection négative chez les thymocytes. À la lumière de ces premiers résultats, il semble peu probable que ce soit aussi simple que cela, car seulement une petite proportion des précurseurs thymiques enclenchent ce mécanisme d'apoptose.

### **3.2 Analyse générale de la souris *scotinE2* -/-**

Notre collaborateur Jean-Christophe Bourdon de l'Université de Dundee, ayant découvert le gène *scotin* (Bourdon et al., 2002), a généré des souris mutantes n'exprimant pas Scotin (knock out). En fait, la souris a une délétion au niveau de l'exon 2 et non une délétion complète du gène. Cet exon a été ciblé, car il serait impliqué dans la fonction apoptotique de la protéine (Bourdon JC, communication personnelle). Le Dr Bourdon nous a gracieusement

fourni ces souris. Avec l'aide du Dr Abdelaziz Amrani, nous les avons croisées pour obtenir des souris qui sont soit homozygotes normales (+/+), hétérozygotes (+/-) ou homozygotes knock out (-/-) pour la délétion de *scotin*. Les souriceaux obtenus lors des différents croisements ont été génotypés par PCR. L'analyse générale du développement de ces souris et l'aspect macroscopique de leurs organes n'a montré aucune anomalie chez les souris *scotinE2* -/- comparativement aux deux autres souches. Il n'y a aucun signe évident d'auto-immunité (perte de peau, diabète, arthrite, etc) ou de mortalité précoce (données non présentées). La seule anomalie reportée est l'apparition de tumeurs chez les souris -/- âgées qui a été notée par notre collaborateur (Bourdon JC, communication personnelle). Pour vérifier par FACS si les étapes du développement des thymocytes étaient bien suivies, les thymocytes des souris *scotinE2* -/- et +/+ ont été récupérés et colorés pour les marqueurs de surface CD4, CD8, CD69 et TCR (Figure 8).

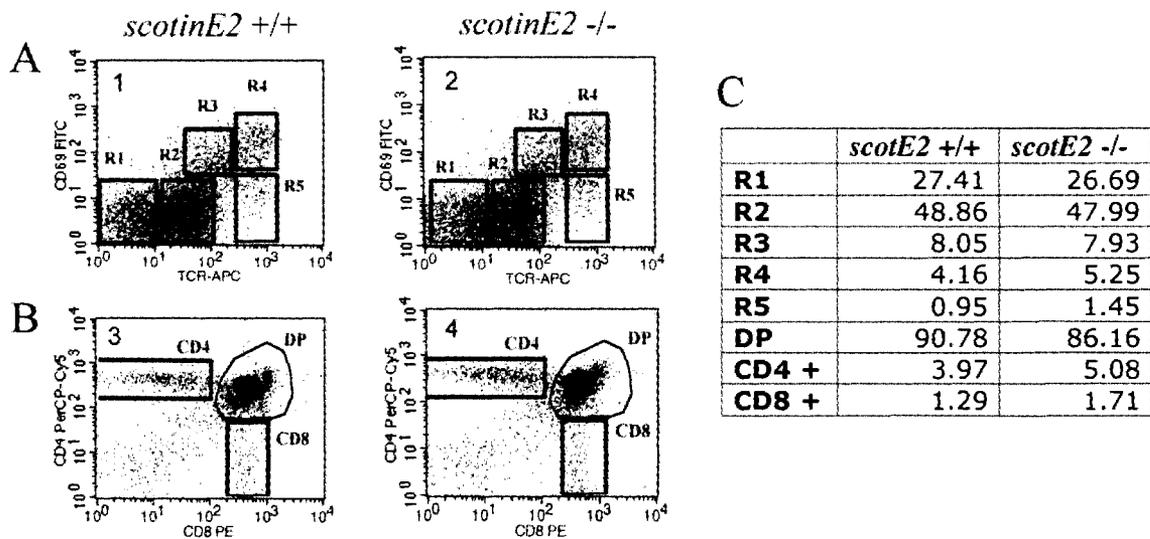


Figure 8. Analyse phénotypique des thymocytes des souris *scotinE2* -/-.

La répartition des thymocytes dans les sous-populations a été évaluée via l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8 (A) et de CD69 et du TCR (B) chez les souris *scotinE2* -/- (panneaux 1 et 3), et *scotinE2* +/+ (panneaux 2 et 4) âgées de 10 semaines. Selon les étapes de maturation exposées à la figure 3, le pourcentage de cellules retrouvées dans chaque sous-populations a été comptabilisé (C).

La distribution des thymocytes dans les sous-populations d'intérêts (CD4 vs CD8 et CD69 vs TCR) est normale chez la souris *scotinE2*<sup>-/-</sup> (Figure 8 panneaux 2 et 4) comparativement à la souris *scotinE2*<sup>+/+</sup> (Figure 8 panneaux 1 et 3). Il n'y a pas d'accumulation de cellules ou d'arrêt du développement à aucun stade de la maturation des thymocytes. Les populations R1 à R5 et celles définies par le marqueurs CD4 et CD8 sont représentées dans des proportions équivalentes (Figure 8C). Finalement, la taille du thymus et le nombre de thymocytes qu'il contient ne sont pas affectés par cette délétion (données non présentées). Il est à noter que le génotypage des souris indique que l'exon 2 de *scotin* est absent chez les *scotinE2*<sup>-/-</sup> (données non présentées). Tout nous porte à croire que cette délétion chez une souche murine n'a pas d'effet majeur sur le développement normal des thymocytes. À la lumière de ces résultats, nous nous sommes demandé pourquoi les souris *scotinE2*<sup>-/-</sup> ne présentaient aucune anomalie évidente. Nous avons donc analysé l'expression de la protéine Scotin par FACS intracellulaire chez les thymocytes totaux de trois souches murines ayant des génotypes différents pour le gène *scotin* (Figure 9). On voit que le taux d'expression de Scotin est identique tant chez les souris *scotinE2*<sup>+/+</sup> que chez les souris *scotinE2*<sup>-/-</sup> et alors, la délétion de l'exon 2 n'amène pas de différence dans l'expression de la protéine Scotin dans le thymus murin. Il est possible que la souris *scotinE2*<sup>-/-</sup> ne soit pas un mutant nul et que cela explique l'absence de phénotype chez ces dernières.

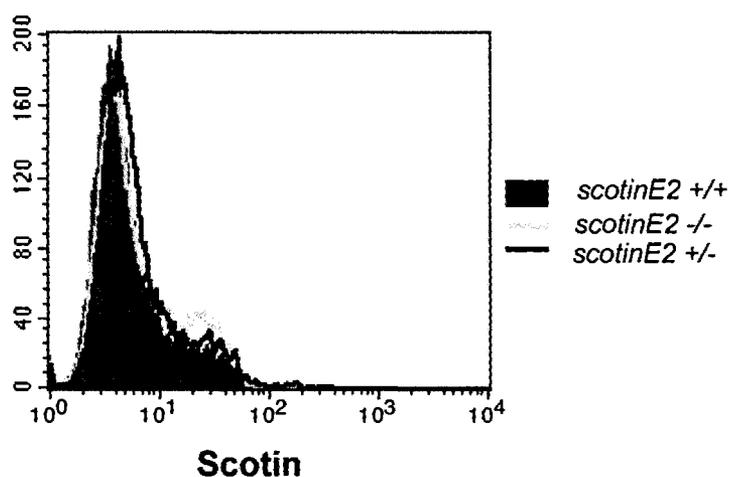


Figure 9. Expression protéique de Scotin chez les différentes souches murines *scotinE2*.

Scotin a été quantifiée par FACS intracellulaire chez les thymocytes totaux des souches *scotinE2*<sup>+/+</sup>, *scotinE2*<sup>+/-</sup> et *scotinE2*<sup>-/-</sup>. Les ajustements du FACS sont différents de ceux utilisés pour les lectures de fluorescence de la figure 6.

Il est à noter que les lectures de FACS pour cette série d'expériences ont été faites avec des ajustements différents de ceux utilisés sur les sous-populations de souris C57/BL6 triées (Figure 7D vs Figure 9). Le patron d'expression bimodale de fluorescence est conservé pour les thymocytes totaux et il ne faut pas en déduire que la fluorescence moins grande des graphiques de la Figure 9 est le signe d'une expression moindre chez les trois souches de souris *scotinE2*. Les résultats sont tout de même comparables.

Par une série de PCR emboîtées (*nested PCR*), le groupe de Bourdon a découvert plusieurs isoformes de Scotin (Bourdon JC, communication personnelle). Chez l'humain, on note 3 promoteurs dans la séquence génomique de *scotin*, 51 ARNm et 13 protéines produites. Chez la souris, on retrouve au moins 3 promoteurs (1 au début de la séquence et 2 internes), 3 ARNm et 3 protéines (Figure 10). Il faut cependant spécifier que les promoteurs internes P2 et P3 n'ont pas été caractérisés formellement. Ces deux promoteurs ont été déduits grâce à des recherches d'homologies sur des bases de données de EST (Expressed Sequence Tag) qui permettent d'identifier les gènes transcrits chez un organisme. Trois sites d'initiation pour la séquence *scotin* ont été trouvés par cette approche et correspondent au promoteur P1 à P3 de la Figure 10. Il est à noter que les isoformes transcrits à partir des promoteurs internes ne possèdent pas l'exon 2 (Figure 10; *scotin4* et *scotin5*) qui est impliqué dans la fonction apoptotique de la protéine et qui a été délété chez la souris *scotinE2* *-/-*. Si on compare les séquences protéiques, *scotin1* est la forme pro-apoptotique qui a été découverte par le Dr Bourdon et c'est la protéine complète représentée dans la Figure 5A. *scotin4* et *scotin5* sont presque identiques, elles possèdent les mêmes exons, mais sont produites via des promoteurs internes différents, P2 et P3 respectivement (Figure 10). Dû à ce fait, elles ont dans leur séquence non traduite en 5' des exons alternatifs différents (e-alt2 pour *scotin4* et e-sarf pour *scotin5*), ce qui permet leur différenciation par PCR sur des ADNc. Ces deux isoformes partagent la même séquence protéique sauf pour une seule exception, la sérine en position 2 de *scotin4* n'est pas présente chez *scotin5* (Figure 5B). Le début de la séquence de *scotin4* est indiqué sur la représentation de *scotin1* (astérisque Figure 5B).

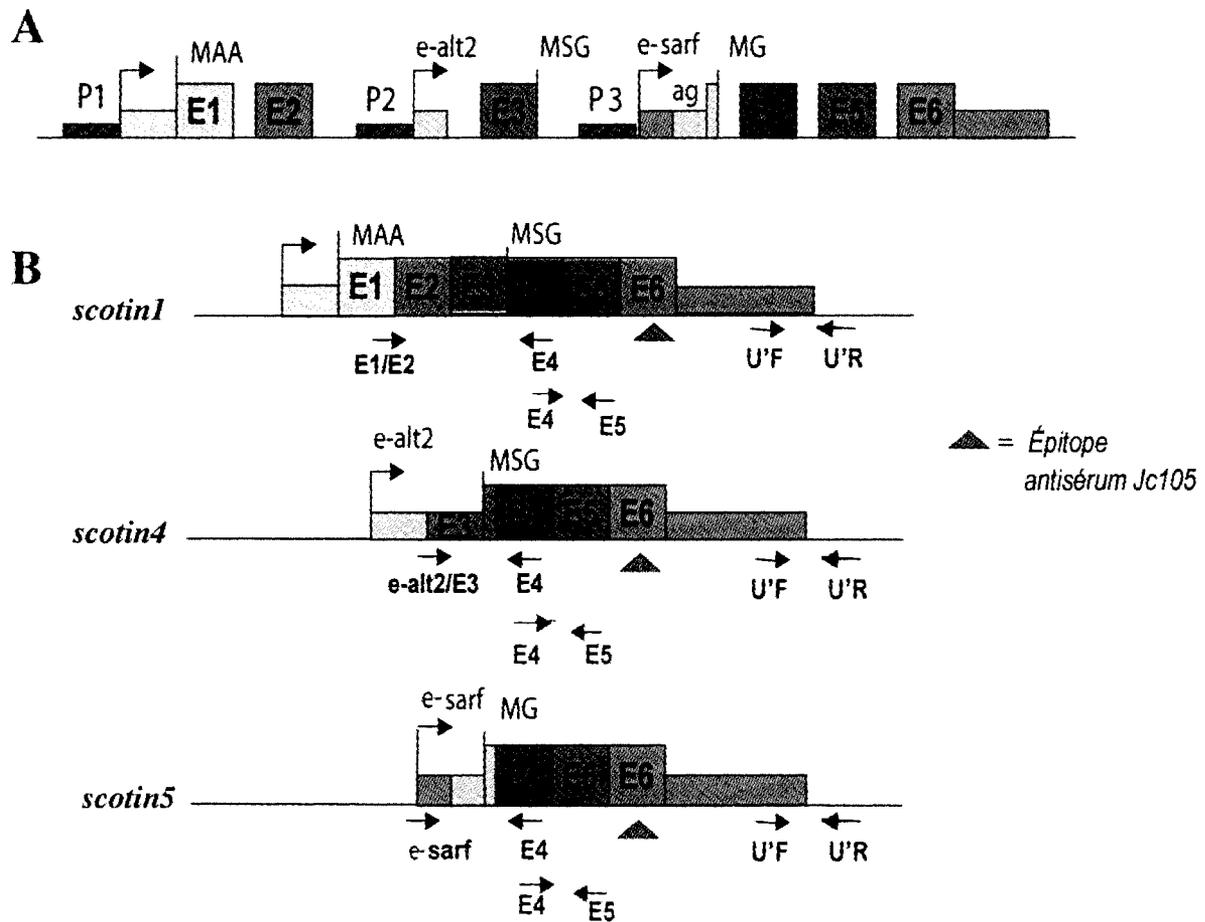


Figure 10. Organisation génomique du gène *scotin*.

On retrouve trois promoteurs (P) et huit exons (E1 à E6, e-alt2 et e-sarf) dans la séquence génomique de *scotin* (A). Par utilisation de promoteur alternatif, trois ARNm sont produits chez la souris : *scotin1*, *scotin4* et *scotin5* (B). Les acides aminés MAA, MSG et MG représentent les séquences d'initiation des protéines Scotin1, Scotin4 et Scotin5 respectivement. Les amorces de qPCR utilisées lors des analyses transcriptomiques préliminaires sont indiquées en 3' des représentations des *scotin* (U'F et U'R) (Knapp, 2003). Elles sont présentes dans toutes les formes de *scotin*. L'épitope reconnu par l'antisérum Jc105 utilisé pour détecter Scotin par immunofluorescence, par FACS et par Western blot est montré (▲). La position des nouvelles amorces qPCR utilisées pour étudier l'expression des isoformes est indiquée sous les séquences des transcrits (flèches). Des amorces permettant de reconnaître toutes les isoformes de *scotin* ont aussi été générées (E4-E5).

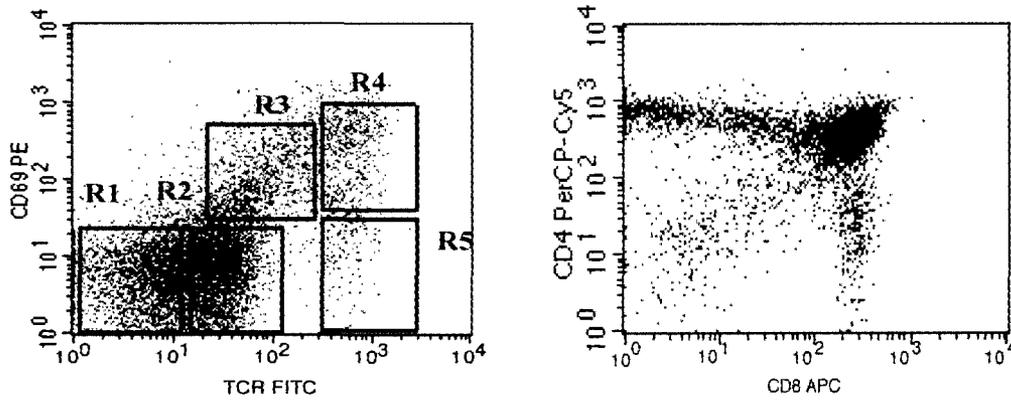
Il est important de noter que l'antisérum Jc105 (anti-Scotin) utilisé pour toutes nos expériences, que se soit par FACS, Western blot ou immunofluorescence, reconnaît toutes les formes de Scotin connues (voir 'épitope Scotin' dans Figure 10 pour sa région de reconnaissance). Il est spécifique à un épitope de la région carboxy-terminale de la protéine

au niveau de l'exon 6. De plus, les qPCR préliminaires (Figure 4B) ont été effectués uniquement avec des amorces qui amplifient toutes les formes connues de *scotin* (voir U'F et U'R dans Figure 10). L'ensemble des isoformes *scotin* produites sera dénommé 'transcrits communs de *scotin*' dès maintenant. Avec nos résultats antérieurs, il n'était pas possible de savoir si les isoformes étaient modulées différemment dans les processus qui nous intéressent. Il est devenu évident que nous devons recommencer l'analyse transcriptionnelle des sous-populations à la lumière de ces nouvelles connaissances. En effet, il est possible que certaines formes soient plus importantes que d'autres pour le développement thymique et que leur modulation lors de ce processus soit différente. Pour clarifier ces questions, nous avons recommencé les études d'expression génique sur de nouvelles sous-populations thymiques triées.

