

LA SOURIS PoNe: GÉNÉRATION D'UN MODÈLE TRANSGÉNIQUE PERMETTANT
L'ANALYSE DU DÉVELOPPEMENT DES THYMOCYTES PAR IMAGERIE *IN VIVO*

par

Maria da Silva Martins

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-1831



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-49485-1
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-49485-1

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 22 avril 2008

le jury a accepté le mémoire de Mme Maria Do Céu Da Silva Martins dans sa version finale.

Membres du jury

M. Viktor Steimle
Directeur
Département de biologie

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

M. Richard Blouin
Président-rapporteur
Département de biologie

RÉSUMÉ

Le développement des précurseurs des lymphocytes T, aussi appelés thymocytes, est un processus complexe qui requiert plusieurs étapes se déroulant dans le microenvironnement spécialisé du thymus. Les processus de sélection positive et négative sont cruciaux pour le développement adéquat du système immunitaire et sont intimement liés à la migration coordonnée des thymocytes à travers différentes zones du thymus. Des défauts dans ces processus sont associés à des failles dans le fonctionnement du système immunitaire et peuvent conduire au développement de maladies autoimmunes. Présentement, il n'y a aucune étude qui rapporte l'observation et l'étude des phénomènes de sélection positive et surtout de la sélection négative dans un contexte physiologique *in vivo*. Le but de ce projet était de générer des souris transgéniques permettant d'observer pour la première fois dans un contexte physiologique le développement, la migration et les phénomènes de sélection positive et négative dans un thymus intact. Pour atteindre ce but, il était nécessaire de générer des constructions rapporteuses permettant l'identification des cellules à l'étude.

Les constructions « Po » et « Ne » destinées à la transgénèse contiennent des protéines fluorescentes EGFP et ECFP comme rapporteurs et des marqueurs de localisation sub-cellulaire. L'EGFP a été fusionnée avec la protéine CD25 humaine, une protéine membranaire, ce qui permet le tri des cellules positives en utilisant des anticorps et des billes magnétiques. Cette protéine de fusion s'exprime efficacement à la surface cellulaire. L'ECFP a été fusionnée à un signal de localisation nucléaire et est ainsi dirigée vers le noyau très efficacement. Cette construction a aussi été modifiée par l'ajout d'un motif tetracystéines dans sa partie N-terminale qui permet la coloration avec des colorants biarséniques. Ces colorants sont disponibles en plusieurs couleurs, sont bien tolérés par les cellules et peuvent être utilisés *in vivo*. Ce type de coloration a été mis au point pour le rapporteur « Po » et est très spécifique. Une séquence rapportée pour sa capacité d'augmenter la traduction, la

séquence SVRU5, a aussi été incluse dans ces constructions dans le but d'augmenter l'expression du transgène sans affecter la régulation de son expression. Cette séquence a aussi une activité IRES ce qui permet dans nos conditions l'expression de deux protéines de taille importante à partir du même ARN messager. De plus, ces constructions versatiles et multifonctionnelles ont été réalisées dans trois vecteurs différents, dont un nouveau vecteur à faible nombre de copies approprié pour le clonage de fragments génomiques pour la transgénèse.

Les constructions rapporteuses « Po » et « Ne » ont été placées sous le contrôle des éléments de régulation de gènes marqueurs dont l'expression a été associée aux phénomènes de sélection positive et négative. La construction « Ne » contient les éléments de régulation de Nur77, un récepteur nucléaire nécessaire pour la sélection négative, alors que la souris « Po » contient les éléments de régulation de CD69, qui est un gène associé à l'activation du TCR. La génération des souris transgéniques « PoNe » est en cours présentement par co-injection de ces constructions. Nous avons identifié une souris positive, laquelle est en train d'être caractérisée. Les expériences de co-injection sont toujours en cours et de nouvelles portées de souriceaux seront prêtes pour être analysés prochainement.

Nous avons généré un système rapporteur versatile et optimisé pour la microscopie biphotonique à deux couleurs. Les souris transgéniques « PoNe » permettront l'analyse *in vivo* du développement des thymocytes. De plus, comme CD69 est un marqueur d'activation des cellules T matures, il sera possible de suivre également la réponse immunitaire *in vivo*. L'utilisation des colorants biarséniques en combinaison avec la tomographie de fluorescence, permettra de suivre une réponse immunitaire à travers le temps dans un animal intact. Nur77 est exprimé dans d'autres tissus que le thymus, ce qui rend ce système transgénique utile dans d'autres contextes que l'étude du système immunitaire.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier en premier lieu mon directeur de recherche Viktor Steimle pour l'opportunité qu'il m'a offert de travailler dans son laboratoire. Sa passion pour la science et application à l'enseignement et l'importance qu'il accorde à ses étudiants m'ont beaucoup marqué. Je le remercie de m'avoir encouragé à apprendre à chercher et expérimenter, d'avoir pris le temps de discuter avec moi et de répondre à mes questions, mais surtout d'avoir toujours été présent et d'avoir cru en moi. Pour toutes ces raisons et bien d'autres je considère avoir eut la chance de travailler avec un grand scientifique et un superviseur hors pair.

Les deux années de ma maîtrise n'auraient pas été pareilles sans la présence de mes collègues de laboratoire Gabrielle, Aline, Yves, J.-F., Rachel, Valérie, Marianne, Hao et Caroline. J'aimerais remercier plus particulièrement Aline Astrain avec qui j'ai travaillé en étroite collaboration pendant les deux années de ma maîtrise et Gabrielle Huppé, notre assistante de recherche ainsi que Valérie Wen Ting Émond que j'ai eu le plaisir d'encadrer lors de son stage dans laboratoire. Je ne peux pas passer sous le silence l'aide de nos collaborateurs Yves Bérubé-Lauzière, pour la tomographie de fluorescence et Mitra Cowan pour la transgénèse, le RRTQ (Réseau de Recherche en Transgénèse du Québec) et le FRSQ (Fonds de Recherche en Santé du Québec) Leur collaboration est grandement appréciée. Je souligne aussi l'aide de tous ceux qui ont collaboré à mes travaux particulièrement les membres du département de biologie de l'université de Sherbrooke, j'ai beaucoup apprécié les années que j'ai passées avec vous. Je remercie également mes conseillers Richard Blouin et Adbelaziz Amrani d'accepter de réviser mon mémoire.

J'aimerais terminer en remerciant ma famille et mes amis, parmi lesquels je compte mes collègues du laboratoire. Merci pour votre support.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
INTRODUCTION	1
1. La réponse immune adaptative et les lymphocytes T	1
2. Reconnaissance des antigènes par les cellules T	2
3. Le développement des lymphocytes T	4
<i>3.1 Anatomie et colonisation du thymus</i>	5
<i>3.2 Les différentes populations de thymocytes en développement</i>	7
4. Les phénomènes de sélection des thymocytes	9
<i>4.1 La sélection positive</i>	10
4.1.1 Initiation du signal de sélection positive.....	11
4.1.2 Molécules dont l'expression est modulée par la sélection positive.....	12
<i>4.2 La sélection négative</i>	15
4.2.1 Modèles d'étude de la sélection négative	15
4.2.2 Déroulement spatio-temporel des événements de sélection négative	18
4.2.3 Voies de signalisation activées par la sélection positive et négative.....	21
4.2.4 Les voies de signalisation en aval du TCR activées par la sélection positive et négative.....	23
5. Études en microscopie biphotonique de la migration des thymocytes	29

5.1	<i>La microscopie : un photon versus deux photons</i>	29
5.2	<i>Les colorants</i>	32
5.3	<i>Préparation des spécimens</i>	33
5.4	<i>Avantages et limitations de la microscopie biophotonique</i>	34
5.5	<i>Les défis associés à l'imagerie du thymus</i>	35
5.6	<i>Études par microscopie biphotonique de la migration des thymocytes</i>	36
6.	Le projet de recherche : hypothèses et objectifs	39
1.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	41
1.1	Enzymes et oligonucléotides	41
1.3	Fosmides	41
1.2	Extraction d'ADN plasmidique et fosmidique	42
1.3	Analyse sur gel d'agarose des digestions des fosmides	43
1.4	PCR	43
1.3.1	<i>Vérification des fosmides CD69</i>	43
1.3.2	<i>Amplification par PCR des séquences de régulation de CD69</i>	44
1.4	Clonage des séquences de régulation de CD69	45
1.5	Génération de pCIITASVRU5Ne	46
1.7	Culture de cellules et transfection	47
1.8	Cytométrie de flux	48
2.	RÉSULTATS	49
2.1	Generation of versatile reporter cassettes expressing fluorescent proteins for multicolor multiphoton microscopy, magnetic cell sorting and biarsenical dye labeling	49
2.1.1	<i>Présentation du manuscrit</i>	49
2.1.2	<i>Résumé</i>	50
2.1.3	<i>Manuscrit</i>	51
2.2	Génération des constructions destinées à la génération de la souris « PoNe »	73
2.2.1	<i>Choix des gènes marqueurs de la sélection négative et positive</i>	73

2.2.2 Clonage des éléments de régulation de l'expression de CD69.....	75
2.2.2.1 Caractérisation des fosmidés CD69.....	76
2.2.2.2 Analyse avec PReMod du contexte génomique de CD69	79
2.2.3 Stratégie de clonage des éléments de régulation de CD69.....	81
3. Génération de la souris transgénique « PoNe ».....	83
4. Caractérisation de la fonction de l'élément SVRU5 en tant que IRES	84
3. DISCUSSION.....	87
3.1 Génération de la souris double transgénique « PoNe ».....	87
3.2 Génération et caractérisation des cassettes rapporteuses « Po » et « Ne ».....	89
3.3 La série « Po »	90
3.4 La série « Ne »	92
3.5 Clonage des rapporteurs dans différents vecteurs.....	94
3.6 Utilisation de la séquence SVRU5.....	95
3.6 Clonage des éléments de régulation de CD69.....	97
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	100
ANNEXES	103
BIBLIOGRAPHIE.....	121

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
Aire :	<i>Autoimmune Regulator</i>
APECED :	<i>Autoimmune Poly Endocrinopathy Candidosis Ectodermic Distrophy</i>
ARN:	Acide ribonucléique
β2m:	β2 microglobuline
BAC:	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BAC/PAC:	<i>Bacterial Artificial Chromosome/P1-derived Artificial Chromosome</i>
Bak:	<i>Bcl-2 homologous Antagonist/Killer</i>
Bax:	<i>Bcl-2 Associated X protein</i>
Bcl 2:	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
bGH:	<i>bovine growth hormone</i>
Bim:	<i>Bcl-2 interacting mediator</i>
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i>
CIITA:	<i>Class II Transactivator</i>
CCR:	<i>CC Chemokine Receptor</i>
CCS:	<i>Cosmic calf serum</i>
CD:	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE:	<i>carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CHORI:	<i>Children's Hospital Oakland Research Institute</i>
CMH:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMTRM:	<i>chloromethylbenzoyl aminotetramethylrhodamine</i>
CRAC:	<i>Calcium release-activated calcium channel</i>
DAG:	diacyl glycérol
DGK :	<i>diacyl glycérol kinase</i>
DN:	Double Négative

DP:	Double Positive
ECFP:	<i>Enhanced Cyan Fluorescent protein</i>
ECVM:	<i>Encephalomyocarditis virus</i>
EDTA:	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGFP:	<i>Enhanced Green Fluorescent protein</i>
ERK:	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
FRT:	<i>Flp Recombination Target</i>
FTOC:	<i>Fetal Thymic Organe Culture</i>
GAP:	<i>GTPase activating proteins</i>
GDP:	guanine diphosphate
GEF:	<i>Guanine Exchange Factors</i>
GFP :	<i>Green fluorescent protein</i>
Grb-2:	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
GTP:	Guanosine triphosphate
HAS:	<i>Heat Stable Antigen</i>
HEK:	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HBS:	<i>HEPES Buffered Saline</i>
HEPES:	<i>acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique</i>
HTLV:	<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>
IAN :	<i>Immune Associated Nucleotide Binding Protein</i>
IP3:	Inositol triphosphate
ITAM:	<i>Immune Tyrosine Activation Motif</i>
IRES:	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
JNK:	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KO:	<i>Knock Out</i>
LAT:	<i>Linker of Activated T-cells</i>
MAPK:	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MEK:	<i>map-erk kinase</i>
NEB:	<i>New England biolabs</i>

NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFAT:	<i>Nuclear factor of Activated T-cells</i>
NFκB:	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NGFI-B:	<i>Nerve cell growth factor I-B</i>
NLS:	<i>Nuclear Localisation Signal</i>
NOD :	<i>Non Obese Diabetic</i>
Nr4a :	<i>nuclear receptor subfamily 4</i>
PBS :	<i>Phosphate Bufferd Saline</i>
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
pCRM:	<i>predicted Cis Regulatory Modules</i>
PFA :	<i>paraformaldéhyde</i>
PIP2 :	<i>phosphatidyl inositol</i>
PLCγ :	<i>phospholipase C γ</i>
pTα :	<i>chaîne de substitution alpha</i>
RAG:	<i>Recombination Activating Genes</i>
RasGRP:	<i>Ras Guanyl Nucleotide-Releasing Protein</i>
RE:	<i>Réticulum endoplasmique</i>
RTOC:	<i>Reaggregate Thymic Organe Culture</i>
SP :	<i>Simple Positive</i>
SNARF:	<i>Seminaphtarhodafluor</i>
SOS:	<i>Son of sevenless</i>
SV40 :	<i>Simian Virus 40</i>
TCR :	<i>T cell receptor</i>
TdT :	<i>Terminal desoxynucléotide Transférase</i>
TE :	<i>Tris EDTA</i>
Tris :	<i>trishydroxymethylaminomethane</i>
UCSB :	<i>University of California, Santa Barbara</i>
VDJ:	<i>Variabilité Diversité Jonction</i>
ZAP-70:	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Fosmides CD69 achetés au centre de ressource BAC/PAC CHORI	42
Tableau 2. Amorces utilisées dans le diagnostic des fosmides CD69	44
Tableau 3. Amorces utilisées pour l'amplification des pCRM de CD69	45
Tableau 4. Amorces utilisées dans le séquençage de la construction « Po ».....	46
Tableau 5. Transfection des cellules HEK 293	47
Tableau 6. Patron de restriction attendu du fosmide D2.....	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Reconnaissance d'antigène par les lymphocytes T CD4 et T CD8.	3
Figure 2. Anatomie du thymus.	6
Figure 3. Les différentes populations de thymocytes en développement.	8
Figure 4. Sélection des thymocytes. Les thymocytes DP expriment différents TCRs.	10
Figure 5. Stades de différenciation des thymocytes définis par 4 marqueurs de surface : CD69, TCR, CD4 et CD8	14
Figure 6. FTOC et RTOC.....	17
Figure 7. Compartimentalisation de la sélection négative.	20
Figure 8. Cinétique de signalisation au cours de la sélection positive et négative.....	24
Figure 9. Localisation de l'excitation par la méthode biphotonique.	31
Figure 10. Structure génomique de CD69.....	75
Figure 11. PCR diagnostique des fosmides B3, D2 et E3.....	77
Figure 12. Analyse de restriction du fosmide D2.....	78
Figure 13. Emplacement des pCRM prédits par PReMod par rapport à CD69.	80
Figure 14. Stratégie de clonage consistant à amplifier par PCR les pCRM identifiées en amont de CD69.....	82
Figure 15. Plan de la construction pBR322PL/CD69pd/K7Po.	82
Figure 17. Plan de la construction pCIITA-SVRU5/Ne.	84

INTRODUCTION

Le système immunitaire est l'un des systèmes les plus disséminés et mobiles dans le corps. En effet, il est majoritairement composé de cellules individuelles qui parcourent continuellement les tissus périphériques (Bhakta et Lewis, 2005). Ces cellules circulent dans l'organisme en empruntant la circulation sanguine et lymphatique (Janeway et al., 2004). Le fonctionnement du système immunitaire dépend de la motilité intrinsèque des cellules qui le composent, des facteurs solubles qui régulent et orientent leurs mouvements et des interactions entre les cellules elles-mêmes (Bhakta et Lewis, 2005) Les phénomènes de migration cellulaire sont également très importants au cours du développement du système immunitaire (Cahalan et Parker, 2006). Nous nous intéresserons à l'étude du développement, de la sélection et de la maturation d'un des acteurs les plus importants de la réponse immunitaire adaptative, le lymphocyte T (Starr et al., 2003).

1. La réponse immune adaptative et les lymphocytes T

Devant la grande diversité des mécanismes mis en place pour protéger l'organisme, la réponse immunitaire adaptative se démarque surtout par sa capacité à générer une réponse dotée d'une reconnaissance individuelle envers un microorganisme. Cette reconnaissance individuelle est la conséquence de l'existence de récepteurs hautement variables qui possèdent de multiples spécificités. Ces récepteurs, capables de reconnaître des structures spécifiques à des entités étrangères à l'organisme : les antigènes, sont portés par les lymphocytes T et B, deux types cellulaires qui jouent un rôle particulièrement important dans cette branche de l'immunité. (Janeway et al., 2004).

2. Reconnaissance des antigènes par les cellules T

Les lymphocytes T peuvent être divisés en deux groupes par l'expression de deux protéines de surface, les protéines CD (*cluster of differentiation*) 4 et CD8 (Janeway et al., 2004). Les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 ont des fonctions distinctes dans la réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD8 activés sont capables de détruire leur cible, par exemple une cellule infectée par un virus, tandis que les lymphocytes T CD4 jouent un rôle très important de régulation et de coordination de la réponse immunitaire (Janeway et al., 2004).

La fonction et le développement des lymphocytes T sont dépendants de leur capacité à reconnaître un antigène par leur récepteur d'antigènes: le TCR (*T cell receptor*) (Janeway et al., 2004). Contrairement aux lymphocytes B, les lymphocytes T ne sont pas capables de reconnaître un antigène tel qu'il se présente à la surface d'une cellule : celui-ci doit être clivé en peptides d'environ une dizaine d'acides aminés et associé à des molécules de présentation d'antigène appelées CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) (figure 1) (Jensen, 2007). Il existe deux types de molécules de CMH, les molécules de classe I (CMH I) et les molécules de classe II (CMH II) qui s'associent à des peptides d'origine différente pour les présenter à la surface des cellules (Jensen, 2007). Les peptides générés par le catabolisme endogène de la cellule via l'activation du protéasome, une protéase multicatalytique, ainsi que d'autres enzymes sont associés aux molécules du CMH I. Cette association se fait dans le réticulum endoplasmique (RE) avant que les molécules de CMH I ne soient envoyées à la surface cellulaire (Jensen, 2007). Les peptides apprêtés dans les compartiments endosomaux s'associent aux molécules de CMH II dans des compartiments de chargement (Jensen, 2007). Les molécules de CMH II sont alors présentées à la surface des cellules (Jensen, 2007). Les molécules de CMH I ont une expression ubiquitaire et sont associées à la présentation d'antigènes d'origine intracellulaire, par exemple dans les cas de pathogènes intracellulaires comme les virus (Jensen, 2007). Les molécules de CMH II sont présentes seulement à la surface de certaines cellules appelées cellules présentatrices d'antigènes professionnelles et

sont associées à la présentation d'antigènes dérivés de l'espace extracellulaire (Jensen, 2007).

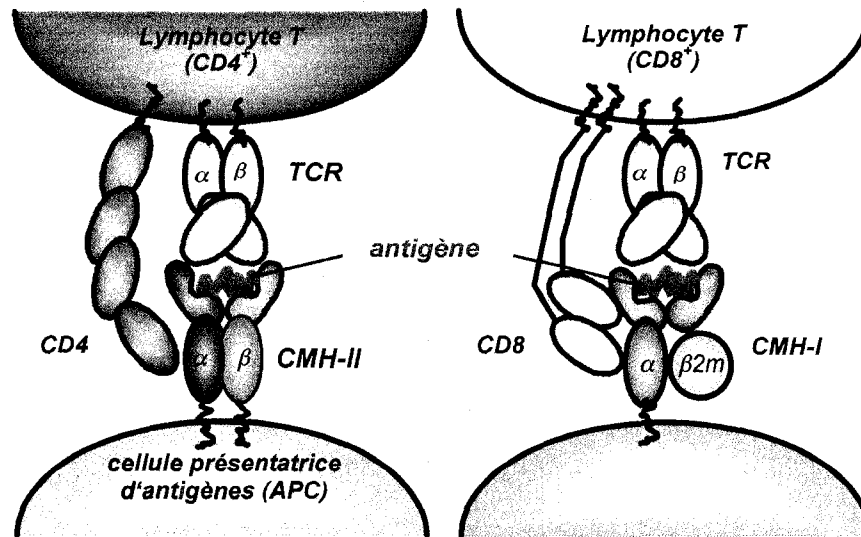


Figure 1. Reconnaissance d'antigène par les lymphocytes T CD4 et T CD8.

Le CMH I est constitué d'une chaîne α et d'une molécule de $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$) alors que le CMH II est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Les chaînes α et β du CMH II et la chaîne α du CMH I forment le sillon qui lie le peptide antigénique. Le TCR reconnaît autant le peptide que la molécule de CMH. Les co-récepteurs CD4 et CD8 reconnaissent des régions invariables des molécules de CMH I et II respectivement, ce qui augmente ainsi l'affinité du TCR pour le complexe antigène-CMH.

Les molécules CD4 et CD8 ont un rôle de co-récepteurs dans la reconnaissance de l'antigène par le TCR dans la mesure où ils augmentent l'affinité du TCR pour le complexe peptide-CMH en reconnaissant des sites invariables sur les molécules de CMH (Rudolph et al., 2006). Les co-récepteur CD4 et CD8 reconnaissent respectivement les molécules de CMH II et de CMH I (figure 1) (Rudolph et al., 2006). Cette interaction est requise pour la réponse effectrice adéquate des lymphocytes T. Le TCR doit donc être capable de reconnaître un

complexe composé d'un peptide de structure variable et d'une molécule de CMH (Rudolph et al., 2006; Mazza et Malissen, 2007). Ainsi, ce récepteur possède un grand niveau de variabilité dans sa spécificité (Davis, 2004). Le TCR est un hétérodimère composé soit des chaînes α et β , soit des chaînes δ et γ . La majorité des lymphocytes T sont de type CD4 ou CD8 et portent un TCR α/β . En dehors de ça, il y a aussi des lymphocytes T qui portent un TCR δ/γ . Nous nous concentrerons ici sur les lymphocytes T α/β qui représentent environ 95% des lymphocytes T (Janeway et al., 2004).

La conformation germinale des loci géniques qui codent pour les chaînes α et β qui composent le TCR est peu commune. Ces loci sont constitués de différents segments géniques appelés V (variables), D (diversité) et J (jonction) qui doivent être recombinaison et associés à un segment codant pour une région constante afin de former un exon fonctionnel (Davis, 2004). La région constante a une fonction structurale et de signalisation, tandis que la région variable, issue de la recombinaison des éléments V, D et J, est responsable de la reconnaissance de l'antigène (Schatz, 2004). Les segments V, D et J sont flanqués par des séquences signal de recombinaison reconnues par les recombinases RAG1/2 (*recombinaison activation genes 1 et 2*). Ces dernières sont responsables des processus de réarrangement des loci appelés recombinaison V(D)J (Schatz, 2004). Les jonctions des éléments $V\alpha$ et $J\alpha$, et $V\beta$, $D\beta$ et $J\beta$, sont très variables en raison de l'activité de la *Terminal desoxynucleotide Transferase* (TdT) qui ajoute des nucléotides non codés par la matrice d'ADN (acide désoxyribonucléique). Le caractère hautement aléatoire de ce processus engendre certes une grande diversité de spécificité (Benedict et al., 2000), mais nécessite aussi une vérification de la fonctionnalité et de la spécificité de ce TCR. Il s'agit d'un processus qui se déroule lors de la maturation des lymphocytes T dans le thymus (Starr et al., 2003).

3. Le développement des lymphocytes T

Les lymphocytes T se développent à partir de précurseurs de la moelle osseuse qui colonisent le thymus. Le thymus est l'organe lymphoïde primaire qui fournit l'environnement spécialisé nécessaire à la survie et la différenciation des lymphocytes T. Les étapes du réarrangement du TCR surviennent tôt lors du développement des lymphocytes T et sont coordonnées dans le temps et dans l'espace. Etant donné le caractère aléatoire du processus de génération du TCR, une fois que les lymphocytes T en développement, aussi appelés thymocytes, expriment un TCR à leur surface il est important de vérifier leur capacité à reconnaître un antigène associé à une molécule de CMH I ou II et leur affinité pour des antigènes du soi. Ces processus, appelés sélections positive et négative permettent de s'assurer de la génération d'un répertoire diversifié de cellules T exprimant les co-récepteurs CD4 ou CD8 capables d'une part de reconnaître un antigène étranger au soi et d'autre part de ne pas réagir contre l'organisme qui les porte (Janeway et al., 2004).

3.1 Anatomie et colonisation du thymus

Le thymus a deux zones anatomiquement et fonctionnellement différentes, le cortex et la médulla (Ciofani et Zuniga-Pflucker, 2007). Le stroma thymique est composé d'un ensemble hétérogène de différents types cellulaires incluant des cellules épithéliales, des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules dendritiques et des macrophages (Anderson et al., 2006a). De cet ensemble, les cellules les plus abondantes sont les cellules épithéliales qui se différencient pour donner origine aux cellules épithéliales corticales et médullaires (figure 2) (Rossi et al., 2006).

Le thymus est colonisé à partir du jour E11.5 chez la souris et de la huitième semaine de gestation chez l'humain, par des précurseurs lymphoïdes qui se développeront dans cet organe

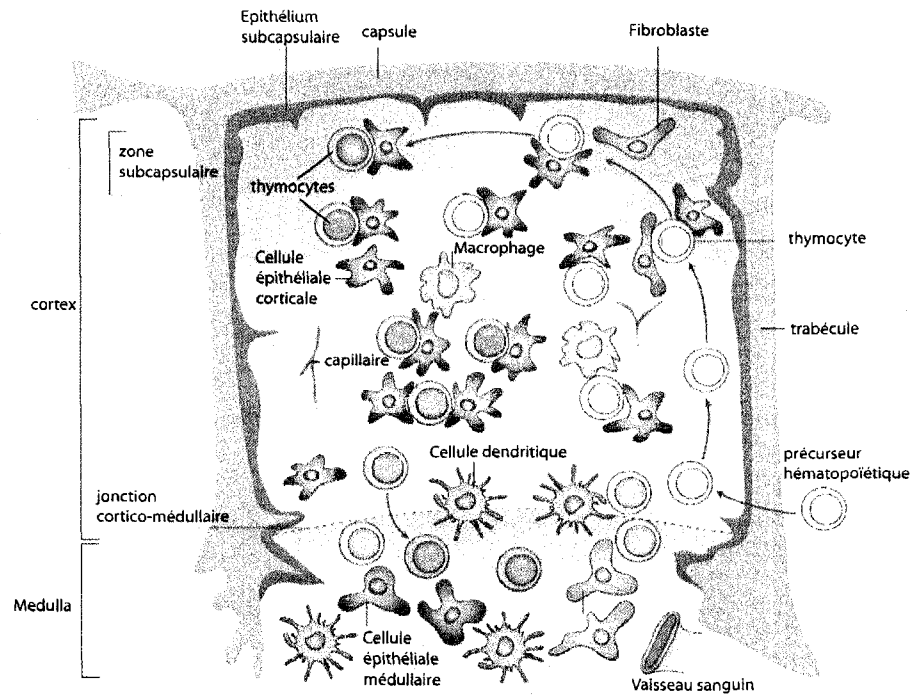


Figure 2. Anatomie du thymus.

Le thymus est composé de deux zones morphologiquement et fonctionnellement différentes, le cortex et la médulla. Le cortex est la zone la plus proche de la capsule de l'organe alors que la médulla est la région la plus éloignée de la capsule. Le cortex et la médulla sont séparés à la jonction cortico-médullaire riche en vaisseaux sanguins par où pénètrent les précurseurs qui colonisent le thymus. Les thymocytes en développement migrent d'abord de la jonction cortico-médullaire vers le cortex et ensuite du cortex vers la médulla. (Adapté de Blackburn et Manley, 2004).

en cellules T matures (Takahama, 2006). Le développement de l'épithélium thymique est dépendant de signaux émis par les thymocytes, tout comme le développement des lymphocytes T nécessite des interactions avec l'épithélium thymique (van Ewijk et al., 1994). Le développement des thymocytes implique une série d'évènements de prolifération, différenciation et sélection qui se déroulent dans des régions distinctes du thymus et dont

l'enchaînement temporel est finement contrôlé. Ces évènements sont strictement dépendants des interactions avec les différentes zones spécialisées du thymus. Il s'agit d'un processus dynamique qui assure la constitution d'un répertoire mature de cellules T périphériques (Ladi et al., 2006).

3.2 Les différentes populations de thymocytes en développement

Les précurseurs lymphoïdes colonisent le thymus postnatal par les veinules post-capillaires fenêtrées à la jonction cortico-médullaire. Il est possible de caractériser les thymocytes en développement selon l'expression de différents marqueurs de surface qui varient avec l'état de différenciation dans lequel se trouvent ces cellules. Ceci permet d'identifier différentes populations de thymocytes et de les associer aux différentes étapes constituant leur développement (Starr et al., 2003). À leur arrivée dans le thymus, les thymocytes n'expriment ni le TCR ni les co-récepteurs CD4 et CD8 qui sont caractéristiques des lymphocytes T ; ces cellules sont ainsi appelées « double négatives » (DN). Le développement et la différenciation des thymocytes double négatifs comprennent 4 stades phénotypiquement et génétiquement distincts (DN1 à DN4) qui se caractérisent par l'expression temporaire coordonnée des glycoprotéines CD25 et CD44 et par une occupation distincte de différentes zones du cortex thymique (figure 3) (Petrie et al., 1990; Godfrey et al., 1993; Lind et al., 2001). Ainsi, les thymocytes DN1 (CD44+/CD25-) arrivent dans le thymus à la jonction cortico-médullaire, où se trouvent les veinules post-capillaires (figure 3). Les cellules DN2 (CD44+/CD25+) sont dispersées dans le cortex thymique tandis que la population de cellules DN3 (CD44-/CD25+) est principalement localisée dans la région subcapsulaire du cortex thymique (figure 3) (Petrie et al., 1990; Godfrey et al., 1993; Lind et al., 2001). C'est au stade DN3 qu'il est possible de détecter des transcrits d'ARN messager des enzymes RAG-1 et RAG-2, qui sont responsables du réarrangement du locus codant pour la chaîne β du TCR (Godfrey et al., 1994). L'association d'une chaîne β fonctionnelle avec une chaîne invariante α de substitution ($pT\alpha$)

forme le pré-TCR, qui transmet un signal de survie aux thymocytes. La recombinaison de la chaîne β du TCR est cruciale pour la survie de ces cellules et son importance a été mise en évidence lors de l'étude des souris déficientes en RAG-1 qui ne peuvent pas effectuer le réarrangement du locus de la chaîne β du TCR et dont le développement des thymocytes est arrêté au stade DN3 (Mombaerts et al., 1992). Ces cellules ayant reçu un signal par le pré-TCR éteignent les marqueurs CD44 et CD25 (stade DN4), prolifèrent de façon importante et ensuite expriment en surface les marqueurs CD4 et CD8, devenant ainsi des thymocytes « double positifs » (DP) qui migrent vers la jonction cortico-médullaire (figure 3) (Saint-Ruf et al., 1994; Prockop et Petrie, 2000; Lind et al., 2001; Prockop et al., 2002).

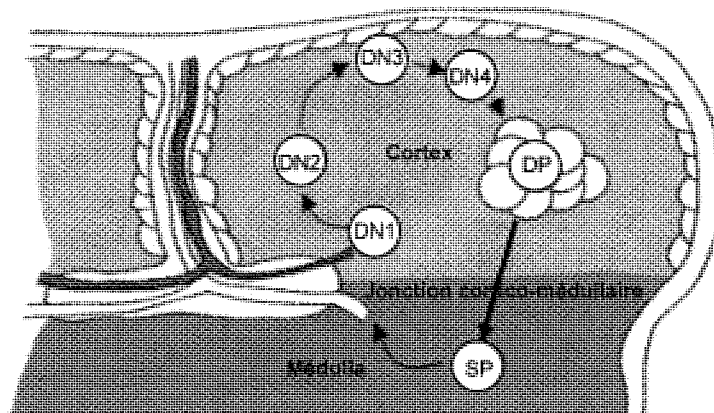


Figure 3. Les différentes populations de thymocytes en développement.

Les précurseurs colonisent le thymus par les veinules de la jonction cortico-médullaire. Les thymocytes DN1 (CD44+/CD25) se trouvent à la jonction cortico-médullaire. Les thymocytes DN2 (CD44+/CD25+) sont dispersés dans le cortex thymique. La population DN3 (CD44-/CD25+) se trouve dans la région subcapsulaire du cortex thymique. Les thymocytes DN4 n'expriment pas les marqueurs CD44 et CD25. Ces cellules deviennent par la suite positives pour les marqueurs CD4 et CD8; on les appelle des thymocytes DP. Ces cellules subissent une importante vague de prolifération et migrent vers la jonction cortico-médullaire. Ces cellules subissent les phénomènes de sélection positive et négative et poursuivent leur maturation dans la médulla pour atteindre l'état SP. (Adapté de Starr et al., 2003).

Les thymocytes au stade DP subissent le réarrangement du locus de la chaîne α du TCR pour exprimer un TCR $\alpha\beta$ complet à leur surface (Starr et al., 2003). Comme je l'ai déjà mentionné, le processus de réarrangement des gènes codant pour le TCR génère une grande diversité de spécificité de récepteur, mais est également un processus hautement aléatoire. Les phénomènes de sélection positive et négative constituent des étapes clé du développement des thymocytes DP. Ces étapes de sélection sont des processus basés sur la spécificité et fonctionnalité des TCRs générés (Starr et al., 2003).