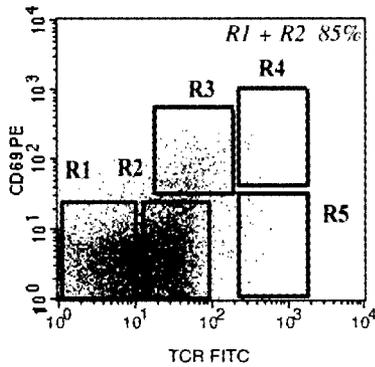
### **3.3 Isolement des sous-populations thymiques de souris C57/BL6 et analyses transcriptomiques**

Tout d'abord, nous avons dû mettre au point un protocole d'isolement des sous-populations R1 à R5 via des tris magnétiques. À l'aide de l'expression différentielle des marqueurs de surface CD69 et TCR au cours du développement, nous avons établi une méthode de tri cellulaire efficace, reproductible et permettant des études d'expression génique via PCR quantitatif (qPCR). En utilisant deux souris C57/BL6 âgées entre 3 et 10 semaines par tri, le nombre de cellules obtenues est suffisant pour nos expériences ultérieures. Après avoir récupéré les thymocytes totaux, nous les avons marqués avec un anti-CD69 biotinylé et un anti-TCR couplé au FITC. Pour cela, nous avons dû effectuer une étape préliminaire de titration de la quantité d'anti-TCR requise pour permettre sa liaison seulement aux cellules exprimant le TCR fortement. Les cellules ont aussi été marquées avec des anticorps couplés à des fluorophores (CD4 PerCP, CD8 PE, CD69 APC et TCR FITC), ce qui nous permettait de suivre le déroulement du tri par FACS (Figure 11).

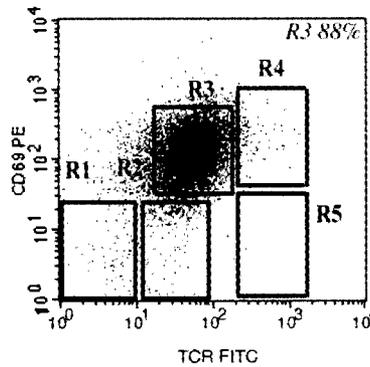
### A Thymocytes totaux



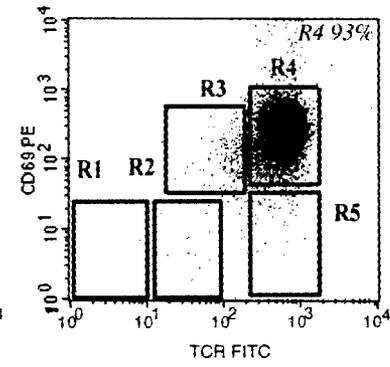
### B R1/R2



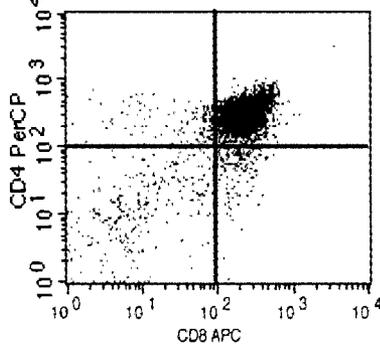
### C R3



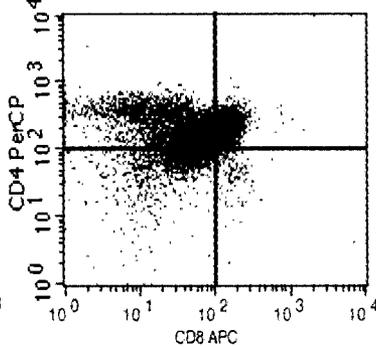
### D R4



### E R1/R2



### F R3



### G R4

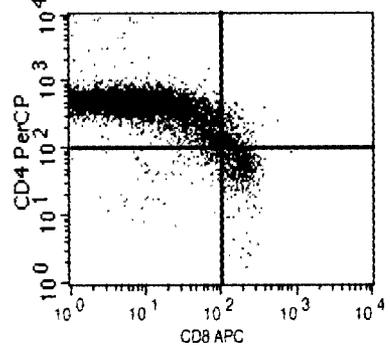


Figure 11. Tris cellulaires multi-paramétriques des sous-populations thymiques.

Des thymocytes totaux de souris C57/BL6 ont été triés à l'aide d'anticorps contre CD69 et TCR $\alpha\beta$  (A). Les sous-populations d'intérêts R1/R2 (B), R3 (C) et R4 (D) sont récupérées. L'efficacité des tris est inscrite dans le coin supérieur droit des figures. Le profil d'expression CD4 vs CD8 pour les sous-populations triées est présenté au bas (E-G).

On a débuté le tri par la séparation des cellules en deux groupes : les thymocytes exprimant fortement le TCR (R4 et R5) et les thymocytes ne l'exprimant pas ou peu (R1, R2 et R3). C'est grâce à la technologie de Miltenyi que nous avons pu développer un protocole adéquat à nos besoins. Avec leurs billes anti-FITC de même que leur aimant séparateur qui fournit un champ magnétique fort, nous avons pu faire une distinction entre des cellules exprimant le TCR à différents niveaux. Suite à ce tri, les deux groupes séparés par les colonnes Miltenyi ont été divisés de nouveau sur la base de leur expression du CD69. Avec les billes magnétiques streptavidin IMag, nous avons séparé les thymocytes exprimant CD69 de ceux qui ne l'expriment pas pour les deux groupes de cellules obtenues précédemment. Cela nous donne les thymocytes immatures R1/R2 (TCR<sup>négatif/faible</sup> et CD69<sup>négatif</sup>), les intermédiaires R3 (TCR<sup>intermédiaire</sup> et CD69<sup>positif</sup>) et les semi-matures R4 (TCR<sup>élevé</sup> et CD69<sup>positif</sup>). Les sous-populations obtenues sont d'une pureté satisfaisante soit les R1/R2 à 85%, les R3 à 88% et les R4 à 93% (Figure 11). Pour permettre l'analyse des transcrits présents dans ces populations, l'ARN de ces cellules a été extrait, des ADNc ont été produits grâce à la réaction de la transcriptase inverse et finalement, on a quantifié les ARNm exprimés par qPCR. Nous devons spécifier qu'il aurait été facile de séparer les sous-populations R1 des R2 ou bien de récupérer les R5 via un tri magnétique semblable à celui exposé ici. Cependant, cela aurait demandé beaucoup de matériel chimique et biologique, ce qui aurait été coûteux. Comme les sous-populations R1/R2 n'ont pas encore reçu de signal d'activation via le TCR, nous avons décidé de les analyser ensemble en tant que cellules immatures. De même, la sous-population R5, qui représente environ 1% des thymocytes, n'était pas nécessaire à notre étude.

Plusieurs auteurs ont montré que les cellules semi-matures CD4+CD8<sup>faible</sup>HSA+ sont la cible principale de la sélection négative (Kishimoto et Sprent, 1997; Villunger et al., 2004). Ces thymocytes semi-matures de la jonction cortico-médullaire correspondent à la sous-population R3. Dans le but de déterminer si on observe des signes moléculaires de sélection au niveau de nos sous-populations isolées, nous avons dosé par qPCR l'expression des

différents gènes d'intérêts chez les ADNc produits. Pour ce faire, nous avons utilisé la trousse commerciale Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Le colorant SYBR Green lie l'ADN double brin. Le complexe ainsi formé absorbe dans le bleu (498 nm) et émet dans le vert (522 nm), ce qui permet un suivi facile de l'amplification de l'ADN (Zipper et al., 2004). La quantification de la production de chaque transcrite a été effectuée avec une courbe standard qui était toujours identique pour un gène donné entre les expériences. Deux types de courbes standards ont été effectuées : relative pour la majorité des gènes et quantitative pour les isoformes *scotin*. Pour celles-ci, nous avons cloné des fragments de séquences spécifiques des différentes isoformes dans des vecteurs et nous avons utilisés ces derniers pour faire une quantification du nombre de copies des gènes. Pour les courbes standards relatives, nous avons utilisé des ADNc qui contenaient une bonne proportion des gènes à être détectés. À titre de contrôle négatif, des qPCR avec de l'ARN des cellules triées ont été faites pour s'assurer que la méthode utilisée donnait des extraits purs sans ADN contaminants. De plus, comme la distinction des isoformes *scotin* était subtile (on utilisait la même amorce antisens pour *scotin1*, *scotin4* et *scotin5*), les produits PCR obtenus au cours de nos premiers essais ont été déposés sur gels pour s'assurer que les fragments amplifiés avaient bien la taille attendue. Grâce à cette méthodologie, nous avons mesuré l'expression des marqueurs de sélection négative *bim* et *nur77*. Ces deux transcrits sont modulés à la hausse chez les R3 et cette augmentation est aussi observée chez les R4 pour *nur77* (Figure 12B). Donc, tout comme les résultats obtenus précédemment (Knapp, 2003), on note l'expression de molécules qui ont clairement été liées à la sélection négative à partir du stades R3.

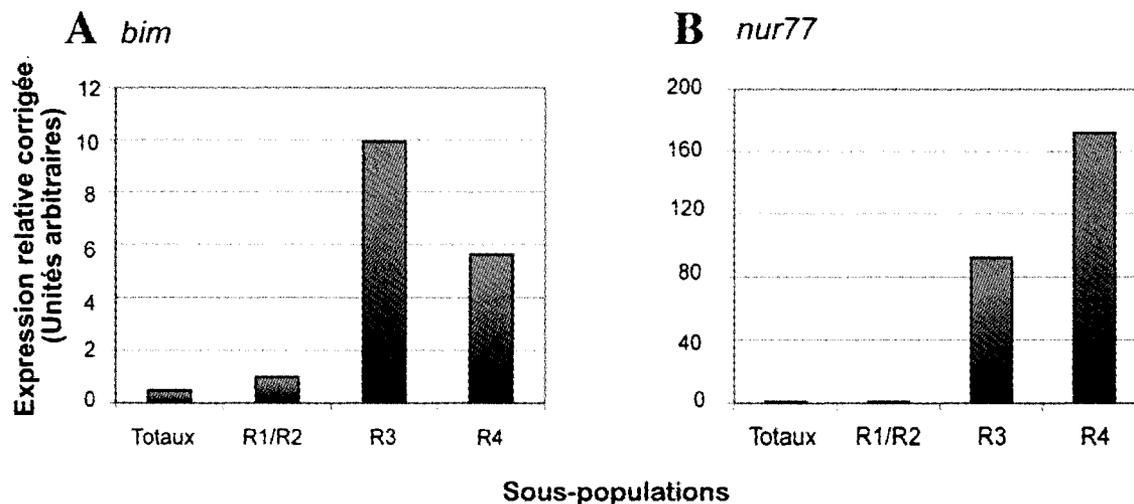


Figure 12. qPCR pour *bim* et *nur77* chez les sous-populations triées. Des qPCR pour les marqueurs de sélection *bim* (A) et *nur77* (B) ont été effectués sur les ADNc des sous-populations thymiques triées. Le niveau d'expression des différents gènes a été calculé grâce au ratio expression du gène/expression *HPRT* pour chacun des ADNc analysés. Les courbes standards ont été effectuées avec des ADNc de références identiques pour toutes les expériences.

Des qPCR préliminaires ont été effectuées pour identifier les isoformes de *scotin* présentes dans le thymus (données non présentées). Pour ce faire, nous avons vérifié si les isoformes exprimées chez la souris, soit les *scotin1*, *scotin4* et *scotin5*, étaient détectables. Nous avons découvert que seulement deux isoformes étaient modulées dans les sous-populations : *scotin1* et *scotin4*. Il n'y a pas d'expression significative de *scotin5* dans les populations thymiques. Pour mieux comparer l'expression des deux isoformes dans les thymocytes, nous avons construit des plasmides contenant les séquences de ces deux isoformes. Ainsi, il est possible de connaître le nombre d'ARNm d'un gène donné présent dans un échantillon. Avec des amorces permettant de doser les transcrits communs de *scotin*, ces qPCR nous ont permis de confirmer qu'on reproduisait bel et bien les résultats obtenus antérieurement (Knapp, 2003) avec notre nouvelle méthode de tri (Figure 13A). Avec des amorces spécifiques aux isoformes d'intérêts, nous avons observé que *scotin4* est plus abondante que *scotin1* dans les ADNc de thymocytes totaux (Figure 13B). Chez les cellules les plus immatures de type R1/R2, on voit que les niveaux des deux transcrits sont similaires. Chez les R3 et les R4,

c'est *scotin4* qui est la plus exprimée, environ cinq fois plus que *scotin1*. Donc, on remarque que la production des isoformes de *scotin* augmente avec la maturation des thymocytes tout comme les marqueurs de sélection négative *bim* et *nur77*. Ces résultats montrent que l'expression de *scotin* chez les thymocytes implique la production de deux isoformes particuliers et que celles-ci sont exprimées en quantité distincte au cours de la maturation.

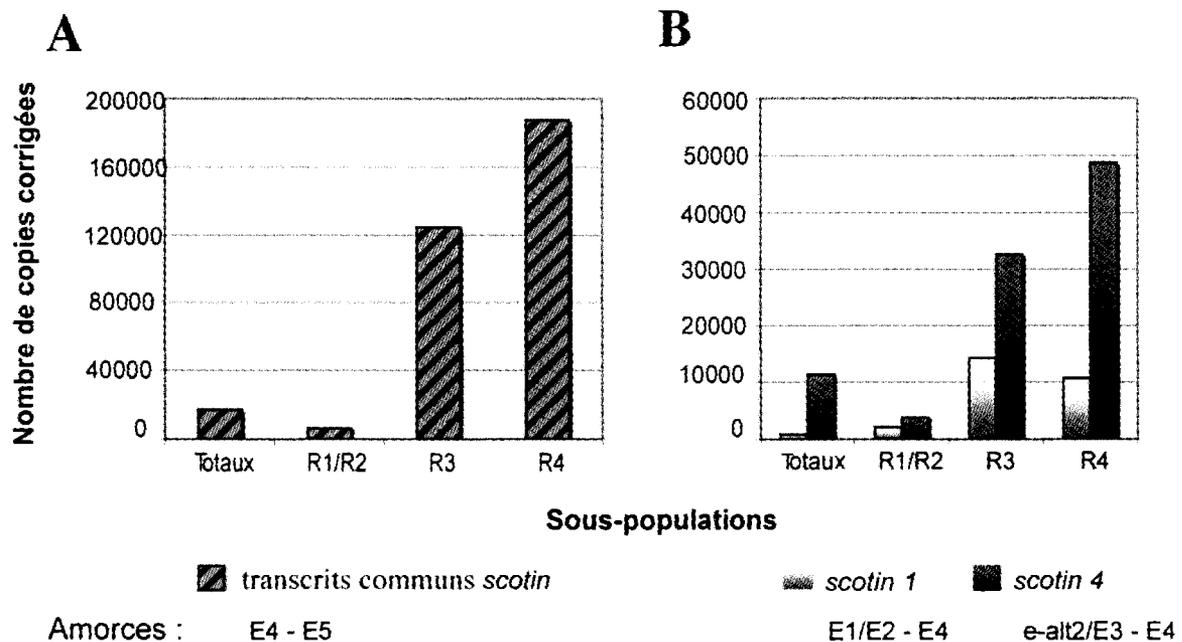


Figure 13. qPCR pour les isoformes de *scotin* chez les sous-populations triées. Des qPCR pour les transcrits communs de *scotin* (A) et de *scotin 1/scotin 4* (B) ont été effectués sur les ADNc des sous-populations thymiques triées. Le niveau d'expression des différents gènes a été calculé grâce au ratio expression du gène/expression HPRT pour chacun des ADNc analysés. Les courbes standards ont été faites avec des plasmides contenant les séquences à détecter pour doser le nombre de copies des gènes.

### 3.4 Analyse moléculaire de la souris *scotinE2* $-/-$

Afin d'éclaircir les raisons de la production d'une protéine Scotin chez les thymocytes de la souris *scotinE2*  $-/-$ , nous avons déterminé si toutes les isoformes de *scotin* étaient exprimées chez celle-ci. En analysant les ADNc des thymocytes DP par qPCR (Figure 14), on voit que *scotin1* est toujours présente chez les souris *scotinE2*  $+/-$  et  $+/+$ , mais absente chez les *scotinE2*  $-/-$ . En ce qui concerne *scotin4*, elle est exprimée par les thymocytes DP des trois souches murines *scotinE2* analysées. Alors, chez une souche murine qui ne produit pas d'ARNm *scotin1*, l'expression de la protéine Scotin, détectée avec un antisérum reconnaissant toutes les formes de Scotin, est observée. Comme *scotin4* est produite chez ces souris, nous croyons que l'expression résiduelle de la protéine Scotin chez les thymocytes *scotinE2*  $-/-$  serait due à l'expression de *scotin4*. L'absence de *scotin1* chez la souris n'induit pas de désordre au niveau du développement thymique et *scotin4* semble compenser sa perte pour la synthèse protéique de Scotin dans le thymus.

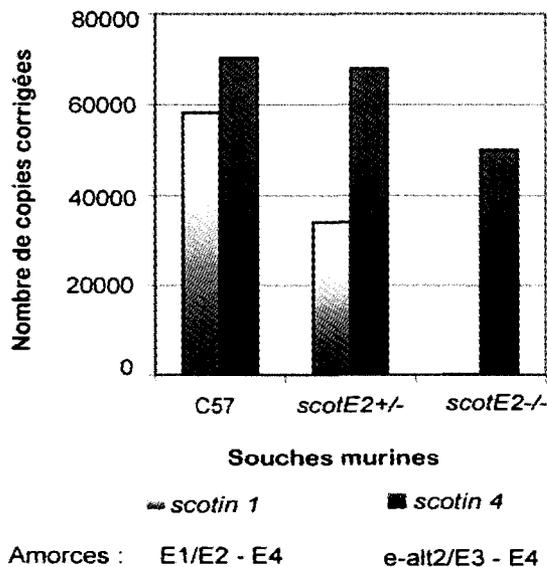


Figure 14. Analyse des ARNm produits par les souris *scotinE2*  $-/-$ . L'expression de *scotin1* et de *scotin4* a été mesurée par qPCR chez les DP des trois souches murines *scotinE2*. Le niveau d'expression des différents gènes a été calculé en faisant le ratio expression du gène/expression *HPRT* pour chacun des ADNc analysés. Les courbes standards sont obtenues avec des plasmides contenant les séquences à détecter pour doser le nombre de copies des gènes.

### 3.5 Essai d'induction de l'apoptose chez les thymocytes DP de souris C57/BL6

Chez les sous-populations thymiques en développement tardif que nous avons triées, les cellules subissent les deux mécanismes de sélection en plus du choix de lignée. Ces processus cellulaires ne surviennent pas lors d'une étape unique ou précise du développement des thymocytes. Par exemple, comme il a été mentionné plus haut, la sélection négative peut survenir à différentes étapes de maturation. Donc, la modulation d'un transcrite au cours du développement des thymocytes ne peut pas être associée simplement à son implication dans un de ces processus. Pour lier *scotin* plus spécifiquement avec la mort cellulaire programmée des thymocytes et pour compléter nos résultats obtenus avec la souris HA-TCR Tg, nous avons mis au point un test d'induction de l'apoptose chez les thymocytes immatures de type double positif pour étudier la modulation des isoformes de *scotin* dans ce contexte. Il est connu que la sélection négative est enclenchée via un signal TCR intense. Nous nous sommes donc basés sur un protocole établi qui mime une signalisation TCR forte et qui a été utilisé en particulier pour étudier les rôles du régulateur de sélection négative *nur77* (Dequiedt et al., 2003; Dequiedt et al., 2005). Pour ce faire, nous avons tout d'abord trié les cellules DP en utilisant les mêmes conditions que celles utilisées pour obtenir les cellules R1/R2 lors des tris des sous-populations. Cependant, des anticorps biotinylés contre le CD69 et le TCR ont été utilisés. Les billes magnétiques streptavidin IMag lient alors les thymocytes plus matures qui expriment le CD69 ou le TCR fortement, soit les R3, R4 et R5. Cela nous laisse les cellules les plus immatures R1 et R2 qui sont majoritairement des DP. En fait, nous avons obtenu des DP avec une pureté de 93% dans la population triée (Figure 15A-B). Après les avoir récupérées, nous avons induit ces DP avec une forte dose de PMA, un activateur de PKC (cPKC et nPKC), et d'ionomycin, un ionophore. Les cellules traitées ainsi ont été récupérées à différents moments pour quantifier le nombre de cellules apoptotiques par FACS via la coloration du marqueur précoce d'apoptose annexinV (Figure 15C-D) et pour doser les transcrits produits par qPCR. Si on dose le nombre de cellules ayant enclenché l'apoptose après avoir été exposées au PMA et à l'ionomycin, on voit qu'avec le temps, les DP entrent peu à peu en mort cellulaire pour atteindre un taux maximum de 80% de cellules

positives pour l'annexinV après 8 heures de culture (Figure 15E). Le contrôle, qui consiste en des DP mis en culture en absence des inducteurs, montre une induction assez importante de l'apoptose avec le temps d'incubation. Cependant, on note deux fois moins d'apoptose chez les DP contrôles après 8 heures en culture comparativement aux DP induits. Les cellules traitées avec le PMA et l'ionomycine entrent donc en mort cellulaire programmée d'une façon significative via ce protocole.

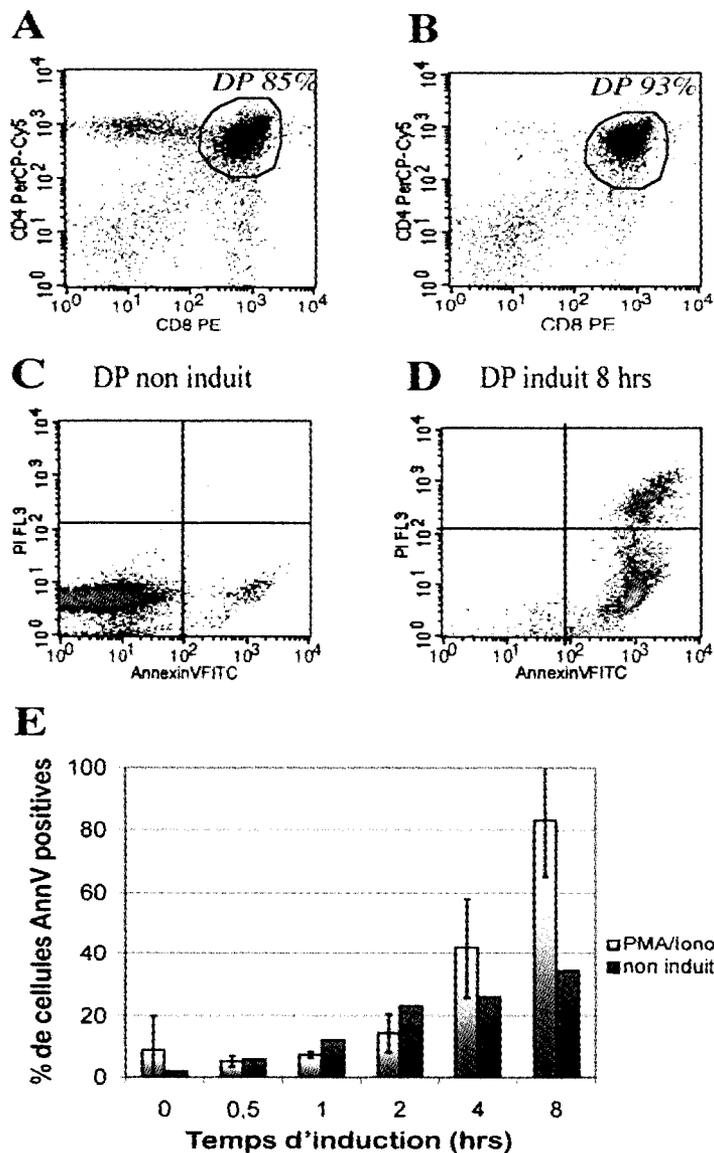


Figure 15. Induction de l'apoptose via un signal TCR fort chez les DP.

Les thymocytes totaux (A) de souris C57/BL6 ont été triés à l'aide de CD69 et du TCR pour obtenir la population DP (B). Le pourcentage de cellules DP est inscrit dans le coin supérieur droit des figures. L'apoptose a été induite chez les DP triés grâce à une incubation en présence de PMA et d'ionomycine. La mort cellulaire est dosée via l'expression de l'annexinV à la surface membranaire aux intervalles mentionnés. Des DP non induits, mais mis en culture sont utilisés à titre de contrôle négatif. Les résultats de deux expériences indépendantes ont été compilés pour l'induction des DP avec le PMA et l'ionomycine. La moyenne et l'écart-type sont présentés.

La prochaine étape était donc de vérifier si les évènements moléculaires se déroulant pendant la sélection négative étaient reproduits par cette induction chimique. Pour ce faire, nous avons d'abord dosé la production des marqueurs moléculaires de sélection négative par qPCR en comparant leur expression au cours de la période d'incubation avec celle au temps zéro. Les marqueurs *bim* (Figure 16A) et *nur77* (Figure 16B) montrent une bonne induction avec le temps en présence de PMA et d'ionomycine. Chez les DP contrôles maintenant, on ne voit pas d'induction de *nur77*, mais *bim* est augmenté autant chez les DP induits que chez les non induits (données non présentées).

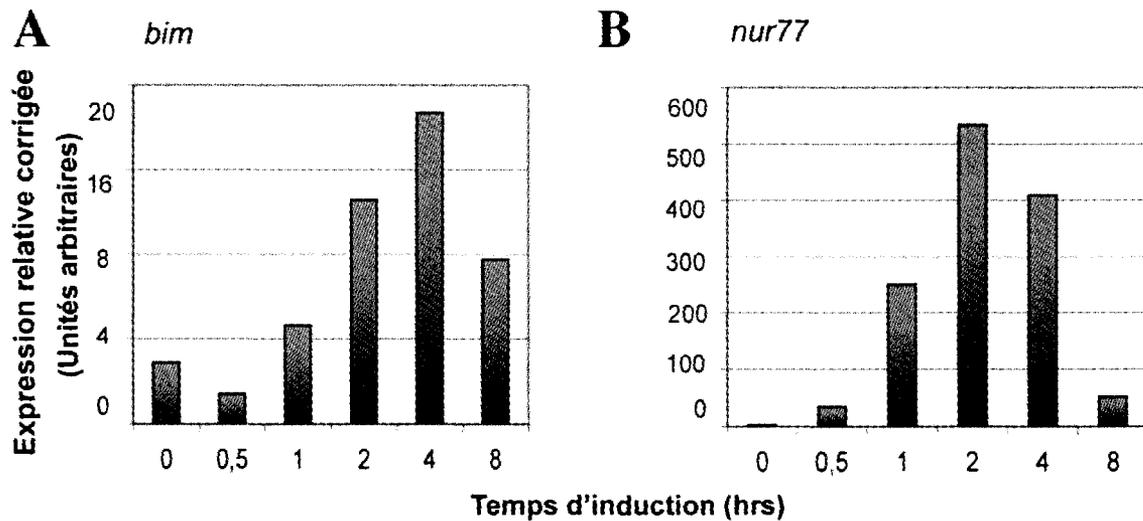


Figure 16. qPCR pour *bim* et *nur77* sur les DP induits par un fort signal TCR. Le dosage de *bim* (A) et *nur77* (B) a été effectué par qPCR sur les ADNc des DP de souris C57/BL6 induits avec le PMA et l'ionomycine. Le niveau d'expression des différents gènes a été calculé grâce au ratio expression du gène/expression HPRT pour chacun des ADNc analysés. Les courbes standards ont été faites avec des ADNc de références identiques pour toutes les expériences.

Si on analyse le nombre de copies de *scotin1* et de *scotin4* par qPCR, on n'observe aucune modulation sur la période d'induction (Figure 17B). Même en utilisant la paire d'amorces qui permet de détecter les transcrits communs de *scotin*, nous ne voyons aucune augmentation des transcrits avec l'entrée en apoptose des cellules traitées avec le PMA et l'ionomycine

(Figure 17A). Donc, lors d'un test d'induction de la mort cellulaire des thymocytes DP, l'expression des isoformes de *scotin* ne varie pas significativement, contrairement au marqueur de sélection négative *nur77*.

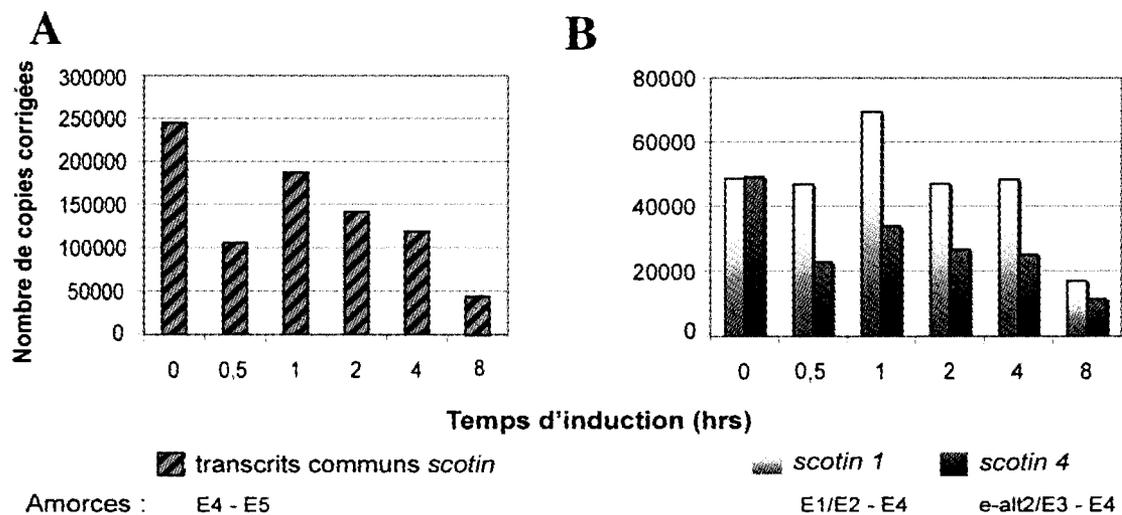


Figure 17. qPCR pour les isoformes des *scotin* sur les DP induits par un fort signal TCR. Le dosage des transcrits communs de *scotin* (A) et des isoformes *scotin1* et *scotin4* (B) a été effectué par qPCR sur les ADNc des DP de C57/BL6 induits avec le PMA et l'ionomycine. Le niveau d'expression des différents gènes a été calculé en faisant le ratio expression du gène/expression HPRT pour chacun des ADNc analysés. Les courbes standards ont été faites avec des plasmides contenant les séquences détectées pour doser le nombre de copies des gènes.

Il est à noter que la sélection négative est un processus très strictement régulé et que les interactions avec les cellules stromales du thymus sont d'une importance primordiale pour le développement des thymocytes. De plus, il est connu que les DP sont sensibles à une panoplie de stimuli et donc, il est justifié de se demander si l'induction de leur mort cellulaire reflète réellement la sélection négative qui est un mécanisme plus spécifique. Grâce aux comparaisons présentées dans l'article de Baldwin et Hogquist, il a été mis en évidence qu'il y a seulement deux gènes qui sont modulés de façon identique entre toutes les études analysant la sélection négative au niveau transcriptionnelle : *nur77* et *bim* (Baldwin et Hogquist, 2007). Le premier répond bien dans notre modèle, mais *bim* est induit tant chez les

DP contrôles que les DP tests. On pourrait donc spéculer que la production de *bim* est causée simplement par la mort des DP plutôt que par l'enclenchement de mécanismes moléculaires spécifiques initiés par le signal TCR fort. Ce qui renforce notre idée que la reproduction des évènements moléculaires de la sélection *in vivo* n'est pas complète ici.

### 3.6 Étude des fonctions et de la localisation cellulaire des isoformes *scotin* dans les cellules HeLa

Pour éclaircir les rôles de *scotin1* et *scotin4*, nous avons opté pour la culture cellulaire. Nous savons que *scotin1* est une protéine pro-apoptotique transmembranaire de 25 kDa qui est localisée dans la membrane du noyau et du réticulum endoplasmique (Bourdon et al., 2002). Si on inhibe son expression via des ARN antisens, on observe une baisse de l'apoptose chez les cellules NIH 3T3 traitées aux rayons U.V. Pour ce qui est de *scotin4*, rien n'était connu. Il est bien documenté que plusieurs médiateurs de l'apoptose sont exprimés sous différentes isoformes ayant des rôles opposés dans ce processus (voir section 4.3) et nous nous sommes demandés si c'était aussi le cas pour les protéines qui nous intéressent. *scotin1* étant très clairement pro-apoptotique (Bourdon et al., 2002), nous avons voulu savoir ce qu'il en était de *scotin4*. Pour cela, nous avons surexprimé les deux isoformes dans les cellules HeLa et puis nous avons mesuré la quantité de cellules annexinV produites (Figure 18).

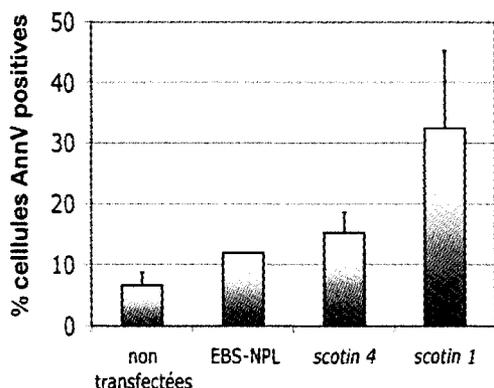


Figure 18. Transfection des HeLa avec les isoformes de *scotin*.

Après 48 heures de transfection, les cellules HeLa ont été récupérées et l'apoptose a été dosée. Seules celles qui sont positives pour CD25 (contrôle de transfection) sont prises en considération dans le calcul de la mort cellulaire. Les cellules exprimant l'annexinV (AnnV) sont considérées comme apoptotiques. Les résultats de trois expériences indépendantes ont été compilés. La moyenne et l'écart-type sont présentés. La transfection avec EBS-NPL a été effectuée une seule fois.

Comme attendu, 35% des cellules transfectées avec *scotin1* sont positives pour l'annexinV après 48 heures de culture. Le plasmide contrôle et *scotin4* produisent un pourcentage équivalent de cellules annexinV positives. Assurément, *scotin4* n'a pas de rôle pro-apoptotique. Pour vérifier si cette isoforme a une fonction anti-apoptotique, des tests de réversion de la mort cellulaire induite par les U.V. ont été entrepris en surexprimant *scotin4* chez des cellules HeLa induites. Les cellules ne survivaient pas bien à une transfection suivi d'un traitement aux U.V. et aucun résultat concluant n'a été obtenu avec cette méthodologie (données non présentées). La caractérisation des isoformes a été poursuivie en effectuant des essais de co-localisation cellulaire par immunofluorescence indirecte sur des cellules HeLa. Les différentes formes de *scotin* ont tout d'abord été surexprimées chez les cellules HeLa qu'on a ensuite colorées pour Scotin de même que pour un marqueur du reticulum endoplasmique.