4. Les phénomènes de sélection des thymocytes

Les thymocytes DP sont des cellules qui ont le potentiel de devenir des thymocytes SP CD4 ou CD8 (Singer, 2002). Ces cellules ont une courte durée de vie (Singer, 2002). Leur devenir est dépendant de signaux transmis par leur TCR suite à la liaison à des complexes peptide-CMH qui leur sont présentés par des cellules épithéliales thymiques (Starr et al., 2003). En absence d'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH les thymocytes ne reçoivent pas de signal de survie et sont éliminés par un phénomène appelé mort par négligence (Starr et al., 2003). Ce processus élimine environ 90% des thymocytes qui ont produit un TCR (figure 4) (Starr et al., 2003). Au contraire, les phénomènes de sélection positive et négative sont la conséquence d'un signal résultant de la liaison du TCR avec les complexes peptide-CMH. (Starr et al., 2003). La sélection positive permet la survie et la poursuite du développement des thymocytes alors que la sélection négative conduit à leur élimination (figure 4) (Starr et al., 2003). Ceci implique que le même récepteur est capable d'engendrer des événements de signalisation qui ont des conséquences diamétralement opposées : survie ou apoptose des thymocytes (Starr et al., 2003). Plusieurs modèles ont été élaborés pour expliquer ce paradoxe, mais le plus accepté de tous demeure celui de l'affinité/avidité différentielle du TCR pour les complexes peptide-CMH présentés par les cellules épithéliales thymiques (Ashton-Rickardt et

al., 1994; Hogquist, 2001; Starr et al., 2003). Ainsi, les thymocytes DP dont le TCR n'est pas capable d'interagir avec un complexe peptide-CMH sont éliminés par mort par négligence. Les thymocytes DP dont le TCR reconnaît les complexes peptide-CMH qui lui sont présentés par des cellules épithéliales du thymus avec une avidité faible reçoivent un signal de survie et continuent leur développement en thymocytes « simple positifs » (SP) CD4+ ou CD8+ (figure 4) (Starr et al., 2003). Au contraire, les thymocytes dont le TCR reconnaît les complexes peptide-CMH avec une forte avidité sont éliminés par induction d'apoptose (figure 4) (Palmer, 2003). La conséquence la plus importante des processus de sélection est la génération d'un répertoire de lymphocytes T matures qui ne réagissent pas contre les antigènes du soi et qui sont capables de reconnaître des antigènes étrangers dans le contexte des molécules de CMH du soi. Ceci est nécessaire au bon fonctionnement de la réponse immunitaire (figure 4) (Anderson et al., 2006b).

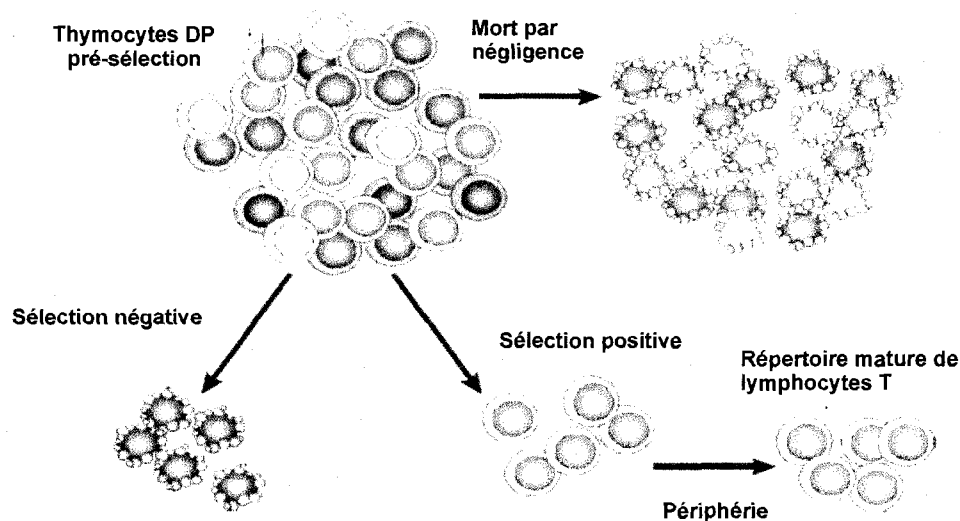


Figure 4. Sélection des thymocytes. Les thymocytes DP expriment différents TCRs. (Adapté de Palmer, 2003).

4.1 La sélection positive

La sélection positive survient à l'étape DP du développement des thymocytes et nécessite le contact entre le TCR et les complexes peptide-CMH. Il en résulte des événements de signalisation et des changements phénotypiques, au cours desquels l'expression de l'un des co-récepteurs, CD4 ou CD8, est éteinte selon la compatibilité avec le type de CMH tandis que le niveau d'expression du TCR augmente. Après réception d'un signal de sélection positive, les thymocytes SP subissent une maturation fonctionnelle afin de générer des cellules SP matures qui quittent le thymus pour la périphérie (Blackman et al., 1990; von Boehmer et Kisielow, 1990; Jameson et al., 1994).

4.1.1 Initiation du signal de sélection positive

Il a été montré que l'interaction entre le TCR et les molécules de CMH est nécessaire à l'initiation d'un signal de sélection positive (Scott et al., 1989). La nature des cellules qui portent les complexes peptide-CMH est également importante dans la mesure où d'autres molécules également présentes à leur surface sont nécessaires à la sélection positive (Anderson et al., 1994). Les cellules épithéliales corticales ont été mises en évidence comme étant nécessaires à la sélection positive, mais il a aussi été démontré que les thymocytes exprimant le CMH II peuvent eux-mêmes participer à la sélection positive des cellules SP CD4 (Choi et al., 2005; Li et al., 2005).

Les peptides qui sont présentés par le CMH ont également un rôle non négligeable à jouer dans ce processus (Nikolić-Zugić et Bevan, 1990; Hogquist et al., 1994; Jameson et al., 1994). Beaucoup de travail a été investi dans l'étude de ces peptides, de leurs propriétés et de leur implication dans la sélection positive (Starr et al., 2003). La conclusion générale de ces études est qu'il existe des peptides de faible affinité capables de promouvoir la sélection positive (Hogquist, 2001). Les cellules T matures qui sont sélectionnées par ces peptides sont capables

de reconnaître des peptides antigéniques de haute affinité qui ont une ressemblance structurelle avec les peptides de faible affinité qui les ont sélectionnées (Hogquist, 2001). Une étude conduite en 2007 par Murata et collègues a démontré qu'il existe une sous-unité catalytique du protéasome, la sous-unité $\beta 5t$, qui est exprimée exclusivement par les cellules épithéliales corticales thymiques. La sous-unité $\beta 5t$ est impliquée dans la génération de peptides qui se lient avec une moindre affinité aux molécules CMH I, pouvant être à l'origine des liaisons faibles avec le TCR qui sont impliquées dans la sélection positive. Les souris dans lesquelles cette sous-unité du protéasome est absente ont un défaut dans la génération de cellules SP CD8 (Murata et al., 2007). Cette étude apporte donc un élément de plus à l'argument que les peptides présentés par les cellules épithéliales corticales aux thymocytes DP jouent un rôle important dans la sélection positive.

Selon le modèle de l'affinité/avidité différentielle du TCR pour les complexes peptide-CMH présentés par les cellules épithéliales thymiques, une interaction de faible intensité mène à un signal de sélection positive (Ashton-Rickardt et al., 1994; Hogquist, 2001; Starr et al., 2003). Il a aussi été rapporté que les interactions entre le TCR et les peptides qui engendrent un signal de sélection positive se dissocient plus rapidement que celles avec les peptides qui engendrent la sélection négative (Hogquist, 2001). Ceci a orienté les recherches dans ce domaine vers la compréhension de la transformation de la cinétique de liaison en événements de signalisation (Hogquist, 2001) qui sera discuté dans les section 4.2.2 et 4.2.3.

4.1.2 Molécules dont l'expression est modulée par la sélection positive

Les conséquences majeures de la sélection positive sont la survie cellulaire, la cessation de la recombinaison du TCR et la migration de ces cellules vers la médulla où leur développement se poursuit (Mick et al., 2004). Ceci a plusieurs conséquences au niveau du programme

transcriptionnel des thymocytes (Mick et al., 2004). Il y a ainsi une grande variation dans l'expression de plusieurs gènes associés aux signaux reçus par le TCR. Notamment, l'extinction des gènes *rag* et *tdt*, l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*), l'arrêt de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme CerK et Tcl-30 et l'expression de récepteurs de chimiokines, comme CCR7 (*CC Chemokine Receptor 7*), qui sont impliqués dans la migration des thymocytes (Mick et al., 2004). Nous pouvons aussi distinguer des marqueurs de surface associés à cette étape du développement (Mick et al., 2004).

L'expression de CD69, un récepteur de lectines de type C, a été à plusieurs reprises associée à une activation du TCR et à un signal de sélection positive (Swat et al., 1993; Yamashita et al., 1993; Ziegler et al., 1994b). Alors qu'une diminution de l'expression de CD69 cause une diminution du nombre de thymocytes SP, une surexpression de ce gène mène à une augmentation des thymocytes SP dans le thymus (Nakayama et al., 2002). Curieusement, la souris KO (*knock-out*) pour ce même gène ne montre aucun phénotype en particulier au niveau du développement et de la sélection thymiques (Lauzurica et al., 2000). Malgré cela, il est clair que CD69 est un bon marqueur de l'activation par le TCR et est associé à la sélection positive (Swat et al., 1993; Yamashita et al., 1993; Ziegler et al., 1994b).

En fait, il est possible de diviser les étapes de différenciation des thymocytes en 5 étapes distinctes, « R1 » à « R5 », en se basant sur les niveaux d'expression de CD69 et du TCR en plus des co-récepteurs CD4 et CD8 à la surface des thymocytes (Barthlott et al., 1997) (figure 5). Les thymocytes « R1 » possèdent un phénotype CD69-/TCR- et correspondent aux thymocytes DN et DP. Les cellules « R2 » ont un phénotype CD69-/TCR^{lo} et correspondent aux thymocytes DP qui expriment un TCR à leur surface et se trouvent dans le cortex où se déroule la sélection positive. Le stade « R3 » représente seulement 2 à 4 % des thymocytes. À ce stade les thymocytes ont un phénotype CD69+/TCR^{int} et reçoivent un signal par le TCR, ce qui leur permet d'augmenter les niveaux d'expression de ce récepteur à leur surface. C'est un

stade très important dans le développement des thymocytes, puisqu'il correspond à la première population identifiable ayant reçu un signal par le TCR. Parmi la population « R3 » se retrouvent les précurseurs des thymocytes SP CD4 et CD8. Les stades « R4 » et « R5 » représentent respectivement les thymocytes de phénotype CD69+/TCRhi et CD69-/TCRhi. À ces stades de différenciation, les thymocytes expriment des niveaux de TCR élevés consistants avec un phénotype mature. La population « R5 » correspond aux lymphocytes matures naïfs qui quittent le thymus pour la périphérie et qui n'expriment plus le marqueur d'activation CD69 (figure 5) (Barthlott et al., 1997).

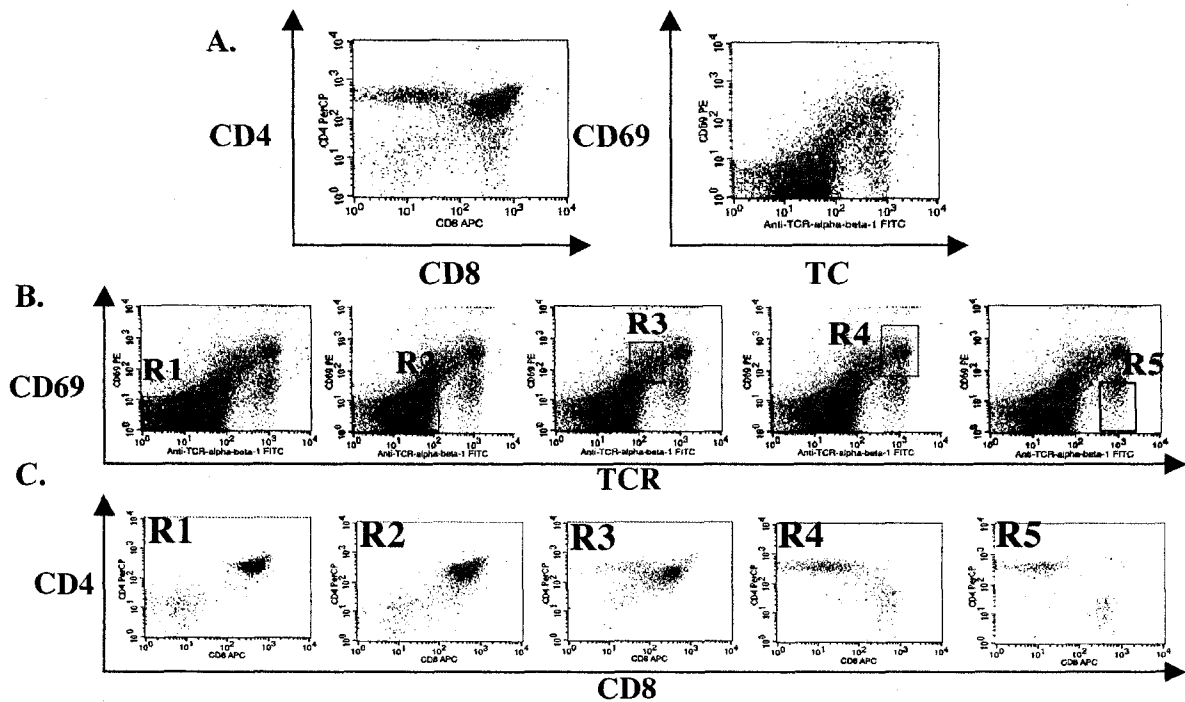


Figure 5. Stades de différenciation des thymocytes définis par 4 marqueurs de surface : CD69, TCR, CD4 et CD8.

A) Analyse des thymocytes totaux d'une souris C57/B6. B) Les populations « R1 » à « R5 » définies par l'expression du TCR et du marqueur d'activation CD69. C) Analyse des différentes populations « R1 » à « R5 » par l'expression des marqueurs de surface CD4 et CD8. (Analyse par cytométrie de flux réalisée par Jean-François Tessier).

4.2 La sélection négative

Environ 5% des thymocytes produisent un TCR qui interagit avec les complexes peptide-CMH trop fortement et active ainsi des voies de signalisation menant à leur élimination (Palmer, 2003). Ce processus est appelé sélection négative, délétion clonale ou tolérance centrale et permet la génération d'un répertoire de cellules T matures qui est tolérant envers le soi (Palmer, 2003).

4.2.1 Modèles d'étude de la sélection négative

Malgré les efforts investis dans la compréhension des mécanismes et de la cinétique accompagnant la sélection négative, ceux-ci demeurent encore largement incompris. Ceci peut être attribué en grande partie au fait qu'il n'existe, pour le moment, aucun modèle permettant l'étude de la sélection négative dans des conditions physiologiques. Le fait que ces systèmes soient artificiels et comportent des différences entre eux rend parfois difficile l'interprétation des données générées (Starr et al., 2003). Il est pour le moment impossible d'identifier et d'isoler les cellules qui subissent ce phénomène, ce qui rend difficile l'étude des voies biochimiques sous-jacentes à ces processus. Il existe cependant un grand nombre de modèles d'étude artificiels qui impliquent des mécanismes d'induction de la sélection négative différents (Starr et al., 2003). Malgré l'ingéniosité et l'apport considérable de ces modèles (Petrie, 2002), plusieurs problèmes leur sont associés et méritent d'être discutés (Petrie, 2002).

Deux approches ont été largement utilisées pour générer des modèles *in vivo* dans lesquels il est possible de manipuler le développement des thymocytes (von Boehmer et Kisielow, 2006).

Une des ces approches est la génération de souris qui expriment un TCR transgénique de spécificité prédéfinie (von Boehmer et Kisielow, 2006). L'un des problèmes majeurs de ces modèles est que le TCR transgénique est souvent exprimé plus tôt (au stade DN) et a un plus fort niveau dans les thymocytes (Baldwin et al., 2005). L'ordre d'expression des chaînes α et β du TCR n'est souvent que partiellement respectée (Baldwin et al., 2005), et l'affinité de la chaîne pT α pour la chaîne β est inférieure à celle de la chaîne α (Trop et al., 2000). Or, la signalisation par le pré-TCR et le TCR n'est pas équivalente (Lacorazza et al., 2001; Borowski et al., 2004). Ainsi, étant donné l'importance primordiale des signaux délivrés par le TCR au cours des phénomènes de sélection, des variations dans l'intensité et le moment d'expression de celui-ci affectent probablement ces processus et rendent les données recueillies avec les différents modèles très différentes et difficiles à concilier (von Boehmer et Kisielow, 2006).

L'autre approche utilisée pour générer des modèles *in vivo* où il est possible de manipuler le développement des thymocytes consiste à utiliser des super antigènes, qui sont des antigènes provoquant l'association du TCR au complexe peptide-CMH de façon non conventionnelle, par reconnaissance de structures invariantes des deux partenaires et indépendamment de la spécificité du TCR. Les super antigènes ont une spécificité pour différentes sous-familles de la région V β du TCR. Etant donné l'importance de l'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH au cours des événements de sélection, les résultats obtenus avec ces modèles ne sont pas représentatifs d'une situation physiologique dans un animal non-transgénique (von Boehmer et Kisielow, 2006).

Des modèles de culture de cellules et d'organes ont aussi été utilisés pour étudier les phénomènes de sélection des thymocytes. Ces systèmes offrent un environnement contrôlé dans lequel il est possible d'étudier une population de thymocytes (Hare et al., 1999). Il y a des études où les thymocytes isolés ont été maintenus en culture de cellules dispersées (Kishimoto et Sprent, 1997). D'autres études ont été effectuées en cultivant les thymocytes isolés en présence d'une monocouche de cellules stromales (Hare et al., 1999). Ces systèmes permettent la manipulation aisée des cellules et de leur environnement, notamment par l'ajout

de différents réactifs, et l'analyse de leur effet, ce qui seraient difficile à réaliser *in vivo* (Hare et al., 1999). Ces systèmes ont l'avantage d'être simples, mais comportent l'inconvénient de ne reproduire que partiellement (voire pas du tout), la structure tridimensionnelle du thymus dont l'importance au cours du développement des thymocytes est bien admise (Hare et al., 1999). Les systèmes de culture d'organes ont l'avantage de conserver cette structure et de permettre également la manipulation du système. Les FTOCs (*Fetal Thymic Organ Culture*) sont réalisés à partir du thymus d'un embryon de 14 ou 15 jours qui se développe en culture (figure 6) (Hare et al., 1999). Il est possible de manipuler la population de cellules analysée dans ce système, par exemple en éliminant la population endogène par l'utilisation de la 2-désoxyguanosine et par la colonisation subséquente avec des cellules colorées (Bouso, 2004). Il est aussi possible d'ajouter des colorants de cellules stromales ou d'ajouter des peptides, des chimokines, des anticorps et d'étudier leur effet (Bouso, 2004).

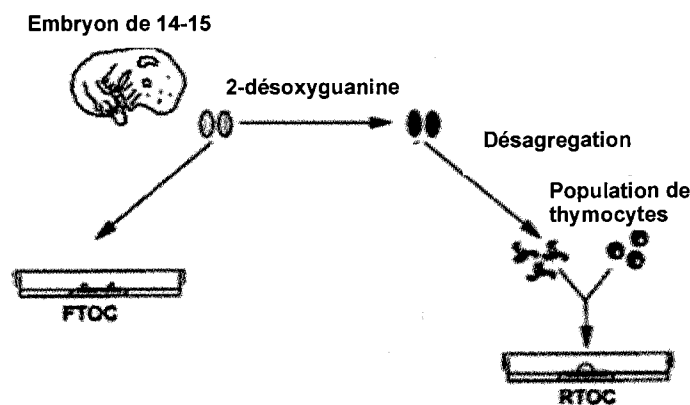


Figure 6. FTOC et RTOC.

Schéma générale des manipulation pour l'établissement de FTOCs et RTOCs (Adapté de Hare et al., 1999).

Une autre méthode, appelée RTOC (*Reaggregated thymic organ culture*), consiste à désagréger les cellules stromales d'un thymus après élimination des thymocytes endogènes et à provoquer la réagrégation de ces cellules avec la population de thymocytes à étudier (figure 6) (Hare et

al., 1999). Malgré les avantages de ces techniques, la densité cellulaire du thymus en culture et son architecture semblent être affectées. En raison de ces différences dans la structure et dans la composition cellulaire du thymus en culture, il faut être prudent dans l'extrapolation des données obtenues avec ces systèmes (Petrie, 2002).

4.2.2 Déroulement spatio-temporel des événements de sélection négative

La localisation précise de la sélection négative dans le thymus ainsi que le phénotype des thymocytes qui la subissent sont encore très controversés (Palmer, 2003). Cependant, il est désormais bien admis qu'au moins une partie des thymocytes subit la sélection négative dans la médulla. La médulla thymique est composée de deux types de cellules présentatrices d'antigènes : les cellules épithéliales médullaires et les cellules dendritiques d'origine hématopoïétique, qui sont toutes les deux impliquées dans la sélection négative (Palmer, 2003). Les cellules épithéliales médullaires sont connues pour être des sites d'expression d'antigènes spécifiques des tissus périphériques et cette expression est contrôlée par le facteur de transcription Aire (*Autoimmune regulator*) (Anderson et al., 2002). L'expression ectopique des protéines des tissus périphériques est cruciale à la tolérisation des thymocytes, comme le montre un défaut dans Aire (Anderson et al., 2002). Une mutation de ce gène mène au développement d'une maladie auto-immune, l'APECED (*Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidosis Ectodermic Dystrophy*) (Ramsey et al., 2002). Ces données fournissent des arguments confirmant l'importance des cellules médullaires thymiques dans la sélection négative. De plus, il a été montré que des protéines présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes médullaires peuvent être nécessaires à la sélection négative *in vitro* (Page et al., 1993). Ceci a été confirmé par d'autres études *in vitro* qui montrent que les molécules CD5, CD80 et CD86 peuvent servir de co-stimulateur à l'induction de l'apoptose lors de la sélection négative, ce qui renforce l'importance du rôle du stroma médullaire dans la sélection négative (Palmer, 2003). Curieusement, les souris qui sont déficientes pour ces mêmes molécules ne semblent pas avoir de défauts de sélection négative, ni développer de

l'auto-immunité (Palmer, 2003). Une des idées avancées pour concilier ces données apparemment contradictoires est que si ces molécules de co-stimulation sont importantes pour la sélection négative, leur fonction est probablement redondante, ce qui expliquerait l'absence de phénotype important lors d'un défaut de l'une de ces molécules (Palmer, 2003).

La maturation des thymocytes SP dans la médulla passe par la diminution du niveau d'expression de la molécule HSA (*Heat Stable Antigen*), que les cellules SP matures n'expriment pas (Kishimoto et Sprent, 1997). En 1997 le groupe du Dr Sprent a conduit des expériences avec des thymocytes semi matures SP CD4 isolés en culture. Selon leur stade de différenciation ces thymocytes devraient être médullaires, et cette étude montre que ces cellules peuvent subir la sélection négative (Kishimoto et Sprent, 1997).

Si l'implication des cellules stromales médullaires dans la sélection négative est désormais bien admise et clairement démontrée, l'existence de sélection négative dans le cortex thymique demeure un sujet de controverse (Palmer, 2003). En 2005, Goldman et collègues ont mis en évidence des phénomènes de délétion clonale dans le cortex thymique de souris dont les cellules épithéliales corticales expriment exclusivement les molécules de CMH I et II sous le contrôle du promoteur de la kératine 14 (Goldman et al., 2005). Des analyses préalables avec ce même modèle semblaient indiquer que les lymphocytes T de ces souris reconnaissaient comme étrangères les cellules épithéliales de souris C57/B6 qui expriment le même allèle de CMH mais sous le contrôle du promoteur endogène pour ce gène. Ceci semble démentir l'implication des cellules corticales thymiques dans la délétion clonale (Laufer et al., 1996; Capone et al., 2001). Il a été démontré par la suite que ces lymphocytes T sont en fait tolérants envers les cellules épithéliales si le CMH qu'elles expriment est placé sous la dépendance du même promoteur que celui utilisé pour la tolérisation, à savoir celui de la kératine 14 (Goldman et al., 2005). Ces observations suggèrent que le cortex peut jouer un rôle dans la tolérisation des thymocytes en développement, notamment pour l'induction de la tolérance envers les molécules de CMH du soi (Goldman et al., 2005).

L'ordre dans lequel les phénomènes de sélection positive et négative se déroulent, et par conséquent la population cible de la sélection négative, demeure encore une question ouverte. Si la sélection négative a lieu exclusivement dans la médulla, les sélections positive et négative seraient des événements séquentiels (figure 7) (Palmer, 2003). Cependant, s'il existe de la sélection négative dans le cortex, il est possible d'envisager une situation dans laquelle la sélection positive et négative co-existent (figure 7) (Palmer, 2003). Les observations que la population de thymocytes semi-matures dans la médulla peut subir la sélection négative supportent plutôt l'idée que les deux phénomènes sont séquentiels et que suite à la sélection positive et à la migration vers le cortex, il y a une période pendant laquelle les cellules sont susceptibles de subir la sélection négative (figure 7) (Kishimoto et Sprent, 1997).

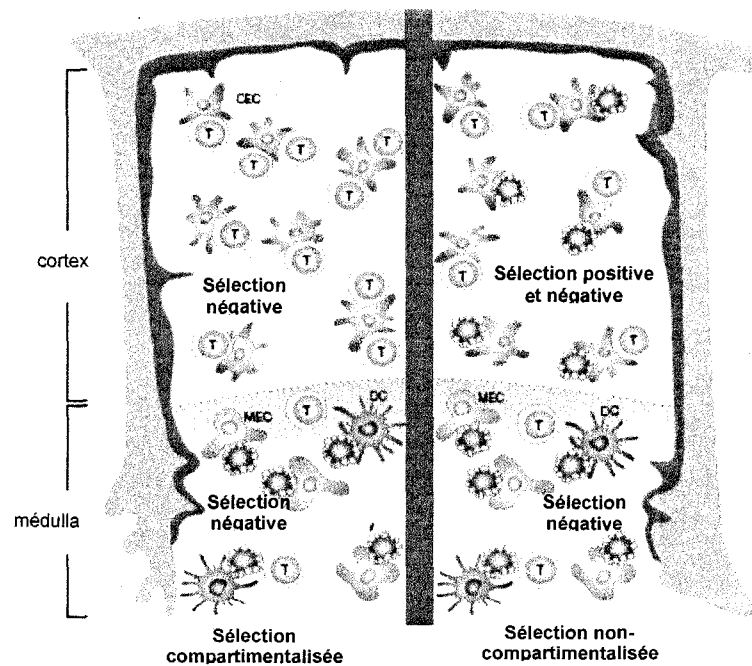


Figure 7. Compartimentalisation de la sélection négative. (Adapté de Palmer, 2003).

Les données recueillies au sujet de la population de thymocytes qui est la cible de la sélection négative varient selon le modèle utilisé. Dans un modèle utilisant un TCR transgénique qui réagit fortement avec le CMH II d'haplotype IE, les thymocytes qui expriment ce TCR transgénique sont éliminés dans les souris qui expriment aussi le CMHII d'haplotype IE (Kappler et al., 1987). Les thymocytes exprimant le TCR transgénique peuvent être retrouvés parmi les thymocytes immatures, mais pas parmi les thymocytes matures (Kappler et al., 1987). Ceci indique que les thymocytes en transition entre le stade DP et SP sont la cible de la sélection négative, suggérant que celle-ci peut se passer au moment où les thymocytes sont sélectionnés pour se déplacer vers la médulla (Kappler et al., 1987). Une autre étude conduite en utilisant des FTOCs isolés à partir d'une souris transgénique ayant un TCR spécifique pour un peptide du cytochrome c a permis de montrer que les thymocytes DP peuvent recevoir un signal de sélection négative sans avoir reçu auparavant de signal de sélection positive. (Spain et Berg, 1992). En utilisant des tétramères de complexes peptide-CMH fluorescents, il a été mis en évidence que les thymocytes peuvent subir la sélection négative à n'importe quelle étape de leur développement (Baldwin et al., 1999). Ceci constitue un argument de plus qui supporte l'idée que les événements de sélection positive et négative ne nécessitent pas d'être séquentiels (Baldwin et al., 1999).

4.2.3 Voies de signalisation activées par la sélection positive et négative

La signalisation immédiate en aval du TCR est nécessaire autant pour la sélection négative que pour la sélection positive (Starr et al., 2003). Les événements les plus immédiats dans le déclenchement des voies de signalisation en aval du TCR requièrent les composantes structurelles du complexe TCR-CD3 (Starr et al., 2003). Il a été démontré que la chaîne α du TCR, plus particulièrement un motif de connexion de la chaîne α , est nécessaire à la sélection positive et nécessaire à la rétention de la sous-unité δ du complexe CD3 (Backstrom et al.,

1998). Les thymocytes qui n'ont pas le motif de connexion de la chaîne α du TCR ou une déficience dans le CD3 δ ne sont plus capables de subir la sélection positive (Backstrom et al., 1998); (Dave et al., 1997) mais restent cependant sensibles à la sélection négative. Ceci suggère que les événements de signalisation impliqués dans la sélection positive et négative bifurquent assez tôt dans la cascade qui suit l'activation du TCR (Werlen et al., 2003). Les rôles des autres sous-unités du complexe CD3 sont plus complexes à étudier du fait que leur absence bloque la génération de thymocytes DP (Starr et al., 2003). Cependant, l'absence de certains motifs ITAMs (*Immune Tyrosine-based Activation Motifs*) de la chaîne ζ du TCR n'empêche pas la génération de thymocytes DP (Starr et al., 2003). L'efficacité de la sélection positive et négative est cependant directement proportionnelle au nombre de ITAMs, indiquant que la présence de ces motifs peut être impliquée non seulement dans l'amplification, mais aussi dans la discrimination ou dans l'inhibition des signaux reçus par le TCR (Love et Shores, 2000).

La signalisation en aval du TCR est dépendante de la phosphorylation des motifs ITAM par des tyrosine-kinases cytoplasmiques (Janeway et al., 2004). Les kinases Lck et ZAP-70 sont requises pour la sélection positive (Starr et al., 2003). La phosphorylation des sous-unités ϵ et ζ du complexe CD3 permettent la fixation de ZAP-70 et sa phosphorylation par Lck (Janeway et al., 2004). Une des principales cibles de ZAP-70 phosphorylée est la protéine adaptatrice LAT (*Linker of Activated T-cells*) (Starr et al., 2003). Dans le cas de la sélection négative, les niveaux de la kinase ZAP-70 phosphorylée et recrutée au TCR sont plus élevés par rapport à ceux qui sont présents lors de la sélection positive. Ceci entraîne une augmentation de la quantité de protéine LAT phosphorylée présente en aval du TCR (Daniels et al., 2006). Cette protéine semble avoir un rôle important dans la différenciation entre les signaux de sélection positive et négative (Werlen et al., 2003). LAT possède 9 résidus tyrosine dont les patrons de phosphorylation peuvent varier, ce qui provoque le recrutement de différentes protéines (Werlen et al., 2003). L'interaction faible entre le TCR et les complexes peptide-CMH nécessaire à la sélection positive peut résulter soit d'un temps d'interaction faible, soit de la

liaison d'une plus petite quantité de récepteurs comparé à un signal de sélection négative dont l'intensité serait plus importante (Werlen et al., 2003). La déficience en LAT entraîne un blocage au stade DP et le rôle de cette protéine dans la signalisation des événements de sélection semble crucial. En effet, elle est responsable, entre autres, de l'activation de la PLC- γ (phospholipase C γ) qui est impliquée dans les principales voies de signalisation de la sélection des thymocytes (Starr et al., 2003). Après activation, la PLC- γ hydrolyse le PIP2 (phosphatidyl-inositol biphosphate) membranaire pour générer deux seconds messagers très importants, le diacyl glycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3). Ainsi, pendant la sélection positive la phosphorylation de LAT serait plus lente et il en résulterait la formation d'un complexe de signalisation instable avec activation diminuée de la PLC- γ (figure 8) (Werlen et al., 2003). Il s'en suivrait une hydrolyse lente du PIP2 et augmentation faible mais soutenue de la concentration de calcium intracellulaire de faible amplitude, mais soutenue et une accumulation de DAG (figure 8) (Werlen et al., 2003). D'un autre côté, les signaux forts de sélection négative induiraient une phosphorylation plus étendue de LAT, le recrutement d'un complexe de signalisation plus stable provoquant une activation maximale de la PLC- γ et résultant finalement en une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire transitoire, mais de grande amplitude (figure 8) (Werlen et al., 2003).