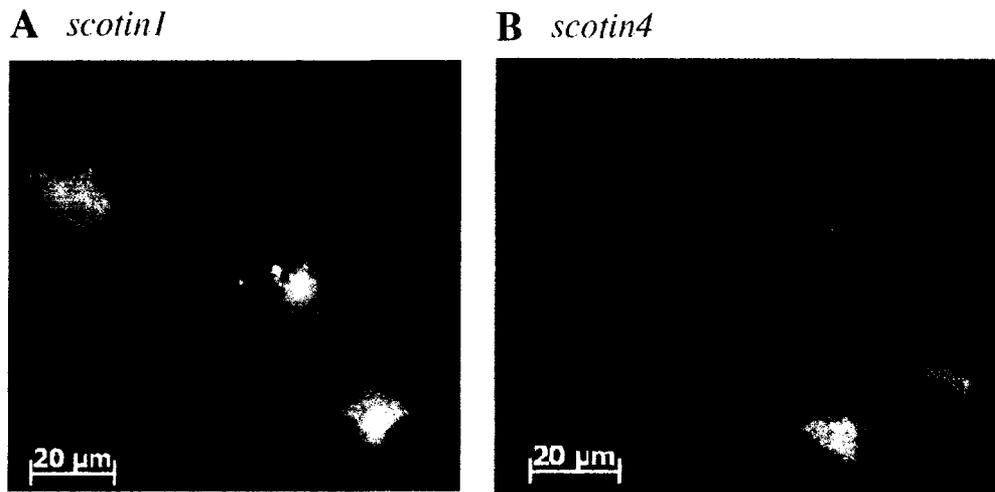


Figure 19. Localisation sub-cellulaire des isoformes de Scotin chez les cellules HeLa transfectées. Des HeLa ont été transfectées avec les isoformes de *scotin1* et *scotin4*. La colocalisation d'un marqueur du reticulum endoplasmique (souris anti-KDEL de souris) avec l'antisérum Jc105 (lapin anti-Scotin C-terminale de souris) a été effectuée par immunofluorescence indirecte à un grossissement de 630 fois. Les images superposées de la coloration nucléaire (DAPI), de Scotin (chèvre anti-lapin Alexa 568) et de KDEL (chèvre anti-souris Alexa 488) sont présentées. Les anticorps secondaires sont inscrits entre les parenthèses.

La visualisation des cellules transfectées a permis de confirmer que *scotin1* colocalise avec le marqueur du reticulum endoplasmique KDEL (Figure 19A), alors que *scotin4* ne colocalise pas avec ce dernier (Figure 19B). Donc, les isoformes de *scotin* sont retrouvées dans des compartiments cellulaires différents et ils semblent jouer des rôles distincts dans l'apoptose.

### 3.7 Analyse de l'apoptose induite par un signal TCR fort chez des lignées cellulaires de thymomes

Afin de mieux comprendre l'implication de *scotin* dans le processus d'apoptose chez les thymocytes, nous avons opté pour l'étude de lignées cellulaires immortelles de thymomes. En fait, ce sont des thymocytes arrêtés à un stade de maturation du développement thymique qui se cultivent très facilement. Deux lignées ont été étudiées, soit les RML11 (Ehlers et al., 2003) et les Bw5147 (ATCC TIB-48). Les premières ont un phénotype de surface similaire aux cellules matures CD4 SP et les secondes, aux DN. En traitant ces lignées avec le PMA et l'ionomycine comme exposé plus haut et en dosant l'expression de l'annexinV, on observe une différence de comportement très marquée entre les deux (Figure 20). Les RML11 sont très résistantes au traitement chimique exposé ci-dessus et ce, même sur une période de 48 heures.

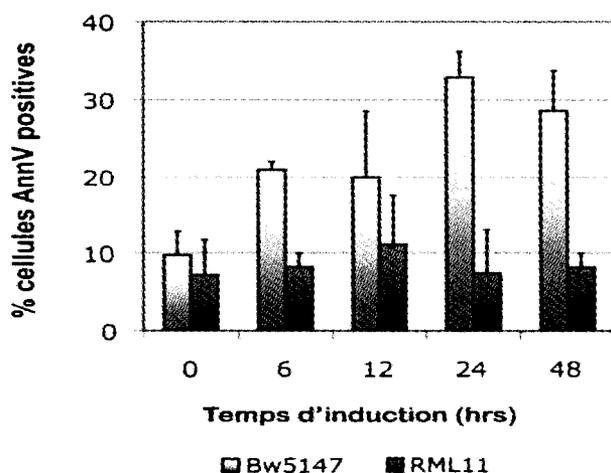


Figure 20. Apoptose chez des lignées de thymomes RML11 et Bw5147 induites via un signal TCR fort.

Les RML11 et les Bw5147 ont été induits avec le PMA et l'ionomycine de façon identique au DP. Le pourcentage de cellules annexinV (AnnV) positives a été déterminé aux temps 0, 6, 12, 24 et 48 heures. Les résultats de deux expériences indépendantes ont été compilés. La moyenne et l'écart-type sont présentés.

On observe environ 10% de cellules annexinV positives pour toute la durée de l'incubation. Les thymomes Bw5147 entrent en apoptose en présence de ces composés chimiques pour atteindre un maximum de 35% de cellules annexinV positives après 24 et 48 heures. Le dosage par qPCR des transcrits produits par les cellules Bw5147 induits révèle que chez ces thymomes pro-apoptotiques, c'est *scotin1* qui est produite en majorité (Figure 21B) alors que chez les RML11 induites par un stimulus mimant un signal TCR fort, c'est *scotin4* qui est présente en majorité (Figure 21C). Il est intéressant de noter que si on quantifie les transcrits communs de *scotin* chez ces deux lignées induites (Figure 21A), on remarque que l'expression est au même niveau chez les RML11 et les Bw5147. Cela veut dire que, globalement, *scotin* est produite en quantité égale dans deux contextes cellulaires différents. Ce qui indique qu'elle pourrait être aussi importante dans le contrôle des mécanismes de survie que dans celui de l'apoptose, par exemple, via l'expression de ses isoformes. Dans une situation de mort cellulaire programmée des thymomes, *scotin1* est augmentée alors que *scotin4* l'est dans une situation de survie.

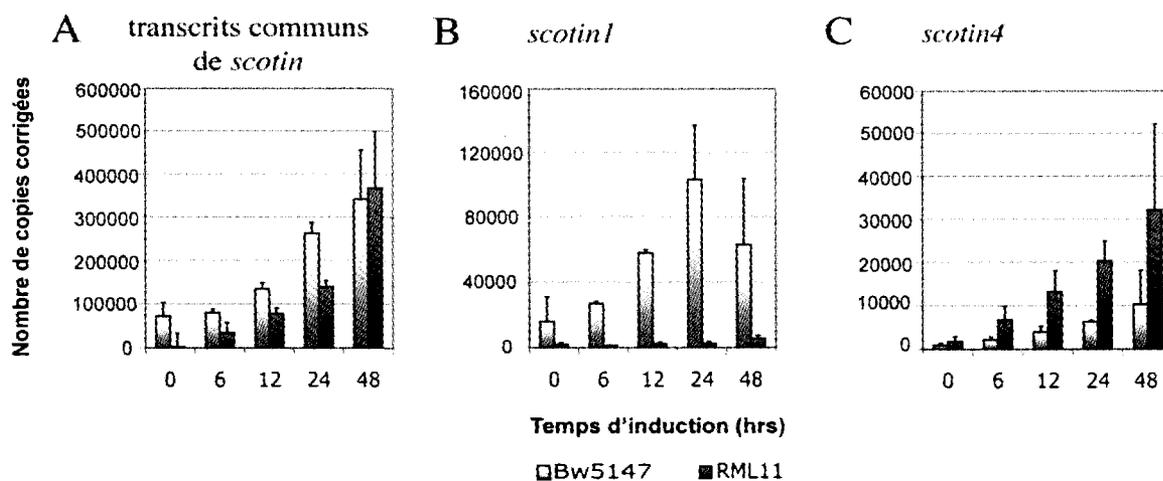


Figure 21. qPCR pour *scotin* chez les thymomes induits avec un stimulus mimant un signal TCR fort. Les thymomes RML11 et Bw5147 ont été induits avec le PMA et l'ionomycine. Au temps 0, 6, 12, 24 et 48 heures, les cellules ont été récupérées. Les transcrits présents chez ces lignées ont été dosés par qPCR sur les ADNc produits. Les transcrits communs de *scotin* (A), *scotin1* (B) et *scotin4* ont été quantifiés. Les résultats de deux expériences indépendantes ont été compilés. La moyenne et l'écart-type sont présentés. Les courbes standards ont été faites avec des plasmides contenant les séquences à détecter pour doser le nombre de copies des gènes.

### 3.8 Génération de vecteurs shRNA ciblant Scotin

Pour étudier plus spécifiquement les rôles des isoformes de *scotin*, nous avons conçu des petits ARN formant des épingles à cheveux, plus communément appelés shRNA, contre ce gène. Lorsqu'exprimés dans une cellule, ces shRNA ciblent une molécule d'ARNm spécifique et en s'y liant, ils amèneront ultimement sa dégradation (Fire et al., 1998). C'est en fait un inhibiteur de l'expression génique. Nous avons fait synthétiser deux types de shRNA : certains ciblant *scotin1* et d'autres ciblant les transcrits communs de *scotin*. Nous n'avons pas fait de shRNA contre *scotin4*, car elle possède peu de nucléotides spécifiques par rapport aux autres isoformes et aucune bonne séquence cible ne nous a été suggérée pour ce gène lorsque nous avons soumis celui-ci au logiciel de prédiction pour construire les shRNA (Ambion). Deux shRNA contre *scotin1* (shScotin 211 et shScotin 296) et deux shRNA contre les transcrits communs de *scotin* (shScotin 552 et shScotin 560) ont été générés. Ces séquences ont été clonées dans le vecteur pSuperRetroPuro (Invitrogen) qui permet d'insérer facilement les shRNA dans le génome via une infection rétrovirale (Brummelkamp et al., 2002). Pour vérifier la capacité d'inhibition de l'expression protéique de ces shRNA, nous avons tout d'abord co-transfecté des cellules HeLa avec *scotin1* et les plasmides codant pour les différents shRNA Scotin. Nous avons choisi ces cellules, car les protocoles de transfection et de dosage de l'expression par immunobuvardage fonctionnaient bien. Comme *scotin1* contient toutes les séquences ciblées par les divers shScotin, si ceux-ci sont efficaces, il devrait y avoir diminution de sa production. Par immunobuvardage (Figure 22), on peut voir que les shScotin sont très efficaces et amènent une diminution d'environ 80% de l'expression de la synthèse protéique (puits 1 à 4) comparativement au shRNA contrôle (puits 5). Les shScotin contre les formes commune (puits 3 et 4) sont un peu plus efficaces que ceux contre *scotin1* (puits 1 et 2). Il est à noter que chez certaines lignées cellulaires, dont les HeLa, une forme protéique de Scotin apparaît à 19 kDa en plus de la forme normale de 25 kDa. La première correspondrait à la protéine Scotin4 alors que la deuxième serait Scotin1 (JC Bourdon, communication personnelle). La forme de 19 kDa n'est que faiblement affectée par le shScotin-211 alors que la forme de 25 kDa, soit Scotin1, l'est fortement.

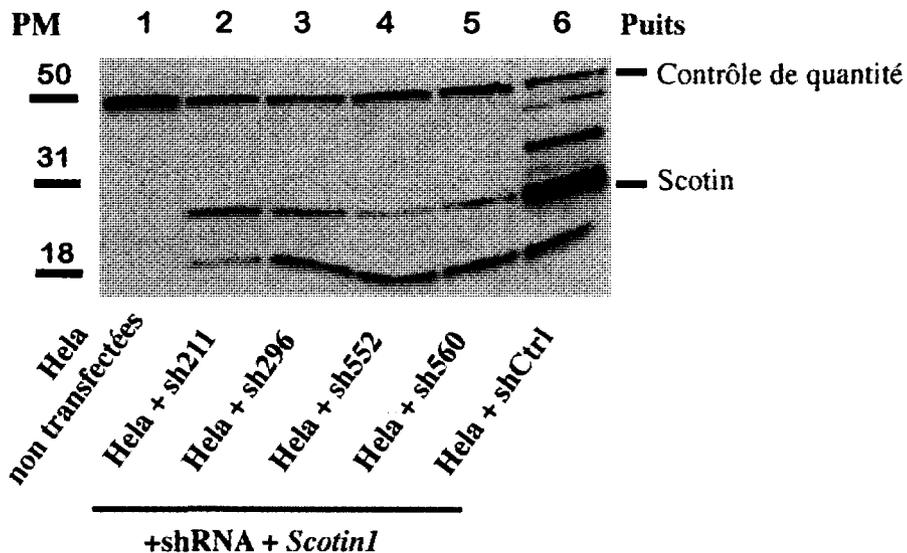


Figure 22. Test de l'efficacité des shRNA Scotin chez les cellules HeLa. Des co-transfections transitoires avec *scotin1* et les différents shRNA contre les isoformes de scotin ont été effectuées avec la Lipofectamine 2000. Pour tester l'efficacité des shRNA, un Western blot pour détecter Scotin a été fait. Elle est détectée à 28 et 19 kD avec le Jc105. Le contrôle de quantité correspond à une bande non spécifique visible à 50 kDa. Ligne 1; HeLa non transfectées; Ligne 2; HeLa + sh211 + *scotin1*, ligne 3 : HeLa + sh296 + *scotin1*, ligne 4 : HeLa + sh552 + *scotin1*, ligne 5 : HeLa + sh560 + *scotin1*, ligne 6 : HeLa + shCtrl + *scotin1*.

### 3.9 Analyse de l'apoptose chez les lignées stables de thymomes exprimant les shScotin

Afin de vérifier l'importance du rôle joué par *scotin* lors de l'induction des thymomes au PMA/Ionomycin, nous avons créé trois lignées de RML11 et de Bw5147 qui expriment des shRNA différents soit : shScotin-211 (ciblant l'exon 2), shScotin-552 (ciblant l'exon 5) et shRNA Contrôle (ciblant une molécule n'affectant pas l'expression de Scotin). Comme tous les shScotin semblaient bien fonctionner, nous avons choisi deux de ceux-ci pour la suite des tests en transfection stable. Les lignées stables ont été générées à l'aide de rétrovirus capables de s'intégrer dans le génome des cellules. Les rétrovirus ont été produits chez les cellules HEK 293T via une co-transfection des vecteurs pAmpho, qui fournit les molécules

d'enveloppement au rétrovirus, et pSuperRetroPuro-shScotin d'intérêt. Les surnageants cellulaires ont été récupérés et ont servi à infecter les thymomes. Par la suite, ces derniers ont été cultivés en présence constante de Puromycine pour stimuler et conserver l'intégration des rétrovirus dans le génome. Si on induit ces lignées stables avec le PMA et l'ionomycin, on voit une différence notable chez les thymomes exprimant le shScotin-552. En effet, la réponse face aux agents chimiques est inversée (Figure 23). Les cellules Bw5147 shScotin-552 n'entrent plus en apoptose en présence des inducteurs au contraire de la souche mère, de la souche shScotin-211 et de la souche shRNA contrôle. Les RML11 exprimant le shScotin-552 deviennent annexinV positives en présence de PMA et d'ionomycin alors que la lignée exprimant le shScotin-211 et le shContrôle se comportent comme la souche mère.

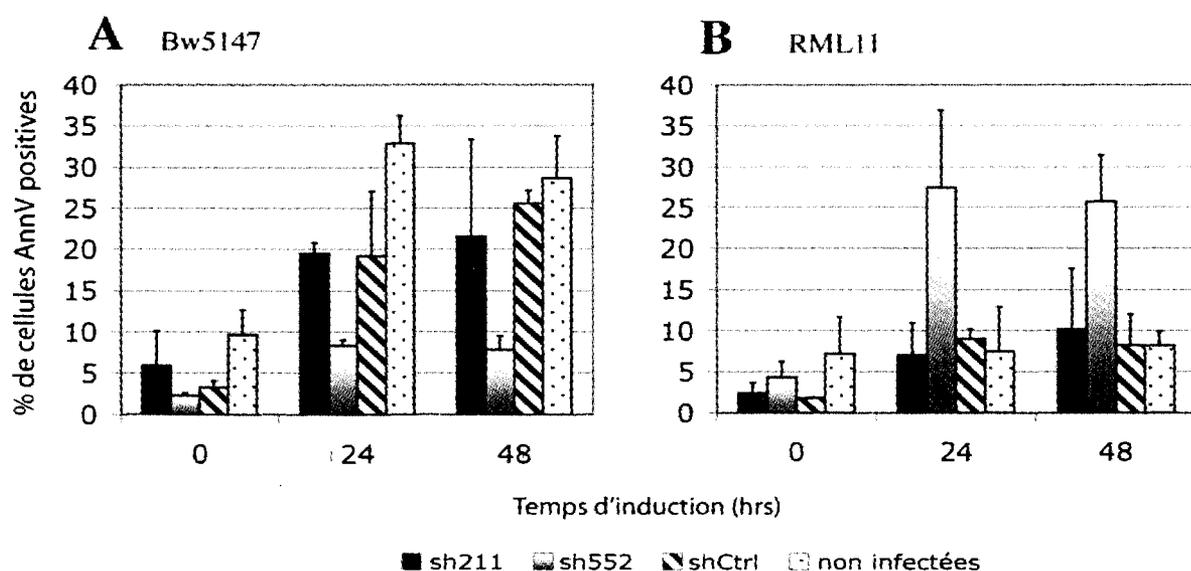


Figure 23. Induction de l'apoptose via un stimulus mimant un signal TCR fort chez des lignées de thymomes exprimant des shRNA contre les isoformes *scotin* de manière stable. Des lignées stables de Bw5147 (A) et RML11 (B) exprimant un shRNA contre *scotin1*, contre les transcrits communs de *scotin*, ou un shRNA contrôle ont été générées. L'apoptose a été induite avec le PMA et l'ionomycin de façon identique aux DP. Les cellules ont été récupérées après 0, 24 et 48 heures d'induction et le pourcentage de cellules annexinV (AnnV) positives a été dosé.

Afin de vérifier l'efficacité des shRNA, nous avons utilisé le qPCR dû aux problèmes récurrents associés aux Western blot avec les extraits de cellules murines. Si on analyse des cellules non transfectées, la détection de Scotin avec l'antisérum Jc105 n'est pas efficace ni reproductible. Le nombre de copies des isoformes *scotin* exprimées par les cellules induites a été dosé (Figure 24).

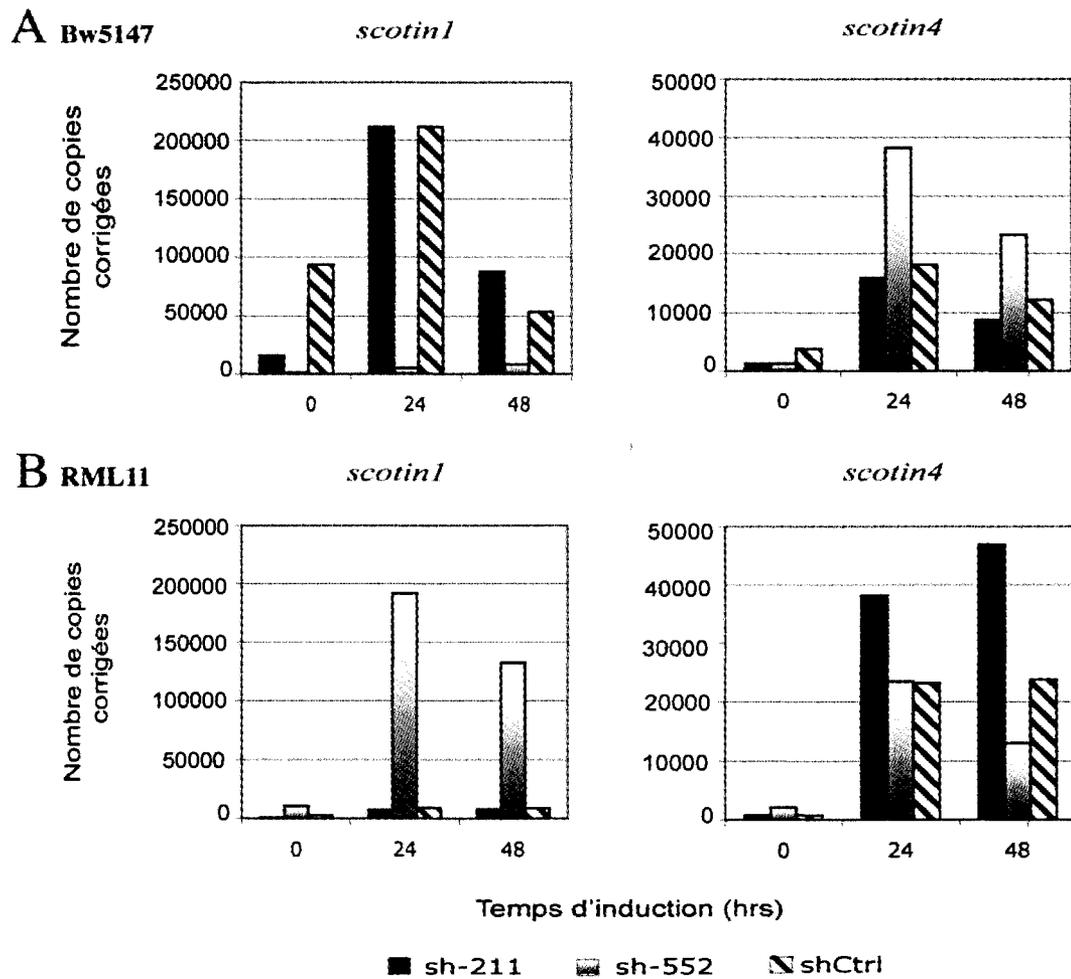


Figure 24. qPCR pour les isoformes de *scotin* chez les lignées de thymomes qui expriment de façon stable des shRNA et qui ont été induites avec le PMA et l'ionomycin. Les différentes lignées stables de RML11 et de Bw5147 ont été induites avec un stimulus mimant un signal TCR fort. Après 0, 24 et 48 heures en présence de PMA et d'ionomycin, des ADNc sur ces cellules ont été produits et les isoformes de *scotin1* (A), *scotin4* (B) ont été dosés par qPCR. Les courbes standard ont été faites avec des plasmides contenant les séquences à détecter pour doser le nombre de copies des gènes.

Des trois lignées RML11 analysées, deux ont le même profil d'expression lors de l'induction. Les cellules RML11 shScotin-211 et shContrôle expriment plus de *scotin4* que de *scotin1*, tout comme les cellules mères (Figure 21). Pour les RML11 shScotin-552, on voit une expression de *scotin4* similaire à celle observée chez les deux autres souches. Cependant, *scotin1* est augmentée de 50 à 100 fois par rapport à la lignée témoin. Contrairement aux autres lignées RML11, le ratio *scotin1/scotin4* chez les RML11 sh-552 induites est supérieur à 1. Les Bw5147 sh-552 changent aussi leur comportement face aux stimuli chimiques utilisés. Les lignées Bw5147 mère, sh Contrôle et shScotin-211 expriment en majorité *scotin1* alors que la lignée shScotin-552 produit faiblement *scotin1*. En fait, les cellules Bw5147 sh-552 expriment 20 à 50 fois moins de *scotin1* que les deux autres lignées Bw5147 analysées. C'est *scotin4* qui est synthétisée en majorité par les cellules Bw5147 sh-552. Ici encore, le ratio *scotin1/scotin4* est inversé comparativement aux lignées mères et contrôles. Alors, chez les Bw5147 et les RML11 exprimant de façon stable un shRNA contre les transcrits communs de *scotin*, une quantité appréciable de *scotin* est tout de même produite. Ce qui est étonnant, car le shScotin-552 devrait inhiber l'expression de toutes les isoformes de *scotin*. De plus, si on regarde l'expression des ARNm par qPCR, on voit que les isoformes de *scotin* sont toujours produites chez les lignées Bw5147 et RML11 stables pour leshScotin-211 lorsqu'elles sont induites et ce, à un niveau similaire à celui des souches contrôles (Figure 24). En conclusion, le shScotin-211 ne fonctionne pas en transfection stable et le shScotin-552 semble affecter le ratio d'expression des isoformes plutôt que d'inhiber leur synthèse uniquement.

## 4 DISCUSSION

Les bases du projet exposé dans ce mémoire se sont construites à Freiburg où l'équipe du Dr Steimle a effectué une analyse transcriptomique sur les thymocytes de souris C57/BL6 en développement tardif (DP vers SP). Avec cette approche, plusieurs transcrits dont les fonctions dans la maturation thymique étaient connues ou inconnues ont été identifiés comme étant fortement modulés au cours des différentes étapes. Pour valider nos résultats, on peut citer l'augmentation de certains marqueurs de la sélection négative comme *bim*, *gadd45 $\beta$* , *IkB<sub>NS</sub>* ou *nur77* lors du développement tardif. Ces mêmes molécules ont aussi été associées à la sélection négative par Baldwin et Hogquist (Baldwin et Hogquist, 2007). Un transcrit nommée *scotin*, qui était fortement modulée dans les cellules post-DP a attiré notre attention (Figure 4B). C'est une protéine transmembranaire pro-apoptotique (Bourdon et al., 2002) et nous l'avons associé à la sélection négative grâce à des analyses préliminaires (Knapp, 2003). Le but du présent mémoire était de compléter les données transcriptionnelles avec des évidences fonctionnelles pour déterminer si notre gène d'intérêt avait une importance réelle dans la sélection négative chez les thymocytes.

### 4.1 L'importance de *scotin* dans la différenciation thymique

Pour débiter l'étude du rôle de *scotin* dans les processus de développement thymique, nous avons eu la chance d'avoir en notre possession une souris ayant une délétion dans l'exon 2 (Bourdon JC, communication personnelle). Si ce gène est important dans les mécanismes de sélection et de maturation, on s'attend à ce que les souris *scotinE2<sup>-/-</sup>* présentent des anomalies au niveau du thymus. Après de simples colorations de surface pour étudier de façon globale le développement des thymocytes, nous avons conclu que la délétion effectuée dans le gène n'amène pas l'arrêt ou l'accumulation de cellules à une des étapes de la

maturation thymique et n'affecte pas l'exportation des lymphocytes T ni la survie de celles-ci dans la périphérie (Figure 8). De plus, aucune anomalie générale n'est observée chez les souris déficientes pour l'exon 2 de *scotin*. Étonnamment, on détecte une quantité identique de protéine Scotin dans le thymus des souris *scotinE2*<sup>-/-</sup> et des souris *+/+* (Figure 9). Donc, la délétion faite dans l'exon 2 n'influence pas la production de Scotin par les thymocytes, ce qui peut expliquer en partie l'absence de phénotype chez les souris *scotinE2*<sup>-/-</sup>. La découverte de plusieurs promoteurs internes (deux chez la souris) et de plusieurs isoformes protéiques (3 chez la souris), dont certaines ne possédant pas l'exon 2 (*scotin* 4 et 5), nous ont fourni une piste de réponse pour expliquer le phénotype normal des souris ayant une délétion au niveau de *scotin*. Cela nous a amené à croire que les isoformes avaient peut-être des implications différentes dans la maturation des thymocytes. Des trois isoformes exprimées chez la souris, seules *scotin1* et 4 sont produites par les thymocytes. Lorsqu'on dose l'expression de ceux-ci par qPCR, on note que chez les thymocytes non triés, c'est *scotin4* qui est trouvée en majorité (Figure 13B). Au cours des différentes étapes de maturation de ces cellules, la *scotin1* ne sera jamais produite plus fortement que la *scotin4* (Figure 13B). Il est important de souligner que seuls les DP de souris *scotinE2*<sup>-/-</sup> et de *scotinE2*<sup>+/-</sup> expriment la *scotin1* (Figure 13). Cependant, *scotin4* est produite par les DP des trois lignées murines *scotinE2*, même par la *scotinE2*<sup>-/-</sup>. Ce serait donc grâce au transcrite *scotin4* que la protéine Scotin est produite par les thymocytes des souris *scotinE2*<sup>-/-</sup> et on peut spéculer que cette isoforme permet la synthèse de la majorité de la protéine Scotin au niveau du thymus. Nous n'avons pas découvert d'anomalie chez les souris *scotinE2*<sup>-/-</sup>, mais il se peut que notre analyse n'ait pas été assez poussée. Des études plus exhaustives de la sélection négative chez ces souris auraient pu être faites. Par exemple, l'élimination de certaines familles des TCR-V $\beta$  par l'expression endogène de rétrovirus est un processus physiologique ressemblant à la délétion clonale et il est possible de doser cette élimination par FACS avec des anticorps spécifiques de ces familles (Simpson et al., 1994). De plus, les phénotypes aberrants peuvent parfois être très subtils. Il serait intéressant de croiser les souris *scotinE2*<sup>-/-</sup> avec des souches murines qui développent des maladies auto-immunes (ex : NOD). Comme cela, il serait possible de voir si la perte de *scotin1* rend ces souris encore plus vulnérables.

## 4.2 Production de Scotin chez les thymocytes de souris C57/BL6

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la morphologie du thymus est très importante et on peut le diviser globalement en deux régions fonctionnelles, soit le cortex et la médulla. Les cellules immatures se situent dans la première alors que celles terminant ou ayant terminé leur maturation se retrouvent dans la médulla. Il est très intéressant d'observer que Scotin est exprimée presque exclusivement par les cellules médullaires (Figure 6). Supportant ce fait, 88% des cellules semi-matures R3/R4 produisent Scotin comparativement à 21% chez les R1/R2 (Figure 7D). Il faut tout de même noter que la majorité, si ce n'est la totalité, des cellules médullaires présentent un signal positif pour cette protéine. Notre hypothèse initiale stipule que Scotin serait impliquée dans la sélection négative. Ce patron d'expression nous fait douter de cela. En effet, seulement une petite partie des cellules de la médulla subit la sélection négative. Dans ce cas, il serait étonnant qu'une molécule impliquée dans la délétion clonale soit produite aussi globalement. Comme l'anticorps utilisé reconnaît toutes les isoformes de Scotin répertoriées, il est possible de spéculer que le fort signal Scotin observé dans la médulla soit causé par la détection de *scotin1* et *scotin4* dans cette dernière. Ce profil d'expression protéique supporte l'hypothèse que Scotin serait importante pour le développement tardif des thymocytes, mais pas seulement dans la sélection négative. De plus, tous ces résultats nous ont porté à croire à croire que *scotin4* pourrait jouer un rôle important dans la maturation thymique.

## 4.3 Fonctions antagonistes de différentes protéines dans les mécanismes d'apoptose

Au contraire de *scotin1*, *scotin4* ne conduit pas à l'apoptose lorsque surexprimée dans les cellules HeLa (Figure 15) et les deux isoformes n'ont définitivement pas le même rôle dans le processus de mort cellulaire programmée. Le contrôle de l'apoptose n'est pas seulement

associé à une régulation transcriptionnelle, d'autres formes de régulation y jouent un rôle important. La production de protéines isoformes en est une très importante (Schwerk et Schulze-Osthoff, 2005). Il y a plusieurs exemples dans la littérature où on note des fonctions antagonistes entre les membres d'une même famille de protéine ou entre les isoformes d'une protéine dans le processus d'apoptose.

Par exemple, la balance entre l'expression de différentes protéines apoptotiques et anti-apoptotiques peut jouer un rôle déterminant dans la destinée cellulaire, notamment chez la famille Bcl-2. Les protéines composant cette famille peuvent s'hétérodimériser via leur domaine d'homologie (BH) (Gurudutta et al., 2005) ce qui a pour effet d'inhiber leurs fonctions (Sattler et al., 1997; Liu et al., 2003). Par exemple, l'action du membre pro-apoptotique Bax est contrecarrée par son association à Bcl-2 qui est anti-apoptotique (Shangary et Johnson, 2002). On croit que ce qui fait balancer le choix entre la survie et la mort cellulaire dans plusieurs contextes, est la différence entre les niveaux d'expression des isoformes de la famille Bcl-2 (Adams, 2003). Si les formes pro-apoptotiques sont exprimées majoritairement par rapport aux isoformes anti-apoptotiques, les cellules entreront en mort cellulaire. Chez les thymocytes DP, le membre anti-apoptotique Bcl-x<sub>L</sub> est exprimé très fortement et il joue un rôle antagoniste à celui de Bim dans les sélections thymiques (Bouillet et al., 2002). Chez les cellules T naïves ou mémoires, c'est la balance entre la production de Bim et de Bcl-2 qui est essentielle pour l'homéostasie (Wojciechowski et al., 2007). De plus, les isoformes d'une même protéine peuvent aussi avoir des fonctions opposées au niveau de la mort cellulaire. Les versions épissées du régulateur et marqueur de sélection négative Bim peuvent être citées. Les formes Bim<sub>EL</sub>, Bim<sub>L</sub> et Bim<sub>S</sub> sont toutes pro-apoptotiques. Ces isoformes sont séquestrées avec une avidité différentielle par les complexes de dynéine associés aux microtubules. Une nouvelle isoforme, Bim<sub>AD</sub>, ne possédant pas le site de liaison au cytosquelette a été identifiée (Marani et al., 2002). Elle a une fonction anti-apoptotique.

La protéine adaptatrice survivin, ayant une fonction dans le développement précoce des thymocytes, est aussi produite sous différents isoformes. Son absence chez des souris *survivin*<sup>-/-</sup> empêche la transition des thymocytes du stade DN vers le stade DP par un arrêt du cycle cellulaire, suivi de la mort des cellules (Okada et al., 2004). La fonction principale de cette protéine est d'inhiber l'activation des caspases. Sous ces diverses formes épissées, la survivin montre des fonctions antagonistes dans l'apoptose. Les différentes isoformes ont des localisations cellulaires distinctes ce qui pourrait expliquer leur différence au niveau de leurs fonctions anti-apoptotiques. L'isoforme survivin-2B est retrouvé dans le cytoplasme et elle est incapable de conduire les cellules vers l'apoptose sans les protéger de celle-ci toutefois (Mahotka et al., 2002). La survivin-Ex3 est anti-apoptotique et est localisée dans le noyau. Le taux d'expression des différentes isoformes corrèle avec le pronostic de différents cancers. Dans les stades tardifs de la tumorigenèse, on observe une perte de survivin-2B alors que survivin-Ex3 est toujours produite (Li, 2005). Dans le même ordre d'idée, le groupe de Bourdon a étudié l'expression des isoformes de *scotin* chez des patientes atteintes de différents types de cancers du sein (Bourdon JC, communication personnelle). Ils ont montré que dans 10% des tumeurs analysées, la séquence génomique de *scotin* est mutée. De plus, l'expression de *scotin1* est perdue dans 15% de ces tumeurs, alors que les autres isoformes sont détectables. Finalement, on note que *scotin5* est surexprimée dans certains cancers du sein et de l'ovaire. Ces données suggèrent que le profil d'expression des isoformes *scotin* pourrait être important dans le contrôle de la survie cellulaire.