4.2.4 Les voies de signalisation en aval du TCR activées par la sélection positive et négative

Le DAG et le PIP2 sont des seconds messagers qui sont impliqués dans deux des voies de signalisation les plus importantes pour la sélection positive (Lewis, 2001). L'une de ces voies se trouve en aval du DAG et est celle des MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). Le rôle de la cascade des MAPK dans la différenciation entre un signal de sélection positive et négative a été démontré (Daniels et al., 2006). Le DAG est un médiateur de l'activation de Ras en activant la RasGRP1 (*Ras Guanyl Nucleotide-Releasing Protein*), une protéine qui fait partie de la classe des GEFs (*Guanine Exchange Factors*) (Starr et al., 2003). Les niveaux de

Ras activés sont le résultat d'un équilibre entre l'activité des GEFs, qui facilitent l'échange de GDP (guanine diphosphate) en GTP (guanine triphosphate) et provoquant l'activation de Ras,

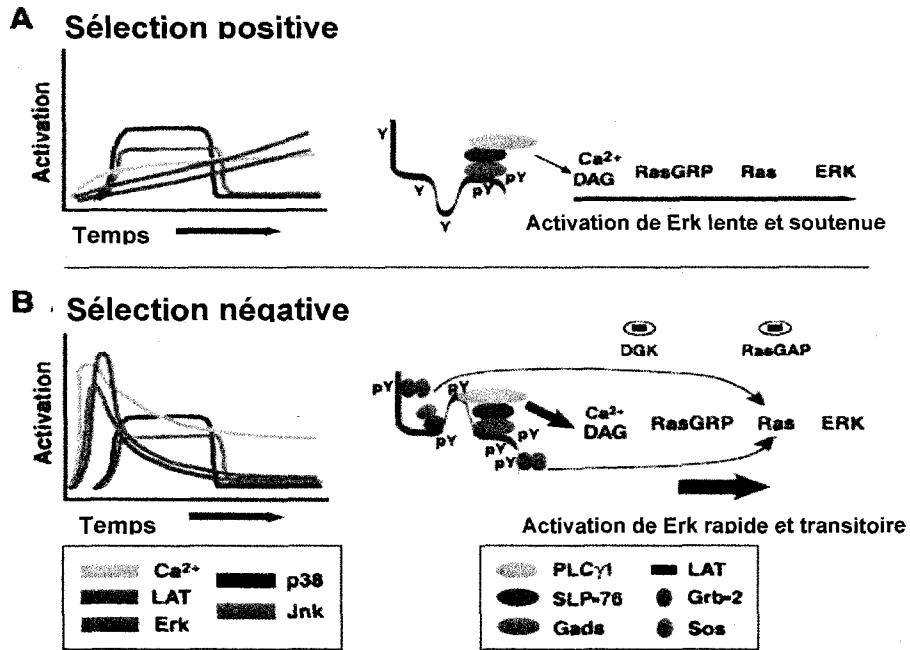


Figure 8. Cinétique de signalisation au cours de la sélection positive et négative.

A) Pendant la sélection positive, la phosphorylation de LAT, la mobilisation du calcium et l'activation de Erk sont lentes et soutenues. Les complexes peptide-CMH qui lient le TCR avec une faible affinité l'occupent pour une courte période de temps, ce qui induit une faible phosphorylation de LAT et conduit à la formation d'un complexe de signalisation instable accompagné d'une production lente de DAG et d'une activation lente de RasGRP et de Erk.

B) Pendant la sélection négative, la phosphorylation de LAT, la mobilisation du calcium et l'activation de Erk sont rapides et transitoires. L'interaction entre le TCR et un complexe peptide-CMH qui conduit à la sélection négative est plus longue et la phosphorylation de LAT est plus importante ce qui mène à une production rapide de DAG accompagnée d'une activation rapide de Erk et Ras. La phosphorylation de LAT permet le recrutement de Grb2 et SOS, ce qui peut augmenter la vitesse d'activation de Erk. L'activité des DGKs (diacylglycérol kinase) et RasGAPs peut contribuer à l'arrêt du signal. La cinétique de p38 et Jnk sont semblables dans le cas de la sélection positive et négative. (Adapté de Werlen et al., 2003).

et des GAPs (*GTPase activating proteins*) qui facilitent l'hydrolyse du GTP par Ras et rendent cette protéine inactive. Les souris qui sont déficientes pour RasGRP1 ont aussi un défaut de sélection positive (figure 8) (Dower et al., 2000). Ces souris montrent un défaut dans l'activation de la protéine Erk (*Extracellular signal Regulated Kinase*). Une fois activée, Ras se lie à la kinase Raf-1 qui peut alors phosphoryler MEK1/2 (*map-erk kinase*), deux kinases dont le substrat est Erk-1/2. Erk-1/2 phosphorylés subissent une translocation vers le noyau et activent des facteurs de transcription impliqués dans la survie cellulaire tels que des membres des familles Fos et Jun (Alberola-Ila et Hernández-Hoyos, 2003). L'importance de l'activation de Erk dans la sélection positive a été mise en évidence en utilisant des souris déficientes pour Erk-1, ou exprimant des dominants négatifs de Ras et MEK qui compromettent l'activité de Erk. Dans ces modèles, la sélection positive est bloquée tandis que la sélection négative n'est pas modifiée (Alberola-Ila et al., 1995; Swan et al., 1995; Alberola-Ila et al., 1996; Pages et al., 1999).

Les travaux de l'équipe du Dr. Palmer suggèrent qu'une différence de l'amplitude et de la durée de l'activation de Erk pourrait constituer une explication à la divergence des signaux menant à la sélection positive ou négative issus d'un même récepteur (figure 8) (Daniels et al., 2006). En effet, une activation soutenue de Erk est associée à un signal de sélection positive, tandis qu'une activation transitoire de Erk est associée à la sélection négative (figure 8) (Daniels et al., 2006). Les phénomènes de sélection semblent également impliquer une localisation subcellulaire différente des protéines RasGRP1, Ras, Raf-1 et Erk (Werlen et al., 2000 ; Daniels et al., 2006). Un signal de sélection négative mène à un recrutement de RasGRP1 et du complexe entre la protéine adaptatrice Grb2 (*Growth factor receptor bound protein 2*) et le facteur d'échange de nucléotide SOS (*son of sevenless*) (Werlen et al., 2003). La sélection positive ne semble pas avoir d'effet sur la localisation subcellulaire de ces protéines et l'activation de RasGRP1, suivie de celles de Ras, Raf-1 et Erk semble se dérouler au niveau de l'appareil de Golgi plutôt qu'à la membrane plasmique (Werlen et al., 2003).

L'expression de SOS à l'état hémizygote est suffisante pour diminuer la sélection négative, sans affecter la sélection positive (Gong et al., 2001). Les souris où SOS est à l'état hémizygote montrent aussi un défaut dans l'activation de deux autres kinases, Jnk (*c-Jun N-terminal kinase*) et p38, qui semblent être impliquées dans la sélection négative (Gong et al., 2001). Ces deux kinases ont un seuil d'activation plus élevé que Erk, ce qui requiert un signal plus fort, consistant avec celui transmis lors de la sélection négative (Gong et al., 2001). Ainsi, pendant la sélection négative, l'activation de la cascade Ras, Raf-1, Erk se fait à la membrane plasmique de façon rapide et transitoire (Daniels et al., 2006). L'activité de Ras présente à la membrane peut être régulée négativement, ce qui explique l'activation transitoire de Raf-1 et Erk (Werlen et al., 2003). Un signal fort de sélection négative peut causer l'internalisation du TCR, mettant ainsi fin au signal d'activation (Werlen et al., 2003). L'action de kinases du DAG peut également bloquer l'activation de RasGRP1 et activer simultanément RasGAP, un régulateur négatif de Ras (Werlen et al., 2003). Ceci pourrait expliquer l'activation transitoire de Ras et par conséquent de Erk (figure 8) (Werlen et al., 2003).

Plusieurs évidences suggèrent qu'une autre voie de signalisation qui se trouve en aval du TCR et qui est importante pour la sélection positive est celle dépendante du calcium (Bhakta et al., 2005). En 2005, l'équipe du Dr. Lewis a démontré, dans un système *in vitro* en utilisant de tranches préparées avec un microtome à partir de thymus de souris immergés dans l'agarose, que dans les thymocytes en sélection positive, d'importantes oscillations dans les concentrations de calcium intracellulaire sont associées à des variations de motilité des cellules (Bhakta et al., 2005). Dans des cellules qui se déplacent lentement et de façon aléatoire, les oscillations du niveau de calcium intracellulaire sont plus faibles que celles des cellules qui s'immobilisent dans un environnement propice à la sélection positive (Bhakta et al., 2005). Les auteurs ont suggéré que les thymocytes qui s'immobilisent sont ceux qui établissent un contact avec une cellule portant un complexe peptide-CMH. Le signal alors transmis par le TCR de ces cellules serait alors à l'origine des fluctuations du niveau de calcium intracellulaire (Bhakta et al., 2005). A la suite de ces événements, les cellules redeviennent mobiles, mais leur vitesse est beaucoup plus importante et leur mouvement

dirigé (Bhakta et al., 2005). Les fluctuations de calcium dans les thymocytes qui ont reçu un signal par le TCR dépendent de l'entrée de calcium à partir de deux réserves distinctes, le RE et l'espace extracellulaire (Lewis, 2001). L'IP3 se lie à des récepteurs qui lui sont spécifiques sur le RE, entraînant ainsi la libération de calcium dans le cytosol (Lewis, 2001). L'augmentation du calcium dans le cytosol est responsable de l'activation des récepteurs CRAC (*Calcium release-activated calcium channel*) sur la membrane plasmique et de l'entrée de calcium extracellulaire à l'intérieur de la cellule (Lewis, 2001). Les signaux de calcium ont une grande capacité de transmission d'information et de régulation de différents processus dans la cellule. Des variations au niveau de l'amplitude, de la fréquence et de la durée des flux de calcium ont pour conséquence l'activation différentielle de la transcription de certains gènes (Dolmetsch et al., 1997); (Dolmetsch et al., 1998). Ces flux de calcium vont être détectés par la calmoduline, qui active à son tour la phosphatase appelée calcineurine. Cette phosphatase est nécessaire à la sélection positive, puisque la sélection positive est absente chez les souris qui en sont déficientes (Hayden-Martinez et al., 2000). Le facteur de transcription NFAT (*Nuclear factor of Activated T-cells*) est une cible importante de la voie de signalisation en aval de la calcineurine (Starr et al., 2003). Plus particulièrement, les thymocytes DP expriment un haut niveau de NFAT4 et l'absence de ce facteur de transcription arrête la sélection positive. (Oukka et al., 1998). Les cibles de NFAT4 sont des gènes de cytokines et d'autres facteurs de survie, dont l'interleukine-2, impliqués dans la maturation subséquente des thymocytes (Lewis, 2001). À présent, il n'y a pas d'étude semblable à celle effectuée par Bhakta et collaborateurs en ce qui concerne la sélection négative.

Le résultat net de la signalisation négative est la mort des thymocytes (Strasser et al., 2007). Les protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bim (*Bcl-2 interacting mediator*), Bak (*Bcl-2 homologous Antagonist/Killer*) et Bax (*Bcl-2 Associated X protein*) sont importantes pour l'apoptose des thymocytes à la suite d'un signal de sélection négative (Siggs et al., 2006). Un défaut de Bim ou un défaut combiné de Bax et Bak empêchent la sélection négative (Bouillet et al., 1999); (Rathmell et al., 2002). De plus, Bax et Bak semblent avoir des rôles non-redondants en aval de Bim (Hutcheson et al., 2005). Il a été montré que la

transcription de Bim est induite pendant la sélection négative (Bouillet et al., 2002; Schmitz et al., 2003). Les facteurs impliqués dans la régulation de la transcription de Bim ne sont toutefois pas bien caractérisés et la régulation de Bim au niveau post-traductionnel est aussi impliquée dans sa capacité d'activer l'apoptose (Strasser et al., 2007).

Des facteurs de transcription qui ont un rôle important dans la mort cellulaire par sélection négative sont Nur77 (Nr4a, NGFI-B (*Nerve cell growth factor I-B*)) et Nor-1 (Sohn et al., 2003). Ces deux facteurs de transcription font partie de la même famille de récepteurs nucléaires orphelins et sont rapidement exprimés suite à un signal de sélection négative (Kuang et al., 1999; Winoto et Littman, 2002). En fait, la surexpression de Nur77 dans des thymocytes cause la mort cellulaire. L'absence de Nur77 n'entraîne pas de phénotype au niveau de la sélection négative (Cheng et al., 1997), mais un dominant négatif de Nur77 abroge ce phénomène de sélection (Liu et al., 1994; Woronicz et al., 1994). Ceci suggère que Nor-1 et Nur77 ont des fonctions redondantes (Liu et al., 1994). Les événements aboutissant à l'induction de l'apoptose en aval de Nur77 sont encore très peu connus (Sohn et al., 2003). De plus, toutes ces études ont été effectuées en utilisant des systèmes artificiels et des thymocytes transgéniques pour leur TCR.

Les thymocytes qui ont survécu aux étapes de sélection deviennent des thymocytes SP immatures qui complètent leur maturation dans la médulla du thymus (Chen, 2004). Jusqu'à récemment, la période de temps nécessaire pour cette maturation était estimée à environ 14 jours (Petrie et Zuniga-Pflucker, 2007). Cependant, des données plus récentes suggèrent qu'il s'agit plutôt d'un processus d'une durée de 4 à 5 jours (McCaughy et al., 2007). Ainsi, les thymocytes matures, qui quittent le thymus, expriment des marqueurs de surface différents des thymocytes SP qui viennent d'être sélectionnés. (Chen, 2004). Les thymocytes matures présentent une diminution de l'expression du marqueur d'activation CD69 et de la protéine HSA, indiquant le retour à un état quiescent (Chen, 2004). La période de temps qui s'écoule entre les événements de sélection et la sortie des thymocytes matures du thymus leur permet

d'acquérir les caractéristiques fonctionnelles des lymphocytes CD4 et CD8, comme par exemple la capacité de résister à l'apoptose et la capacité d'exprimer des cytokines caractéristiques de ces deux lignées suite à une stimulation (Chen, 2004). Enfin, il existe aussi une étape de prolifération associée à la maturation qui assure que le nombre de cellules fonctionnelles matures produites est suffisant pour assurer les besoins de l'organisme en périphérie (Chen, 2004).

5. Études en microscopie biphotonique de la migration des thymocytes

L'étude du développement des lymphocytes passe par la compréhension d'un ensemble d'interactions complexes et dynamiques entre les thymocytes et leur environnement (Cahalan et Parker, 2006). Les thymocytes migrent dans le thymus tout au long de leur développement. Cette migration est d'une importance cruciale et les contacts établis entre les thymocytes et les cellules du stroma thymique leur permettent de passer d'un stade de leur développement au prochain. Cette migration ne se fait pas de façon aléatoire, mais dans un ordre précis, donc, de façon polarisée (Misslitz et al., 2006). Jusqu'à récemment les connaissances sur ce sujet étaient limitées à des observations sur des échantillons fixés. Cette situation a beaucoup changé avec l'application de la microscopie biphotonique à l'observation en temps réel d'organes intacts et de préparations de tranches épaisses de différents tissus, permettant ainsi l'observation des cellules et de leur comportement dynamique dans leur environnement (Cahalan et Parker, 2006).

5.1 La microscopie : un photon versus deux photons

La microscopie à fluorescence à longtemps été un outil de choix pour observer des tissus et s'intéresser au fonctionnement de divers processus biologiques (Bajénoff et Germain, 2007).

La limitation majeure de ce type de microscopie est son manque de résolution, dû à la fluorescence hors du plan focal (Bajénoff et Germain, 2007). L'avènement de la microscopie confocale a en partie réglé ce problème en limitant l'illumination du spécimen à une zone précise, plutôt qu'à son ensemble, et en ne recueillant que la lumière issue du plan focal, éliminant ainsi le « bruit » des régions hors focus (Bajénoff et Germain, 2007). Malgré ces progrès, il n'en demeure pas moins que les spécimens observés sont des échantillons statiques et que l'épaisseur de l'échantillon est limitée en raison de la dispersion de la lumière par les composants cellulaires (Bajénoff et Germain, 2007). De plus, le fait que l'illumination du spécimen ne se fasse pas seulement au plan focal entraîne un photoblanchiment de l'échantillon qui compromet la possibilité de répéter des observations dans la même zone (Zipfel et al., 2003). Ceci empêche aussi l'acquisition de données d'une même zone pendant une longue période de temps, une condition indispensable à l'étude du développement des thymocyte qui implique de suivre de nombreux processus dynamiques au niveau des cellules individuelles (Bajénoff et Germain, 2007). L'utilisation de la microscopie biphotonique permet de contourner les principaux problèmes qui surviennent lors de l'analyse *in vivo* de cellules individuelles dans des tissus profonds (Cahalan et al., 2002).

Le principe physique à la base de la microscopie biphotonique a été découvert en 1931 par Maria Göppert-Mayer (Göppert-Mayer, 1931). La microscopie de fluorescence conventionnelle implique qu'une molécule fluorescente absorbe l'énergie d'un photon puis émet, quelques nanosecondes plus tard, un photon d'énergie inférieure à celle qu'elle a absorbé (Cahalan et al., 2002). Etant donné que l'énergie d'un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde, le photon émis a une longueur d'onde plus longue que celui qui l'a excité au départ (Cahalan et al., 2002). Dans un système biphoton, l'excitation implique l'absorption quasi simultanée de deux photons, chacun d'entre eux contribuant à fournir environ la moitié de l'énergie nécessaire à l'excitation du fluorophore (Zipfel et al., 2003). La molécule fluorescente émet alors un photon, comme si elle avait été excitée par un seul photon d'énergie supérieure (Zipfel et al., 2003). Ainsi, la fluorescence émise augmente avec le carré de l'intensité de l'excitation, étant donné la nécessité de l'absorption quasi

simultanée de deux photons (Zipfel et al., 2003). Les probabilités que ce phénomène se produisent hors du plan focal sont extrêmement faibles, car l'intensité de la lumière incidente n'est suffisante qu'au plan focal (figure 9) (Zipfel et al., 2003). Ce principe a été appliqué à la biologie pour l'imagerie de cellules vivantes et d'autres objets microscopiques à la fin des années 80 (Denk et al., 1990). Dans la dernière décennie des sources laser pulsées de l'ordre du femtoseconde sont devenues disponibles commercialement ainsi que le premier microscope multiphoton, introduit par BioRad en 1996. Ceci a largement contribué à l'essor de nouvelles applications de cette technique, notamment au niveau de l'imagerie *in vivo* du système immunitaire, qui est largement composé de cellules motiles participant à des rencontres dynamiques dans les tissus lymphoïdes (Bajénoff et Germain, 2007). Ces études ont permis de recueillir des nouvelles données très importantes pour la compréhension du fonctionnement de ce système (Cahalan et Parker, 2006). Le système immunitaire représente donc un candidat de choix pour des analyses *in vivo* à l'aide d'un microscope multiphoton.

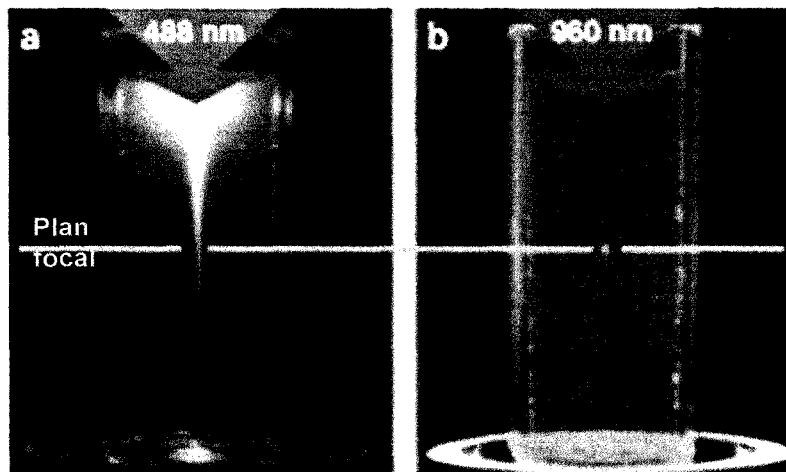


Figure 9. Localisation de l'excitation par la méthode biphotonique.

A) L'excitation de l'échantillon avec la méthode conventionnelle génère de la fluorescence au-dessus et en dessous du plan focal. B) Avec l'excitation biphotonique, en raison de la probabilité très faible d'absorption simultanée de deux photons hors du plan focal, l'émission de fluorescence n'a lieu qu'au plan focal. (Adapté de Zipfel et al., 2003).

5.2 Les colorants

Les techniques de microscopie décrites plus haut nécessitent le marquage des échantillons à observer avec des molécules fluorescentes (Cahalan et Parker, 2006). Ce marquage peut être fait *in vitro*, *in vivo* ou par des moyens de manipulation génétique (Cahalan et Parker, 2006). L'une des avancées importantes dans les techniques de marquage d'échantillons est le développement d'anticorps couplés à des molécules fluorescentes, sans que ce couplage affecte la spécificité des anticorps (Bajénoff et Germain, 2007). Cette technique s'avère très utile pour l'imagerie d'échantillons statiques mais présente plusieurs limitations pour l'imagerie *in vivo*, dans la mesure où l'anticorps peut inhiber la fonction de la molécule qu'il reconnaît ou stimuler la phagocytose (Bajénoff et Germain, 2007).

Une alternative est l'utilisation de colorants fluorescents perméables à la membrane cellulaire et permettant la coloration de populations de cellules d'intérêt avec différentes couleurs (Germain et al., 2006). Ces cellules peuvent ensuite être transférés dans une souris ou en culture d'organes afin de les observer (Germain et al., 2006). Les colorants les plus utilisés sont le CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*), le SNARF (*seminaphthorhodafluor*) et le CMTRM (*chloromethylbenzoyl aminotetramethylrhodamine*). S'il peut être avantageux de colorer les cellules de cette façon, il convient de rappeler que ces colorants se diluent avec la division cellulaire et que le signal diminue dans les populations de cellules filles issues de cellules qui prolifèrent de façon active (Bajénoff et Germain, 2007). Ces colorants sont aussi sensibles au photoblanchiment et peuvent générer des sous-produits toxiques (Germain et al., 2006). Ces problèmes peuvent être contournés par l'utilisation de protéines fluorescentes. Ces protéines sont disponibles en plusieurs couleurs, leur fluorescence a été optimisée et elles sont bien tolérées par les cellules ce qui permet leur utilisation *in vivo* (Tsien, 2005). De plus, le marquage avec ces protéines est stable et ne diminue pas avec les

divisions cellulaires (Bajénoff et Germain, 2007). La génération d'animaux transgéniques avec ces protéines est une approche très utilisée pour marquer une population de cellules d'intérêt (Bajénoff et Germain, 2007).

Des techniques diverses, comme la transgénèse conventionnelle, le « *knock-in* » ou la recombinaison avec des BAC (*Bacterial artificial chromosome*), peuvent être utilisées pour générer des animaux qui expriment des protéines fluorescentes dans des tissus spécifiques (Germain et al., 2006; Bajénoff et Germain, 2007). Des vecteurs rétroviraux ou lentiviraux peuvent être utilisés pour la transduction de cellules souches hématopoïétiques qui sont ensuite transférées dans des souris pour la génération d'animaux chimériques (Germain et al., 2006). Bien qu'il soit long et coûteux de générer des modèles dans lesquels l'expression d'une protéine fluorescente se fait sous le contrôle d'un promoteur donné, ceci a l'avantage de générer un système dans lequel le marquage ne se perd pas et qui ne nécessite aucune manipulation ultérieure des cellules à étudier (Germain et al., 2006). Le choix judicieux des protéines à utiliser peut permettre l'observation de plus d'un marqueur dans le même animal.

Un nouveau type de colorant a été introduit récemment (Adams et al., 2002). Il s'agit d'un dérivé de la fluorescéine qui possède deux groupements arséniques capables de se lier aux groupements thiol de cystéines présentes sur sa séquence cible à raison d'un groupement arsénique pour deux cystéines (Adams et al., 2002). Lorsque le colorant se lie à sa séquence cible, il devient fluorescent. Ces colorants sont capables de reconnaître leur cible dès qu'elle est traduite (Adams et al., 2002) et sont de petite taille, donc peu encombrants. Plusieurs couleurs de réactifs, qui se lient au même motif, sont disponibles, ce qui permet des études dynamiques (Adams et al., 2002).

5.3 Préparation des spécimens

Il existe deux façons principales de préparer les spécimens à observer : la préparation d'explants d'organes ou les préparations intravitales (Cahalan et Parker, 2006; Germain et al., 2006). Dans le premier cas, l'organe est maintenu dans du milieu de culture oxygéné et chauffé de façon à maintenir le plus possible des conditions physiologiques, alors que dans le cas de la préparation intravitale, l'animal est anesthésié, l'organe est exposé chirurgicalement et immergé dans du milieu chaud pendant le temps de l'observation (Germain et al., 2006). Un des avantages de l'explant par rapport à la préparation intravitale est que l'accès aux tissus à observer est grandement facilité par la possibilité de choisir l'orientation de l'organe à observer (Germain et al., 2006). Le traumatisme de l'anesthésie et de la chirurgie peut cependant causer des artéfacts dans les deux techniques citées (Cahalan et Parker, 2006). Dans le cas de l'explant, la perfusion artificielle de l'organe peut ne pas recréer les conditions physiologiques avec autant de fidélité que souhaité. Au contraire, la préparation intravitale a l'avantage de conserver la circulation et l'innervation physiologique de l'organe (Bouso et Robey, 2004). Cependant, la préparation d'explants a l'avantage de soustraire l'organe à observer des mouvements dus à la respiration et aux battements du cœur ainsi que de faciliter la manipulation de l'évènement à observer par l'ajout de drogues par exemple (Bouso et Robey, 2004). Le choix entre les deux techniques doit être fait en considérant l'organe qui est observé, sa localisation anatomique, mais aussi la question biologique posée (Bouso et Robey, 2004).

5.4 Avantages et limitations de la microscopie biophotonique

Le principe de l'absorption de deux photons confère à la microscopie biphotonique ses principaux avantages (Zipfel et al., 2003). Etant donné que l'intensité nécessaire à l'absorption de deux photons par le fluorophore n'est assez élevée qu'au plan focal, cela limite l'excitation des fluorophores à celui-ci, diminuant ainsi le photoblanchiment de l'échantillon en dehors du plan focal et permettant de faire plusieurs observations sur un même échantillon (Zipfel et al.,

2003). Le fait que l'énergie du photon soit inversement proportionnelle à sa longueur d'onde nécessite l'utilisation de longueurs d'onde plus grandes dans le cas de la microscopie biphotonique (Cahalan et Parker, 2006). Ces longueurs d'onde, moins dispersées par les tissus, y pénètrent plus facilement et permettent ainsi de faire des observations à une plus grande profondeur (Cahalan et Parker, 2006).

Quelques limitations sont cependant associées à la microscopie biphotonique. Le coût des lasers nécessaires à cette technique est assez élevé et la profondeur à laquelle il est possible d'effectuer des observations reste limitée à quelques centaines de microns (Bouso et Robey, 2004). Afin de réaliser des observations, il est nécessaire d'introduire, dans les tissus à observer, des traceurs ou des marqueurs fluorescents capable de s'associer à des structures permettant d'obtenir de l'information pertinente sur les processus étudiés (Bouso et Robey, 2004).

5.5 Les défis associés à l'imagerie du thymus

L'hétérogénéité des populations de thymocytes en développement dans le thymus et leur grande mobilité augmentent la difficulté des observations en temps réel dans cet organe (Bouso, 2004). De plus, il est difficile de corréliser la visualisation d'un événement avec le processus biologique développemental sous-jacent subi par le thymocyte, et cela d'autant plus que le réseau stromal du thymus est très dense et que les interactions avec les différentes cellules qui le composent sont très importantes (Bouso, 2004). D'autre part, en raison de leur mobilité importante, les thymocytes quittent fréquemment le champ d'observation, ce qui constitue une difficulté supplémentaire à prendre en compte (Bouso, 2004). Enfin, le maintien de la circulation et de l'innervation physiologique du thymus est important, mais la localisation de cet organe ne permet pas de réaliser de préparation intravivale (Cahalan et Parker, 2006).

5.6 *Études par microscopie biphotonique de la migration des thymocytes*

Afin d'obtenir plus d'informations sur les processus dynamiques associés au développement des thymocytes, plusieurs groupes de recherche ont réalisé des expériences en utilisant la microscopie biphotonique (Bouso et al., 2002b; Bhakta et al., 2005; Witt et al., 2005). L'équipe de la Dre. Robey a combiné la microscopie biphotonique et la technique RTOC pour observer les interactions entre les thymocytes en développement et leur environnement pendant la sélection positive (Bouso et al., 2002b). Des thymocytes isolées d'une souris transgénique pour le TCR et ne possédant pas le gène de la $\beta 2$ microglobuline, ou des thymocytes n'exprimant pas le CMH I, ont été utilisés dans cette étude comme source de cellules n'ayant encore subi aucun phénomène de sélection (Bouso et al., 2002b). Le TCR transgénique utilisé reconnaît le peptide F5 du virus de l'influenza présenté par un CMH I de type D^b (Bouso et al., 2002a). Des RTOCs ont été reconstitués avec les thymocytes cités ci-dessus et des cellules stromales n'exprimant pas de CMH I ou exprimant le type de CMH I nécessaire à la sélection positive des thymocytes exprimant le TCR transgénique (Bouso et al., 2002b). Les données recueillies montrent que les thymocytes sont des cellules motiles dans leur environnement et que leur motilité n'est pas passive (Bouso et al., 2002b). Les thymocytes établissent trois fois plus de contacts avec les cellules qui expriment le CMH I qu'avec celles qui ne l'expriment pas, ce qui suggère que les molécules de CMH I sont impliquées dans ces contacts (Bouso et al., 2002b). Les contacts entre les thymocytes et les cellules stromales qui expriment un CMH I peuvent être stables, si le thymocyte s'immobilise, ou dynamiques, s'il se déplace de façon active le long de la cellule stromale (Bouso et al., 2002b). Cependant, au cours des expériences réalisées dans ces travaux, il était impossible d'associer les observations effectuées à un phénomène de signalisation précis (Bouso et al., 2002b).

Une autre étude de l'équipe de la Dre. Robey a utilisé des souris chimériques dont environ 1% des thymocytes expriment la GFP (*Green fluorescent protein*) (Witt et al., 2005). Les lobes thymiques de ces souris ont été prélevés chirurgicalement, perfusés avec du milieu chauffé et oxygéné et observés avec un microscope biphotonique (Witt et al., 2005). La plupart des thymocytes se déplacent à une vitesse entre 3 et 8 $\mu\text{m}/\text{min}$, de façon aléatoire dans le champ de vision, et ont une morphologie arrondie indiquant qu'ils s'arrêtent et interagissent avec leur environnement. D'autres thymocytes, en proportion moins élevée, se déplacent à des vitesses supérieures, de façon dirigée et présentent une morphologie polarisée, avec un uropode, indiquant un déplacement actif (Witt et al., 2005). Les auteurs ont émis l'hypothèse que les cellules qui se déplacent plus rapidement et de façon polarisée correspondent à des cellules ayant subi la sélection positive et se déplaçant vers la médulla. Pour vérifier cette hypothèse, les auteurs ont poursuivi leurs expériences impliquant des souris chimériques dans lesquelles environ 1% des thymocytes expriment la GFP. Cependant, les thymocytes utilisés dans cette deuxième partie des travaux, exprimaient un TCR transgénique permettant, ou non, la sélection positive dans un environnement contrôlé (Witt et al., 2005). Dans des conditions permissives pour la sélection positive, environ le tiers des thymocytes sont de phénotype polarisé et se déplacent de façon dirigée vers la médulla, à une vitesse supérieure à 10 $\mu\text{m}/\text{min}$. En revanche, dans le cas où les thymocytes ne peuvent subir la sélection positive, aucun thymocyte présentant un phénotype de migration dirigée n'a pu être visualisé (Witt et al., 2005). Ces données suggèrent que, avant de recevoir un signal de sélection, les thymocytes se déplacent dans le cortex de façon aléatoire et à faible vitesse, jusqu'à réaliser une interaction productive avec les cellules épithéliales thymique. Lorsqu'ils reçoivent un signal de sélection positive, leur comportement change et ils se déplacent vers la médulla à une vitesse plus importante (Witt et al., 2005).

Comme je l'ai déjà mentionné, les flux de calcium induit par un signal de sélection positive ont aussi été analysés par microscopie biphotonique (Bhakta et al., 2005). Dans cette étude, des tranches de thymus ont été colorées etensemencées avec des thymocytes exprimant un

TCR transgénique qui reconnaît un peptide du cytochrome c dans le contexte du CMH II I-E^k (Bhakta et al., 2005). Les souris d'où les thymocytes ont été isolés n'expriment pas l'haplotype de CMH II nécessaire à la sélection positive (Bhakta et al., 2005), ce qui permet d'obtenir une population de cellules n'ayant pas reçu de signaux de sélection. Ces thymocytes ont été traités avec l'indo-PE3, un indicateur de calcium, et déposés sur des tranches de thymus exprimant, ou non, l'haplotype de CMH nécessaire à la sélection positive (Bhakta et al., 2005). Les tranches de thymus ont été perfusées avec du milieu chaud et oxygéné pendant l'observation (Bhakta et al., 2005). Les observations ainsi réalisées montrent que, dans un environnement ne permettant pas la sélection positive, les thymocytes se déplacent à une vitesse moyenne de 3,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ et leur concentration de calcium intracellulaire varie entre 0 et 200 nM, alors que, dans un environnement où la sélection positive est possible, certaines cellules présentent une augmentation rapide, transitoire et élevée de la concentration intracellulaire de calcium (Bhakta et al., 2005). Cette augmentation de calcium intracellulaire a été associée à une immobilisation de la cellule et à une prolongation du contact du thymocyte avec une cellule exprimant un complexe peptide-CMH capable de promouvoir la sélection positive (Bhakta et al., 2005). Les auteurs estiment que cette prolongation du contact serait nécessaire à l'activation de la transcription des effecteurs du signal de sélection positive avant que le thymocyte ne migre de façon rapide et dirigée vers la médulla (Bhakta et al., 2005).

Ces études fournissent des éléments qui contribuent au développement d'un modèle hypothétique pouvant expliquer les mouvements de migration associés à la sélection positive. Les thymocytes se déplacent de façon aléatoire dans le cortex thymique et établissent des contacts dynamiques avec les cellules stromales. L'interaction du TCR avec un complexe peptide CMH qui déclenche un signal de sélection positive mène à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et à une immobilisation du thymocyte qui précède un changement de comportement migratoire de la cellule. Celle-ci entame ensuite un déplacement à grande vitesse vers la médulla du thymus.