On pourrait citer bien d'autres protéines qui ont des fonctions antagonistes dans l'apoptose via la production de leurs différentes isoformes. Notamment, ceux du proto-oncogène c-Myc (Benassayag et al., 2005) ou les quatre isoformes de BAG-1 (Chen et al., 2002). Ce dernier exemple est assez intéressant, car ces isoformes, au même titre que ceux de *Scotin*, ont des localisations cellulaires distinctes et sont produits via des promoteurs internes différents. Avec ce qui est connu des isoformes de *scotin*, il est possible de croire que si on a une expression plus élevée de *scotin4* dans une cellule par rapport à celle de *scotin1*, sa survie

sera favorisée (voir section 4.6). Si on est en présence du phénomène contraire, la mort cellulaire serait enclenchée. Des expériences en culture cellulaire où on exprimait des ratios croissants de *scotin4* par rapport à *scotin1* ont été effectuées chez les cellules HeLa. Les résultats semblaient soutenir cette hypothèse, mais ils n'étaient pas statistiquement satisfaisants (données non présentées).

#### **4.4 Localisation sub-cellulaire des isoformes de *scotin***

Le mécanisme via lequel *scotin1* mène à l'apoptose a été associé au 'ER stress' par plusieurs auteurs (Bourdon et al., 2002; Terrinoni et al., 2004). La morphologie du réticulum endoplasmique est fortement altérée lorsque les cellules enclenchent ce processus de mort cellulaire programmée. On peut le visualiser en colorant des protéines résidentes du réticulum endoplasmique qui s'agrègent et montrent une expression très forte dans ce cas (Terrinoni et al., 2004). Dans nos études de localisation cellulaire, nous avons observé ce phénomène d'altération morphologique du réticulum endoplasmique lors de la transfection de *scotin1*. Les cellules ayant un signal fort pour *scotin1* présentaient un signal très intense pour KDEL, le marqueur du réticulum endoplasmique utilisé dans nos études (données non présentées). La morphologie générale de ces cellules était très anormale (cellules petites, peu de cytoplasmes, noyaux difformes), ce qui suggère qu'elles étaient en apoptose. Cependant, la morphologie cellulaire ou celle du réticulum endoplasmique n'ont pas été affectées par la surexpression de *scotin4*. D'ailleurs, cette dernière isoforme ne colocalise pas avec KDEL (Figure 19). Comme la protéine Scotin4 débute avec la séquence transmembranaire (Figure 5), celle-ci pourrait servir de séquence signal dans ce cas. Cette protéine pourrait donc être excrétée ou présente dans les vésicules intracellulaires de transport. Il serait intéressant d'étudier plus en détail la localisation cellulaire de Scotin4 et les interactions que les isoformes de Scotin font avec les autres protéines intracellulaires. Ainsi, il serait possible de voir si leurs fonctions sont affectées par les associations moléculaires que les isoformes

effectuent dans les cellules. Tout nous pousse à croire que les isoformes de *scotin* ont des fonctions distinctes dues aux nombreuses différences que nous avons découvertes entre eux. Est-ce que, tout comme la survivin (Mahotka et al., 2002) et les isoformes de Bim (Marani et al., 2002), leur localisation sub-cellulaire distincte explique leur fonction apoptotique opposée?

Il est intéressant de noter qu'il a été découvert dernièrement que les thymocytes de souris déficientes en *bim* sont moins sensibles au traitement à la thapsigargin, un agent inducteur du 'ER stress' (Puthalakath et al., 2007). Cette voie d'apoptose a été impliquée dans plusieurs maladies humaines (Rutishauser et Spiess, 2002) et Bim est essentiel pour son induction dans une panoplie de types cellulaires dont les thymocytes. Plusieurs molécules sont impliquées dans cette voie d'apoptose et toutes ne sont pas d'importance équivalente pour son enclenchement chez les différentes lignées. Par exemple, *puma*, dont la perte rend la lignée cellulaire MEF résistante au traitement à la thapsigargin (Reimertz et al., 2003), n'est pas nécessaire à l'induction du 'ER stress' chez les thymocytes (Puthalakath et al., 2007). Donc, il pourrait y avoir une connexion entre *bim* et *scotin* pour induire le 'ER stress' dans les thymocytes. L'implication du 'ER stress' dans la sélection négative et l'importance de *scotin* dans ce processus d'apoptose chez les thymocytes méritent, selon nous, une attention particulière.

#### **4.5 Importance des isoformes *scotin* lors de la mort cellulaire induite des thymocytes immatures**

Dans le but d'analyser l'implication des isoformes de *scotin* dans la mort cellulaire chez les thymocytes, nous avons tout d'abord établi un protocole d'induction de l'apoptose chez les thymocytes DP. Ces derniers sont très sensibles aux stimuli apoptotiques (Tadakuma et al.,

1990) par exemple, face aux glucocorticoïdes (Zilberman et al., 2004). Bien que notre protocole d'induction de l'apoptose fonctionne à merveille (Figure 15E), que l'ARNm du marqueur de sélection négative *nur77* (Figure 16B) soit modulé à la hausse en présence des inducteurs, *bim*, l'autre régulateur de la sélection négative, est tout aussi augmenté chez les DP induits que chez les DP non induits (données non présentées). Donc, la modulation à la hausse de l'expression de *bim* n'est pas causée par des mécanismes cellulaires spécifiques enclenchés par l'induction chimique, elle pourrait être une simple conséquence de l'entrée en apoptose des thymocytes qui survient dans les deux contextes à des degrés différents. On n'observe aucune augmentation de l'expression des isoformes de *scotin* au cours de la période d'incubation en présence de PMA et d'ionomycin (Figure 17). Cela est vrai aussi lorsqu'on dose les ARNm avec des amorces reconnaissant toutes les formes de *scotin* connues. À la lumière de ces résultats, nous pouvons tirer deux conclusions : soit que *scotin* n'est tout simplement pas impliquée dans la sélection négative ou bien que notre modèle ne reflète pas entièrement les signaux transmis lors de ce processus. Il est justifiable de se demander à quel point notre essai *ex vivo* reproduit la sélection négative et plusieurs évidence permettent de concilier nos résultats avec une fonction de *scotin* dans les mécanismes de délétion clonale.

Le PMA et l'ionomycin activent les deux voies principales qui sont enclenchées lors de la liaison du TCR chez les cellules T et les thymocytes (Parra et al., 2005). L'ionomycin étant un ionophore, il va conduire à une élévation de la concentration intracellulaire de calcium (Bouillet et al., 1999). Cette augmentation activera les cascades de signalisation calcineurine/NFAT (Zhao et al., 1995; Ohoka et al., 1996). Le PMA aura pour fonction d'activer la PKC (cPKC et nPKC), une sérine/thréonine kinase (Kaldjian et al., 1988). Dans le contexte physiologique de signalisation, le TCR lié active la phospholipase C $\gamma$ 1 qui à son tour enclenche les deux voies mentionnées plus haut en produisant de l'inositol triphosphate (IP $_3$ ), qui permet la libération du calcium, et du diacylglycérol (DAG), qui active la PKC et la voie Ras (Werlen et al., 2003). Donc, du point de vue moléculaire, les voies de signalisation

tardives activées lors de la liaison du complexe TCR au complexe pCMH sont reproduites par notre protocole d'induction. Donc, cette méthodologie reproduit les mécanismes de sélection négative en ce sens qu'il permet la transmission d'un signal intracellulaire fort via les composantes activées tardivement par le TCR. Cependant, plusieurs événements de signalisation précoce qui se déroulent via les protéines associées au TCR comme par exemple via le complexe CD3 (Love et Shores, 2000), via les protéines adaptatrices telle LAT (Aguado et al., 2002) ou via les tyrosines kinase comme ZAP-70 (Negishi et al., 1995) sont contournés dans notre essai *ex vivo*. La signalisation est initiée plus en aval du complexe CD3-TCR dans notre modèle comparativement à ce qui se passe lors de la sélection négative *in vivo*. Comme seulement quelques-unes des voies de signalisation précoces sont enclenchées via l'induction au PMA/ionomycine, il se peut que les signaux de transcription nécessaires à l'expression de *scotin* ne soient pas activés.

De plus, un contexte spatio-temporel adéquat est essentiel au bon déroulement de la sélection négative (Ladi et al., 2006; Takahama, 2006). Les interactions avec les cellules stromales du thymus sont d'une importance primordiale pour le développement des thymocytes (Punt et al., 1994; Fowlkes et Schweighoffer, 1995; Starr et al., 2003). L'absence de ces contacts dans notre modèle pourrait causer un manque de signaux intracellulaires essentiels. Chez les cellules T matures, la spécificité de reconnaissance dépend des sites de liaison de leur TCR alors que leur activation est régulée par les signaux de co-stimulation (Vacchio et al., 2005; Ladi et al., 2006). L'importance de la co-stimulation pour l'activation des cellules T périphériques est très bien documentée, mais son implication dans le développement des thymocytes reste sujet de débat. Il a été démontré que si on bloque la liaison de B7 à CD28 en culture de thymus fœtaux (FTOC) à l'aide d'anticorps dirigés contre B7-1 et B7-2, on diminue la délétion clonale enclenchée par la stimulation via un anti-CD3 (Amsen et Kruisbeek, 1996). Il est aussi à noter que la sélection négative des thymocytes peut se dérouler à divers stades de maturation. Elle ne survient pas uniquement chez les DP, mais aussi chez les post-DP (MacDonald et Lees, 1990; Kishimoto et Sprent, 1997; Punt et al.,

1997). Il est alors raisonnable de penser que des stratégies de délétion clonale différentes pourraient être utilisées tout dépendant du stade de maturation auquel les précurseurs rencontrent leurs antigènes (Punt et al., 1997). Le groupe de Sprent a défini les cellules CD4+ médullaires en deux catégories : les semi-matures HSA<sup>élevé</sup> et les matures HSA<sup>faible</sup> (Kishimoto et Sprent, 1997). Ces deux types cellulaires ont des sensibilités différentielles aux stimuli de sélection négative. Les thymocytes CD4+ semi-matures sont encore sensibles à la stimulation par la combinaison anti-TCR/anti-CD28 alors que les matures ne le sont plus. En fait, ces derniers prolifèrent en présence de ce stimulus. De plus, cette étude a démontré que les DP et les cellules CD4+HSA<sup>élevé</sup> ont des sensibilités différentes aux stimuli apoptotiques. Par exemple, les CD4+HSA<sup>élevé</sup> sont sensibles à l'apoptose médiée par Fas, contrairement aux DP, et la quantité d'anti-TCR à leur fournir pour qu'elles entrent en apoptose doit être plus élevée que celle à donner aux DP. Il serait donc possible que les mécanismes employés pour enclencher la sélection négative dans ces populations thymiques soient distincts de ceux mis en cause chez les DP. Entre autre, *scotin* pourrait être impliquée seulement dans les mécanismes de mort survenant chez les cellules semi-matures CD4+HSA<sup>élevée</sup> où son expression est forte. À la lumière de ces résultats, on peut conclure qu'il n'y a pas de lien direct ou de corrélation entre l'apoptose induite chimiquement chez les thymocytes immatures de type DP et l'expression de *scotin*. Dans cet essai, certains événements qui conduisent à la sélection négative *in vivo* pourraient ne pas être reproduits. Comme il est maintenant connu que les thymocytes ont différentes sensibilités face aux divers stimuli apoptotiques à différents stades de leur développement, il serait intéressant d'induire les diverses sous-populations thymiques avec une combinaison d'anticorps, comme anti-CD3/anti-CD28, qui permettent la signalisation directe via le TCR et de vérifier le comportement des isoformes *scotin* dans ce cas (Rajpal et al., 2003). Peut-être que cela nous donnerait une meilleure réponse quant à l'implication de *scotin* au niveau de la mort programmée de thymocytes.

#### **4.6 Expressions et rôles des isoformes *scotin* lors de l'apoptose induite chez des lignées thymiques immortelles**

La culture primaire et la transfection des thymocytes isolés de souris sont difficiles et peu triviales. En utilisant des lignées immortelles de thymomes, nous pouvons contourner les problèmes causés par la culture *ex vivo* des thymocytes. Ces derniers doivent croître dans un environnement semblable à celui de leur organe de maturation, sinon leur survie est compromise. On le voit bien avec les thymocytes DP qui sont mis en culture pour 8 heures sans inducteur et où 35% des DP entrent en apoptose. Le FTOC est souvent utilisée pour reproduire l'architecture thymique (Hare et al., 1999), mais cette technique étant laborieuse et demandant beaucoup de mise au point, nous l'avons écartée. Pour continuer notre analyse fonctionnelle de *scotin*, deux lignées de thymomes poussant très bien en milieu de culture ont été choisies.

Les cellules Bw5147 sont de phénotype immatures DN alors que les cellules RML11 représentent des cellules matures de type CD4 SP. Si on traite ces lignées avec le même stimulus apoptotique que les thymocytes DP, la lignée Bw5147 montre une bonne induction de l'apoptose alors que chez les RML11, il n'y a pas d'accumulation de cellules annexinV positives (Figure 20). Donc, chez des lignées thymiques représentant des stades de maturation différents, on observe un comportement complètement opposé face à un stimulus mimant un signal TCR fort. Il est connu que les cellules immatures sont très sensibles aux signaux de sélection et autres stimuli (Zilberman et al., 2004) alors que les thymocytes matures sont résistants (Kishimoto et Sprent, 1997). Par qPCR, nous avons observé une induction du transcrite de *scotin1* chez les Bw5147 induites et une augmentation marquée de *scotin4* chez les RML11 induites (Figure 21B). Le ratio *scotin1/scotin4* est supérieur à 1 chez les Bw5147 alors qu'il est inférieur à 1 chez les RML11. Pour l'isoforme *scotin1*, on ne remarque aucune augmentation chez les RML11 induites alors qu'après 48 heures d'induction pour la souche Bw5147 on note une hausse de *scotin4*. Comme seulement 35%

des Bw5147 traités entrent en apoptose (Figure 20), il est possible que l'augmentation de *scotin4* chez cette souche soit présente seulement chez les cellules survivant aux stimuli. De plus, comme le taux de cellules positives pour l'annexinV reste constant tout au long de l'induction chez les RML11, cela peut expliquer le manque d'augmentation de *scotin1* chez celles-ci. Donc, l'expression des isoformes varie selon la destinée des cellules traitées.

Il a été démontré qu'il était possible d'inhiber la synthèse d'isoformes spécifiques d'un gène par RNAi sans affecter la production des autres isoformes non ciblées (Celotto et Graveley, 2002). Nous avons donc tenté d'utiliser cette méthodologie pour *scotin* à l'aide de vecteurs rétroviraux shRNA ciblant les isoformes. Le but ultime étant de générer des lignées stables qui expriment un ARN interférant contre une isoforme précise de *scotin*. Dû aux restrictions imposées par le manque de séquence spécifique à *scotin4* par rapport à *scotin1* (voir section 3.2 et Figure 10), nous n'avons pas généré de shScotin contre *scotin4*. L'efficacité des shScotin a été testée par transfection transitoire chez des cellules HeLa suivi d'un dosage de Scotin par Western blot (Figure 22). Par la suite, des lignées stables pour l'expression de différents shRNA ont été produites (voir section 3.9). Des résultats intéressants ont été obtenus lorsqu'on induit ces lignées avec le PMA et l'ionomycine. Alors que les lignées contrôles et les lignées stables pour le shScotin-211 (ciblant *scotin1*) se comportent de manière identique aux cellules mères, les lignées de thymomes exprimant le shScotin-552 ont une réponse inverse face aux stimuli. C'est-à-dire que les cellules RML11 entrent en apoptose et les cellules Bw5147 survivent (Figure 23). Le shScotin-211 ne semble pas fonctionner dans ces lignées stables pour une raison inconnue. Pourtant, les essais préliminaires en transfection transitoires chez les HeLa donnaient de bons résultats pour l'inhibition de la synthèse protéique de Scotin1 (Figure 22). Il ne faut pas oublier que c'est par Western blot qu'on a effectué les tests d'efficacité d'inhibition chez les cellules HeLa alors que c'est par qPCR qu'on les a effectués chez les thymomes (Figure 24). La différence dans les méthodes de détection utilisées entre les deux séries d'expérience pourrait expliquer en partie la divergence observée pour l'inhibition de l'expression. Cependant, comme les

comportements apoptotiques des cellules stables pour le shScotin-211 ne changent pas, cela nous pousse à croire qu'il n'affecte tout simplement pas la synthèse de *scotin1* chez les thymomes et que sa fonction pro-apoptotique est conservée chez ceux-ci. Il aurait été utile de savoir si l'autre shRNA ciblant *scotin1* (shScotin-296) que nous avons généré a le même comportement dans ce contexte. Ainsi, nous aurions pu différencier entre un ciblage ardu de l'isoforme *scotin1* ou entre le fait que le shScotin-211 ne fonctionne pas en transfection stable.