Actuellement, aucune étude n'a été publiée sur le comportement migratoire et la mobilité des thymocytes pendant la sélection négative.

6. Le projet de recherche : hypothèses et objectifs

Comme mentionné plus tôt, les études concernant les phénomènes de sélection rapportées jusqu'à maintenant ont été conduites dans des modèles de TCR transgéniques ou dans des systèmes de culture *in vitro*. La sélection négative n'a jamais été analysée dans un contexte physiologique. Les modèles utilisés jusqu'à maintenant se sont avérés très informatifs, mais beaucoup de questions demeurent sans réponse en ce qui concerne ces processus qui sont si importants au développement d'un système immunitaire fonctionnel. Est-ce que les signaux de sélection sont successifs ou est-ce qu'ils peuvent se passer en même temps? S'ils sont successifs, est-ce que l'un doit arriver avant l'autre? Quelle est la nature des contacts nécessaires à la sélection? Où vont les cellules qui ont reçu un signal de sélection? Quelles sont les caractéristiques du mouvement de ces cellules? Dans quelles zones du thymus se passent les différents processus de sélection?

Il y a des indications venant autant de la littérature (Goldman et al., 2005) que d'études effectuées dans notre laboratoire (données non publiées) que la sélection négative pourrait avoir lieu dans le cortex et dans la médulla, mais il y a encore de la controverse à ce sujet. L'hypothèse sur laquelle repose mon projet de recherche est celle que la sélection négative n'a pas lieu uniquement dans la médulla, mais que les thymocytes localisés dans le cortex pourraient subir eux aussi la sélection négative. Il pourrait ainsi y avoir deux étapes de sélection négative : celle dans le cortex pourrait être responsable de l'élimination des thymocytes portant un TCR qui reconnaît avec une trop forte affinité les molécules de CMH

du soi tandis que l'étape médullaire serait responsable de la tolérisation du répertoire de TCR envers les peptides du soi existant en périphérie.

Les modèles utilisés jusqu'à maintenant se sont avérés très informatifs, mais beaucoup de questions sur les mécanismes de développement d'un système immunitaire fonctionnel demeurent encore sans réponse. Les signaux de sélection sont-ils reçus successivement ou simultanément par les cellules en développement? S'ils sont successifs, existe-t-il un ordre séquentiel? Quelle est la nature des contacts nécessaires à la sélection? Où vont les cellules qui ont reçu un signal de sélection? Quelles sont les caractéristiques du mouvement de ces cellules? Dans quelles zones précises du thymus se déroulent les différents processus de sélection?

Le but de mon projet de recherche est de générer un nouveau modèle de souris transgénique, le modèle « PoNe », qui permettra l'étude, *in vivo*, du développement des thymocytes, dans un contexte où la diversité du répertoire de TCR est conservée. Ce modèle permettra l'analyse des processus de sélection positive et négative dans un contexte physiologique ainsi que le tri des cellules ayant subi la sélection négative, ce qui devrait permettre l'analyse moléculaire des voies de signalisation impliquées dans ce processus. De plus, ce nouveau modèle permettra de visualiser la migration des thymocytes et de corréler les informations obtenues sur la mobilité des cellules aux signaux de sélection reçus.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les matériels et les méthodes énoncées se réfèrent aux sections 2.2, 2.3 et 2.4 de ce mémoire.

1.1 Enzymes et oligonucléotides

Les enzymes utilisées pour effectuer les cartes de restriction et pour préparer les fragments à cloner ont été achetées chez NEB (*New England Biolabs*) et utilisées selon les protocoles recommandés. Les ligations ont été réalisées avec la T4 ligase (M0202S, NEB) selon les recommandations du fabricant. Tous les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés par Sigma.

1.2 Fosmides

Les clones génomiques de CD69 (tableau 1) ont été commandés au centre de ressource BAC/PAC (*Bacterial Artificial Chromosome/P1-derived Artificial Chromosome*) CHORI (*Children's Hospital Okland Research Institute*). Nous avons obtenu des fragments d'environ 40 kilo bases contenant la séquence génomique de CD69 clonées dans le vecteur Epifos5 (Kim et al., 1992). Ces clones sont appelés fosmides et ont été reçus sous la forme de transformants de la bactérie *E.coli DH10*.

Tableau 1. Fosmides CD69 achetés au centre de ressource BAC/PAC CHORI

Numéro du clone (BAC/PAC CHORI)	Gène
WI1-488M21 (G135P66175B2)	CD69
WI1-2167J23 (G135P60102D1)	CD69
WI1-232H21 (G135P63114E2)	CD69
WI1-2303J21 (G135P602938D2)	CD69
WI1-963N19 (G135P68834B3)	CD69

1.3 Extraction d'ADN plasmidique et fosmidique

Les extractions d'ADN plasmidiques ont été réalisées selon les protocoles standard de biologie moléculaire (Sambrook, 1989). L'ADN utilisé pour les transfections a été purifié avec la trousse *QIAGEN® Plasmid Midi Kit* (12145, QIAGEN) selon les instructions du fabricant. Les extractions d'ADN fosmidique ont été effectuées à partir d'une culture de 5 ml dans du milieu LB liquide supplémenté de chloramphénicol (12,5 µg/ml) incubée toute la nuit à 37°C avec agitation. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation 30 secondes à 4°C à 12000 rpm (Hettich MIKRO200R). Le culot a été resuspendu dans la solution dans 100 µl de solution S1 (50 mM de glucose, 25 mM Tris-HCl (*trishydroxymethylaminomethane-chlohydric acid*), 10 mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), pH 8, 0) contenant de la RNase (100 µg/ml). Suite à l'ajout de 200 µl de solution S2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) la suspension de cellules a été mélangée par agitation douce et incubée 5 minutes à température de la pièce. Après ajout de 150 µl de solution S3 (5 M acétate de sodium, 3 M acide acétique) le lysat a été filtré avec du papier Whatman dans des tubes contenant 0,6 volume d'isopropanol. L'ADN a été précipité par centrifugation, 30 minutes à 4°C à 12000 rpm (Hettich MIKRO200R). Le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol 70% et centrifugé 5 minutes à 4°C à 12000 rpm (Hettich MIKRO200R). Le culot a été séché à l'air et une fois sec, l'ADN a été repris dans du tampon TE 1X (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

1.4 Analyse sur gel d'agarose des digestions des fosmides

Les analyses de digestion des fosmides ont été effectuées sur des gels d'agarose (SeaKem LE agarose 5004, Camdrex) 0,7%/TBE 0,5X (Tris base 5,4g/l, acide borique 2,75 g/l, EDTA 0,01 mol/l, pH 8). Ces gels ont migré pendant 12h à 30V. Le marqueur utilisé est le λ Sty I, préparé en digérant l'ADN du phage λ (27-4111-01 Amersham) avec l'enzyme StyI. 400 ng de marqueur ont été utilisés pour chaque puits. Les gels ont été colorés avec du bromure d'éthidium.

1.5 PCR

1.5.1 Vérification des fosmides CD69

La présence du gène CD69 dans les fosmides achetés a été vérifiée par PCR (*polymerase chain reaction*) (Robocycler gradient 96, Stratagene). Les PCR ont été réalisés avec la *Taq* ADN polymérase (M0267L, NEB) selon les recommandations du manufacturier. Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant :

95°C, 7 minutes, 1 cycle
98°C, 1 minute
50°C, 1 minute
72°C, 1 minute
72°C, 5 minutes, 1 cycle

} 30 cycles

Les paires d'amorces VS 166/VS167 se situant à la frontière du premier exon et du premier intron ont été utilisées (tableau 2).

Tableau 2. Amorces utilisées dans le diagnostic des fosmidés CD69

Nom	Séquence	Région amplifiée	Taille du produit (paires de base)
VS 166 F	5' ATTAAAAAGGATGGATTCT	Frontière exon 1 et	406
VS 167 R	5' ACTTACTGATGATGGTGGTTATGG	intron 1-2 de CD69	

Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (SeaKem LE agarose 5004, Camdrex) /TBE 0,5X coloré avec du GelRed™ (41003, Biotium) selon les recommandations du fabricant. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le *50 bp DNA ladder* (N3236S, NEB).

1.5.2 Amplification par PCR des séquences de régulation de CD69

Les pCRM (*predicted Cis Regulatory Modules*) distal et proximal de CD69 ont été amplifiées par PCR (Biometra TGradient). La réaction de PCR a été réalisée en utilisant la polymérase Phusion™ *Hot Start* (F-540S, Finnzymes) selon les indications du fabricant. Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant :

98°C, 45 secondes, 1 cycle	} gradient : diminution de 1°C par cycle, 18 cycles
98°C, 15 secondes	
72°C à 53°C, 15s	
72°C, 30 secondes	

98°C, 15 secondes }
 53°C, 15s } 25 cycles
 72°C, 30 secondes }
 72°C, 5 minutes, 1 cycle

Les amorces VS 285 et VS 286, contenant respectivement les sites Nhe I et Bgl II (soulignés), ont été utilisées pour l'amplification du pCRM proximal de CD69, alors que les amorces VS 288 et VS 289 contenant respectivement les sites Sal I et Mlu I (soulignés), ont été utilisées pour générer le produit de PCR utilisé dans le clonage du pCRM distal de CD69 (tableau 3).

Tableau 3. Amorces utilisées pour l'amplification des pCRM de CD69

Nom	Séquence	Région amplifiée	Taille du produit (paires de base)
VS 285 F	5' TTAACGGCTAGCAGAGGCTGGCTATGATGACT	pCRM proximal	1425
VS 286 R	5' CCTTAGATCTTCCCTGGCGACTCTCAAGTGGT		
VS 288 F	5' CGCGGTCGACAGTGGGCTTGGGAGTGT	pCRM distal	1489
VS 289 R	5' CGCGACGCGTAACACTTGCCTTTTATCTG		

1.6 Clonage des séquences de régulation de CD69

Les produits amplifiés par PCR ont été traités à la protéinase K (P2308, Sigma) avant d'être clonés, selon le protocole décrit par Crowe et collaborateurs (Crowe JS, 1991). Avant la ligation, ces fragments ont été digérés avec les enzymes de restriction appropriées et purifiés sur gel d'agarose (SeaKem LE agarose 5004, Camdrex) 0,8%/TBE 0,5X coloré avec du GelRed™ (41003, Biotium) selon les indications du fabricant, en utilisant la trousse

PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (K2100-12, Invitrogen). La construction a été vérifiée par séquençage au Centre d'innovation de l'université McGill et Génome Québec en utilisant les amorces VS 293 et VS 294 situées dans le pCRM distal, les amorces VS 296 et 298 situées dans le pCRM proximal et l'amorce VS 295 située dans la séquence SVRU5 faisant partie de la construction rapporteuse « Po » (tableau 4).

Tableau 4. Amorces utilisées dans le séquençage de la construction « Po »

Nom	Séquence*
VS 293	5' TGATCTCAGGCATAGCTAAACACCA
VS 294	5' ACCCAGTGCAGTTCTCCCTCAAG
VS 295	5' GGCGGGCGCGTGAAGGAGAG
VS 296	5' CTGAAAAGGACATGGGGAAATA
VS 298	5' TTTTAAAATCCCACTCAACAG

* L'emplacement des amorces contenues dans ces tableaux est annoté dans l'annexe 1.

1.7 Génération de pCIITASVRU5Ne

Le fragment contenant le cadre de lecture ouvert de CIITA a été isolé à partir du vecteur EBS-NPL-CIITA en utilisant les enzymes *NheI* et *EcoRI*. Ce fragment a été cloné en utilisant les mêmes sites de restriction dans le vecteur pSVRU5Ne (décrit en 2.1). La ligation a été faite avec la T4 ligase (NEB, M0202S) selon les recommandations du fabricant. Le vecteur et l'insert ont été purifiés sur gel d'agarose (SeaKem LE agarose 5004, Camdrex) 0,8%/TBE 0,5X coloré avec du GelRed™ (41003, Biotium) selon les indications du fabricant avant la ligation. La purification a été effectuée en utilisant la trousse *QIAquick® Gel Extraction Kit* (28704, QIAGEN). La construction a été vérifiée par séquençage au Centre d'innovation de

l'université McGill et Génome Québec en utilisant une amorce située dans le promoteur CMV (5' ATGGGCGTGGATAGCGGTTTACT).

1.8 Culture de cellules et transfection

Les cellules HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293 (ATCC # CRL-11268) ont été cultivées à 37°C, 5% CO₂ dans du milieu DMEM supplémenté avec pénicilline/streptomycine/L-glutamine (450-202-EL, Wisent), 10% CCS (*Cosmic Calf Serum*) (Fisher, Hyclone). Dans un pétri de 60 mm, 4x10⁵ cellules ont été cultivées 24 heures et transfectées selon la méthode de précipitation au phosphate de calcium (Jordan et al., 1996) avec les modifications décrites par la suite. Le milieu a été changé 3 heures avant la transfection. Une quantité totale d'ADN de 2,5µg a été transfectée pour chaque condition (tableau 5).

Tableau 5. Transfection des cellules HEK 293

Construction	Quantité d'ADN transfectée (µg)
EBS-NPL	2,5
pEGFP-N1	1,25
pSRαneoCIITA	2,5
pSVRU5/Ne	2,5
pCIITA-SVRU5/Ne	2,5

L'ADN a été resuspendu dans du CaCl₂ 0,25 M (volume final 275µl). Après agitation, le mélange d'ADN-CaCl₂ a été ajouté gouttes à gouttes à 275µl HBS (*HEPES* (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique) *Buffered Saline*) (280 mM NaCl, 50mM HEPES, 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,05-7,10) en vortexant à vitesse maximale. Le mélange d'ADN-CaCl₂-HBS a été incubé 30 min à température de la pièce. Le précipité formé a été

resuspendu et dispersé gouttes à gouttes sur les cellules. Les cellules sont restées en contact avec le précipité pendant 24 heures avant que le milieu ne soit changé pour du milieu frais. Les cellules ont été analysées 48 heures après transfection.

1.9 Cytométrie de flux

Les cellules HEK 293 transfectées ont été lavées avec du PBS (*Phosphate Buffered Saline*)/0,5%BSA (*Bovine Serum Albumin*) et resuspendues dans 2 ml de PBS1X/0,5%BSA. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 1000g à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 50µl de l'anticorps *QR HK14 Conjugate anti-human HLA-DR* (R-8144, Sigma) dilué 1/90 et incubées pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1X/0,5% BSA, resuspendues dans 500µl de PBS/0,5%BSA/4%PFA (paraformaldéhyde) et incubées 30 minutes à 4°C. Les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 1000g à 4°C et le culot a été resuspendu dans 1 ml de PBS1X/0,5%BSA. Les cellules ont été analysées avec le FacsCalibur (Becton Dickinson). Les données obtenues ont été traitées avec le logiciel *CellQuest Pro* (Becton Dickinson).

2. RÉSULTATS

2.1 Generation of versatile reporter cassettes expressing fluorescent proteins for multicolor multiphoton microscopy, magnetic cell sorting and biarsenical dye labeling

(Génération de cassettes rapporteuses versatiles exprimant des protéines fluorescentes pour la microscopie biphotonique multicolore, le tri cellulaire magnétique et le marquage avec des colorants biarséniques)

2.1.1 Présentation du manuscrit

Le manuscrit qui suit rapporte les travaux effectués pour la génération des constructions rapporteuses utilisées subséquentement dans la génération des constructions « Po » et « Ne » destinées à la transgénèse. Ce manuscrit est en préparation et sera soumis prochainement à la revue *BMC Biotechnology*.

Trois auteurs sont intervenus dans la réalisation de ce manuscrit dont deux co-premiers auteurs ayant contribué à part égale. Les travaux documentés ont été effectués en étroite collaboration avec Mme Aline Astrain, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr. Viktor Steimle. Pour ma part, je me suis concentrée sur la réalisation de la série de constructions « Po », alors que Mme Aline Astrain s'est plutôt attachée à la réalisation des constructions de la série « Ne ». J'ai également effectué la caractérisation des constructions « Po » et « Ne » par transfection transitoire en culture de cellules par des analyses de FACS et de microscopie confocale. Nous avons cependant chacune participé à toutes les étapes de la conception et de la réalisation de ces travaux y compris la génération des figures et la rédaction du manuscrit.

2.1.2 Résumé

Contexte : La combinaison de l'utilisation de la microscopie biphotonique et des protéines fluorescentes ont un grand potentiel en ce qui a trait à l'analyse de la migration cellulaire, de la communication entre les cellules et des phénomènes de sélection positive et négative des thymocytes. Le développement des rapporteurs optimisés augmente le potentiel de ces approches.

Résultats : Nous présentons deux séries de rapporteurs (appelés la série « Po » et « Ne ») basés sur l'utilisation des protéines fluorescentes EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) et ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) et optimisés pour leur utilisation en microscopie biphotonique à deux couleurs dans une souris transgénique. La protéine de fusion entre le CD25 humain et la EGFP a été générée en utilisant la séquence E2 entre les deux gènes. Cette protéine de fusion s'exprime efficacement à la surface cellulaire et permet même de visualiser la présence de prolongations filamenteuses de la membrane cytoplasmique entre les cellules adjacentes, probablement des nanotubules. La ECFP est dirigée vers le noyau et a été aussi modifiée par l'ajout d'un motif tetracystéines N-terminale qui permet la coloration avec des colorant biarséniques. Une séquence rapportée pour sa capacité d'augmenter la traduction a aussi été inclus dans ces constructions. De plus, un vecteur de clonage à faible nombre de copies a été généré pour faciliter le clonage de fragments génomiques pour la transgénése.

Conclusion : La série de constructions proposées a été générée et testée et devrait être d'une grande utilité pour des investigations dans des champs d'étude divers.

2.1.3 Manuscript

Note: submitted to Biotechniques (section: research reports)

**Generation of versatile reporter cassettes expressing fluorescent proteins
for multicolor multiphoton microscopy, magnetic cell sorting,
and biarsenical dye labeling**

Aline Astrain*, Maria da Silva Martins*, and Viktor Steimle

Address: Département de Biologie, Université de Sherbrooke, 2500 boul Université,
Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada

*Both authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order

Address correspondence to: Viktor Steimle, Département de Biologie, Université de
Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada

Email: viktor.steimle@usherbrooke.ca

Tel. 1 819 821 8000 ext. 62068

Fax. 1 819 821 8049

Running title: Fluorescent reporter cassettes for two-color two-photon microscopy

Key words: green fluorescent protein, two-photon fluorescence microscopy, transgenic mice

Abbreviations: ECFP, EGFP, EYFP: enhanced (cyan, green, yellow) fluorescent protein;

TPLSM: two-photon laser scanning microscopy

Word count abstract: 175

Word count main text: 3,189

Abstract

Two-photon laser scanning microscopy in combination with genetically encoded fluorescent proteins has great potential for the *in vivo* analysis of cell migration, communication and selection events. The development of optimized reporter cassettes should further improve such approaches. We present here two series of reporter constructs (called “Po” and “Ne” series) based on the use of EGFP and ECFP, which were optimized for two-color two-photon analysis in transgenic mice. A fusion protein between human CD25 and EGFP using the E2-linker element was very efficiently expressed at the cell surface, visualizing filamentous membrane structures, most probably tunneling nanotubes, very efficiently. ECFP fluorescence was directed to the nucleus and the reporter was further modified by addition of an optimized N-terminal tetracysteine-tag, for labeling with biarsenical dyes. A sequence element for enhanced translation efficiency was also included in the constructs. In addition, a low copy cloning vector based on pBR322 was generated that should facilitate cloning of larger genomic fragments and generation of DNA fragments suitable for microinjection. These constructs should be useful for many different cell biology applications.

Introduction

The discovery and optimization of genes encoding autofluorescent proteins has revolutionized cell biology, especially in terms of live cell imaging (1-4). Engineered genes coding for fluorescent proteins with different spectral properties have been used to generate transgenic organisms such as plants, worms, flies and mammals, notably transgenic mice (5). Over the last few years, two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) has enabled the visualization of fluorescent labeled cells at depths of several hundreds of μm in living tissues (6). TPLSM, in combination with genetically encoded fluorescent proteins and/or fluorescent dyes has provided unprecedented insight into cellular processes such as cell migration and communication in intact organs or *ex vivo* explants (7-9).

We are interested in cellular migration and selection processes that are essential for the normal development of thymocytes. Different types of T cells, the effector cells of the cellular immune response, develop in the thymus, a primary lymphoid organ, from common precursors called thymocytes through a complex set of migration, differentiation steps including the processes of positive and negative selection (10,11). Analysis of negative selection has so far almost exclusively relied on artificial induction of negative selection, mainly due to the fact that no cell surface marker is known that identifies thymocytes undergoing negative selection. We aim to visualize the physiological process of thymocyte negative selection by generating transgenic mouse lines expressing fluorescent proteins under the control of regulatory elements of genes known to be induced by positive (CD69) and negative selection (Nur77, Nr4a1) respectively (12-14). Since the proximal signals show considerable overlap, a clear distinction between the two processes can only be made in double transgenic mice. We present here the generation of fluorescent reporter cassettes optimized for the detection of positive (Po-series) and negative (Ne-series) thymic selection and migration events. The features included in these cassettes should make them useful for a variety of applications in different fields of cellular biology.

Results

Our aim was to generate a series of versatile reporter cassettes suitable for two-color *in vivo* fluorescent imaging via TPLSM, for cell-sorting through a cell-surface expressed marker, and for labeling with bi-arsenical dyes for time-resolved tracking and the development of whole-body fluorescent tomography studies in transgenic mice. To the best of our knowledge, there has been so far only one description of a TPLSM analysis with simultaneous detection of two fluorescent proteins (15). Sahai and colleagues used ECFP and EGFP as fluorescent proteins (15). The emission spectra of these two fluorescent proteins show a considerable overlap and are therefore not often used as a couple in conventional fluorescence microscopy. However, Ti-Sapphire lasers found in most commercial multi-photon microscopes have a weak power output beyond wavelengths of 900 nm, making excitation of more red-shifted fluorescent proteins inefficient (15). For example, EYFP is excited efficiently only at wavelengths beyond 920 nm and is therefore not well suited for use with conventional Ti-Sapphire lasers, while ECFP and EGFP can be simultaneously excited at a wavelength of 880 nm (15,16). We therefore opted for the use of ECFP and EGFP as fluorescent proteins.

EGFP-based constructs (Ne-series)

We wanted to direct the two fluorescent proteins to different cellular compartments to facilitate discrimination between the two reporters. Furthermore, while cells expressing fluorescent proteins can be efficiently sorted via flow cytometry, cell sorting via a cell-surface expressed marker, specific antibodies and magnetic beads presents not only an economical alternative to expensive flow cytometry instruments, but is potentially superior to flow cytometry in terms of processed cell numbers, sorting speed and viability of sorted cells. We therefore generated a fusion protein between the human CD25 transmembrane protein (hCD25; IL-2 receptor α -chain) and EGFP. Human CD25 has been used as a transgenic marker in hematopoietic cells in several transgenic mice, and does not appear to interfere with

normal differentiation (17-19). EGFP was fused C-terminally to the cytoplasmic tail of hCD25 via the “E2” linker ((EAAAR)₂; amino acid single letter code), which has been reported to be superior to the frequently used glycine-serine linkers (20). The chimeric construct hCD25-EGFP was generated using the pEGFP-N1 plasmid (Clontech) as a backbone (pNe; Fig. 1 A).

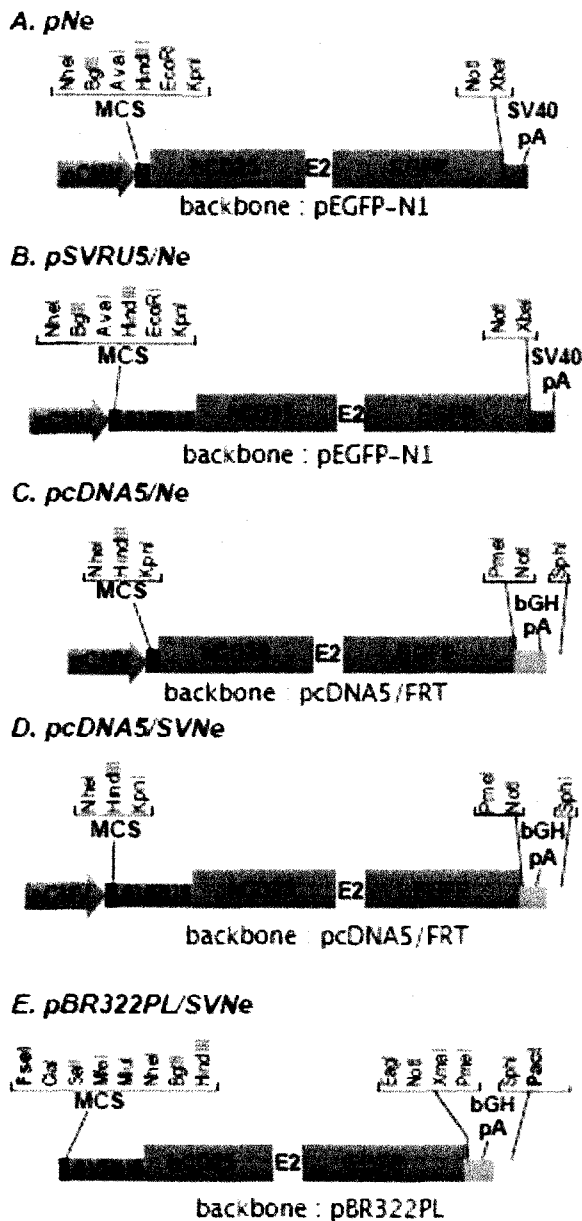


Figure 1. Ne-series of constructs. A) pNe, expressing an hCD25-EGFP fusion protein. The construct was generated in pEGFP-N1 as a backbone. pCMV: CMV promoter; MCS: multiple cloning site; E2: E2-linker; SV40pA: SV40-derived polyadenylation signal. B) pSVRU5/Ne. The SVRU5 sequence element was inserted upstream of the hCD25-EGFP coding region into pNe. C) pcDNA5/Ne. The hCD25-EGFP coding region was transferred in to pcDNA5/FRT. bGHpA: bovine growth hormone polyadenylation signal. D) pcDNA5/SVNe. The SVRU5 sequence element was inserted upstream of the hCD25-EGFP coding region in pcDNA5/Ne. E) pBR322PL/SVNe. The SVRU5/hCD25-EGFP/bGHpA element was transferred into pBR322PL (see supplemental Fig. 1).

Low expression levels of transgenic reporter constructs can cause problems for detection, especially when very large regulatory regions are used to generate the transgenic constructs, or when the reporters are inserted into the endogenous loci via homologous recombination (18). We therefore inserted a sequence element 5' to the hCD25-EGFP cassette, which has been shown to improve translation efficiency (pSVRU5Ne; Fig. 1 B). The SVRU5 element is derived from the hybrid SR α promoter (21) and contains (5' to 3') a short region downstream of the initiation site of the SV40 early promoter, a sequence element derived from the RU5 region of the HTLV-1 virus and a small intron derived from SV40. The SVRU5 element was shown to increase expression levels via increased translation efficiency in various cell types including lymphoid cells (21).

The hCD25-EGFP cassette without or with a 5'-flanking SVRU5 element was transferred into the pcDNA5/FRT plasmid (Invitrogen), thus leading to the pcDNA5/Ne and pcDNA5/SVNe constructs respectively (Fig. 1 C, D). pcDNA5/FRT contains 3' UTR and polyadenylation sequences from the bovine growth hormone gene (bGH), which have been used very frequently for transgenic cDNA expression cassettes.

Both pEGFP-N1 and pcDNA5/FRT are high-copy number plasmids. Cloning of larger genomic fragments is sometimes problematic in such plasmids, and plasmid stability can be improved using plasmids with low-copy origins of replication (22). We therefore generated a new low-copy cloning vector derived from pBR322 (23) by deleting the tetracycline resistance gene and replacing it with a synthetic multiple cloning site (pBR322PL, supplemental data Fig. S1).

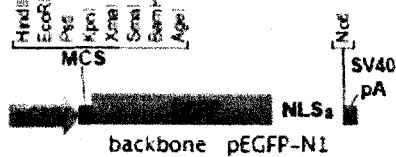
The SVRU5/hCD25-EGFP/bGHpA fragment from pcDNA5/SVNe was transferred to pBR322PL thus generating pBR322PL/SVNe (Fig. 1 E). This construct contains a large multiple cloning site upstream of the reporter cassette suitable for insertion of regulatory regions. The cassette is flanked at both ends by rare 8-base cutting restriction enzyme sites

(FseI, PacI) for the isolation of DNA fragments free of vector and suitable for micro-injection (Fig. 1 E).

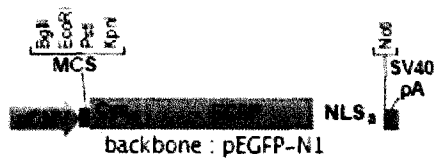
ECFP-based constructs (Po-series)

The Po-series of constructs is based on ECFP as a fluorescent reporter. In order to facilitate discrimination between the two reporters, ECFP was directed to the cell nucleus by addition of three C-terminal, SV40-derived nuclear localization signals (24), generating pECFP-NLS₃ (Fig. 2 A).

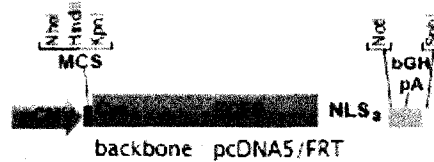
A. pECFP-NLS₃



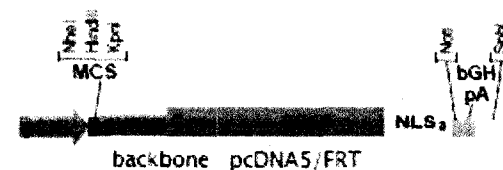
B. pPo



C. pcDNA5/Po



D. pcDNA5/SVPo



E. pBR322PL/SVPo

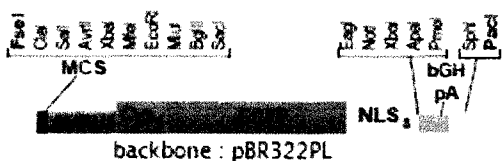


Figure 2. Po-series of constructs. A) pECFP-NLS₃. The ECFP coding region and three C-terminal repeats of the SV40 NLS (NLS₃) were transferred into a pEGFP-N1 backbone. For other abbreviations, see legend to figure 1. B) pPo. An N-terminal optimized tetracysteine tag (Cys₄; HRWCCPGCCKTF) was fused to the ECFP-NLS₃ coding region. C) pcDNA5/Po. The Cys₄-ECFP-NLS₃ coding region was transferred to pcDNA5/FRT. D) pcDNA5/SVPo. The SVRU5 element was inserted into pcDNA5/Po upstream of the Cys₄-ECFP-NLS₃ coding region. E) pBR322PL/SVPo. The SVRU5/Cys₄-ECFP-NLS₃/bGHpA element was transferred into pBR322PL.

The ECFP-NLS₃ coding sequence was further modified by addition of an N-terminal tetracysteine-tag. Membrane-permeable biarsenical dyes bind covalently to CCXXCC tetracysteine motifs and become fluorescent upon binding (25,26) enabling several interesting analysis modalities, as for example fluorescence pulse-chase experiments (25,27). The original tetracysteine-binding motif was recently improved by genetic selection in mammalian cells (28), and we thus added the optimized N-terminal HRWCCPGCCKTF-tag to our ECFP-NLS₃ coding sequence generating pPo (Fig. 2 B). As for the Ne-series of constructs, this reporter cassette was transferred into pcDNA5/FRT either alone or with an N-terminal SVRU5 sequence leading to the pcDNA5/Po and pcDNA5/SVPo constructs respectively (Fig. 2 C, D). Finally, the SVRU5/Po/bGHpA cassette was inserted into pBR322PL generating pBR322PL/SVPo (Fig. 2 E).

Functional analysis of constructs

Expression vectors coding for hCD25, EGFP, or for the hCD25-EGFP fusion protein respectively were transiently transfected into HeLa cells and analyzed 48h after transfection by flow cytometry for EGFP fluorescence and cell surface expression of human CD25 as detected by monoclonal antibody. As shown in Fig. 3A, the fusion protein is expressed very efficiently (panel 4). The almost perfect co-expression between cell-surface hCD25, as detected by antibody labeling on live cells, and EGFP fluorescence indicates that the fusion protein is directed very efficiently to the cell surface. Subcellular localization was analyzed after transient transfection of the constructs into HeLa cells by fluorescence microscopy. In contrast to untagged EGFP, which is distributed throughout the cell, we found that the hCD25-EGFP fusion protein is localized almost exclusively at the cell surface (Fig. 3B, panel 2). Filamentous connections between cells, most probably tunneling nanotubes (29,30)), are very well visualized by the hCD25-EGFP fusion protein (Fig. 3B. panel 2). All different constructs containing the hCD25-EGFP coding region were well expressed and showed similar subcellular localization of the protein. (Fig. 3, and data not shown). All experiments were also carried out in HEK293 cells with similar results (data not shown).

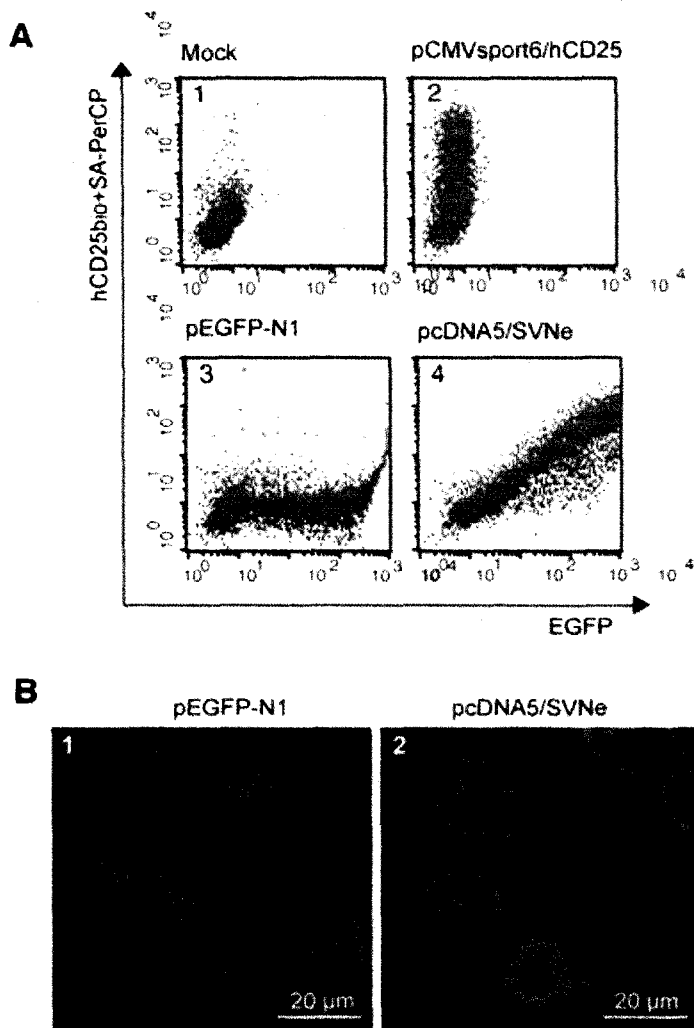


Figure 3. Analysis of Ne-constructs. A) Flow cytometry analysis. HeLa cells were transiently transfected with empty vector (panel 1), or with equal amounts of expression plasmids pCMVSPORT6/hCD25 (panel 2), pEGFP-N1 (panel 3), or pcDNA5/SVNe (Panel 4). Cells were stained with a biotinylated mAb specific for human CD25 and streptavidin-coupled PerCP and analyzed by flow cytometry for hCD25 expression (Y-axis) and EGFP fluorescence (X-axis). **B)** Microscopy analysis. HeLa grown on cover slips were transiently transfected either with pEGFP-N1 (panel 1), or with pcDNA5/SVNe and analyzed by confocal microscopy for EGFP fluorescence. The bar corresponds to 20 μm.

In transient transfections as shown here, the presence of the SVRU5 element does not appear to have a strong effect on expression levels. We have made similar observations also with EBV-based episomal vectors (unpublished results). In stable transfections, the SVRU5 element does however lead to a clear increase in expression levels (data not shown).

EGFP is not well detected in conventional benchtop flow cytometers using 488 nm excitation and detection filters optimized for FITC fluorescence, such as the FACS Calibur (Becton

Dickinson). Nevertheless the ECFP-expressing constructs were weakly, but clearly detectable in transient transfections in HEK293 and HeLa cells by flow cytometry (data not shown). We incubated live HeLa cells transiently transfected with either ECFP-NLS₃ constructs or the tetracysteine-tag containing Po constructs with the red-fluorescent ReAsH (Lumioered, Invitrogen) compound and analyzed the cells by fluorescence microscopy for ECFP and red fluorescence. ECFP fluorescence was completely nuclear and the Po constructs appear to be expressed very well (Fig 4, panels 1, 2).

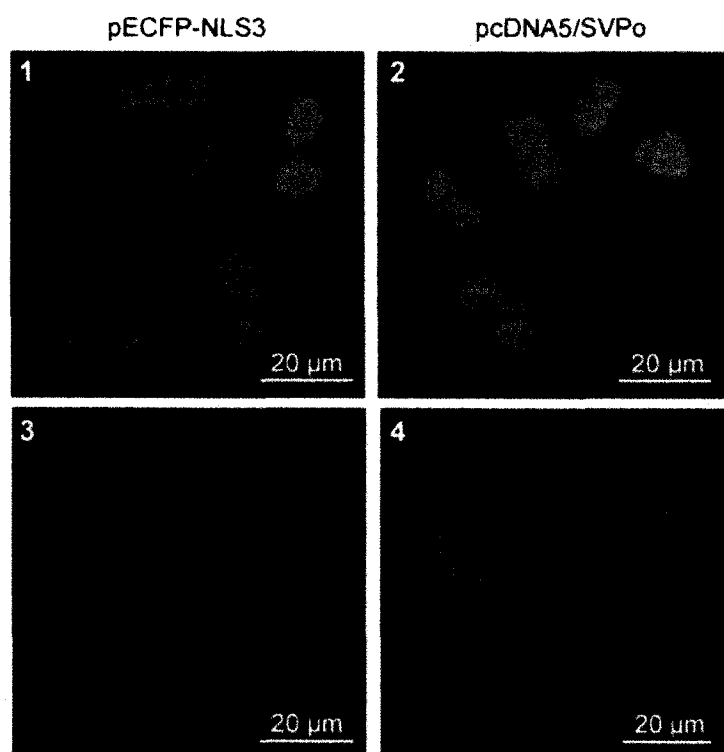


Figure 4. Analysis of Po-constructs.

HeLa cells grown on cover slips were transiently transfected and analyzed by confocal microscopy. Cells were either transfected with pECFP-NLS₃ (panels 1, 3), or with pcDNA5/SVPo (panels 2, 4). Forty-eight hours after transfection, live cells were incubated with 0.5 μ M ReAsH biarsenical compound for 15 minutes. After washing cells were fixed and analyzed for ECFP fluorescence (panels 1, 2), or ReAsH fluorescence (panels 2, 3). Exposure times were identical for images acquired in panels 1 and, or panels 3 and 4, respectively. The bar corresponds to 20 μ m.

Staining with ReAsH efficiently marked the Po expressing cells and had a low background on cells not expressing the tetracysteine-tag (Fig. 4, compare panels 3 and 4). Interestingly, incubation with ReAsH stained some cytoplasmic perinuclear regions, which were negative

for ECFP fluorescence (Fig. 4, panel 4). This is most probably due to the fact that the tetracysteine sequence is available for interaction with the bi-arsenic compound immediately after polypeptide synthesis in the cytoplasm and does not depend on protein folding and maturation, like the ECFP moiety.

ECFP and EGFP show a considerable overlap in their emission spectra and are thus not easy to distinguish in microscopy analyses. Sahai and colleagues used conventional filter sets for detection combined with a computational signal subtraction approach, which led to a clear discrimination between the two fluorophores (15). We used an Olympus FV1000 confocal laser-scanning microscope equipped with spectral detectors, which through their variable bandwidth permit efficient separation of fluorochromes with similar emission profiles (Fig. 5). In HeLa cells transiently co-transfected with the pcDNA5/SVPo and pcDNA5/SVNe constructs, the two fluorescent signals could be very well detected independently of each other with minimal background from the other fluorophore (Fig. 5).

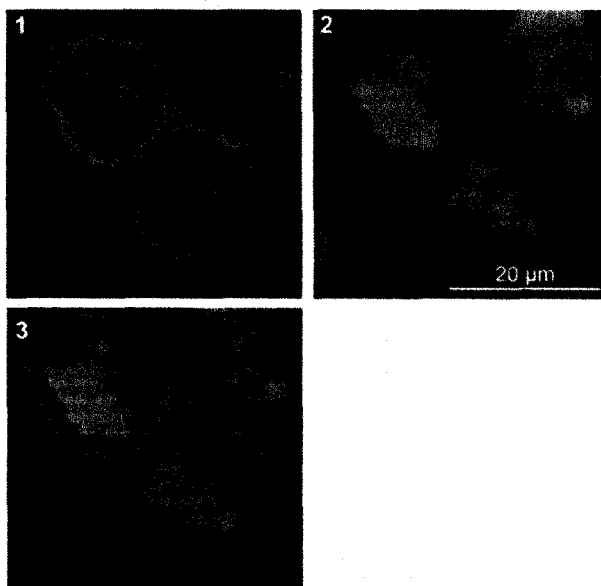


Figure 5. Two-color analysis of Po- and Ne-constructs. HeLa cells grown on cover slips were co-transfected with equal amounts of pcDNA5/SVPo and pcDNA5/SVNe and cells were fixed and analyzed by confocal fluorescence microscopy for EGFP fluorescence (panel 1), or for ECFP fluorescence (panel 2). Panel 3 shows a merge between images from panels 1 and 2. The bar corresponds to 20 μm .

Discussion

The reporter cassettes presented here were designed as a pair for the discrimination between closely related cell types and cellular signaling events via two-color TPSLM. ECFP and EGFP were chosen because they are both efficiently excited at the same wavelength by conventional Ti-Sapphire lasers (15,16). Despite the considerable overlap between the two emission spectra, they can be clearly distinguished from each other. To facilitate further the discrimination between these two fluorophores, they were directed to different cellular compartments. A fusion between the cell surface expressed transmembrane protein human CD25 and EGFP (Ne-series) is directed very efficiently to the cell surface. The frequent occurrence of reduced fluorescence in chimeric proteins containing GFP is not at all observed here. The GFP fluorescence of hCD25-EGFP is at least as strong as that of the uncoupled EGFP, when equivalent amounts of DNA are transfected. This may be due to the use of the E2-linker sequence connecting the two proteins. The linker peptide sequence EAAAR either in two (E2) or in four copies (E4) was found to be superior to several other types of linker peptides including the frequently used glycine-serine linkers (20). While we have not compared different linkers for our reporter, it certainly appears that the E2-linker works very well in the hCD25-EGFP fusion protein.

Efficient cell surface expression of the hCD25-EGFP will be useful for magnetic cell sorting of marker-positive cells. For simple positive-negative sorting approaches, cell sorting via magnetic beads is normally superior to flow cytometry, even when compared to high-speed cell sorters. Cell sorting speed of the best cell sorters is around 5×10^7 cells per hour at present, while the potential for scale-up of magnetic sorting is almost unlimited and processing of several times 10^9 cells in one sort is commonplace. Due to the shorter sorting time, cell survival is normally better and sterility is also easier to ensure in magnetic sorting. But obviously, our hCD25-EGFP reporter can be used also for cell sorting via flow cytometry, for example when multiparameter sorting is required.

Immunotoxins based on the hCD25-specific anti-TAC mAb have been developed and extensively characterized by Pastan and colleagues (34). Such immunotoxins could therefore be used for *in vivo* ablation strategy of hCD25-EGFP positive cells and tissues in transgenic mice and efficiency of ablation could be monitored via the EGFP fluorescence.

Interestingly, the hCD25-EGFP reporter very efficiently visualizes filamentous connections between cells. This was observed both in HeLa cells (Fig. 3) and HEK293 cells (data not shown). These membrane structures have been called tunneling nanotubes and have been shown to be important for cell-to-cell communication (29,30). To our knowledge these structures have so far only been demonstrated in cell culture, and it will be very interesting to see whether such communications can also be visualized *in vivo*, in transgenic mice expressing the hCD25-EGFP reporter.

As expected, and as been shown for fluorescent and other proteins (24), the ECFP reporter was efficiently directed to the cell nucleus by C-terminal addition of three copies of the SV40 nuclear localization signal. The ECFP-NLS₃ fusion protein was further modified by addition of an optimized N-terminal tetracysteine tag designed to bind covalently to biarsenical dyes (28). Addition of the tetracysteine tag did not interfere with nuclear localization and if anything, the ECFP fluorescence appeared to be slightly more intense, when compared to untagged protein (Fig. 4, and data not shown). Labeling with biarsenical dyes will permit pulse-chase experiments and should thus allow to track cells of longer time frames and distances. Another interesting potential application is the development of fluorescence tomography analysis in intact small animals (31). The current most red-shifted biarsenical dye, ReAsH (Lumioered) with excitation and emission maxima at 593 nm and 608 nm respectively is still not ideal for deep tissue penetration, but the future development of cell permeable near-infrared biarsenical dyes may further improve whole body imaging approaches. To our knowledge, no transgenic mice with tetracysteine tags have so far been described and it will be very informative to test this technique even with the currently available dyes.

In some of our constructs we have included the composite SVRU5 sequence element. This element was originally generated as part of the so-called SR α promoter, where transcription was initiated by the SV40 early promoter (21). The presence of the SVRU5 element boosted expression of target genes by one to two orders of magnitude compared to the SV early promoter alone and the effect was shown to be mostly post-transcriptional (21). The HTLV-1 sequence is predicted to form a stem-loop and sequences within the loop are homologous to the 18S rRNA (21). It is in agreement with this finding that the SVRU5 sequences can act as an internal ribosomal entry site and supports bicistronic expression of constructs ((32), and our unpublished results). There is of course the possibility that the SVRU5 region might interact with a neighboring regulatory region in an unexpected manner, and therefore the inclusion of this element in transgenic reporter constructs has to be carefully validated. But if expression levels of reporter constructs can be boosted without affecting the expression pattern, this will be very interesting and potentially useful in certain cases.

The different constructs presented here are flanked by different multiple cloning sites, which should facilitate transfer to other constructs and further modification if desired. Exchange of the open reading frames coding for the fluorescent protein moieties of the constructs with those coding for different spectral variants or other types of fluorescent proteins should further increase the versatility and potential usefulness of these vectors. Finally we have generated a low-copy plasmid vector with a large multiple cloning sites based on pBR322, which should be useful to generate reporter constructs with relatively large flanking regulatory regions suitable for the generation of transgenic mice. We expect that these constructs will be widely useful for *in vivo* analysis of cellular migration events.

Materials and Methods

Cell culture and transfections

HeLa cells (ATCC, # CCL-2) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 5 % fetal calf serum, 10 U/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin. HeLa cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions and cells were analyzed 48 hours post-transfection.

Generation of reporter constructs

An IMAGE clone containing the hCD25 coding sequences in the pCMVSPORT6 cDNA cloning and expression vector was obtained from Open Biosystems (catalog # EHS1001-6116348). Sequencing of this clone and comparison to EST databases revealed that it corresponds to a naturally occurring splice variant of hCD25, in which the sequence coding for amino acids 186 to 195 (GEMETSQFP) in the extracellular domain of the full-length protein is missing. Transfection and staining with an hCD25-specific mAb (clone MEM-181, Serotec) showed that this variant is well recognized by the antibody (see Fig. 3). The EBS-NPL expression vector containing an SR α -promoter (21) has been described (33), pEGFP-N1 and pECFP-C1 are from Clontech, pcDNA5/FRT from Invitrogen, and pBR322 was obtained from New England Biolabs.

For the generation of the different constructs, the hCD25 ORF and the SVRU5 element were amplified by PCR with suitable restriction sites included in the PCR primers from pCMVSPORT6/hCD25 and EBS-NPL respectively. The ECFP ORF was isolated as a restriction

enzyme fragment. The E2-linker (IGIEAAAREAAARGPVATM; E2-linker underlined, last amino acid of hCD25 and met of EGFP in italics), the N-terminal optimized tetracysteine tag (MAGSHRWCCPGCCKTFGGRGPVATM; tetracysteine tag underlined, met of ECFP in italics), and the three repeats of the SV40 NLS sequence (KSGDPKKRKRKVDPKKKRKRKVDPKKKRKRKVG; last amino acid of ECFP in italics, NLS₃ underlined) were synthesized as double-stranded adaptor oligonucleotides with restriction enzyme compatible overhangs at their ends. Oligonucleotides were obtained from Sigma-Aldrich. All constructs were verified by sequencing. Sequences of constructs are available upon request.

Immunofluorescence microscopy

Immunolocalizations were performed on HeLa cells grown on glass cover slips (Fisher). For detection of cell-surface CD25, cells were stained for 30 minutes at 4°C with biotinylated mouse anti-human-CD25 (Serotec, clone MEM-181) diluted 1:400, washed and incubated with streptavidin-APC (1:200, Becton Dickinson) for 30 minutes at 4°C. For detection of the tetracysteine-tag, cells were incubated with 0.5 μM ReAsH reagent (LumioRed, Invitrogen) in serum free OptiMEM medium (Invitrogen) for 15 minutes at 37°C, and washed with 1x BAL washing buffer (Invitrogen). After washing, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 4°C. Cover slips were mounted onto microscopy slides with Prolong Antifade reagent (Invitrogen). Cells were observed with an Olympus FV1000 confocal microscope. Data was processed with the Fluoview image analysis software (Olympus).

Flow cytometry

HeLa cells were incubated for 30 minutes at 4°C with biotinylated mouse anti-human-CD25 mAb (Serotec, clone MEM-181) diluted 1:400. Cells were washed twice and incubated with

streptavidin-PerCP (1:200, Becton Dickinson) for 30 minutes at 4°C. After washing, cells were analysed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Fluorescence analysis was gated on live cells through forward and side scatter properties of cells. Data was processed with Cell Quest Pro software (Becton Dickinson).

Additional material

Supplemental Figure S1. Low-copy cloning vector pBR322PL.

Acknowledgements

We thank Gilles Grondin and Leonid Volkov for help with the fluorescence microscopy. A.A. was supported by a fellowship from the *Ministère de l'Éducation Nationale, France*. This work was supported by a grant from the RRTQ/QTRN (*Réseau de recherche en transgénèse du Québec / Quebec transgenesis research network*).

References

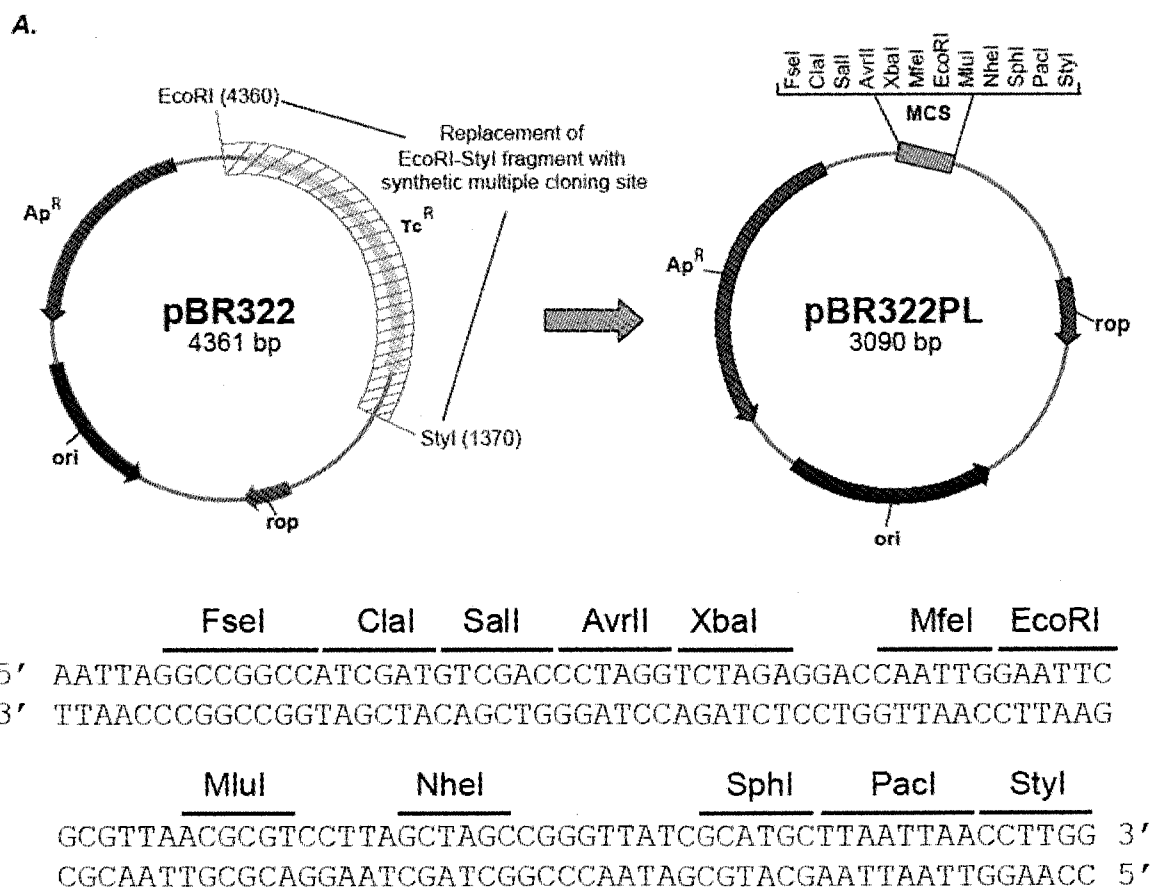
1. **Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward and D.C. Prasher.** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
2. **Chudakov, D.M., S. Lukyanov and K.A. Lukyanov.** 2005. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol* 23:605-613.
3. **Giepmans, B.N., S.R. Adams, M.H. Ellisman and R.Y. Tsien.** 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312:217-224.
4. **Tsien, R.Y.** 2006. Breeding and building molecules to spy on cells and tumors. *Keio J Med* 55:127-140.
5. **Hadjantonakis, A.K., M.E. Dickinson, S.E. Fraser and V.E. Papaioannou.** 2003. Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. *Nat Rev Genet* 4:613-625.
6. **Zipfel, W.R., R.M. Williams and W.W. Webb.** 2003. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 21:1369-1377.
7. **Flesken-Nikitin, A., R.M. Williams, W.R. Zipfel, W.W. Webb and A.Y. Nikitin.** 2005. Use of multiphoton imaging for studying cell migration in the mouse. *Methods Mol Biol* 294:335-345.
8. **Bajenoff, M. and R.N. Germain.** 2007. Seeing is believing: a focus on the contribution of microscopic imaging to our understanding of immune system function. *Eur J Immunol* 37 *Suppl 1*:S18-33.
9. **Cahalan, M.D. and I. Parker.** 2008. Choreography of Cell Motility and Interaction Dynamics Imaged by Two-Photon Microscopy in Lymphoid Organs. *Annu Rev Immunol*.
10. **Starr, T.K., S.C. Jameson and K.A. Hogquist.** 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139-176.
11. **Petrie, H.T.** 2003. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat Rev Immunol* 3:859-866.

12. **Brandle, D., S. Muller, C. Muller, H. Hengartner and H. Pircher.** 1994. Regulation of RAG-1 and CD69 expression in the thymus during positive and negative selection. *Eur J Immunol* 24:145-151.
13. **Woronicz, J.D., B. Calnan, V. Ngo and A. Winoto.** 1994. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367:277-281.
14. **Calnan, B.J., S. Szychowski, F.K. Chan, D. Cado and A. Winoto.** 1995. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 3:273-282.
15. **Sahai, E., J. Wyckoff, U. Philippar, J.E. Segall, F. Gertler and J. Condeelis.** 2005. Simultaneous imaging of GFP, CFP and collagen in tumors in vivo using multiphoton microscopy. *BMC Biotechnol* 5:14.
16. **Blab, G.A., P.H. Lommerse, L. Cognet, G.S. Harms and T. Schmidt.** 2001. Two-photon excitation action cross-sections of the autofluorescent proteins. *Chemical Physics Letters* 350:71-77.
17. **Martensson, I.L., F. Melchers and T.H. Winkler.** 1997. A transgenic marker for mouse B lymphoid precursors. *J Exp Med* 185:653-661.
18. **Gounari, F., I. Aifantis, C. Martin, H.J. Fehling, S. Hoeflinger, P. Leder, H. von Boehmer and B. Reizis.** 2002. Tracing lymphopoiesis with the aid of a pTalpha-controlled reporter gene. *Nat Immunol* 3:489-496.
19. **Martin, C.H., I. Aifantis, M.L. Scimone, U.H. von Andrian, B. Reizis, H. von Boehmer and F. Gounari.** 2003. Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat Immunol* 4:866-873.
20. **Paulmurugan, R. and S.S. Gambhir.** 2005. Novel fusion protein approach for efficient high-throughput screening of small molecule-mediated protein-protein interactions in cells and living animals. *Cancer Res* 65:7413-7420.
21. **Takebe, Y., M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida and N. Arai.** 1988. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Molecular & Cellular Biology* 8:466-472.

22. **Kim, U.J., H. Shizuya, P.J. de Jong, B. Birren and M.I. Simon.** 1992. Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res* 20:1083-1085.
23. **Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker and H.W. Boyer.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113.
24. **Fischer-Fantuzzi, L. and C. Vesco.** 1988. Cell-dependent efficiency of reiterated nuclear signals in a mutant simian virus 40 oncoprotein targeted to the nucleus. *Mol Cell Biol* 8:5495-5503.
25. **Adams, S.R., R.E. Campbell, L.A. Gross, B.R. Martin, G.K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis and R.Y. Tsien.** 2002. New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc* 124:6063-6076.
26. **Griffin, B.A., S.R. Adams and R.Y. Tsien.** 1998. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281:269-272.
27. **Gaietta, G., T.J. Deerinck, S.R. Adams, J. Bouwer, O. Tour, D.W. Laird, G.E. Sosinsky, R.Y. Tsien, et al.** 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296:503-507.
28. **Martin, B.R., B.N. Giepmans, S.R. Adams and R.Y. Tsien.** 2005. Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat Biotechnol* 23:1308-1314.
29. **Gerdes, H.H., N.V. Bukoreshtliev and J.F. Barroso.** 2007. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* 581:2194-2201.
30. **Rustom, A., R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther and H.H. Gerdes.** 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303:1007-1010.
31. **Rao, J., A. Dragulescu-Andrasi and H. Yao.** 2007. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Curr Opin Biotechnol* 18:17-25.
32. **Attal, J., M.C. Theron, F. Taboit, M. Cajero-Juarez, G. Kann, P. Bolifraud and L.M. Houdebine.** 1996. The RU5 ('R') region from human leukaemia viruses (HTLV-

- 1) contains an internal ribosome entry site (IRES)-like sequence. *FEBS Lett* 392:220-224.
33. **Bontron, S., C. Ucla, B. Mach and V. Steimle.** 1997. Efficient repression of endogenous major histocompatibility complex class II expression through dominant negative CIITA mutants isolated by a functional selection strategy. *Molecular & Cellular Biology* 17:4249-4258.
34. **Pastan, I., R. Hassan, D.J. Fitzgerald and R.J. Kreitman.** 2006. Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 6:559-565.

Supplemental data



Supplemental Figure S1. Low-copy cloning vector pBR322PL. A) Generation of pBR322PL. The 1367 bp EcoRI-StyI fragment containing the tetracycline resistance gene (Tc^R) was replaced by a double-stranded oligonucleotide adaptor containing a multiple cloning site (MCS). The EcoRI site from pBR322 was destroyed during this cloning step, but the StyI site was retained. Ap^R : ampicillin resistance gene (β -lactamase); ori: origin of replication; rop: *rop* gene product responsible for low copy number. B) Nucleotide sequence and restriction enzyme sites of MCS of pBR322PL. Unique restriction enzyme sites within the MCS are shown above the nucleotide sequence.

2.2 Génération des constructions destinées à la génération de la souris « PoNe »

Les constructions « Po » et « Ne », dont la génération est rapportée dans la section 2.1 de ce mémoire, sont destinées à être utilisées pour la génération d'un nouveau modèle murin, la souris « PoNe », permettant l'étude simultanée *in vivo* des phénomènes de sélection positive et négative des thymocytes. Dans ce but, chacune des constructions rapporteuses doit s'exprimer sous le contrôle d'éléments de régulation de la transcription de gènes associés à la sélection positive et négative. Les gènes utilisés comme gène marqueur de la sélection positive et négative doivent donc être activés au niveau transcriptionnel par les voies de signalisation spécifiques à ces phénomènes de sélection. L'implication de ces gènes dans chacun des processus ainsi que les éléments qui contrôlent leur transcription doivent être connus et caractérisés dans la littérature.

2.2.1 Choix des gènes marqueurs de la sélection négative et positive

Il n'existe pas de marqueur de surface qui soit associé à la sélection négative, mais l'expression de plusieurs protéines intracellulaires a été corrélée aux processus de sélection négative. Comme cela a été discuté précédemment, les protéines Bim et Nur77 sont clairement impliquées dans l'induction de l'apoptose suite à un signal de sélection négative (Woronicz et al., 1994; Bouillet et al., 1999). Bim est induit au niveau transcriptionnel suite à un signal de sélection négative (Bouillet et al., 2002; Schmitz et al., 2003), cependant, ses éléments de régulation ne sont pas bien caractérisés dans la littérature. La transcription de Nur77 est aussi induite en réponse à un signal de sélection négative (Liu et al., 1994). La liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de cette protéine sont également nécessaires à la sélection négative (Kuang et al., 1999). Plusieurs études se sont penchées sur la régulation de la transcription de Nur77 (Williams and Lau, 1993; Yoon and Lau, 1993; Woronicz et al., 1995). Nur77 est donc un bon comme marqueur de la sélection négative et nous avons décidé

d'utiliser ses éléments de régulation dans la construction rapporteuse « Ne ».

Peu de gènes candidats clairement associés à la sélection positive remplissent les conditions décrites précédemment pour le choix des gènes marqueurs destinés à contrôler l'expression des constructions rapporteuses dans la lignée « PoNe ». Différentes études ont utilisé des micropuces d'ADN ou ARN pour mettre en évidence les gènes dont l'expression est modulée après un signal de sélection positive. Une de ces études montre l'expression de IAN1 et IAN4 (*Immune-associated nucleotide binding protein 1 et 4*) dans les thymocytes suite à un signal de sélection positive (Poirier et al., 1999; Nitta et al., 2006). Ces protéines font partie d'une nouvelle famille de protéines qui n'est pas encore bien caractérisée (Nitta et al., 2006), ce qui rend difficile l'utilisation de leur éléments de régulation de transcription dans nos constructions. De plus, IAN1 s'exprime dans les thymocytes DN à la suite d'un signal par le pré-TCR, ce qui rend son utilisation peu adaptée à l'étude des phénomènes de sélection (Poirier et al., 1999). En effet, la signalisation découlant d'un signal de sélection positive serait, dans ces conditions, difficile à distinguer de celle obtenue à la suite d'un signal par le pré-TCR. Cependant, comme je l'ai mentionné plutôt, plusieurs études ont mis en évidence l'association de la molécule CD69 au processus de sélection positive et les séquences régulant l'expression de ce gène sont bien caractérisées (Swat et al., 1993; Yamashita et al., 1993; Ziegler et al., 1994b). CD69 n'est pas seulement un marqueur de la sélection positive, il est également associé à d'autres phénomènes. Ce point sera abordé dans la discussion. Toutefois, nous avons décidé d'utiliser les éléments de régulation de CD69 pour associer l'expression de la construction rapporteuse « Po » à un signal de sélection positive dans la souris « PoNe ».

Les sections qui suivent traiteront du travail accompli en vue de la génération de la lignée transgénique « PoNe ». Comme cela a déjà été mentionné, pendant ma maîtrise j'ai travaillé en collaboration avec Mme Aline Astrain, étudiante au doctorat. En ce qui concerne cette partie du travail, nous avons collaboré dans l'analyse de la littérature, des éléments qui régulent la transcription des gènes marqueurs choisis et dans l'élaboration des stratégies de

clonage de ces mêmes éléments. Cependant, Mme Astrain s'est concentrée sur la génération de la construction « Ne » alors que moi je me suis concentrée sur la génération de la construction « Po ». Un travail équivalent à celui qui est décrit dans les sections qui suivent a été accompli en vue de générer la construction « Ne ».

2.2.2 Clonage des éléments de régulation de l'expression de CD69

La séquence génomique de CD69 murin a été analysée afin de déterminer la position des éléments qui contrôlent l'expression de CD69 et d'établir une stratégie pour les cloner. Le gène CD69 murin a une taille d'environ 7,5 kilobases et contient 5 exons (figure 10) (Ziegler et al., 1994b). Une étude des 700 paires de bases en amont du codon d'initiation dans la partie 5' du gène CD69 a permis l'identification de son promoteur proximal (Ziegler et al., 1994b). Cette séquence contient les sites consensus de la boîte TATA et des séquences de liaison de différents facteurs de transcription, tels NFκB (*nuclear factor κB*), Oct-1/2, PU.1 et les facteurs de transcription de la famille GATA (Ziegler et al., 1994b). Cette séquence est la seule qui a été rapportée dans la littérature comme ayant un rôle dans la régulation de l'expression de CD69.

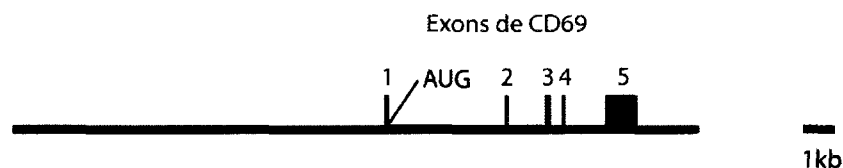


Figure 10. Structure génomique de CD69.

Le gène CD69 murin se trouve sur le chromosome 6 à la position 129,217,342-129,225,387 sur le brin (-) (Ensembl release 48-december 2007). Il est composé de 5 exons et 4 introns. Le AUG se trouve sur l'exon 1 à 85 paires de bases du début de l'exon. Le transcrit de CD69 comporte 1621 paires de bases et la protéine CD69 est composée de 199 acides aminés.

2.2.2.1 Caractérisation des fosmidés CD69

Des clones génomiques contenant la séquence de CD69 murin (lignée C57/BL6) ainsi qu'une large partie en 5' de son codon d'initiation ont été utilisés dans le clonage de ses éléments de régulation. Deux clones ont été obtenus du centre ressource BAC/PAC CHORI (Osoegawa et al., 2000) : WI1-488M21 (G135P66175**B2**); WI1-2167J23 (G135P60102**D1**), dorénavant désignés fosmidés B2, D1 respectivement. Le centre ressource BAC/PAC CHORI ne garantit pas l'exactitude des séquences de chaque clone (<http://bacpac.chori.org/>). En réalité, environ 10% à 15% des clones proposés à la vente sont mal identifiés. Les clones ne sont séquencés qu'à leurs extrémités, ce qui permet d'identifier les limites des séquences clonées, mais pas la qualité de la séquence dans son intégrité. Il est donc impératif de vérifier la présence et l'intégrité des régions cible dans les clones reçus.