Afin d'expliquer les différences de comportements causées par l'expression du shScotin-552, nous avons spéculé que chez les cellules RML11, le shScotin-552 cible *scotin4* ce qui empêcherait son action anti-apoptotique et que chez les cellules Bw5147, il arrêterait la synthèse de *scotin1*. Cependant, un résultat surprenant a émané des essais d'induction lorsqu'on a dosé les transcrits de *scotin* chez les thymomes exprimant de façon stable le shScotin-552. En effet, les isoformes exprimées au cours de l'incubation sont différentes de celles produites lorsqu'on induit les cellules mères ou les lignées contrôles (Figure 24). Les RML11 shScotin-552 expriment de 10 à 20 fois plus de *scotin1* que la lignée contrôle et ont un ratio *scotin1/scotin4* élevé. Les cellules Bw5147 shScotin-552 produisent peu de *scotin1* et ont un ratio *scotin1/scotin4* inférieur à 1 lorsqu'induites. Chez ces deux lignées, le contraire était observé chez les cellules mères ou contrôles. Il est à noter que l'expression de *scotin4* est similaire entre toutes les souches shScotin stables, tant chez les RML11 que chez les Bw5147 (Figure 24). Elle ne semble pas affectée de façon significative contrairement à ce qu'on observe pour la production de *scotin1*. Il semble que la composante importante pour le contrôle de l'entrée en apoptose dans le cas présent soit le ratio d'expression *scotin1/scotin4* et non la présence ou l'absence d'un des deux gènes. Donc, si on change ce ratio dans des lignées de thymomes immortelles, on peut inverser la réponse attendue face à un signal TCR fort. Par exemple, avec un ratio plus élevé, des cellules anti-apoptotiques deviennent résistantes au stimulus et vice versa.

Le shScotin-552 devrait inhiber la synthèse de toutes les formes de *scotin*. Ce n'est pas ce qu'on observe dans nos expériences. Des transcrits *scotin* demeurent présents chez les thymomes stables pour shScotin-552, *scotin4* n'est pas affectée en aucun cas par ce shRNA et *scotin1* est exprimée très fortement chez les RML11 shScotin-552. Il aurait été intéressant de pouvoir quantifier la production de la protéine chez ces lignées, mais cela n'a pas fonctionné (données non exposées). Il est important de spécifier que les transfectants stables testés jusqu'à maintenant n'avaient pas été clonés, ils provenaient d'un 'pool' cellulaires sélectionné. Les raisons pour lesquelles il y a une augmentation de la production de *scotin1* chez les RML11 en présence shScotin-552 nous sont inconnues. Dans ce cas-ci, il aurait été utile de pouvoir comparer les résultats obtenus avec le shScotin-552 et avec le shScotin-560 pour vérifier s'ils se comportent de façon identique par qPCR. Cependant, aucun autre shScotin n'a été testé en transfection stable pour l'instant. Une hypothèse qu'on pourrait émettre est qu'une autre isoforme pro-apoptotique est présente dans les cellules RML11. Si c'est le cas, ce gène ne devrait pas posséder l'exon 5, ciblé par le shScotin-552, mais devrait avoir les séquences détectées par les amorces de *scotin1*. C'est le cas de *scotin3*. Cependant, comme son expression n'avait pas été détectée dans les sous-populations thymiques lors de nos qPCR préliminaires (données non exposées), nous avons mis cette isoforme de côté dans nos analyses ultérieures. Cependant, rien n'empêche de penser qu'une telle isoforme est présent chez la souris, mais qu'il nous est inconnu pour l'instant. Il est à noter que lorsqu'on dose le nombre de copies des isoformes *scotin* exprimées par les thymocytes ou les thymomes, il y a toujours un surplus des transcrits communs de *scotin* qui est détecté par rapport à la somme des copies des deux isoformes *scotin1* et *scotin4* (Figures 12, 16 et 21). Cette somme est environ deux fois moins élevée que le nombre de transcrits communs de *scotin*. Ce qui renforce l'hypothèse qu'une autre isoforme de *scotin* est produite par les thymocytes, mais qu'on ne la prend pas en considération dans nos analyses. Il serait intéressant de vérifier, par PCR emboîtées ou RACE-PCR par exemple, si d'autres isoformes seraient exprimées dans le thymus et les thymomes. Le fait est que lorsqu'on diminue l'expression de *scotin1* dans une lignée cellulaire pro-apoptotique, elle devient résistante à l'induction de l'apoptose et vice versa.

Ces dernières expériences démontrent que l'expression contrôlée des isoformes de *scotin* est très importante au niveau de l'homéostasie de la mort cellulaire chez les lignées de thymomes. Tant pour les conduire vers l'apoptose que pour contribuer à la survie des cellules. Comme les thymomes sont des lignées dérivées des thymocytes, il est raisonnable de croire que Scotin est aussi importante dans ces processus au niveau des cellules normales. Avec les outils que nous avons développés au cours des dernières années, il sera possible de répondre à la question suivante : est-ce que Scotin est nécessaire au développement des thymocytes dans un contexte physiologique? Les shRNA pourraient être utilisés pour transfecter ou pour infecter des thymocytes en culture primaire. Par la suite, la capacité de maturation de ces cellules serait analysée par la méthode FTOC. Le développement d'un anticorps fiable pour la détection de Scotin est essentiel au bon déroulement des études futures. L'absence d'un tel réactif nous a freiné à quelques reprises dans nos démarches et de plus, les réponses qu'on obtiendrait avec cet outil seront plus claires (ex : dosage de l'efficacité des shRNA). Finalement, si nous avons en notre possession une souris 'knock out' complète pour Scotin, nous pourrions avoir une meilleure idée de l'importance de ce gène dans le développement thymique. En cherchant des homologues de *xShisa*, un gène impliqué dans la formation de la tête chez *Xenopus*, un groupe japonais a découvert dernièrement un transcrit identifié comme *mShisa5* qui correspond en fait à *scotin1* (Furushima et al., 2007). Afin d'étudier son implication dans le développement, ils ont créé une souris qui a une délétion complète au niveau des exons E4 et E5 de *scotin*. Les souris sont viables, fertiles et les embryons se développent normalement. Ils ont étudié uniquement le développement embryonnaire et ils n'ont observé aucun phénotype aberrant au niveau de la formation de la tête. Aucune analyse du système immunitaire ou bien des thymocytes n'a été effectué. Il serait donc intéressant d'étudier cette souris à ce niveau.

## 4.7 Perspectives

Deux articles analysant les événements moléculaires associés aux mécanismes de sélections thymiques ont paru dernièrement. Les résultats ont été obtenus par une approche de micropuces à ADN sur des modèles cellulaires et murins différents. Le groupe de Verdin a comparé les signaux activés par la liaison du TCR chez des cellules DO11.10 (lignée de thymocytes immortels) dont l'expression de Nur77 est soit constitutive (modèle sélection négative) ou inactive (modèle sélection positive) (Kasler et Verdin, 2007). Les résultats ont permis l'identification de divers gènes connus pour leur implication dans la sélection négative (*bim*), positive (*zap70*) ou bien pour les deux (*bcl2*). Le gène *scotin* est un des 142 transcrits fortement modulé chez ces cellules qui a ressorti dans les analyses. Les auteurs l'associent autant avec la sélection négative que positive. L'article de Baldwin et Hogquist abonde dans le même sens et ce, dans un contexte plus physiologique (Baldwin et Hogquist, 2007). Utilisant les souris HY<sup>cd4</sup> (Baldwin et al., 2005), ils ont comparé le profil d'expression des thymocytes double positif dans un contexte de sélection positif (femelles), de sélection négative (mâles) et sur un fond génétique non propice à la sélection. Avec cette méthodologie, ils ont identifié *scotin* comme étant modulé à la hausse dans les deux processus de sélection. Tout comme lors de nos études préliminaires, les micropuces utilisées dans ces deux articles ne différencient pas les isoformes et c'est donc les transcrits communs de *scotin* qui sont dosés. Alors, les résultats obtenus avec nos essais chez les RML11 et les Bw5147 induits, qui montrent que *scotin* est augmentée dans un contexte de survie ou de mort cellulaire chez des lignées thymiques, sont compatibles avec les résultats exposés dans ces deux publications. Selon l'article de Baldwin, peu de molécules sont essentielles à la sélection négative. Ayant comparé les données des articles utilisant une approche transcriptomique pour identifier les gènes importants dans ce processus, ils ont découvert que les deux seuls gènes qui sont modulés de façon identique entre toutes les approches sont *bim* et *nur77*. Selon eux, ce sont les régulateurs primaires de la sélection négative. D'autres protéines peuvent être importantes, mais comme la délétion clonale est un mécanisme essentiel à l'homéostasie du corps, il est très probable que des mécanismes de redondance et

de compensation soient présents pour assurer sa bonne complétion. De plus, comme nous l'avons mentionné précédemment, il est possible de penser que différents mécanismes de sélection négative sont présents chez les thymocytes à des stades de maturation distincts et qu'ils nécessitent alors des molécules spécifiques pour se dérouler à ces étapes précises. Ce qui permet de concilier une implication de *scotin* dans ce processus malgré son manque de modulation chez les DP soumis à un signal TCR fort.

Il est connu que les thymocytes passent environ 14 jours dans le thymus après avoir atteint leur maturité et avant d'être exportés vers la périphérie (Hayday et Pennington, 2007). Ce séjour serait nécessaire comme dernier test de l'affinité du TCR envers son ligand. Les thymocytes matures se déplacent alors dans le thymus à la recherche de leur pCMH complémentaire. Notre hypothèse de départ voulait que *scotin* soit impliquée dans le processus de sélection négative. À la lumière de nos résultats, il est possible de penser que *scotin1* régule la sélection négative à un stade précis du développement et que *scotin4* fourni un signal de survie aux cellules matures de la médulla qui attendent leur exportation. Rappelons que l'expression de cette isoforme est à son plus fort chez les R4, ces thymocytes médullaires ayant presque terminé leur maturation. Comme *scotin4* semble avoir un rôle à jouer dans la survie cellulaire chez des lignées de thymomes de phénotype mature RML11, il serait intéressant d'orienter nos études futures vers cette voie. Une découverte faite par un groupe de recherche de l'Institut Max-Planck de Freiburg est très intéressante à citer dans ce contexte (Bessin, 2006). On y a développé un modèle murin permettant d'identifier les gènes importants pour la sélection positive. Ils ont utilisé des souris transgéniques HA-TCR nude H-2d Rag<sup>-/-</sup>, chez lesquelles aucun thymocyte ou lymphocyte n'est produit. Ils leur ont greffé un thymus foetaux de souris H-2b Rag<sup>-/-</sup>. Les deux souches étant sur un fond génétique CMH différent, la sélection positive est bloquée. On retrouve des thymocytes DP dans le thymus, mais il n'y a pas de cellules T en périphérie. En infectant les souris transplantées avec des retrovirus Mo-MLV, ils cherchaient à découvrir des insertions rétrovirales aléatoires dans le génome des précurseurs lymphocytaires qui permettent de

contrecarrer ce blocage et de produire des cellules T matures. Les mutations créées ainsi peuvent amener un phénotype de type 'gain de fonction' pour les gènes affectés. Les provirus agissent en tant que promoteur ou 'enhancer' de transcription dans ce cas. Avec cette méthodologie, ils ont découvert qu'une insertion de Mo-MLV dans la séquence promotrice de *scotin4* cause l'apparition de cellules T dans la périphérie. Donc, on peut spéculer que la surexpression de *scotin4* permet à la sélection positive de se dérouler dans ce modèle.

#### 4.8 Conclusion

En conclusion, le gène *scotin* possède 3 promoteurs, dont 2 internes, qui permettent l'expression d'au moins 2 isoformes dans le thymus. L'expression de *scotin1* et *scotin4* augmente avec la maturation des thymocytes, mais c'est *scotin4* qui est exprimée majoritairement tout au long du développement. Ces isoformes ont des fonctions différentes dans l'apoptose et leur localisation sub-cellulaire l'est tout autant. La protéine Scotin est exprimée presque exclusivement par les cellules thymiques de la médulla plus spécifiquement par les cellules R3/R4. Un signal intracellulaire fort, mimant celui fourni par le TCR lors de la sélection négative, n'amène pas l'augmentation de la synthèse de *scotin* chez des thymocytes immatures DP. Cependant, des lignées de thymomes ayant des réponses pro- et anti-apoptotiques face à ce même stimuli chimique montrent une expression préférentielle de *scotin1* et *scotin4* respectivement. Si on inhibe la production de *scotin* chez ces lignées de thymomes avec des shRNA contre les transcrits communs de *scotin*, on altère la réponse apoptotique normale. Des cellules pro-apoptotiques en présence de PMA et d'ionomycin deviennent résistantes à la mort cellulaire et expriment plus de *scotin4* que de *scotin1*, alors que le contraire est observé chez les cellules mères. Nous croyons que les deux isoformes de *scotin* sont impliquées dans le développement thymique et ce, de façon indépendante l'une de l'autre.

## 5 BIBLIOGRAPHIE

Aaltonen, J., et Bjorses, P. (1999). Cloning of the APECED gene provides new insight into human autoimmunity. *Ann Med* 31, 111-116.

Adams, J. M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17, 2481-2495.

Aguado, E., Richelme, S., Nunez-Cruz, S., Miazek, A., Mura, A. M., Richelme, M., Guo, X. J., Sainty, D., He, H. T., Malissen, B., et Malissen, M. (2002). Induction of T helper type 2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. *Science* 296, 2036-2040.

Alam, S. M., Travers, P. J., Wung, J. L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S. C., et Gascoigne, N. R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381, 616-620.

Alberola-Ila, J. e. a. (2003). The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. *Immunol Rev* 191, 79-96.

Amsen, D., et Kruisbeek, A. M. (1996). CD28-B7 interactions function to co-stimulate clonal deletion of double-positive thymocytes. *Int Immunol* 8, 1927-1936.

Anderson, G., et Jenkinson, E. J. (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 1, 31-40.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C., et Mathis, D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 23, 227-239.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401.

Baecher-Allan, C., et Hafler, D. A. (2006). Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 203-216.

Bain, G., Cravatt, C. B., Loomans, C., Alberola-Ila, J., Hedrick, S. M., et Murre, C. (2001). Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat Immunol* 2, 165-171.

Baldwin, T. A., et Hogquist, K. A. (2007). Transcriptional analysis of clonal deletion in vivo. *J Immunol* *179*, 837-844.

Baldwin, T. A., Hogquist, K. A., et Jameson, S. C. (2004). The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus. *J Immunol* *173*, 6515-6520.

Baldwin, T. A., Sandau, M. M., Jameson, S. C., et Hogquist, K. A. (2005). The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection. *J Exp Med* *202*, 111-121.

Barthlott, T., Kohler, H., et Eichmann, K. (1997). Asynchronous coreceptor downregulation after positive thymic selection: prolonged maintenance of the double positive state in CD8 lineage differentiation due to sustained biosynthesis of the CD4 coreceptor. *J Exp Med* *185*, 357-362.

Benassayag, C., Montero, L., Colombie, N., Gallant, P., Cribbs, D., et Morello, D. (2005). Human c-Myc isoforms differentially regulate cell growth and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* *25*, 9897-9909.

Bessin, G. (2006). Genetic screen for positive selection in the thymus. Thèse de doctorat, Université de Freiburg, Allemagne.

Bettini, M., Xi, H., Milbrandt, J., et Kersh, G. J. (2002). Thymocyte development in early growth response gene 1-deficient mice. *J Immunol* *169*, 1713-1720.

Bhakta, N. R., Oh, D. Y., et Lewis, R. S. (2005). Calcium oscillations regulate thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nat Immunol* *6*, 143-151.

Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K., et Bleul, C. C. (2003). Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med* *198*, 757-769.

Boniface, J. J., Rabinowitz, J. D., Wulfig, C., Hampl, J., Reich, Z., Altman, J. D., Kantor, R. M., Beeson, C., McConnell, H. M., et Davis, M. M. (1998). Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected]. *Immunity* *9*, 459-466.

Borgulya, P., Kishi, H., Muller, U., Kirberg, J., et von Boehmer, H. (1991). Development of the CD4 and CD8 lineage of T cells: instruction versus selection. *Embo J* *10*, 913-918.

Born, W. K., Reardon, C. L., et O'Brien, R. L. (2006). The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 18, 31-38.

Bosselut, R., Zhang, W., Ashe, J. M., Kopacz, J. L., Samelson, L. E., et Singer, A. (1999). Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction. *J Exp Med* 190, 1517-1526.

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., Adams, J. M., et Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286, 1735-1738.

Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., et Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-926.

Bourdon, J. C., Renzing, J., Robertson, P. L., Fernandes, K. N., et Lane, D. P. (2002). Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane. *J Cell Biol* 158, 235-246.

Bouso, P., Bhakta, N. R., Lewis, R. S., et Robey, E. (2002). Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296, 1876-1880.

Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T. I., Yamashita, Y., Sharrow, S. O., et Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 13, 59-71.

Brummelkamp, T. R., Bernards, R., et Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.

Calnan, B. J., Szychowski, S., Chan, F. K., Cado, D., et Winoto, A. (1995). A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 3, 273-282.

Celotto, A. M., et Graveley, B. R. (2002). Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. *Rna* 8, 718-724.

Chan, S. H., Cosgrove, D., Waltzinger, C., Benoist, C., et Mathis, D. (1993). Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell* 73, 225-236.

Chen, J., Xiong, J., Liu, H., Chernenko, G., et Tang, S. C. (2002). Distinct BAG-1 isoforms have different anti-apoptotic functions in BAG-1-transfected C33A human cervical carcinoma cell line. *Oncogene* 21, 7050-7059.

Cheng, L. E., Chan, F. K., Cado, D., et Winoto, A. (1997). Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *Embo J* 16, 1865-1875.