Les séquences d'ADN théoriquement correspondantes aux fosmidés achetés ont été obtenues de la base de données Ensembl! (<http://www.ensembl.org/index.html>) en utilisant les informations données sur chaque clone au sujet de la position des extrémités de la séquence contenue par rapport à l'annotation du génome de la souris et le contig sur lequel se trouve cette séquence. À partir de ces séquences, il a été possible de créer une amorce amplifiant la frontière entre l'exon1 de CD69 et l'intron 1-2. La réaction de PCR utilisant ces amorces (VS 166 et VS 167, tableau 2) a permis de diagnostiquer la présence de la partie 5' de CD69.

L'analyse des fosmidés B2 et D1 par PCR n'a pas permis d'identifier les séquences cibles (résultats non montrés). De la même façon, le patron de restriction obtenu avec différentes enzymes de restriction ne correspondait pas à celui attendu (résultats non montrés). Il est donc probable que ces deux fosmidés soient mal identifiés dans la base de données du centre

ressource BAC/PAC CHORI.

Trois autres fosmidés ont été commandés au centre ressource BAC/PAC CHORI : WI1-963N19 (G135P68834**B3**); WI1-2303J21 (G135P602938**D2**) et WI1-232H21 (G135P63114**E2**), dorénavant désignés fosmidés B3, D2 et E2 respectivement. L'analyse par PCR a permis d'amplifier un fragment de 406 paires de bases indiquant la présence de la région 5' de CD69 dans les fosmidés B3, D2. Il n'a pas été possible d'amplifier cette région à partir du fosmide E2 (figure 11).

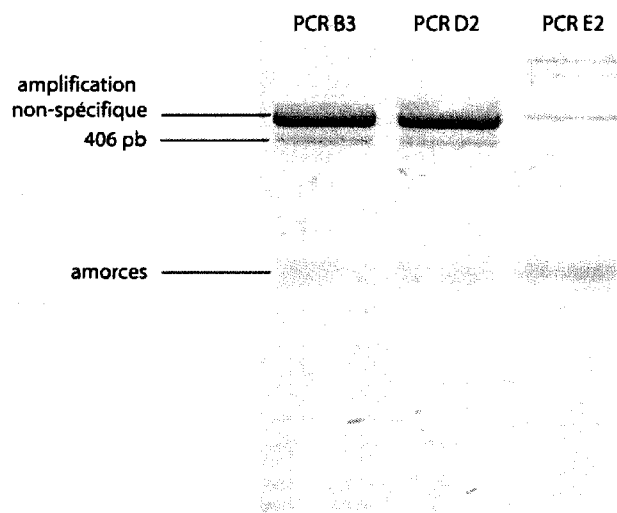


Figure 11. PCR diagnostique des fosmidés B3, D2 et E3.

Les amorces VS166 et VS 167 ont été utilisées pour les amplifications indiquées sur la figure.

La taille attendue de l'amplicon est de 406 paires de base.

Les patrons de restriction attendus avec différentes enzymes pour le fosmide D2 sont présentés dans le tableau 3 et les résultats obtenus sont en accord avec les prévisions (tableau 6; figure 12).

Tableau 6. Patron de restriction attendu du fosmide D2

Enzyme	Taille des fragment (kilobases)
BamH I	15 – 10 – 7,5 – 6 – 5 – 1,5
EcoR I	18 – 10 – 8,5 – 4,2 – 2,5 – 2,3
Kpn I	15 – 11 – 8,4 – 3,2 – 3,1 – 2,9 – 1,4
Ecor V	19 – 10 – 5,1 – 5,1 – 4,8
Mfe I	7,2 – 5,7 – 5,7 – 5,5 – 4,9 – 2,7 – 2,4 – 0,9
Not I	38 – 6,8
Sfi I	34 – 11
Hind III	8 – 6,9 – 5,4 – 4,8 – 4,5 – 2,6 – 2,5 – 2,4 – 1,7 – 1,3

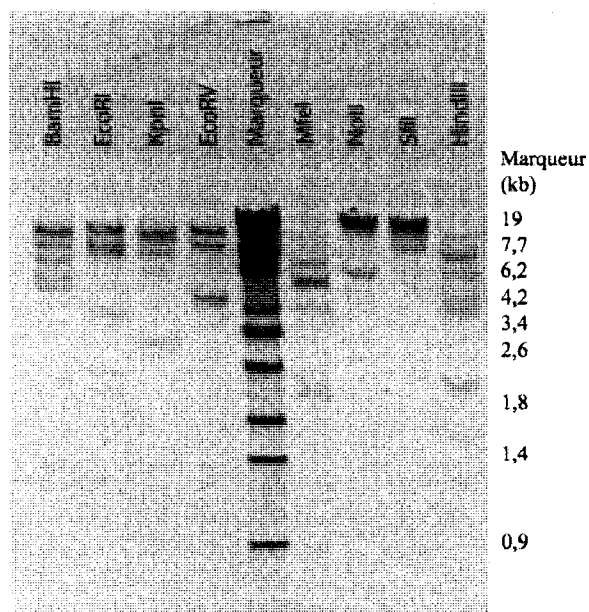


Figure 12. Analyse de restriction du fosmide D2.

Le fosmide D2 a été digéré avec différentes enzymes de restriction, comme indiqué sur la figure.

Il est important de mentionner que le contraste de la figure 12 ne permet pas de bien voir tous les fragments. Il existe de légers écarts entre la taille des fragments prédits et obtenus quand les fragments obtenus sont comparés au marqueur de poids moléculaire utilisé, surtout quand il s'agit des fragments de plus haut poids moléculaire. Ceci peut être expliqué par le fait que la séparation des plus grands fragments dans ce type de gel n'est pas efficace. Il est difficile de trouver des conditions dans lesquelles la séparation de tous les fragments est efficace, en raison des grosses variations de tailles existant entre les fragments étudiés. Cependant, étant donnée que la distribution des fragments entre eux est en accord avec les tailles attendues et que le diagnostic par PCR est positif, le fosmide D2 a été utilisé pour la suite des manipulations.

2.2.2.2 Analyse avec PReMod du contexte génomique de CD69

En dehors du promoteur décrit par Ziegler et collègues, aucun autre élément de séquence n'a été décrit dans la littérature pouvant avoir un effet sur la régulation de CD69. Cependant, plusieurs études ont montré certaines interactions existant entre le promoteur de certains gènes et des éléments distaux qui sont importantes dans la régulation de l'expression de ces gènes (Ling et Hoffman, 2007; Vernimmen et al., 2007). L'importance de ce type d'interaction a été notamment mise en évidence dans le cas de la régulation de l'expression des cytokines spécifiques des cellules T de type Th2 (Lee et al., 2003; Lee et Rao, 2004; Spilianakis et Flavell, 2004; Lee et al., 2005; Spilianakis et al., 2005).

PReMod (<http://genomequebec.mcgill.ca/PReMod/welcome.do>) est une base de données permettant la prédiction de modules de régulation en *cis* (*predicted Cis Regulatory Modules*; pCRMs) à travers le génome (Ferretti et al., 2007). L'algorithme utilisé pour effectuer les prédictions a été développé par Mathieu Blanchette et collaborateurs en 2006 (Blanchette et

al., 2006). Cette base de données permet d'identifier de potentiels sites de liaison de facteurs de transcription donnés, en amont et en aval d'un gène d'intérêt, et ce pour le génome humain et celui de la souris (Ferretti et al., 2007). Les analyses peuvent être restreintes à des régions chromosomiques définies ou à des zones autour d'un gène d'intérêt (Ferretti et al., 2007). Les résultats contiennent également de l'information au sujet des facteurs de transcription qui lient un pCRM donné et de leur distribution (Ferretti et al., 2007). Il est aussi possible de visualiser le contexte génomique de la séquence analysée et d'accéder à de l'information supplémentaire via des liens incorporés vers le *Repeat Masker* (<http://www.repeatmasker.org/>), le UCSC (*University of California, Santa Barbara*) *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) et NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Puisque PReMod s'avère être un outil d'analyse puissant, le contexte génomique de CD69 a été analysé avec ce programme. Le lien vers *Repeat Masker* a permis d'identifier un très grand nombre de répétitions existant en 5' de CD69 (figure 13). Dans les 10 000 paires de base qui suivent le pCRM proximal de CD69 16 séquences répétées ont été détectées. La taille des répétitions est variée et les plus étendues sont cataloguées dans la figure 14.

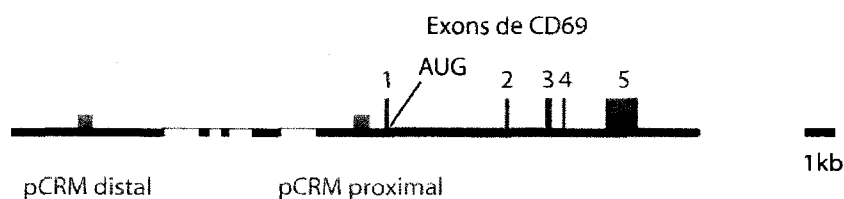


Figure 13. Emplacement des pCRM prédits par PReMod par rapport à CD69.

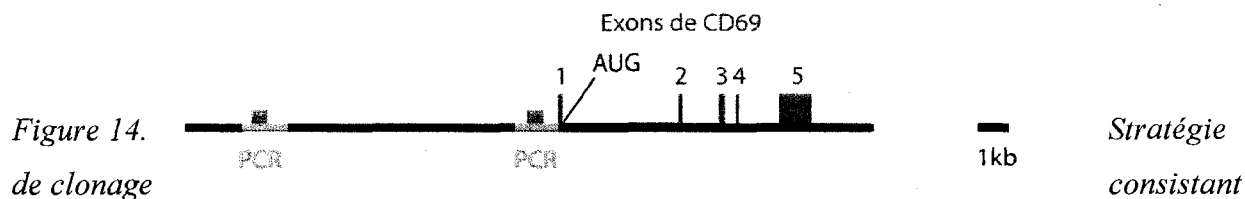
Le pCRM distal est situé à -9414 paires de bases par rapport à CD69 et a une taille de 493 paires de bases. Le pCRM proximal se trouve à -393 paires de bases par rapport à CD69 et a une taille de 530 paires de bases. Les séquences répétées de plus de 150 paires de bases sont annotées en jaune. Les séquences répétées séparées par moins de 100 paires de base ont été considérées comme une seule séquence répétée pour des fins d'annotation.

La présence de ces séquences répétées rend plus difficile la manipulation de cette séquence à des fins de clonage. Deux pCRMs ont été identifiés, un à -393 paires de bases (proximal) par rapport au codon d'initiation et un deuxième à environ -9,4 kilobases (distal) par rapport au codon d'initiation (figure 14). Le pCRM proximal trouvé est compris dans les séquences décrites dans la littérature (Ziegler et al., 1994a). Il a une longueur de 530 paires de bases et contient des sites consensus pour le facteur de transcription NFκB, comme cela est décrit dans la littérature (Ziegler et al., 1994a). La taille du pCRM distal est de 493 paires de bases de longueur. Malgré la grande distance qui les sépare, les deux pCRMs ont en commun des sites consensus pour la liaison du facteurs de transcription NFκB et c'est pourquoi les deux pCRM font partie de la stratégie de clonage élaborée pour la génération de la construction finale « Po » destinée à la transgénèse.

2.2.3 Stratégie de clonage des éléments de régulation de CD69

Puisque l'utilisation de sites de restriction est très limitée par les choix précis des séquences à isoler, la stratégie de clonage finalement choisie consiste à amplifier les deux pCRMs relatifs à CD69 par PCR. Des amorces ont été dessinées pour amplifier les régions d'intérêt. L'amorce anti-sens permettant d'amplifier le pCRM proximale a été stratégiquement placée entre le codon d'initiation et le site d'initiation. Le site d'initiation se trouve à 126 paires de base du codon d'initiation et l'amorce en question est située à 85 paires de base de celui-ci. Les amplifications ont été effectuées en utilisant la polymérase *Phusion Hot Start* de Finnzymes, une polymérase de la famille des polymérases de *Pyrococcus* avec une modification *hot start* fusionnée à un domaine de processivité. Selon le fabricant le taux d'erreur de cette polymérase est de 4.4×10^7 , ce qui 50 fois inférieur au taux d'erreur de la *Taq* polymérase. L'ajout du domaine de processivité augmente de 10 fois la vitesse de l'enzyme, ce qui rend son utilisation pour l'amplification de fragments longs intéressante. Le produit PCR contenant le pCRM proximal a une taille de 1425 paires de bases et celui qui contient le pCRM distal a une taille

de 1489 paires de bases. Ces produits contiennent la séquence des pCRMs entourée d'environ 500 paires de base de chaque côté (figure 14).



à amplifier par PCR les pCRM identifiés en amont de CD69.

Le pCRM proximal amplifié avec les amorces VS 248 et VS 249 a une taille de 1425 paires de bases. Le pCRM distal amplifié avec les amorces VS 288 et VS289 a une taille de 1498 paires de bases. Les pCRM sont indiqués en bleu et les amplicons en orange.

Les deux produits PCR sont destinés à être clonés en amont de la construction rapporteuse « Po » dans le vecteur pBR322PLK7Po de sorte à contrôler son expression. Le pCRM proximal a été cloné en utilisant les sites Nhe I et Bgl II. Le pCRM distal a été cloné en utilisant les sites Sal I et Mlu I (figure 15).

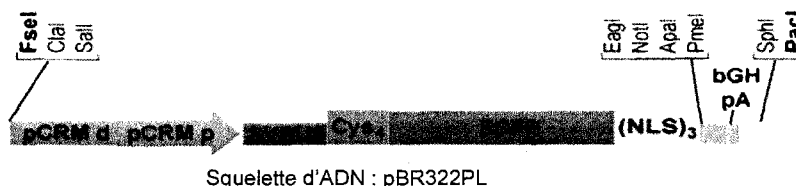


Figure 15. Plan de la construction pBR322PL/CD69pd/K7Po.

Cette construction comprend le pCRM distal et proximal de CD69 régulant l'expression de la protéine de fusion ECFP-NLS3, qui porte en N-terminal une étiquette tetracystéine (Cys4). En 5' de la protéine de fusion se trouve l'élément SVRU5 et en 3' le signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (bGH) provenant du vecteur pcDNA5/FRT.

La séquence complète et annotée de la construction « Po » se trouve en annexe. Puisque la lignée « PoNe » est générée par la co-injections des constructions « Po » et « Ne », la séquence annotée de la construction « Ne » générée par Mme Astrain se trouve également en annexe, à titre informatif.

3. Génération de la souris transgénique « PoNe »

Une méthode de micro-injection conventionnelle dans des ovocytes de souris C57/B6 a été choisie pour la génération de la souris double transgénique « PoNe ». Nous avons envisagé la possibilité de recourir à des méthodes comme le « knock-in » ou la recombinaison avec des BAC, qui ont l'avantage de conserver la régulation endogène du gène cible et de contrôler l'endroit et le nombre d'insertions du transgène (Germain et al., 2006; Bajénoff et Germain, 2007). Cependant, ces méthodes sont plus dispendieuses et laborieuses que la transgénèse conventionnelle, pour laquelle nous avons donc opté.

Les micro-injections dans des ovocytes de souris C57/B6 ont été effectuées au laboratoire de transgénèse sous la supervision de la Dre. Cowan au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. L'ADN de chaque construction a été préparé dans notre laboratoire, linéarisé avec les enzymes Pac I et Cla I et précipité. L'ADN de chaque construction a été envoyé à la Dre. Cowan, qui s'est ensuite occupée de la purification du fragment d'intérêt et des micro-injections.

Les expériences de micro-injection ont débuté le 3 septembre 2007 et les premières portées sont nées le 24 septembre 2007. Mme Astrain s'est occupée d'établir des protocoles pour

diagnostiquer les souriceaux et nous avons jusqu'à présent une souris positive pour la construction « Ne ». Les procédures de micro-injection sont toujours en cours.

4. Caractérisation de la fonction de l'élément SVRU5 en tant que IRES

L'élément SVRU5 a été inclus dans les constructions rapporteuses en premier lieu pour sa capacité à augmenter l'expression, au niveau traductionnel, du transcrit qui lui est associé (Takebe et al., 1988). Il a aussi été montré que la séquence RU5 du virus HTLV-1 (*Human T-Lymphotropic Virus-1*), qui fait partie de la séquence SVRU5, peut se comporter comme un IRES (*Internal ribosome entry site*) et ainsi permettre la traduction du deuxième cistron d'une construction bicistronique de façon indépendante de la coiffe de l'ARN messager (Attal et al., 1996). Il a été montré que certains de ces IRES possèdent des séquences homologues à l'ARN ribosomal, permettant ainsi le recrutement des sous-unités du ribosome nécessaires à l'initiation de la transcription (Dresios et al., 2006). Il existe de telles séquences dans le virus HTLV-1, notamment dans la région RU5 (Takebe et al., 1988).

Afin de tester la capacité de la séquence SVRU5 à fonctionner en tant qu'IRES, le cadre de lecture ouvert de CIITA (*Class II transactivator*) a été cloné en amont de cette séquence dans la construction pSVRU5/Ne (figure 17).

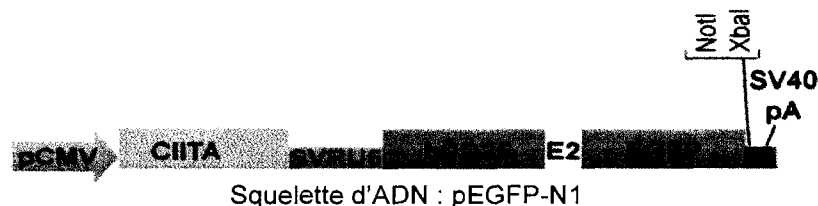


Figure 17. Plan de la construction pCIITA-SVRU5/Ne.

Cette construction bicistronique est composée de la région codante de CIITA, de l'élément SVRU5 et de la protéine de fusion hCD25-EGFP.

CIITA est un transactivateur dont le rôle est de contrôler l'expression des molécules de CMH II (Steimle et al., 1993). Il a aussi été démontré que la transfection de CIITA est suffisante pour activer l'expression des molécules de CMH II dans des cellules qui ne les expriment pas constitutivement (Steimle et al., 1994). Par conséquent, si la séquence SVRU5 fonctionne comme un IRES, il doit permettre l'expression des deux cistrons de la construction pCIITA/SVRU5/Ne, c'est-à-dire, CIITA et la protéine de fusion hsCD25-EGFP.

Des cellules HeLa, qui n'expriment pas CIITA constitutivement, ont été transfectées de façon transitoire tel qu'indiqué dans la figure 18, colorées avec un anticorps anti-CMH II et analysées par cytométrie de flux (figure 18).

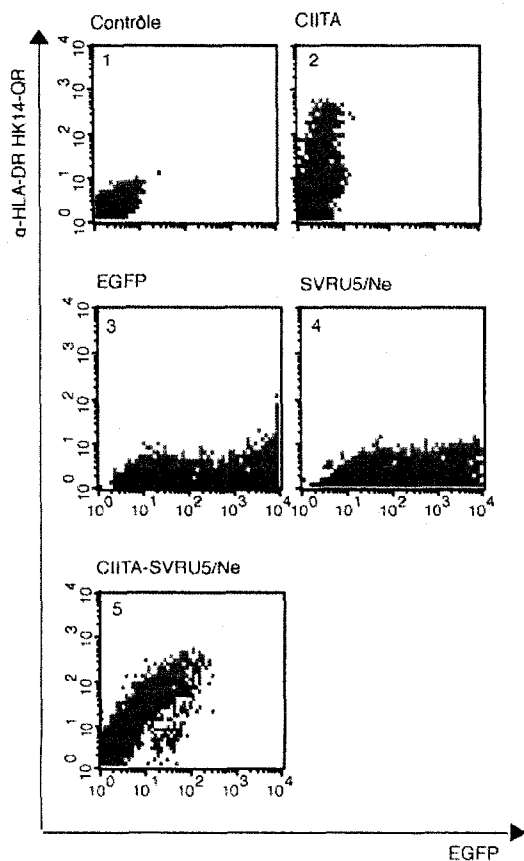


Figure 17. Analyse par cytométrie de flux de la fonction IRES de SVRU5.

Des cellules HEK 293 ont été transfectées de façon transitoire avec EBS-NPL (contrôle; panneau 1), pSR α neoCIITA (CIITA; panneau 2), pEGFP-N1 (EGFP; panneau 3), pSVRU5/Ne (SVRU5/Ne; panneau 4) et avec la construction bicistronique pCIITASVRU5Ne (CIITA-SVRU5/Ne; panneau 5). La présence de molécules de CMH II a été mise en évidence avec l'anticorps α -HLA-DR HK-14-QR. Les cellules ont été analysées pour la présence des molécules de CMH II et de la EGFP.

La présence de molécules de CMH II à la surface des cellules transfectées avec CIITA a été mise en évidence ce qui indique l'expression de CIITA et l'activation de l'expression des molécules de CMH II par cette protéine (figure 18). En revanche, les cellules transfectées avec la construction pSVRU5/Ne seule ne possèdent pas de molécules de CMH II à leur surface, mais sont positives pour l'expression de l'EGFP, indiquant l'expression de la protéine de fusion hCD25-EGFP (figure 17). La présence simultanée de molécules de CMH II et de la protéine de fusion hCD25-EGFP peut être mise en évidence à la surface des cellules dans lesquelles la construction bicistronique a été transfectée (figure 18). Il est ainsi possible de conclure que la séquence SVRU5 fonctionne dans ce cas-ci comme un IRES permettant l'expression de deux cistrons simultanément.

3. DISCUSSION

3.1 Génération de la souris double transgénique « PoNe »

Le but ultime de mon projet était de générer une nouvelle souris double transgénique permettant de suivre par microscopie biphotonique *in vivo* les processus de sélection positive et négative des thymocytes. Pour que l'observation des thymocytes soit réalisable, il est nécessaire que ces cellules soient colorées. Il existe plusieurs possibilités en ce qui a trait à la méthode utilisée pour marquer une population de cellules d'intérêt *in vivo*. Ainsi, il est possible de colorer les cellules avec des colorants vitaux, tel que le CFSE et le SNARF avant de les transférer dans une souris (Germain et al., 2006; Bajénoff et Germain, 2007). L'inconvénient majeur de cette technique est que le marquage avec ces colorants n'est pas stable au cours des divisions cellulaires (Germain et al., 2006; Bajénoff et Germain, 2007). L'utilisation de vecteurs rétroviraux encodant une protéine fluorescente permet de contourner ce problème. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent être infectées avec ces vecteurs et ensuite être transférées dans des souris pour la génération d'animaux chimériques (Witt et al., 2005). Cependant, ce système possède un désavantage majeur puisque le marquage n'est pas du tout spécifique des événements subis par les cellules. Il est alors nécessaire de recourir à l'utilisation de souris transgéniques pour le TCR afin d'étudier les phénomènes de sélection positive et négative.

Notre but est d'étudier les phénomènes de sélection dans un répertoire de thymocytes sauvages pour le TCR et non dans un contexte artificiel. Pour cela, il est nécessaire de pouvoir visualiser les événements en aval du TCR. Nous avons décidé de générer des souris transgéniques dans lesquelles un rapporteur génétique est placé sous le contrôle d'éléments de

régulation de gènes connus pour être activés lors des phénomènes de sélections positive et négative. Par rapport à la transgénèse conventionnelle, où le transgène s'insère par recombinaison de façon aléatoire, le « *knock in* » permet de cibler l'insertion par recombinaison homologue dans un *locus* donné (Mak, 2007). Cette technique permettrait d'insérer la construction rapporteuse dans le locus du gène marqueur et d'obtenir ainsi une régulation de l'expression de ces constructions qui très semblable à la régulation endogène des gènes marqueurs CD69 et Nur77. La transgénèse conventionnelle est moins dispendieuse, moins longue, et malgré le fait qu'il ne soit pas possible de contrôler le site d'insertion, il peut être avantageux d'avoir des insertions multiples en ce qui concerne les niveaux d'expression du transgène. C'est pourquoi nous avons opté pour cette technique pour la génération de la souris « PoNe ». Plusieurs lignées fondatrices indépendantes seront générées et validées.

Afin de pouvoir étudier la sélection positive et négative dans le même animal, il est nécessaire d'avoir un marqueur associé à chacun de ces processus. La co-injection de deux transgènes différents, contrôlés par le même promoteur ou des promoteurs différents, a déjà été utilisée pour générer des souris double transgéniques (Beermann et al., 1991; Overbeek et al., 1991; Qian et al., 2001; Sato et al., 2001; Zhang, 2001; Voyle et al., 2003). La co-injection peut résulter dans l'expression active et indépendante des deux transgènes (Overbeek et al., 1991; Sato et al., 2001; Zhang, 2001). La co-intégration des deux transgènes facilite le maintien de la lignée double transgénique. Par rapport à l'injection d'une seule construction, la co-injection n'est pas plus exigeante techniquement et a l'avantage de permettre l'expression de plusieurs protéines en même temps (Zhang, 2001). Les constructions « Po » et « Ne » ont été co-injectées en septembre 2007 dans des ovocytes de souris C57/BL6 dans le but de générer la souris double transgénique « PoNe ». Nous avons identifié une souris positive pour la construction « Ne » et les croisements nécessaires à établir la lignée sont actuellement en cours. D'autres portées sont nées et les souris seront génotypées prochainement. Également, d'autres expériences de co-injection sont présentement en cours.

3.2 Génération et caractérisation des cassettes rapporteuses « Po » et « Ne »

La finalité des constructions rapporteuses « Po » et « Ne » est de permettre la distinction entre un signal de sélection positive et négative par leur détection simultanée dans une seule cellule. Il est donc impératif de pouvoir distinguer les deux rapporteurs utilisés. Pour pouvoir suivre l'expression de deux protéines fluorescentes dans le même animal de façon simultanée par microscopie biphotonique, il faut que leur longueur d'onde d'excitation soit commune et dans les limites des lasers titane – saphir couramment utilisés (Sahai et al., 2005). Sahai et collaborateurs ont rapporté l'utilisation de la paire EGFP et ECFP dans une étude utilisant la microscopie biphotonique *in vivo* (Sahai et al., 2005). En effet, cette paire de fluorophores peut être excitée de façon optimal avec un laser titane-saphir (Blab, 2001). Chaque construction doit exprimer une des protéines fluorescentes choisies comme rapporteur. L'EGFP peut être aisément détectée par un cytomètre de flux standard, alors que la combinaison des filtres de détection dans un cytomètre de flux standard ne permet pas celle de l'ECFP. Il est actuellement impossible de distinguer les thymocytes qui subissent la sélection négative *in vivo* par l'expression d'un marqueur membranaire détectable avec un anticorps sans perméabilisation. L'expression de l'EGFP dans les cellules ayant reçu un signal de sélection négative permet la visualisation, par cytométrie de flux, des thymocytes qui subissent ce phénomène. En ce qui concerne la sélection positive, il est possible d'exploiter l'expression endogène de la protéine transmembranaire CD69 à l'aide d'un marquage avec un anticorps pour mettre en évidence les cellules ayant reçu ce signal. Ainsi, dans ce cas, l'expression d'une protéine fluorescente détectable par les cytomètres classiques n'était pas absolument nécessaire.

Afin de faciliter la discrimination entre les deux rapporteurs utilisés, nous avons décidé de leur donner une localisation subcellulaire différente. Il n'y a pas de marqueur membranaire connu associé à la sélection négative et un des objectifs de l'utilisation de la lignée « PoNe » est l'isolation et l'étude des voies de signalisation impliquées dans la sélection négative des

thymocytes. En conséquence, il a été décidé d'inclure dans le rapporteur « Ne » un marqueur membranaire qui permettra de trier les cellules positives. Dans le cas de la construction « Po », comme je l'ai déjà mentionné, l'expression de CD69 rend déjà possible le tri des cellules positives en utilisant des anticorps commerciaux et des billes magnétiques. Afin d'induire une localisation subcellulaire différente des rapporteurs « Po » et « Ne », le rapporteur « Po » est couplé à un signal de localisation nucléaire. Ce choix a également été motivé par le fait que CD69 est également exprimé à la surface des plaquettes (Testi et al., 1990). Ceci pourrait représenter un important problème de bruit de fond au cours de l'analyse des organes lymphoïdes primaires et secondaires qui sont hautement vascularisés. Puisque les plaquettes n'ont pas de noyau (Janeway et al., 2004), le choix de la localisation nucléaire pour la construction est tout à fait approprié.

3.3 La série « Po »

L'analyse du rapporteur « Po » par cytométrie de flux n'est pas optimale, mais le rapporteur « Po » est très bien détecté en microscopie confocale. L'ECFP a été couplée à un signal de localisation nucléaire (NLS; *Nuclear localisation signal*) de sorte à diriger son expression au noyau. Le signal de localisation nucléaire utilisé est celui du virus SV40 (*Simian virus 40*) répété trois fois (NLS₃). Le NLS₃ est utilisé couramment comme signal de localisation nucléaire et est reconnu comme étant très efficace (Fischer-Fantuzzi et Vesco, 1988). Les analyses de cellules HeLa transfectées avec la construction pcDNA5/K7Po montrent clairement que la fluorescence de la ECFP est effectivement exclusivement nucléaire, comme attendu.

La séquence HRWCCPGCCKTF contenant un motif trétracystéine (CCXXCC; X étant un acide aminé différent d'une cystéine) a été ajoutée à la construction « Po ». Ce motif peut être reconnu par un dérivé de la fluorescéine possédant la propriété de devenir fluorescent lorsqu'il

est lié aux cystéines par ses deux groupements arsénique (Adams et al., 2002). L'étiquette HRWCCPGCCKTF a été optimisée pour une plus grande spécificité dans la liaison du colorant et un niveau de fluorescence plus élevé avec moins de bruit de fond (Martin et al., 2005).

Les cellules HeLa transfectées avec la construction pcDNA5/K7Po ont été colorées avec le colorant ReAsH et analysées par microscopie confocale. La coloration avec le ReAsH a été mise au point et elle est très spécifique. J'aimerais attirer l'attention sur certaines zones, autour du noyau, qui présentent une coloration rouge mais pas de coloration bleue. Ceci met non seulement en évidence la sensibilité de la coloration avec le ReAsH mais aussi sa propriété à se lier à la séquence de quatre cystéines dès que celle-ci est traduite, avant même que l'ECFP soit mature et fluorescente.

L'utilisation du motif tétracystéine rend la construction « Po » plus versatile puisqu'il devient alors possible d'identifier la cible dès qu'elle est traduite. Les colorants biarséniques sont de petite taille, perméables à la membrane cellulaire et peuvent être utilisés *in vivo* (Adams et al., 2002), rendant ainsi possible le suivi de la réponse immunitaire *in vivo*. D'ailleurs, le motif lui-même est de petite taille, ce qui diminue considérablement l'encombrement stérique de la protéine de fusion (Adams et al., 2002). Les colorants biarséniques sont disponibles en plusieurs couleurs qui lient le même motif, ce qui offre la possibilité de faire des études dynamiques de type « *pulse-chase* » (Adams et al., 2002; Gaietta et al., 2002). Dans un avenir immédiat, l'utilisation des dérivés biarséniques pour la coloration des cellules exprimant la cassette « Po » permettra d'évaluer le temps entre la traduction de la protéine de fusion et l'observation de la fluorescence, correspondant au temps de repliement et de maturation de l'ECFP. Ceci sera particulièrement utile pour évaluer l'un des défauts potentiels de notre système, à savoir le temps s'écoulant entre la réception d'un signal de sélection par une cellule et l'observation de la fluorescence. Enfin, l'ajout du motif HRWCCPGCCKTF permettra également une collaboration avec le Dr. Bérubé-Lauzière qui travaille sur le développement

d'un tomographe de fluorescence pour l'imagerie non-invasive de petits animaux à la faculté de Génie de l'Université de Sherbrooke. L'utilisation des colorants dont la longueur d'onde d'émission se situe dans l'infra-rouge est idéale, puisqu'ils ont une meilleure pénétration dans les tissus profonds. Le ReAsh est un colorant biarsénique rouge et son maximum d'émission est à 602 nm, ce qui demeure sous optimal. Cependant, selon des informations obtenues d'*Invitrogen Molecular Probes*, des colorants biarséniques dont la longueur d'onde d'émission se situe dans l'infra-rouge sont en train d'être développés, ce qui rendrait l'utilisation de notre souris optimale pour des applications en tomographie de fluorescence.

3.4 La série « Ne »

La protéine CD25 humaine fait partie de la construction « Ne » en tant que marqueur membranaire. La protéine CD25 est la chaîne α du récepteur de l'interleukine 2 (Janeway et al., 2004). Il s'agit d'une protéine membranaire normalement exprimée dans les lymphocytes T et la protéine humaine a déjà été utilisée comme rapporteur dans d'autres systèmes murins où elle s'exprime bien (Gounari et al., 2002; Martin et al., 2003). La protéine humaine n'affecte pas la signalisation dans la souris (Gounari et al., 2002; Martin et al., 2003), tout en conservant sa localisation membranaire. Il existe des anticorps commerciaux disponibles qui reconnaissent le CD25 et rendent possible l'isolement des cellules positives pour ce rapporteur par un tri utilisant des billes magnétiques. Ceci rend possible l'étude des voies de signalisation endogènes dans les thymocytes qui subissent la sélection négative, ce qui n'était pas possible jusqu'à présent.

CD25 a été fusionné avec l'EGFP. Il est courant d'introduire une courte séquence d'acides aminés entre les deux protéines fusionnées. Une étude récente a montré que des séquences contenant deux (E2) ou quatre (E4) répétitions des acides aminés EAAAR sont plus efficaces que les séquences GGGSGGGGS, ACGSLSCGSF, et ACGSLSCGS-FACGSLSCGSF

utilisées couramment pour faire un lien entre deux protéines dans une fusion, autant en culture de cellules qu'*in vivo* (Paulmurugan et Gambhir, 2005).

L'expression du rapporteur « Ne » a été évaluée par cytométrie de flux et par microscopie confocale. L'analyse en cytométrie de flux des cellules HeLa transfectées de façon transitoire avec la construction pcDNA5/K7Ne et colorées avec un anticorps qui reconnaît le CD25 montre que le rapporteur « Ne » s'exprime de façon très efficace et qu'il y a clairement une co-expression nette du CD25 humain et de l'EGFP. Les niveaux de fluorescence observés pour la fusion CD25-EGFP sont très semblables à ceux qui sont observés avec l'EGFP seule, contrairement à ce qui est parfois observé dans les protéines de fusion contenant l'EGFP. Ceci confirme l'efficacité de la séquence E2 comme adaptateur dans la fusion. Des analyses en microscopie confocale de ces mêmes cellules montrent que la protéine de fusion hCD25-EGFP est fortement exprimée à la membrane des cellules, conformément à ce qui était attendu. Il est même possible de voir des prolongations de la membrane cytoplasmique qui établissent des communications entre les cellules adjacentes. Des structures de ce type ont été décrites dans la littérature comme ayant un rôle dans la communication cellulaire (Rustom et al., 2004; Gerdes et al., 2007). Jusqu'à présent, ces structures ont seulement été documentées en culture de cellules et il serait intéressant de documenter leur existence et d'évaluer leur rôle *in vivo*.

L'observation simultanée des rapporteurs « Po » et « Ne » implique la distinction entre les signaux de l'EGFP et de l'ECFP. Cette distinction est difficile en raison du chevauchement des spectres d'émission de ces deux fluorophores. Sahai et collaborateurs ont rapporté la détection simultanée de l'EGFP et de l'ECFP à l'aide d'une approche informatique de soustraction des deux spectres d'émission (Sahai et al., 2005). Dans le cas présent, nous avons utilisé le microscope confocal Olympus FV1000 doté de détecteurs spectraux dont les limites de détection peuvent être ajustées de façon à obtenir une séparation des deux signaux. Des cellules HeLa co-transfectées avec les constructions pcDNA5/K7Po et pcDNA5/K7Ne ont été

analysées par microscopie confocale. Dans ces expériences, le signal membranaire de l'EGFP est aisément distingué de celui nucléaire de l'ECFP.

3.5 Clonage des rapporteurs dans différents vecteurs

Les rapporteurs « Po » et « Ne » ont été réalisés dans le squelette d'ADN de trois vecteurs différents, pEGFP-N1, pcDNA5/FRT et pBR322PL, ce qui augmente leur versatilité pour différentes utilisations ultérieures potentielles.

Le sous clonage des rapporteurs dans le vecteur pcDNA5/FRT a permis de leur d'inclure le signal de polyadénylation de la bGH (*bovine growth hormone; hormone de croissance bovine*) dans les cassettes rapporteuses. Ce signal est souvent utilisé dans des constructions destinées à la transgénèse. Le vecteur pcDNA5/FRT contient aussi un site FRT (*Flp Recombination Target*) qui permet la recombinaison par la recombinaison Flp (O'Gorman et al., 1991). Lorsque les sites FRT sont présents dans le génome de la lignée cellulaire d'intérêt et que celle-ci est transfectée avec un vecteur contenant un site FRT, il y a recombinaison et insertion du vecteur dans le génome si la recombinaison Flp est exprimée (O'Gorman et al., 1991). Ceci permet d'utiliser nos rapporteurs comme marqueurs lors de la génération de lignées stables, ce qui a l'avantage de permettre la détection rapide de l'expression du gène transfecté et le tri des cellules positives.

Pour permettre le clonage de régions génomiques de taille importante destinées à contrôler la transcription des rapporteurs, ceux-ci ont été sous-clonés dans un vecteur à faible nombre de copies. pEGFP-N1 et pcDNA5/FRT sont des vecteurs à nombre de copies élevé et ce type de vecteur est reconnu comme étant instables lorsque des séquences d'ADN de taille importante y sont insérés (Kim et al., 1992). Le vecteur pBR322 est un vecteur à faible nombre de copies

(Bolivar et al., 1992). Ce vecteur contient le gène *rop* dont le transcrit stabilise le complexe ARNI-ARNII ce qui décroît le nombre de copies du plasmide (Covarrubias et al., 1981). L'inconvénient de ce vecteur est que peu de sites uniques sont disponibles pour réaliser les clonages. Nous avons entrepris de générer un nouveau vecteur basé sur pBR322 en supprimant le gène *tet* de résistance à la tétracycline et en le remplaçant par un site de clonage multiple synthétique. Ce site de clonage multiple contient plusieurs palindromes de 6 bases, des sites de restriction d'usage commun et des palindromes de 8 bases qui constituent des sites de restriction plus rares. Ceci rend le clonage dans ce vecteur plus facile et permet l'insertion de constructions contenant des fragments génomiques de grande taille à l'aide des palindromes de 8 bases qui sont plus rares dans le génome.

3.6 Utilisation de la séquence SVRU5

Le suivi d'un rapporteur fluorescent *in vivo* implique que son expression doit être assez élevée pour permettre sa détection. Dans le cas présent, il n'est pas possible d'utiliser un promoteur fort pour contrôler l'expression des rapporteurs, puisque leur régulation doit être le plus proche possible de la régulation endogène des gènes marqueurs de la sélection positive et négative. Une alternative qui s'est imposée est l'utilisation de la séquence SVRU5, qui a été rapportée dans la littérature pour sa capacité d'augmenter l'expression du transcrit en agissant uniquement au niveau traductionnel (Takebe et al., 1988). Les tests de cette activité en transfection transitoire sont peu informatifs, puisqu'il s'agit d'une situation où la construction est surexprimée. Il sera nécessaire d'étudier la capacité de la séquence SVRU5 à augmenter les niveaux de protéines produits, dans une situation où la construction est intégrée au génome des cellules analysées, notamment dans la souris « PoNe ».

Une étude a rapporté que la séquence SVRU5 contient une région de type IRES (Attal et al., 1996), ce qui nous a motivé à tester cette activité potentielle. Les IRES ont été identifiés pour

la première fois dans la région non-traduite en 5' de certains ARN messagers du poliovirus (Pelletier et Sonenberg, 1988). Ils ont ensuite été mis en évidence dans l'ARN messager de beaucoup d'autres virus ainsi que dans la région non-traduite en 5' d'ARN messagers de mammifères (Hartenbach et Fussenegger, 2006). Ces séquences permettent la transcription de deux gènes dans un seul ARN messager et la traduction de deux protéines différentes à partir d'un même ARN messager, aboutissant ainsi à l'expression de plusieurs protéines à partir d'un même promoteur (Vagner et al., 2001).

Nous avons testé la fonction IRES de la séquence SVRU5 en utilisant une construction bicistronique contenant la séquence codante de CIITA et la protéine de fusion hCD25-EGFP. Nos résultats montrent que la séquence SVRU5 a la capacité de promouvoir la traduction d'au moins deux protéines, qui ont des cadres de lecture ouverts assez grands, à partir du même ARN messager. Ceci est avantageux dans le cadre d'un système rapporteur comme le nôtre, puisque ses possibilités d'application se voient ainsi multipliées. L'utilisation de rapporteurs bicistroniques est très utile notamment dans le suivi de la thérapie génique *in vivo*. (Wang et al., 2005).

La séquence IRES du EMCV (*encephalomyocarditis virus*) est une des plus utilisées (Mountford et Smith, 1995) puisqu'elle présente une activité plus élevée que d'autres IRES viraux (Borman et al., 1997) et elle est active dans plusieurs types cellulaires (Borman et al., 1995). Cependant, l'expression dépendante du IRES de l'ECMV (*Encephalomyocarditis virus*) d'un deuxième cistron d'une construction bicistronique est très variable, pouvant aller de 6% à 100%, mais se retrouvant la plupart du temps entre 20% et 50 % par rapport à l'expression du premier cistron (Mizuguchi et al., 2000). L'efficacité de cette expression est aussi dépendante du type cellulaire et du type de rapporteur utilisé (Mizuguchi et al., 2000). Les limitations de l'utilisation de la séquence IRES de l'ECMV ont motivé plusieurs groupes de recherche à explorer de nouvelles séquences capables d'agir comme IRES. Dans les

dernières années, des IRES synthétiques ont été développés (Chappell et al., 2000; Chappell et al., 2001; Owens et al., 2001; Chappell et Mauro, 2003; Chappell et al., 2004). Une caractérisation plus extensive du fonctionnement de la séquence SVRU5, impliquant entre autres la vérification de l'efficacité de cette séquence avec d'autres cistrons dans différentes lignées de cellules et *in vivo* ainsi qu'une comparaison avec les IRES existants, permettra de déterminer si le SVRU5 peut être une alternative intéressante aux IRES qui sont actuellement utilisés.

Nous avons généré des rapporteurs versatiles qui peuvent être suivis avec des techniques courantes de détection de la fluorescence, qui possèdent une localisation subcellulaire différente et qui permettent le tri des cellules qui les expriment. Les deux rapporteurs s'expriment fortement en transfection transitoire et la détection simultanée des deux rapporteurs est possible. L'étiquette HRWCCPGCCKTF permet d'effectuer des expériences de « *pulse chase* » *in vivo* et l'utilisation potentielle de la tomographie de fluorescence pour le suivi de la réponse immunitaire *in vivo*. La capacité de la séquence SVRU5 à agir comme un IRES ajoute un élément de versatilité de plus à nos rapporteurs. Ces vecteurs sont disponibles dans trois squelettes d'ADN différents qui peuvent être facilement manipulés et peuvent donc présenter de nombreuses applications potentielles.

3.6 Clonage des éléments de régulation de CD69

Le rôle de CD69 dans les phénomènes de sélection ainsi que dans d'autres processus relatifs à la biologie des cellules T, n'est pas complètement élucidé (Sancho et al., 2005). Des études *in vitro* ont montré que la sélection négative est associée à une activation du TCR et à l'expression de CD69 dans les cellules DP, comme c'est le cas de la sélection positive (Kishimoto et al., 1995; Kishimoto et Sprent, 1997; Merckenschlager et al., 1997). Cependant, une étude conduite en 2003 a montré, en utilisant un modèle *in vivo*, que ces observations

pouvaient être le résultat d'une activation causée par des facteurs indirects indépendants de la sélection négative par le TCR (Zhan et al., 2003). Cette controverse renforce le besoin de générer une lignée double transgénique « PoNe ». Avec cette lignée, il sera possible d'observer *in vivo* dans un modèle où le répertoire de cellules T est sauvage pour le TCR si les thymocytes qui ont reçu un signal de sélection positive ou négative présentent ou non une augmentation de l'expression de CD69 suite à l'activation du TCR.

CD69 a été choisi comme gène marqueur associé à la sélection positive puisque son association à ce phénomène a été démontrée à plusieurs reprises (Swat et al., 1993; Yamashita et al., 1993) et que ses éléments de régulation ont été caractérisés (Ziegler et al., 1994a). Le contexte génomique de CD69 a été analysé avec le logiciel PReMod, ce qui a permis d'identifier deux pCRMs. L'un d'entre eux est proximal par rapport à CD69 et comprend le promoteur identifié dans la littérature, tandis que l'autre, distal, est localisé à 9,4 kilobases du codon d'initiation de CD69. Les deux pCRM ont des sites consensus pour la liaison de facteurs de transcription couramment impliqués dans l'expression de protéines du système immunitaire. De plus, il est probable que le pCRM distal que nous avons identifié puisse avoir un rôle dans la régulation à distance de CD69 (Ling et Hoffman, 2007; Vernimmen et al., 2007). L'analyse avec PReMod a permis de remarquer que les deux pCRM font partie de régions conservées, ce qui renforce un rôle potentiel pour le pCRM distal dans la régulation de CD69. Nous avons inclus les deux pCRMs dans la construction « Po ».

Nous avons envisagé de tester la fonctionnalité de ces éléments de régulation en culture de cellules. Pour réaliser ce projet, il était nécessaire d'utiliser une lignée cellulaire qui permet l'expression de CD69 et Nur77. De telles lignées sont disponibles, mais sont en général difficiles à transfecter. Nous avons toutefois réalisé des essais préliminaires de transfection en utilisant diverses méthodes avec des cellules DO11.10, un hybridome de cellules T qui exprime CD69 et Nur77, mais les taux de transfection obtenus étaient très faibles. De plus, il serait nécessaire de générer une lignée stable pour évaluer le fonctionnement de ces séquences

régulatrices dans un contexte le plus proche possible de celui rencontré dans la souris transgénique. Même dans de telles circonstances, le nombre d'insertions et leur localisation ne correspond pas nécessairement à ce qui serait retrouvé dans une souris transgénique. De plus, cette manipulation ne serait pas possible avec le vecteur pBR322PL puisqu'il n'a pas de marqueur de sélection approprié et la co-transfection d'un vecteur de sélection serait probablement encore moins efficace que la transfection d'un seul vecteur dans une telle lignée cellulaire. Il était donc extrêmement laborieux de mettre au point une expérience pour évaluer la fonctionnalité des éléments de régulation de CD69 en culture de cellules, et surtout que les observations effectuées à partir de ce modèle n'auraient été que peu informatives par rapport à la situation obtenue dans les souris transgéniques.

La génération de la construction « Ne » n'est pas rapportée en profondeur. Cependant, il est important de mentionner que le travail effectué pour la génération de la construction « Po » a aussi été conduit pour la génération de la construction « Ne ». Nur77 a été choisi comme gène marqueur de la sélection négative car son implication dans ce phénomène est bien démontrée et la régulation de sa transcription a été étudiée (Williams et Lau, 1993; Yoon et Lau, 1993; Woronicz et al., 1995; Kuang et al., 1999). Les éléments qui régulent la transcription de Nur77 ont été identifiés et clonés en 5' du rapporteur « Ne » dans pBR322PL/K7Ne. Cette construction a été utilisée avec la construction pBR322PL/K7Po dans la génération par co-injection des souris double transgéniques « PoNe ».

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'établissement de la lignée transgénique « PoNe » est actuellement en cours. Suite au génotypage des souriceaux et au choix des fondateurs, il sera nécessaire de caractériser les niveaux d'expression des transgènes dans ces souris et leur corrélation avec l'expression des protéines Nur77 et CD69.

L'analyse de ces souris permettra, pour la première fois, l'étude de la sélection positive et négative dans le contexte d'une population de thymocytes sauvages pour le TCR. Il sera possible de trier les cellules positives pour l'expression des transgènes et de caractériser les voies biomoléculaires et l'expression des gènes impliqués dans les phénomènes de sélection. De plus, l'observation de coupes de thymus de ces souris sauvage pour le TCR permettra de mieux juger de la localisation et la distribution des thymocytes qui ont reçu un signal de sélection. Les études en microscopie biphotonique permettront de caractériser, pour la première fois, le comportement dynamique des thymocytes qui subissent les phénomènes de sélection positive et négative. À plus long terme, le croisement de la souris « PoNe » avec des modèles murins qui présentent des défauts de sélection négative, comme la souris NOD (*Non obese diabetic*), la souris Bim^{-/-} ou la souris exprimant le dominant négatif de Nur77 devrait fournir des modèles d'étude intéressants du destin des thymocytes autoréactifs qui devraient être éliminés par sélection négative.

Les rapporteurs utilisés dans la génération de ces souris sont très versatiles et peuvent être utilisés pour d'autres fins. Diverses applications peuvent être envisagées : l'utilisation du rapporteur « Ne » pour la génération de vecteurs rétroviraux ou lentiviraux bicistroniques qui permettent simultanément l'expression d'un ARN de type « *short hairpin* » et un tri efficace des cellules transfectées. Le changement de fluorophores dans les rapporteurs n'est pas

laborieux et peut permettre l'adaptation de ces rapporteurs à différentes applications.

D'autres applications dans l'étude du système immunitaire peuvent être envisagées pour la souris « PoNe ». En effet, CD69 est bien connu comme marqueur d'activation du TCR, ce qui peut être exploité pour l'étude, *in vivo* et en périphérie, de l'activation des cellules T lors de la réponse immunitaire. Ces analyses pourraient s'effectuer par microscopie confocale (coupes de ganglions), biphotonique (ganglions explantés ou analysés *in situ*) ou par tomographie de fluorescence. Il est important de mentionner que l'expression de CD69 est associée aux phénomènes d'activation du TCR, autant dans les thymocytes que dans les cellules T matures (Testi et al., 1994). En fait, CD69 est exprimé dans toutes les cellules de la lignée hématopoïétique activées, sauf les érythrocytes (Testi et al., 1994). En réalité, CD69 est exprimé dans toutes les cellules de la lignée hématopoïétique activées, à l'exception des érythrocytes {Testi, 1994 #801}. Le fait que CD69 soit exprimé dans des cellules de la lignée hématopoïétique est avantageux en termes d'augmentation des possibilités d'applications de la lignée « PoNe ». Dans cette optique, il serait ainsi possible de documenter l'expression de CD69 au site d'inflammation en utilisant la tomographie de fluorescence.

Des applications de la souris « PoNe » indépendantes de l'étude du système immunitaire sont également envisageables. Nur77 est exprimé dans divers tissus comme marqueur précoce d'activation (Hsu et al., 2004). La déficience de son expression dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins est associée au développement de lésion athérosclérotiques (Arkenbout et al., 2002; Martínez-González et Badimon, 2005; Bonta et al., 2007) et à des anomalies de la neurotransmission dépendante de la dopamine dans le système nerveux central (Gilbert et al., 2006). Contrairement à d'autres récepteurs nucléaires qui sont exprimés dans les cellules au repos, Nur77 est exprimé suite à des stimuli extérieurs (Hsu et al., 2004). Son expression a été associée à l'induction de l'apoptose et à la prolifération cellulaire (Hsu et al., 2004). Ainsi, l'expression de Nur77 a été détectée après la stimulation avec des facteurs de croissance et semble avoir un rôle dans la croissance cellulaire dans certains cancers. La souris

« PoNe » s'avère être un outil intéressant pour l'étude *in vivo* des rôles de Nur77 dans différents tissus et domaines d'étude.

ANNEXES

pBR322PL/CD69pd/K7Po

FseI ClaI Sall

1 ttgggccggccatcgatgctcgacagtgggcctggggagtgtgccccttcagttacactgtcaagggcagtagcctaaattatccataatgtattattaggat 100
101 gctttgtatotttcttaagottgcatattcctctcacaaccctaagattttgaaatgcataatgaactccaggggtgctgcatgtttctctcagttttct 200
201 ctccctacagaggtcaagcaactctgttggatttactacacagttgtcaagcaagagtcaaacacacaagactcaatcgtttggtatttttgacttctctag 300
301 gatttctaagtgtattgtccctcttccacaaccactttctctgagggtccatccctcaaacatgctcttccatgtgacagacacactgaaataaatgtgggaatg 400
VS 293 (F)
401 atctcaggcatagctcaaacaccatgtctcttttggatgatagagttctctctattcctttcactttcaaaaagtgatcagaattttccatagttcaagttctat 500
PCR distal
501 gtgcacagggaacttcacaattttaccacattaaaaccaagaagaacatatacaattcaacactttccaatgtgtttttgtatctggggaaatgttctgcaga 600
601 agaggaaagttaagaaagtttgatgaactcagaagagaagagactggaaattgctgagaactggaaacccccatttccctcacagccacctttactggtcc 700
701 catgtagtaaccattttcaaacctgctatataaaaaacaagtgataccgatttacataacttgaat 800
801 tacttttaatgaaacattgcaaatggaaactctgatccacaagaagactaaggacattccagtacctcattccactcactgaaagaaaaaatcattttgaa 900
901 atatgatgagcaggttgtcaaccggaaactgctcaggtcgggaagtttgggttcctttgaacacataccaactaaggcagctgcccgtgataaggactgtac 1000
VS 294 (R)
1001 accctgaccttccctgcccactttgcatctgcctcacattacatcatttcccttcagaaacctccctccggattcttccatataaggtccacacttgagggag 1100
1101 aactgcactgggttttagtgtctgaatggcctggcccaaccacaagcctcaggtgtctgtgaagcctcagttctctcagttacaataatgctcaatcacaacaga 1200

1201 tgetgtcgtgaacatatgggtatcactttatattatatacatatTTTTTcatgggatgaaacccatgaaataatttttaagaatgggaaagtcaggcatggtg 1300

1301 goataggtaatgctagcatttgatgtgccccagcattcaataggcagagaagcaggtggatctctgtgagttccgggtcagcttgggtotaccaagagagttc 1400

1401 caggacagtcaccaatacacagagaaaccctgtcttttaaaaaacaaaaacaaacaaaaatacccaaaacttttgctgtccctataaagtcagggtg 1500

MluI NheI

1501 ggataaatgacttcagataaaaaggcaagtgtt**acgcgt**cottag**cttagc**agagggctggctatgatgactctccctgcctatTTTTTgtcagttctgaaot 1600

1601 ctatgaaaacctcatcccatccaacaggcatgagtcagaagagcacttcttggtatcctatgagtatctggaccttcctgcttttcaacttgatactgaatt 1700

1701 aattaccttatttattatgggaaaaacctggcacataggcatatggaaaaagaaccgctaagacacaaccgaaagacctaaaggccctgcagtgccaggt 1800

1801 cctgggcactcctatggaataagaagaagctctctgtttagagggaaagtaatagaggaagtgccagaggccaatgtagaggttctcttggtgtaa 1900

1901 ggtctttggattttaaggaaacctttattaggaagcctttgggtgagctgaatgtttotcaacaagatgatatgacatacttaattctcatcccagctgctgtg 2000

2001 caggaaagatactgagaacaaaaaggcaattaggaccagcatgtacctgtctgtgtctcaagcagacaaatccacctgctggctcacctcagttgtctg 2100

2101 tgccggtaccttccaagcaacctaaagcattatcttccaaaaggcaaacacagacaactttactccaggtcctttgacaatctctccattctctgtota 2200

2201 ttccatattgcaaatgtagagatcattccagaatgtaagaaatcatgcttgaatTTTTTaaagatctctcaacttgacttaccaaaacagacattttctg 2300

2301 catttatgtggtgctcaataacttatctgaatgagatggatatcatgggaagatattgtgtatagggatcatottccaaatatccgaggccacagacacct 2400

VS 296 (F)

2401 gaaaaggecatggggaaatagaaggagatattctgcagtgagacaaagtaagtttgacagtgaggatgacaagaaatgagcaagggatgatgaaatag 2500

PCR1 proximal

2501 ataactgaagagaaacagtttttagatcacac**ccgaggaagtttcagaccacaagctttctgtttccctgcaactaaagcaactcctgacacttgaagaacta** 2600

2601 gtctctggggaaaaaagaagtgaatgccacacgTTTTTaaatccataattaactaaataaaacttgccaattgagagagagggagagagagccacaaa 2700

VS 298 (F)

2701 gatagagatttttaaatccctactcaacagtacatctctctggccaccaacagcacctggtagacataatgggtattcaataaatgcctgtacctgcctacat 2800

2801 atacaaagaaccaatgcaaaggattgcatgaaaaagttttactctctcttccagtgttttccatgtcaaatacagcaatctcaaacttttagctcctt 2900

2901 gtttagattataccatttcttaagttatttgtggttttaaaagtttgtggaaggatgtcttcgattctgggaaaatcccatttatctcttctcttgaag 3000

3001 ctacagttgtgagaaagcacatttcagacagcagggaaaaccgcagctcaccacaacaacacacgggtgaagtgtctaggccgctggagcataaattaa 3100

boite TATA CD69

3101 gagaactggctgagttgagtgagtagcagggtaggaggaaggggtggagcctaatacgagtataaaaggctgaaatctccgagatcaagacactgaacaaga 3200

Inr

BglII

EcoRI SVRU5

3201 cagctccagctacatctctccgtggaccacttgagagtcgccagggagagatctcgagctcaagcttgaattccggcctctgagctattccagaagtag 3300

VS295 (R)

3301 tgaggaggcttttttgaggcctaggcttttgcaaaagctcctcgatcgagggtcgcattctctcttcacggcgcgcgcctacctgaggccgcat 3400

3401 ccacgccggttgagtcgcggttctgccgcctccgcctgtggtgcctcctgaactcggtcgccgcttaggtaagttaaagctcaggtcgagaccggg 3500

3501 cctttgtccggcgtcccttgagcctacctagactcagccgctctccacgctttgctgacctgcttgctcaactctacgtctttgtttctgtttct 3600

3601 gttctgcgccgttacagatccaagctcctcgaggaactgaaaaaccagaaagttaactggtaagtttagtctttttgtcttttatttcaggtcccggatc 3700

KpnI

3701 cggtggtggtgcaaatcaaagaactgctcctcagtgatggttgctttacttctaggcctgtacggaagtgttacttctgctctaaaagctgctgcaggt 3800

K7Po

motif tetra cytéines

AgeI

3801 accacc ATG GCC GGC TCC [REDACTED] GGA GGC AGG GGA CCG GTC GCC 3875

1 M A G S H R W C C P G C C K T F G G R G P V A 23

ECFP-NLS3

3876 ACC **ATG GAC AAG AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGC CTG GTC CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC** 3950
 24 T M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N 48

3951 **GGC GAC AAG TTC AAG GTC TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TCC** 4025
 49 G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C 73

4026 **ACC AAG GGC AAG CTG CCC GTC GGC TGG GCC ACC CTC GTC ACC ACC CTG ACC TCG GGC GTC CAG TGC TTC AAG GGC** 4100
 74 T T G K L P V P W P T L V T T L T W G V Q C F S R 98

4101 **TAC GGC GAC CAG ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCG ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG GGC ACC ATC** 4175
 99 Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I 123

4176 **TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC GGC GGC GAG GTC AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTC AAC GGC ATC** 4250
 124 F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I 148

4251 **GAG CTG AAC GGC ATC CAC TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGC CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC ATC AAG CAC** 4325
 149 E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y I S H 173

4326 **TAC GTC TAT ATC ACC GGT GAC AAG CAG AAG AAC GGC ATC AAG GCC AAC TTC AAG ATC GGC TAC AAC ATC GAG GAC** 4400
 174 N V Y I T A D K Q K N G I K A N F K I R H N I E D 198

4401 **GGC AGC GTC CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC GGC ATC GGC GAC GGC CCC GTC CTG CTG GGC GAC AAC** 4475
 199 G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N 223

4476 **TAC TAC CTG GGC ACC CAG TCC GGC CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG GGC GAT GAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC** 4550
 224 H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F 248

BsrGI

NLS3

4551 ~~ATG ACC GCG GCG GCG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CAG TAC AAG~~ TCC GGA GAT CCT AAA AAG AAG AGA AAG GTT 4625
 249 V T A A G I T L G M D E L Y K S G D P K K K R K V 273
NotI/EagI XbaI Apa PmeI
 4626 GAC CCC AAG AAG AAA CGG AAG GTC GAT CCA AAG AAG AAG CGC AAA GTG GGA TAA **gcggccgctcgagctctagagggcccggtt** 4707
 274 D P K K K R K V D P K K K R K V G * 291
 4708 **taaac** 4807
 4808 4907
SphI PacI
 4908 **gcatgcttaattaa**ccttggcagaacatatccatcgctccgccatctccagcagccgcacgcccgcacatctcgggcagcgt 5007
 5008 tgggtcctggccacgggtgcgcatgatcgctgctcctgctgcttgaggaccggctaggtggcggggtgccttactggttagcagaatgaatcaccgata 5107
 5108 cgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcggtttccggtttcgtaaagtctgaaaacgc 5207
 5208 ggaagtcagcgcctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggctaccctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgtggca 5307
 5308 ttgacctgagtgatTTTTctctggtcccgcgcacataccgccagttgTTTaccctcacaacgttccagtaaccgggcagttcatcatcagtaacc 5407
 5408 cgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcgggtatcattacccccatgaacagaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaacg 5507
 5508 cccttaacatggcccgctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgct 5607
 5608 tcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgctttcgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagct 5707
 5708 tgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttgccgggtgtcggggcgcagccatgaccagtcacgtagcgata 5807
 5808 gcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaa 5907

5908 taccgcatcagggcgtcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggctcggttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcgtaatac 6007

6008 ggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgctggcgTTTT 6107

6108 ccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgcagaggactataaagataccaggcgTTTTccccct 6207

6208 ggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcac 6307

6308 gctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccggttcagcccagccgctgcgccttatccgtaacta 6407

6408 tcgtcttgagtccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggggtgctacagag 6507

6508 ttcttgaagtggggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagct 6607

6608 cttgatccggcaaaacaaccaccgctggtagcgggtggTTTTTTTTgTTTgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgat 6707

6708 cttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaat 6807

6808 taaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtc 6907

6908 tatttcgttcatccatagttgctgactccccgctcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgaga 7007

7008 cccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagctc 7107

7108 attaattggtgccgggaagctagagtaagtagttcggcagttaatagtttgcgcaacgttggtgccattgctgcaggcatcgtggtgtcacgctcgctcgt 7207

7208 ttggtatggttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttgcaaaaaagcggttagctccttcggctcctccgat 7307

7308 cgtgtcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtg 7407
7408 actggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaacacgggataataccgcgccacatagca 7507
7508 gaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgc 7607
7608 acccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacgg 7707
7708 aaatggtgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaa 7807
7808 ataaacaaataggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtat 7907
7908 cacgaggccctttcgtcttcaagaa 7932

pBR322PL/Nur77pd/K7Ne

FseI ClaI SalI Séquence distale en amont du gène Nur77

1 ttagccggccatcgcgatgctcgacccgggagctgaaggaggcagttgtgattccagcagaggggaaggaggatgccccgtggcctgtggctgacactgcaact 100
101 gcagagagggtaggaattagctgaaggacctaccctagggtaacctggtaggctggccctgggtgtggggcctgactggatagcaactggtttgtatctg 200
201 cagtatgtagctcttctccctgcccttgggtgogtttgggcattcagctctagtttggacacacagctcccagaattactcattctctgttcttcccc 300
301 caccccctaccgcagtgagcagttgaacctgggtttagtcttaagagcaggacttgggtggctccactgagaggcttctgccaggctgggaccaggttggc 400
401 tccaggtctcccaaagcctgogtcaattatctacctgcttccatcctgcagagctctgggctagtggtgttgggcagcctctggcctgcaaggatgaagt 500
501 gtgggatgcccccaagtcctttatgcctttcttctgtctgtgctagggttcatgctccacattgggtggccctagctatggtccacagagggactctttc 600
601 tctgctcacacttccccagcagcagctgctgttctctgtccccctctagccttgaggcagcaagaacctttagtagtgtagtggtcaaggaggttg 700
701 cctgggtgagagtgctcttgggctgctctgctgcttaccctttagcttctccctcaggagaagtggctctgtgctacttttttgtgaaggcagaatg 800
801 gtgggaaagtggataatgctagaactcaggatggcacaccctgggaagacaggacctgcacctgcttctgctggagggaggaccgtcctggcttctg 900
901 ttgctggcatatthaaacacatcttgggagtagaggggaggtggggggctgggtggagagataaaatggggagccagatatgacataaccagagctaagg 1000
1001 ttatttgtccttttagagcaaaggcatccattctcatagaaacctgggtcctgtcttcaagtgtgtgtgtggggcataaatgatagtagtggttccata 1100
1101 ttaaaccaagggcccaagtaaaccttttgtgcaagggcccaaggaaagaaagatccaactatggatgatgtgggggtgggaggggtccaggatggctccagt 1200

1201 ggacatcatcctgtccacacttcttctcctaggtggctttttgtcctttggaaggtggcttggttaaagtccagagctatggactcagccgcaacgagact 1300

1301 acacgttagectgggggggggttctgctggttaactctgaacatatcaaccgaatgacatcagcagtgatgaaaactgttccgtatgcaggggacagtgat 1400

1401 taaaaagaaatagcaggctggttgggggggggtcttttgtggtgatgggatggactccaggttacaatgctaggcaagcaagaactctaccactgag 1500

1501 ctacgcccttagccatTTTTAAAAACGGTTATGGCCAGAATAGGCCGTCATTGGATAGTCTCGGTTAGTCTGCTGCACCTGGTGGGCTGGCAGCAGAAA 1600

1601 tcgggaaccaggggtgggtcaaggatgggatagagatactgcaaagagaatccctagtagggaaagctaaccactgaatctttctccataccccttc 1700

1701 ctttctttacctgactacaaatgaggttctttagcttagactgggatggagatgtgacctgcaggggtgacagctccaggtggctgcagcctggctg 1800

1801 cactttgagtacagccctggccagacccttccctgcaagcagtaactggttacagctgctctcttccactgctggagcaggtagtggggaggcaggtgggt 1900

1901 ccccatcagggactgggaccaggaattgacagaagagtgtgaaaaggagatggagttcgatggccctgggttcaagacccattgtgctactacctagc 2000

2001 ttagtgaccttgaacaagtaccattatgtctctgaatctatttataaaatggggaagagttggcaagagtttggaaagatttctcaggctccaccgggt 2100

2101 ctgaaattcggcaatttctcaactaggggtgcatccatcctgcgaggggttaagaggccatcgctgagaaaccagcatcgggtgtggagccgagcccgttga 2200

2201 ccagcctggcaagctatgcccttgggaaggaaacctgaaggccagagtgcctgtcctcagtcctggggctagagaccctgcacattgccaaggctga 2300

2301 ggcacgggcccagcccacctcctatcttctgggtgtgtccagaatggcttgccctcagccctgaactgcctggctgctcagaatggcagagagtgatac 2400

2401 cctaggtgtccaggacagactgggaaagggacaaaagcggagcagggcctggggtaggggtgggcaggaggagaggagctgttggcaccaggagcagc 2500