Cho, H. J., Edmondson, S. G., Miller, A. D., Sellars, M., Alexander, S. T., Somersan, S., et Punt, J. A. (2003). Cutting edge: identification of the targets of clonal deletion in an unmanipulated thymus. *J Immunol* 170, 10-13.

Cochran, J. R., Cameron, T. O., et Stern, L. J. (2000). The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity* 12, 241-250.

Cunningham, N. R., Artim, S. C., Fornadel, C. M., Sellars, M. C., Edmonson, S. G., Scott, G., Albino, F., Mathur, A., et Punt, J. A. (2006). Immature CD4+CD8+ thymocytes and mature T cells regulate Nur77 distinctly in response to TCR stimulation. *J Immunol* 177, 6660-6666.

Daniels, M. A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Hollander, G. A., Gascoigne, N. R., et Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444, 724-729.

Dave, V. P., Allman, D., Keefe, R., Hardy, R. R., et Kappes, D. J. (1998). HD mice: a novel mouse mutant with a specific defect in the generation of CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8187-8192.

Dequiedt, F., Kasler, H., Fischle, W., Kiermer, V., Weinstein, M., Herndier, B. G., et Verdin, E. (2003). HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity* 18, 687-698.

Dequiedt, F., Van Lint, J., Lecomte, E., Van Duppen, V., Seufferlein, T., Vandenheede, J. R., Wattiez, R., et Kettmann, R. (2005). Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Exp Med* 201, 793-804.

Derbinski, J., Gabler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenahn, M., Peltonen, L., Walter, J., et Kyewski, B. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* 202, 33-45.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., et Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2, 1032-1039.

Dong, C., Davis, R. J., et Flavell, R. A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20, 55-72.

Dower, N. A., Stang, S. L., Bottorff, D. A., Ebinu, J. O., Dickie, P., Ostergaard, H. L., et Stone, J. C. (2000). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 1, 317-321.

Ehlers, M., Laule-Kilian, K., Petter, M., Aldrian, C. J., Grueter, B., Wurch, A., Yoshida, N., Watanabe, T., Satake, M., et Steimle, V. (2003). Morpholino antisense oligonucleotide-mediated gene knockdown during thymocyte development reveals role for Runx3 transcription factor in CD4 silencing during development of CD4-/CD8+ thymocytes. *J Immunol* 171, 3594-3604.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., et Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fowlkes, B. J., et Schweighoffer, E. (1995). Positive selection of T cells. *Curr Opin Immunol* 7, 188-195.

Furushima, K., Yamamoto, A., Nagano, T., Shibata, M., Miyachi, H., Abe, T., Ohshima, N., Kiyonari, H., et Aizawa, S. (2007). Mouse homologues of Shisa antagonistic to Wnt and Fgf signalings. *Dev Biol* 306, 480-492.

Gallegos, A. M., et Bevan, M. J. (2006). Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev* 209, 290-296.

Garcia, K. C., Teyton, L., et Wilson, I. A. (1999). Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17, 369-397.

Germain, R. N. (2001). The T cell receptor for antigen: signaling and ligand discrimination. *J Biol Chem* 276, 35223-35226.

Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2, 309-322.

Gil, D., Schamel, W. W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F., et Alarcon, B. (2002). Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* *109*, 901-912.

Goldrath, A. W., et Bevan, M. J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* *402*, 255-262.

Gray, D. H., Seach, N., Ueno, T., Milton, M. K., Liston, A., Lew, A. M., Goodnow, C. C., et Boyd, R. L. (2006). Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* *108*, 3777-3785.

Gurudutta, G. U., Verma, Y. K., Singh, V. K., Gupta, P., Raj, H. G., Sharma, R. K., et Chandra, R. (2005). Structural conservation of residues in BH1 and BH2 domains of Bcl-2 family proteins. *FEBS Lett* *579*, 3503-3507.

Hanahan, D. (1998). Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* *10*, 656-662.

Hare, K. J., Jenkinson, E. J., et Anderson, G. (1999). In vitro models of T cell development. *Semin Immunol* *11*, 3-12.

Hayday, A. C., et Pennington, D. J. (2007). Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* *8*, 137-144.

He, X., He, X., Dave, V. P., Zhang, Y., Hua, X., Nicolas, E., Xu, W., Roe, B. A., et Kappes, D. J. (2005). The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature* *433*, 826-833.

Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., et Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., et Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* *162*, 5317-5326.

Jameson, S. C., Hogquist, K. A., et Bevan, M. J. (1994). Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* *369*, 750-752.

Janeway, C. A., Jr. (1995). Ligands for the T-cell receptor: hard times for avidity models. *Immunol Today* *16*, 223-225.

Janeway, C. A. J., Travers, P., Walport, M., et Capra, J. D. (2006). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease - Sixth Edition*. Garland Science.

Kaldjian, E., McCarthy, S. A., Sharrow, S. O., Littman, D. R., Klausner, R. D., et Singer, A. (1988). Nonequivalent effects of PKC activation by PMA on murine CD4 and CD8 cell-surface expression. *Faseb J* 2, 2801-2806.

Kappes, D. J., He, X., et He, X. (2006). Role of the transcription factor Th-POK in CD4:CD8 lineage commitment. *Immunol Rev* 209, 237-252.

Kasler, H. G., et Verdin, E. (2007). Histone Deacetylase 7 Functions as a Key Regulator of Genes Involved in both Positive and Negative Selection of Thymocytes. *Mol Cell Biol* 27, 5184-5200.

Kawai, T., et Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7, 131-137.

Kersh, G. J., Kersh, E. N., Fremont, D. H., et Allen, P. M. (1998). High- and low-potency ligands with similar affinities for the TCR: the importance of kinetics in TCR signaling. *Immunity* 9, 817-826.

Kirberg, J., Baron, A., Jakob, S., Rolink, A., Karjalainen, K., et von Boehmer, H. (1994). Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J Exp Med* 180, 25-34.

Kishimoto, H., et Sprent, J. (1997). Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 185, 263-271.

Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M., et von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333, 742-746.

Kjer-Nielsen, L., Clements, C. S., Purcell, A. W., Brooks, A. G., Whisstock, J. C., Burrows, S. R., McCluskey, J., et Rossjohn, J. (2003). A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity* 18, 53-64.

Knapp, B. (2003). Identifikation und Analyse differentiell exprimierter Proteine und Gene während der Thymozytenentwicklung. Thèse de doctorat, Université de Freiburg, Allemagne.

- Krogsgaard, M., Prado, N., Adams, E. J., He, X. L., Chow, D. C., Wilson, D. B., Garcia, K. C., et Davis, M. M. (2003). Evidence that structural rearrangements and/or flexibility during TCR binding can contribute to T cell activation. *Mol Cell* 12, 1367-1378.
- Kuang, A. A., Cado, D., et Winoto, A. (1999). Nur77 transcription activity correlates with its apoptotic function in vivo. *Eur J Immunol* 29, 3722-3728.
- Kyewski, B., et Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 4, 688-698.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., et Robey, E. A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* 7, 338-343.
- Li, F. (2005). Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* 92, 212-216.
- Li, Q. J., Dinner, A. R., Qi, S., Irvine, D. J., Huppa, J. B., Davis, M. M., et Chakraborty, A. K. (2004). CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse. *Nat Immunol* 5, 791-799.
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y. H., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C., et Zhang, X. K. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116, 527-540.
- Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E., et Petrie, H. T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194, 127-134.
- Linette, G. P., Grusby, M. J., Hedrick, S. M., Hansen, T. H., Glimcher, L. H., et Korsmeyer, S. J. (1994). Bcl-2 is upregulated at the CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity* 1, 197-205.
- Liston, A., Lesage, S., Gray, D. H., O'Reilly, L. A., Strasser, A., Fahrner, A. M., Boyd, R. L., Wilson, J., Baxter, A. G., Gallo, E. M., et al. (2004). Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity* 21, 817-830.
- Liu, X., et Bosselut, R. (2004). Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nat Immunol* 5, 280-288.

Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., et Kappler, J. W. (2003). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* 19, 341-352.

Liu, Z. G., Smith, S. W., McLaughlin, K. A., Schwartz, L. M., et Osborne, B. A. (1994). Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur77*. *Nature* 367, 281-284.

Livak, F., et Petrie, H. T. (2002). Access roads for RAG-ged terrains: control of T cell receptor gene rearrangement at multiple levels. *Semin Immunol* 14, 297-309.

Love, P. E., et Shores, E. W. (2000). ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity* 12, 591-597.

Lucas, B., et Germain, R. N. (1996). Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4+CD8+ thymocyte differentiation. *Immunity* 5, 461-477.

MacDonald, H. R., et Lees, R. K. (1990). Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature* 343, 642-644.

Mahotka, C., Liebmann, J., Wenzel, M., Suschek, C. V., Schmitt, M., Gabbert, H. E., et Gerharz, C. D. (2002). Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ* 9, 1334-1342.

Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., et Lemoine, N. R. (2002). Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* 22, 3577-3589.

Marsden, V. S., et Strasser, A. (2003). Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* 21, 71-105.

Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., et Cyster, J. G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360.

Matsui, K., Boniface, J. J., Steffner, P., Reay, P. A., et Davis, M. M. (1994). Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12862-12866.

McKeithan, T. W. (1995). Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5042-5046.

McNeil, L. K., Starr, T. K., et Hogquist, K. A. (2005). A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13574-13579.

Medzhitov, R., et Janeway, C. A., Jr. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 10, 351-353.

Meylan, E., et Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* 22, 561-569.

Miller, J. F. (1961). Immunological function of the thymus. *Lancet* 2, 748-749.

Minguet, S., Swamy, M., Alarcon, B., Luescher, I. F., et Schamel, W. W. (2007). Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3. *Immunity* 26, 43-54.

Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., et Tanaka, K. (2007). Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316, 1349-1353.

Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H. S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K. J., Lalioti, M. D., Mullis, P. E., Antonarakis, S. E., et al. (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17, 393-398.

Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J. A., Ploegh, H., Peters, C., et Rudensky, A. Y. (1998). Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280, 450-453.

Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A. C., et Loh, D. Y. (1995). Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376, 435-438.

O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., et Huang, D. C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* 17, 384-395.

Ohoka, Y., Kuwata, T., Tozawa, Y., Zhao, Y., Mukai, M., Motegi, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., et Iwata, M. (1996). In vitro differentiation and commitment of CD4+ CD8+ thymocytes to the CD4 lineage, without TCR engagement. *Int Immunol* 8, 297-306.

Okada, H., Bakal, C., Shahinian, A., Elia, A., Wakeham, A., Suh, W. K., Duncan, G. S., Ciofani, M., Rottapel, R., Zuniga-Pflucker, J. C., et Mak, T. W. (2004). Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J Exp Med* *199*, 399-410.

Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., et Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* *286*, 1374-1377.

Parham, P. (2003). Le système immunitaire. (De Boeck Université).

Parra, M., Kasler, H., McKinsey, T. A., Olson, E. N., et Verdin, E. (2005). Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem* *280*, 13762-13770.

Plotkin, J., Prockop, S. E., Lepique, A., et Petrie, H. T. (2003). Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* *171*, 4521-4527.

Punt, J. A., Havran, W., Abe, R., Sarin, A., et Singer, A. (1997). T cell receptor (TCR)-induced death of immature CD4+CD8+ thymocytes by two distinct mechanisms differing in their requirement for CD28 costimulation: implications for negative selection in the thymus. *J Exp Med* *186*, 1911-1922.

Punt, J. A., Osborne, B. A., Takahama, Y., Sharrow, S. O., et Singer, A. (1994). Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med* *179*, 709-713.

Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* *129*, 1337-1349.

Rajpal, A., Cho, Y. A., Yelent, B., Koza-Taylor, P. H., Li, D., Chen, E., Whang, M., Kang, C., Turi, T. G., et Winoto, A. (2003). Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. *Embo J* *22*, 6526-6536.

Rathmell, J. C., Lindsten, T., Zong, W. X., Cinalli, R. M., et Thompson, C. B. (2002). Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* *3*, 932-939.

- Reimertz, C., Kogel, D., Rami, A., Chittenden, T., et Prehn, J. H. (2003). Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol* *162*, 587-597.
- Rincon, M., Whitmarsh, A., Yang, D. D., Weiss, L., Derijard, B., Jayaraj, P., Davis, R. J., et Flavell, R. A. (1998). The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. *J Exp Med* *188*, 1817-1830.
- Risueno, R. M., van Santen, H. M., et Alarcon, B. (2006). A conformational change senses the strength of T cell receptor-ligand interaction during thymic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9625-9630.
- Rivera, R. R., Johns, C. P., Quan, J., Johnson, R. S., et Murre, C. (2000). Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3. *Immunity* *12*, 17-26.
- Rosen, H., Alfonso, C., Surh, C. D., et McHeyzer-Williams, M. G. (2003). Rapid induction of medullary thymocyte phenotypic maturation and egress inhibition by nanomolar sphingosine 1-phosphate receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10907-10912.
- Rutishauser, J., et Spiess, M. (2002). Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Med Wkly* *132*, 211-222.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* *275*, 983-986.
- Schwerk, C., et Schulze-Osthoff, K. (2005). Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* *19*, 1-13.
- Sebzda, E., Wallace, V. A., Mayer, J., Yeung, R. S., Mak, T. W., et Ohashi, P. S. (1994). Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* *263*, 1615-1618.
- Shangary, S., et Johnson, D. E. (2002). Peptides derived from BH3 domains of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x(L) and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death. *Biochemistry* *41*, 9485-9495.
- Simpson, E., Takacs, K., et Altmann, D. M. (1994). Thymic repertoire selection by superantigens: presentation by human and mouse MHC molecules. *Thymus* *23*, 1-13.

Smith, K. M., Olson, D. C., Hirose, R., et Hanahan, D. (1997). Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int Immunol* *9*, 1355-1365.

Starr, T. K., Jameson, S. C., et Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* *21*, 139-176.

Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* *5*, 189-200.

Strasser, A., Harris, A. W., von Boehmer, H., et Cory, S. (1994). Positive and negative selection of T cells in T-cell receptor transgenic mice expressing a bcl-2 transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 1376-1380.

Sun, G., Liu, X., Mercado, P., Jenkinson, S. R., Kypriotou, M., Feigenbaum, L., Galera, P., et Bosselut, R. (2005). The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection. *Nat Immunol* *6*, 373-381.

Sun, Z. J., Kim, K. S., Wagner, G., et Reinherz, E. L. (2001). Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer. *Cell* *105*, 913-923.

Surh, C. D., et Sprent, J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* *372*, 100-103.

Suzuki, H., Punt, J. A., Granger, L. G., et Singer, A. (1995). Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: a new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity* *2*, 413-425.

Tadakuma, T., Kizaki, H., Odaka, C., Kubota, R., Ishimura, Y., Yagita, H., et Okumura, K. (1990). CD4+CD8+ thymocytes are susceptible to DNA fragmentation induced by phorbol ester, calcium ionophore and anti-CD3 antibody. *Eur J Immunol* *20*, 779-784.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* *6*, 127-135.

Terrinoni, A., Ranalli, M., Cadot, B., Leta, A., Bagetta, G., Vousden, K. H., et Melino, G. (2004). p73-alpha is capable of inducing scotin and ER stress. *Oncogene* *23*, 3721-3725.

Turka, L. A., Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Chun, J. J., Gorka, C., Lee, K., McCormack, W. T., et Thompson, C. B. (1991). Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science* *253*, 778-781.

Ueno, T., Saito, F., Gray, D. H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R. L., et Takahama, Y. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* *200*, 493-505.

Vacchio, M. S., Williams, J. A., et Hodes, R. J. (2005). A novel role for CD28 in thymic selection: elimination of CD28/B7 interactions increases positive selection. *Eur J Immunol* *35*, 418-427.

van Ewijk, W., Shores, E. W., et Singer, A. (1994). Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* *15*, 214-217.

van Meerwijk, J. P., et Germain, R. N. (1993). Development of mature CD8<sup>+</sup> thymocytes: selection rather than instruction? *Science* *261*, 911-915.

Villunger, A., Marsden, V. S., Zhan, Y., Erlacher, M., Lew, A. M., Bouillet, P., Berzins, S., Godfrey, D. I., Heath, W. R., et Strasser, A. (2004). Negative selection of semimature CD4<sup>(+)</sup>8<sup>(-)</sup>HSA<sup>+</sup> thymocytes requires the BH3-only protein Bim but is independent of death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 7052-7057.

von Boehmer, H., et Fehling, H. J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* *15*, 433-452.

Werlen, G., Hausmann, B., Naehrer, D., et Palmer, E. (2003). Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* *299*, 1859-1863.

Werlen, G., Hausmann, B., et Palmer, E. (2000). A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* *406*, 422-426.

Witt, C. M., Raychaudhuri, S., Schaefer, B., Chakraborty, A. K., et Robey, E. A. (2005). Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol* *3*, e160.

Wojciechowski, S., Tripathi, P., Bourdeau, T., Acero, L., Grimes, H. L., Katz, J. D., Finkelman, F. D., et Hildeman, D. A. (2007). Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis. *J Exp Med*.

Yamashita, I., Nagata, T., Tada, T., et Nakayama, T. (1993). CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol* 5, 1139-1150.

Zhao, Y., Tozawa, Y., Iseki, R., Mukai, M., et Iwata, M. (1995). Calcineurin activation protects T cells from glucocorticoid-induced apoptosis. *J Immunol* 154, 6346-6354.

Zilberman, Y., Zafir, E., Ovadia, H., Yefenof, E., Guy, R., et Sionov, R. V. (2004). The glucocorticoid receptor mediates the thymic epithelial cell-induced apoptosis of CD4+8+ thymic lymphoma cells. *Cell Immunol* 227, 12-23.

Zinkernagel, R. M., et Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., et Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32, e103.