2501 tggaggggaggagatcctgttctgggaagccctgcgggcacggatttacaacaccccctcctcctggctcggttatttcggaccccgggacccgatccg 2600

2601 ggtccggttgggtgagcctagtggtctggaagcta**ctatatttagccggcgagcggggcagaggaaaactatttatagatcaacaatccgcgctccc** 2700

2701 **tgcggtcaatggaaccccgcggtcgcgtcacgcgcgcagacattccaggccccccctcttctgccccgccccctggggtccccggtccccgcgcctctctctgg** 2800
pCRM -62
2801 **ccgcctccccgcggaaccgcgcgccccccgcgccttgatatggccaaagctcgccgggcccgtgtgcgtcagtgggccccgccccctctccatgcgtca** 2900
Exon 1 du gène codant pour Nur77
2901 **cggagcgccttaagatgtgggtcgggctcgccaggggagccccagtgacaggaggctgcgaaagtgggggagtgctctagaaggactcgggagcggagcgc** 3000
3001 **acgccccgaccaggctgcgactgggtcgtgggtccccggccaagggagtgggagccccgctgggtaggtacccccgaggagcgtgtttctgtttctagggga** 3100
3101 **cagtgcataaaagagatggggtgtacgcgcgggcgaaaaggaagggtgttttcgggtcggcttacgaggaggggtgtgtaggggtgcatttttggtattaa** 3200
3201 **aggatagctcttgagtagggtagccagggttgaaagtttaggaagcgggcaagggtctgcaagggtgcttggttttgtaggtagtgggcgcttggtt** 3300
3301 **aggaggtttccccgctaggatctccagtgtaggcactctgtactctgggtttgggtgttgattgccgggtagggggtgtctgagcatggactgggaaa** 3400
3401 **aggtagctcagagcttcggcgttgctgggateccatccaagtacaagtaagattggatttcacgggtctctctccccgggctctcagcccccttccagtg** 3500
3501 **tttacttaataacttcataggtgtacttagattttctgattcccttacogaactttctttctgaaccgtgctggaagacctgggggttgctgaaggaaat** 3600
3601 **ggctagctaggttggtggtaaatggttggttagactaagttgtcagagtatctagaaacctaggagctgtagcctggtgcagctactgaaagccgcac** 3700
3701 **gtggagcctgggtggaagttgctcacgatagagtctcgatgtagtactgactagggggagacccttctgtcatcagacagacttgataccccagtg** 3800
3801 **tcttttgagtctgtaggtaggggtgcagcctgcgggcttggtcacctaacagggtgtgcccaggacctgccccagccgattctcccactccctctttca** 3900
3901 **acccgcctcttctctctcttgagacacccccacccccctcaggaggctagatgcagatctgtatcttggttgccgactatcggcctgaagctgggtag** 4000
4001 **attggtgggggtgatccggatgtaggatgtccaagtgagaaacaggatttgaatggagctggaacaaacgcccagtcctgactgggtgccacccttct** 4100

4101 tcctccacccccaaacctcccttcccaggcttcttgcaaacagaggcagaagtggccatattttctttcttccaggtgctgtatgccctagggact 4200

4201 tgacacggggcaggcggggtgggaactgggtgggggggggtgctgttttatgggaagtcgtatgcctagccagcgggtggagctgtcctggctagggacc 4300

4301 caggggtggtgtgggaatgggagaaatactgggactagagggtctcaagggccagcaggtggtgatagtccttttctccaccaccctctgctccagc 4400

4401 accctctgctcagcaccctctgctcagcaccctctgctcagcaccctctgctcagcaccctctgctcagcaccctctgctcagcaccctctgctc 4500

4501 ccagcaccctctgcccagcaccctctgctcagcaccctctgctcagcaccctctgctcagcaccctctgctcagcaccctctgctcagcaccct 4600

4601 ctgcctcagtggttctgtgtgacctgtcttttcaactagaaagtctagaactgtacagaccccagagttggaggtggaaagggacactaggtcctggagc 4700

4701 ctctctgtgggctttttgaccagatgagaacgtaagggcctcctccagctaccctgggtcattcaggtgcttcaggtttgtgacctttgctgagacc 4800

4801 tggatgctgcagcaaacagacatctgctttagcagagggacagcttgtctctgtgcatccgctggtaggatcctccactctgtccaattagcttggggct 4900

4901 gctgctgggttctgagtggttctcttacaataatgacaagggttaggggctggagagatggctcaggggctaagagcaccatgtggcagtttgcaactgtc 5000

5001 tgtaactcctgttccaggggggatctgacaccctcacacggacaaacatgcaggcaaacacctattggcatggaaaatgaaaataaatgaccgggttag 5100

5101 ctgagaaaattccttttgagagttgtcttttctccagtcagagactgctctctggatcttctctgctcagttcctcgcctcccttcaatatatggtattta 5200

MfeI Séquence proximale en amont du codon initiateur du gène de Nur77

5201 aggttttactttttttgcggtttt**caattg**tttttaattgtatttatatgtgtctctgtgtgtgcatgagcatgggtgtcctacaaggctagagacat 5300

5301 cagatgtcctggagctagagttacagatggttgtgagccacctgatgtagttgctgggaactggatttagttcctgtggaagagcagtgcatgctcttaa 5400

5401 ccactgagcaacttctccacccccccccccccccagtatcgggtattttaaactctatagcaatgctacccaaccattgtggagctggggatgggtga 5500

5501 ggtggcctagttcccccaactcctggaacatgtcagaaagtacagagtgggtgctgtgggatcagcatgcggggggtggtggtggtgaggtgtgggg 5600

6865 [REDACTED] 6939
34 A T F K A M A Y K E G T M L N C E C K R G F R R I 58

6940 [REDACTED] 7014
59 K S G S L Y M L C T G N S S H S S W D N Q C C Q C T 83

7015 [REDACTED] 7089
84 S S A T R N T T K Q V T P Q P E E Q K E R K T T E 108

7090 [REDACTED] 7164
109 M Q S P M Q P V D Q A S L P G H C R E P P P W E N 133

7165 [REDACTED] 7239
134 E A T E R I Y H F V V G Q M V Y Y Q C V Q G Y R A 158

7240 [REDACTED] 7314
159 L H R G P A E S V C K M T H G K T R W T Q P Q L I 183

7315 [REDACTED] 7389
184 C T G E E K P Q A S P E G R P E S E T S C L V T T 208

7390 [REDACTED] 7464
209 T D F Q I Q T E M A A T M E T S I F T T E Y Q V A 233

7465 [REDACTED] 7539
234 V A G C V F L L I S V L L L S G L T W Q R R Q R K 258

7540 [REDACTED] 7614
259 S R R T I G I E A A A R E A A A R G P V A T M V S 283

EcoRI (détruit) GAG GCT GCC GCA AGA GAG GCA GCT GCC AGG GGT CCG GTC GCC ACC
AgeI (détruit) AGG GGT CCG GTC GCC ACC
EGFP

7615 ██████████ 7689
 284 K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K F 308

7690 ██████████ 7764
 309 S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K 333

7765 ██████████ 7839
 334 L P V P W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H 358

7840 ██████████ 7914
 359 M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D 383

7915 ██████████ 7989
 384 D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G 408

7990 ██████████ 8064
 409 I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I 433

8065 ██████████ 8139
 434 M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q 458

8140 ██████████ 8214
 459 L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S 483

8215 ██████████ 8289
 484 T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A 508

NotI XbaI

8290 ██████████ agcggccgc 8377

509 G I T L G M D E L Y K *

520

NOJA

8378 ... 8477

SphI

8478 ... **catg** 8577

PacI

8578 **cttaattaac**cttggcagaacatatccatcgcgtccgccatctccagcagccgcacgcggcgcatctcgggcagcgttgggtcctggccacgggtgcgca 8677

8678 tgatcgtgctcctgtcgttgaggaccggttaggctggcggggtgccttactggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcgactg 8777

8778 ctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggctctcggtttccgtgtttcgtaaagtctgaaacgcggaagtacgcgcctgcaccatt 8877

8878 atgttccgatctgcatcgcaggatgctgctggctaccctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgtggcattgaccctgagtgatTTTTTctct 8977

8978 ggtcccgcgcacataccgccagttgtttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaaccggtatcgtgagcatcctctctcg 9077

9078 tttcatcggatcattacccccatgaacagaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaacggccttaacatggcccgctttatc 9177

9178 agaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagcttt 9277

9278 accgcagctgcctcgcgctttcgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggag 9377

9378 cagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttgccgggtgtcggggcgcagccatgaccagtcacgtagcगतagcggagtgtatactggcttaact 9477

9478 atcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcgggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcatcaggcgtcttccgc 9577

9578 ttcctcgtcactgactcgtcgcgtcggctcgttcggctgcccgcagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggat 9677

9678 aacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacg 9777

11178 ggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctggtgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctt 11277

11278 ttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggaataagggcgacacggaaatggtgaatactcactctt 11377

11378 cctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgc 11477

11478 acatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcaag 11577

11578 aa 11579

BIBLIOGRAPHIE

Adams, S., Campbell, R., Gross, L., Martin, B., Walkup, G., Yao, Y., Llopis, J., and Tsien, R. (2002). New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc* *124*, 6063-6076.

Alberola-Ila, J., Forbush, K., Seger, R., Krebs, E., and Perlmutter, R. (1995). Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* *373*, 620-623.

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

Alberola-Ila, J., Hogquist, K., Swan, K., Bevan, M., and Perlmutter, R. (1996). Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* *184*, 9-18.

Anderson, G., Jenkinson, W., Jones, T., Parnell, S., Kinsella, F., White, A., Pongrac'z, J., Rossi, S., and Jenkinson, E. (2006a). Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. *Immunol Rev* *209*, 10-27.

Anderson, G., Jenkinson, W.E., Jones, T., Parnell, S.M., Kinsella, F.A., White, A.J., Pongrac'z, J.E., Rossi, S.W., and Jenkinson, E.J. (2006b). Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. *Immunol Rev* *209*, 10-27.

Anderson, G., Owen, J.J., Moore, N.C., and Jenkinson, E.J. (1994). Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J Exp Med* *179*, 2027-2031.

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., and Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* *298*, 1395-1401.

Arkenbout, E., de Waard, V., van Bragt, M., van Achterberg, T., Grimbergen, J., Pichon, B., Pannekoek, H., and de Vries, C. (2002). Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherosclerosis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation* *106*, 1530-1535.

Ashton-Rickardt, P., Bandeira, A., Delaney, J., Van Kaer, L., Pircher, H., Zinkernagel, R., and Tonegawa, S. (1994). Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* *76*, 651-663.

Attal, J., Théron, M., Taboit, F., Cajero-Juarez, M., Kann, G., Bolifraud, P., and Houdebine, L. (1996). The RU5 ('R') region from human leukaemia viruses (HTLV-1) contains an internal ribosome entry site (IRES)-like sequence. *FEBS Lett* 392, 220-224.

Backstrom, B.T., Muller, U., Hausmann, B., and Palmer, E. (1998). Positive selection through a motif in the alphabeta T cell receptor. *Science* 281, 835-838.

Bajénoff, M., and Germain, R. (2007). Seeing is believing: a focus on the contribution of microscopic imaging to our understanding of immune system function. *Eur J Immunol* 37 *Suppl 1*, S18-33.

Baldwin, K.K., Trenchak, B.P., Altman, J.D., and Davis, M.M. (1999). Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J Immunol* 163, 689-698.

Baldwin, T.A., Sandau, M.M., Jameson, S.C., and 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., and 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.

Beermann, F., Ruppert, S., Hummler, E., and Schütz, G. (1991). Tyrosinase as a marker for transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 19, 958.

Benedict, C., Gilfillan, S., Thai, T., and Kearney, J. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunol Rev* 175, 150-157.

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

Bhakta, N.R., and Lewis, R.S. (2005). Real-time measurement of signaling and motility during T cell development in the thymus. *Semin Immunol* 17, 411-420.

Blab, G. (2001). Two-photon excitation action cross sections of the autofluorescent proteins. *Chemical Physics Letters* 350, 71-77.

Blackburn, C.C., and Manley, N.R. (2004). Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol* 4, 278-289.

Blackman, M., Kappler, J., and Marrack, P. (1990). The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248, 1335-1341.

- Blanchette, M., Bataille, A., Chen, X., Poitras, C., Laganière, J., Lefèbvre, C., Deblois, G., Giguère, V., Ferretti, V., Bergeron, D., Coulombe, B., and Robert, F. (2006). Genome-wide computational prediction of transcriptional regulatory modules reveals new insights into human gene expression. *Genome Res* 16, 656-668.
- Bolivar, F., Rodriguez, R., Greene, P., Betlach, M., Heynker, H., Boyer, H., Crosa, J., and Falkow, S. (1992). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. 1977. *Biotechnology* 24, 153-171.
- Bonta, P., Pols, T., and de Vries, C. (2007). NR4A nuclear receptors in atherosclerosis and vein-graft disease. *Trends Cardiovasc Med* 17, 105-111.
- Borman, A., Bailly, J., Girard, M., and Kean, K. (1995). Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro. *Nucleic Acids Res* 23, 3656-3663.
- Borman, A., Le Mercier, P., Girard, M., and Kean, K. (1997). Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res* 25, 925-932.
- Borowski, C., Li, X., Aifantis, I., Gounari, F., and von Boehmer, H. (2004). Pre-TCRalpha and TCRalpha are not interchangeable partners of TCRbeta during T lymphocyte development. *J Exp Med* 199, 607-615.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D., Tarlinton, D., Kay, T., Köntgen, F., Adams, J., and 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., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-926.
- Bousso, P. (2004). Real-time imaging of T-cell development. *Curr Opin Immunol* 16, 400-405.
- Bousso, P., Bhakta, N., Lewis, R., and Robey, E. (2002a). Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296, 1876-1880.
- Bousso, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S., and Robey, E. (2002b). Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296, 1876-1880.
- Bousso, P., and Robey, E.A. (2004). Dynamic behavior of T cells and thymocytes in lymphoid organs as revealed by two-photon microscopy. *Immunity* 21, 349-355.
- Cahalan, M., and Parker, I. (2006). Imaging the choreography of lymphocyte trafficking and the immune response. *Curr Opin Immunol* 18, 476-482.

Cahalan, M., Parker, I., Wei, S., and Miller, M. (2002). Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol* 2, 872-880.

Capone, M., Romagnoli, P., Beermann, F., MacDonald, H.R., and van Meerwijk, J.P. (2001). Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* 97, 1336-1342.

Chappell, S., Edelman, G., and Mauro, V. (2000). A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1536-1541.

Chappell, S., Edelman, G., and Mauro, V. (2004). Biochemical and functional analysis of a 9-nt RNA sequence that affects translation efficiency in eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9590-9594.

Chappell, S., and Mauro, V. (2003). The internal ribosome entry site (IRES) contained within the RNA-binding motif protein 3 (Rbm3) mRNA is composed of functionally distinct elements. *J Biol Chem* 278, 33793-33800.

Chappell, S., Owens, G., and Mauro, V. (2001). A 5' Leader of Rbm3, a Cold Stress-induced mRNA, Mediates Internal Initiation of Translation with Increased Efficiency under Conditions of Mild Hypothermia. *J Biol Chem* 276, 36917-36922.

Chen, W. (2004). The late stage of T cell development within mouse thymus. *Cell Mol Immunol* 1, 3-11.

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

Choi, E., Jung, K., Park, H., Chung, D., Song, J., Yang, S., Simpson, E., and Park, S. (2005). Thymocyte-thymocyte interaction for efficient positive selection and maturation of CD4 T cells. *Immunity* 23, 387-396.

Ciofani, M., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 463-493.

Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberón, X., Vichido, I., Blanco, A., Kupersztoch-Portnoy, Y., and Bolivar, F. (1981). Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene* 13, 25-35.

Crowe JS, C.H., Smith MA, Sims MJ, Parker D, Gewert D (1991). Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion. *Nucleic Acids Res* 19, 184.

- Daniels, M., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Holländer, G., Gascoigne, N., and Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444, 724-729.
- Dave, V., Cao, Z., Browne, C., Alarcon, B., Fernandez-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S., and Kappes, D. (1997). CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J* 16, 1360-1370.
- Davis, M. (2004). The evolutionary and structural 'logic' of antigen receptor diversity. *Semin Immunol* 16, 239-243.
- Denk, W., Strickler, J., and Webb, W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76.
- Dolmetsch, R., Lewis, R., Goodnow, C., and Healy, J. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386, 855-858.
- Dolmetsch, R., Xu, K., and Lewis, R. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933-936.
- Dower, N.A., Stang, S.L., Bottorff, D.A., Ebinu, J.O., Dickie, P., Ostergaard, H.L., and Stone, J.C. (2000). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 1, 317-321.
- Dresios, J., Chappell, S., Zhou, W., and Mauro, V. (2006). An mRNA-rRNA base-pairing mechanism for translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* 13, 30-34.
- Ferretti, V., Poitras, C., Bergeron, D., Coulombe, B., Robert, F., and Blanchette, M. (2007). PReMod: a database of genome-wide mammalian cis-regulatory module predictions. *Nucleic Acids Res* 35, D122-126.
- Fischer-Fantuzzi, L., and Vesco, C. (1988). Cell-dependent efficiency of reiterated nuclear signals in a mutant simian virus 40 oncoprotein targeted to the nucleus. *Mol Cell Biol* 8, 5495-5503.
- Gaietta, G., Deerinck, T., Adams, S., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D., Sosinsky, G., Tsien, R., and Ellisman, M. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503-507.
- Gerdes, H., Bukoreshtliev, N., and Barroso, J. (2007). Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* 581, 2194-2201.
- Germain, R., Miller, M., Dustin, M., and Nussenzweig, M. (2006). Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. *Nat Rev Immunol* 6, 497-507.

- Gilbert, F., Morissette, M., St-Hilaire, M., Paquet, B., Rouillard, C., Di Paolo, T., and Lévesque, D. (2006). Nur77 gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover. *Biol Psychiatry* *60*, 538-547.
- Godfrey, D., Kennedy, J., Mombaerts, P., Tonegawa, S., and Zlotnik, A. (1994). Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8-thymocyte differentiation. *J Immunol* *152*, 4783-4792.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* *150*, 4244-4252.
- Goldman, K., Park, C., Kim, M., Matzinger, P., and Anderson, C. (2005). Thymic cortical epithelium induces self tolerance. *Eur J Immunol* *35*, 709-717.
- Gong, Q., Cheng, A., Akk, A., Alberola-Ila, J., Gong, G., Pawson, T., and Chan, A. (2001). Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat Immunol* *2*, 29-36.
- Göppert-Mayer, M. (1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik* *401*, 273-294.
- Gounari, F., Aifantis, I., Martin, C., Fehling, H., Hoeflinger, S., Leder, P., von Boehmer, H., and Reizis, B. (2002). Tracing lymphopoiesis with the aid of a pTalpha-controlled reporter gene. *Nat Immunol* *3*, 489-496.
- Hare, K., Jenkinson, E., and Anderson, G. (1999). In vitro models of T cell development. *Semin Immunol* *11*, 3-12.
- Hartenbach, S., and Fussenegger, M. (2006). A novel synthetic mammalian promoter derived from an internal ribosome entry site. *Biotechnol Bioeng* *95*, 547-559.
- Hayden-Martinez, K., Kane, L., and Hedrick, S. (2000). Effects of a constitutively active form of calcineurin on T cell activation and thymic selection. *J Immunol* *165*, 3713-3721.
- Hogquist, K., Jameson, S., Heath, W., Howard, J., Bevan, M., and Carbone, F. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.
- Hogquist, K.A. (2001). Signal strength in thymic selection and lineage commitment. *Curr Opin Immunol* *13*, 225-231.
- Hsu, H., Zhou, T., and Mountz, J. (2004). Nur77 family of nuclear hormone receptors. Current drug targets *Inflammation and allergy* *3*, 413-423.

- Hutcheson, J., Scatizzi, J., Bickel, E., Brown, N., Bouillet, P., Strasser, A., and Perlman, H. (2005). Combined loss of proapoptotic genes Bak or Bax with Bim synergizes to cause defects in hematopoiesis and in thymocyte apoptosis. *J Exp Med* 201, 1949-1960.
- Jameson, S., Hogquist, K., and Bevan, M. (1994). Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* 369, 750-752.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2004). *Immunobiology*, Vol 1, 6th edn (Garland Science).
- Jensen, P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8, 1041-1048.
- Jordan, M., Schallhorn, A., and Wurm, F. (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24, 596-601.
- Kappler, J., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273-280.
- Kim, U., Shizuya, H., de Jong, P., Birren, B., and Simon, M. (1992). Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res* 20, 1083-1085.
- Kishimoto, H., Kubo, R., Yorifuji, H., Nakayama, T., Asano, Y., and Tada, T. (1995). Physical dissociation of the TCR-CD3 complex accompanies receptor ligation. *J Exp Med* 182, 1997-2006.
- Kishimoto, H., and Sprent, J. (1997). Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* 185, 263-271.
- Kuang, A., Cado, D., and Winoto, A. (1999). Nur77 transcription activity correlates with its apoptotic function in vivo. *Eur J Immunol* 29, 3722-3728.
- Lacorazza, H.D., Tucek-Szabo, C., Vasovic, L.V., Remus, K., and Nikolich-Zugich, J. (2001). Premature TCR alpha beta expression and signaling in early thymocytes impair thymocyte expansion and partially block their development. *J Immunol* 166, 3184-3193.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., and Robey, E.A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* 7, 338-343.
- Laufer, T.M., DeKoning, J., Markowitz, J.S., Lo, D., and Glimcher, L.H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383, 81-85.

- Lauzurica, P., Sancho, D., Torres, M., Albella, B., Marazuela, M., Merino, T., Bueren, J.A., Martinez, A.C., and Sanchez-Madrid, F. (2000). Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood* 95, 2312-2320.
- Lee, D., and Rao, A. (2004). Molecular analysis of a locus control region in the T helper 2 cytokine gene cluster: a target for STAT6 but not GATA3. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16010-16015.
- Lee, G., Fields, P., Griffin, T., and Flavell, R. (2003). Regulation of the Th2 cytokine locus by a locus control region. *Immunity* 19, 145-153.
- Lee, G., Spilianakis, C., and Flavell, R. (2005). Hypersensitive site 7 of the TH2 locus control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range intrachromosomal interactions. *Nat Immunol* 6, 42-48.
- Lewis, R. (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19, 497-521.
- Li, W., Kim, M., Gourley, T., McCarthy, B., Sant'Angelo, D., and Chang, C. (2005). An alternate pathway for CD4 T cell development: thymocyte-expressed MHC class II selects a distinct T cell population. *Immunity* 23, 375-386.
- Lind, E., Prockop, S., Porritt, H., and Petrie, H. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194, 127-134.
- Ling, J., and Hoffman, A. (2007). Epigenetics of long-range chromatin interactions. *Pediatr Res* 61, 11R-16R.
- Liu, Z., Smith, S., McLaughlin, K., Schwartz, L., and Osborne, B. (1994). Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur77*. *Nature* 367, 281-284.
- Love, P., and Shores, E. (2000). ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity* 12, 591-597.
- Mak, T. (2007). Gene targeting in embryonic stem cells scores a knockout in stockholm. *Cell* 131, 1027-1031.
- Martin, B.R., Giepmans, B.N., Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (2005). Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat Biotechnol* 23, 1308-1314.
- Martin, C., Aifantis, I., Scimone, M., von Andrian, U., Reizis, B., von Boehmer, H., and Gounari, F. (2003). Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat Immunol* 4, 866-873.

Martínez-González, J., and Badimon, L. (2005). The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res* 65, 609-618.

Mazza, C., and Malissen, B. (2007). What guides MHC-restricted TCR recognition? *Semin Immunol* 19, 225-235.

McCaughy, T.M., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2007). Thymic emigration revisited. *J Exp Med* 204, 2513-2520.

Merkenschlager, M., Graf, D., Lovatt, M., Bommhardt, U., Zamoyska, R., and Fisher, A. (1997). How many thymocytes audition for selection? *J Exp Med* 186, 1149-1158.

Mick, V.E., Starr, T.K., McCaughy, T.M., McNeil, L.K., and Hogquist, K.A. (2004). The regulated expression of a diverse set of genes during thymocyte positive selection in vivo. *J Immunol* 173, 5434-5444.

Misslitz, A., Bernhardt, G., and Förster, R. (2006). Trafficking on serpentines: molecular insight on how maturing T cells find their winding paths in the thymus. *Immunol Rev* 209, 115-128.

Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., and Hayakawa, T. (2000). IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 1, 376-382.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.

Mountford, P., and Smith, A. (1995). Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet* 11, 179-184.

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

Nakayama, T., Kasprovicz, D.J., Yamashita, M., Schubert, L.A., Gillard, G., Kimura, M., Didierlaurent, A., Koseki, H., and Ziegler, S.F. (2002). The generation of mature, single-positive thymocytes in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *J Immunol* 168, 87-94.

Nikolić-Zugić, J., and Bevan, M. (1990). Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire. *Nature* 344, 65-67.

Nitta, T., Nasreen, M., Seike, T., Goji, A., Ohigashi, I., Miyazaki, T., Ohta, T., Kanno, M., and Takahama, Y. (2006). IAN family critically regulates survival and development of T lymphocytes. *PLoS Biol* 4, e103.

- O'Gorman, S., Fox, D., and Wahl, G. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251, 1351-1355.
- Osoegawa, K., Tateno, M., Woon, P., Frengen, E., Mammoser, A., Catanese, J., Hayashizaki, Y., and de Jong, P. (2000). Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res* 10, 116-128.
- Oukka, M., Ho, I., de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M., and Glimcher, L. (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* 9, 295-304.
- Overbeek, P., Aguilar-Cordova, E., Hanten, G., Schaffner, D., Patel, P., Lebovitz, R., and Lieberman, M. (1991). Coinjection strategy for visual identification of transgenic mice. *Transgenic Res* 1, 31-37.
- Owens, G., Chappell, S., Mauro, V., and Edelman, G. (2001). Identification of two short internal ribosome entry sites selected from libraries of random oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1471-1476.
- Page, D.M., Kane, L.P., Allison, J.P., and Hedrick, S.M. (1993). Two signals are required for negative selection of CD4+CD8+ thymocytes. *J Immunol* 151, 1868-1880.
- Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 3, 383-391.
- Paulmurugan, R., and Gambhir, S. (2005). Novel fusion protein approach for efficient high-throughput screening of small molecule-mediating protein-protein interactions in cells and living animals. *Cancer Res* 65, 7413-7420.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.
- Petrie, H., Hugo, P., Scollay, R., and Shortman, K. (1990). Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro. *J Exp Med* 172, 1583-1588.
- Petrie, H.T. (2002). Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunol Rev* 189, 8-19.
- Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* 25, 649-679.
- Poirier, G.M., Anderson, G., Huvar, A., Wagaman, P.C., Shuttleworth, J., Jenkinson, E., Jackson, M.R., Peterson, P.A., and Erlander, M.G. (1999). Immune-associated nucleotide-1 (IAN-1) is a thymic selection marker and defines a novel gene family conserved in plants. *J Immunol* 163, 4960-4969.

Prockop, S., Palencia, S., Ryan, C., Gordon, K., Gray, D., and Petrie, H. (2002). Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. *J Immunol* *169*, 4354-4361.

Prockop, S., and Petrie, H. (2000). Cell migration and the anatomic control of thymocyte precursor differentiation. *Semin Immunol* *12*, 435-444.

Qian, F., Hanahan, D., and Weissman, I. (2001). L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* *98*, 3976-3981.

Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kampe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., and Peltonen, L. (2002). Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* *11*, 397-409.

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

Rossi, S., Jenkinson, W., Anderson, G., and Jenkinson, E. (2006). Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* *441*, 988-991.

Rudolph, M., Stanfield, R., and Wilson, I. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* *24*, 419-466.

Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., and Gerdes, H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* *303*, 1007-1010.

Sahai, E., Wyckoff, J., Philippar, U., Segall, J., Gertler, F., and Condeelis, J. (2005). Simultaneous imaging of GFP, CFP and collagen in tumors in vivo using multiphoton microscopy. *BMC Biotechnol* *5*, 14.

Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H., and von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* *266*, 1208-1212.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3.

Sancho, D., Gómez, M., and Sánchez-Madrid, F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* *26*, 136-140.

Sato, M., Watanabe, T., Oshida, A., Nagashima, A., Miyazaki, J., and Kimura, M. (2001). Usefulness of double gene construct for rapid identification of transgenic mice exhibiting tissue-specific gene expression. *Mol Reprod Dev* *60*, 446-456.

Schatz, D. (2004). Antigen receptor genes and the evolution of a recombinase. *Semin Immunol* 16, 245-256.

Schmitz, I., Clayton, L., and Reinherz, E. (2003). Gene expression analysis of thymocyte selection in vivo. *Int Immunol* 15, 1237-1248.

Scott, B., Bluthmann, H., Teh, H.S., and von Boehmer, H. (1989). The generation of mature T cells requires interaction of the alpha beta T-cell receptor with major histocompatibility antigens. *Nature* 338, 591-593.

Siggs, O., Makaroff, L., and Liston, A. (2006). The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol* 18, 175-183.

Singer, A. (2002). New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision. *Curr Opin Immunol* 14, 207-215.

Sohn, S., Rajpal, A., and Winoto, A. (2003). Apoptosis during lymphoid development. *Curr Opin Immunol* 15, 209-216.

Spain, L.M., and Berg, L.J. (1992). Developmental regulation of thymocyte susceptibility to deletion by "self"-peptide. *J Exp Med* 176, 213-223.

Spilianakis, C., and Flavell, R. (2004). Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat Immunol* 5, 1017-1027.

Spilianakis, C., Lalioti, M., Town, T., Lee, G., and Flavell, R. (2005). Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435, 637-645.

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

Steimle, V., Otten, L., Zufferey, M., and Mach, B. (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75, 135-146.

Steimle, V., Siegrist, C., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B., and Mach, B. (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265, 106-109.

Strasser, A., Puthalakath, H., O'Reilly, L., and Bouillet, P. (2007). What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain. *Immunol Cell Biol*.

Swan, K., Alberola-Ila, J., Gross, J., Appleby, M., Forbush, K., Thomas, J., and Perlmutter, R. (1995). Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *EMBO J* 14, 276-285.

Swat, W., Dessing, M., von Boehmer, H., and Kisielow, P. (1993). CD69 expression during selection and maturation of CD4+8+ thymocytes. *Eur J Immunol* 23, 739-746.

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

Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., and Arai, N. (1988). SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* 8, 466-472.

Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., and Santoni, A. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 15, 479-483.

Testi, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P., and Santoni, A. (1990). CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J Exp Med* 172, 701-707.

Trop, S., Rhodes, M., Wiest, D.L., Hugo, P., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2000). Competitive displacement of pT alpha by TCR-alpha during TCR assembly prevents surface coexpression of pre-TCR and alpha beta TCR. *J Immunol* 165, 5566-5572.

Tsien, R. (2005). Building and breeding molecules to spy on cells and tumors. *FEBS Lett* 579, 927-932.

Vagner, S., Galy, B., and Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2, 893-898.

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

Vernimmen, D., De Gobbi, M., Sloane-Stanley, J., Wood, W., and Higgs, D. (2007). Long-range chromosomal interactions regulate the timing of the transition between poised and active gene expression. *EMBO J* 26, 2041-2051.

von Boehmer, H., and Kisielow, P. (1990). Self-nonsel self discrimination by T cells. *Science* 248, 1369-1373.

von Boehmer, H., and Kisielow, P. (2006). Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur? *Immunol Rev* 209, 284-289.

Voyle, R., Beermann, F., Lees, R., Schümann, J., Zimmer, J., Held, W., and MacDonald, H. (2003). Ligand-dependent inhibition of CD1d-restricted NKT cell development in mice transgenic for the activating receptor Ly49D. *J Exp Med* 197, 919-925.

Wang, Y., Iyer, M., Annala, A., Chappell, S., Mauro, V., and Gambhir, S. (2005). Noninvasive monitoring of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals using improved bicistronic vectors. *J Nucl Med* 46, 667-674.

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

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

Williams, G., and Lau, L. (1993). Activation of the inducible orphan receptor gene *nur77* by serum growth factors: dissociation of immediate-early and delayed-early responses. *Mol Cell Biol* 13, 6124-6136.

Winoto, A., and Littman, D. (2002). Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell* 109 Suppl, S57-66.

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

Woronicz, J., Calnan, B., Ngo, V., and Winoto, A. (1994). Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367, 277-281.

Woronicz, J., Lina, A., Calnan, B., Szychowski, S., Cheng, L., and Winoto, A. (1995). Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 15, 6364-6376.

Yamashita, I., Nagata, T., Tada, T., and 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.

Yoon, J., and Lau, L. (1993). Transcriptional activation of the inducible nuclear receptor gene *nur77* by nerve growth factor and membrane depolarization in PC12 cells. *J Biol Chem* 268, 9148-9155.

Zhan, Y., Purton, J., Godfrey, D., Cole, T., Heath, W., and Lew, A. (2003). Without peripheral interference, thymic deletion is mediated in a cohort of double-positive cells without classical activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1197-1202.

Zhang, J., Yuge Wang, Guangsan Li, Yingyun Wei, Guofa Hu, Yu Shen & Miao Du (2001). Co-expression of multiple gene constructs in transgenic mice

Biotechnology Letters 23, 1249-1255.

Ziegler, S., Levin, S., Johnson, L., Copeland, N., Gilbert, D., Jenkins, N., Baker, E., Sutherland, G., Feldhaus, A., and Ramsdell, F. (1994a). The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. *J Immunol* 152, 1228-1236.

Ziegler, S.F., Ramsdell, F., and Alderson, M.R. (1994b). The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12, 456-465.

Zipfel, W., Williams, R., and Webb, W. (2003). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 21, 1369-1377.