

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

Adrien Six (adrien.six@upmc.fr)
Université Pierre et Marie Curie

IF-IIa
février 2010

IF2010 BMC423 IF-IIa

5

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

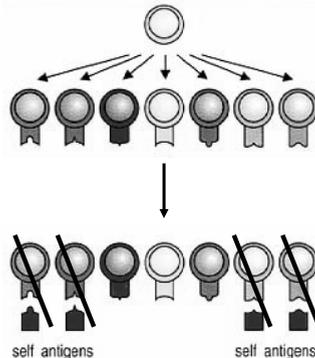
1. Introduction
2. Recombinaison V(D)J
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IIa

6

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

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

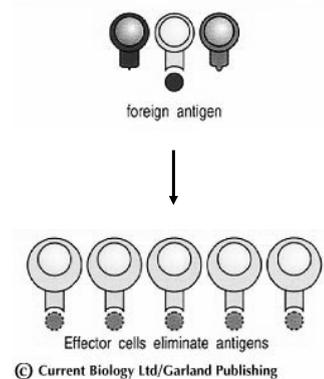


IF2010 BMC423 IF-IIa

8

Théorie de la sélection clonale (2)

- La liaison avec une bonne affinité d'une molécule étrangère et d'un récepteur entraîne l'activation du lymphocyte
- Les cellules effectrices différenciées à partir d'un lymphocyte activé donné expriment des récepteurs de même spécificité



IF2010 BMC423 IF-IIa

9

Un paradoxe génétique

- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
- ~25 000 gènes dans le génome humain
- Mais...
- Capacité de production d'une variété « infinie » d'Ig et de TCR (cf. Landsteiner)
- Constance des domaines constants vs. Diversité dans les domaines variables (cf. Edelman, 1969)
- Combien de gènes doit-on considérer ?

=> Théorie des réarrangements somatiques
La recombinaison V(D)J (Tonegawa, 1976)

IF2010 BMC423 IF-IIa

11

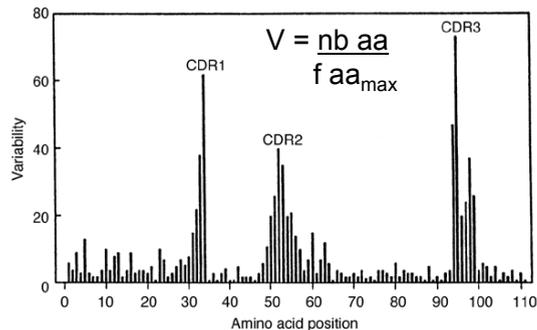
Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

1. Introduction
2. **Recombinaison V(D)J**
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IIa

12

Les régions hypervariables (1)

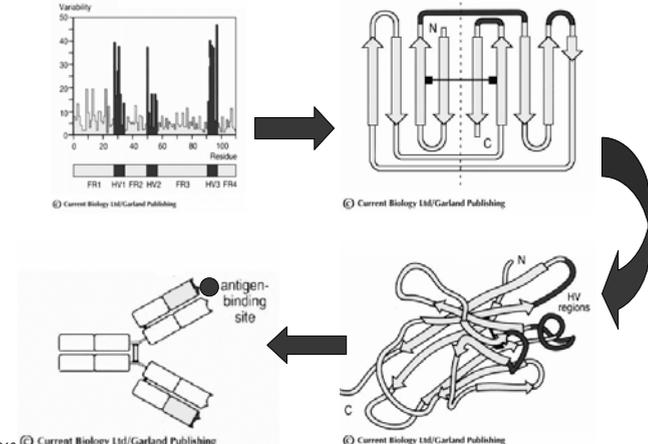


Si l'on aligne les séquences variables d'IgH ou IgL, on observe trois régions hypervariables dites régions «CDRs», qui forment le site de liaison à l'antigène...

IF2010 BMC423 IF-IIa

13

Les régions hypervariables (2)

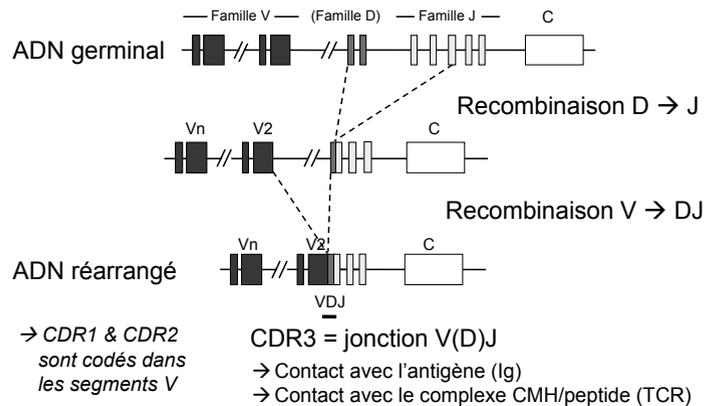


IF2010 © Current Biology Ltd/Garland Publishing

© Current Biology Ltd/Garland Publishing

14

Les régions variables sont créées pendant la recombinaison V(D)J



IF2010 BMC423 IF-IIa

16

Les régions CDR1, CDR2 & CDR3

Source of variation	CDR1	CDR2	CDR3
Sequence encoded by:	V segment	V segment	V _L -J _L junction; V _H -D _H -J _H junctions
Junctional flexibility	-	-	+
P-nucleotide addition	-	-	+
N-nucleotide addition*	-	-	+
Somatic hypermutation	+	+	+

*N-nucleotide addition occurs only in heavy-chain DNA.

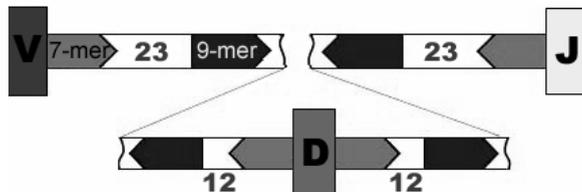
Table 5-3
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

IF2010 BMC423 IF-IIa

17

La recombinaison V(D)J (1)

- Nécessite l'expression des protéines RAG-1 et RAG-2
- Nécessité de l'ouverture/accessibilité de la chromatine pour la recombinaison
- Reconnaissance de RSS : heptamère-espaceur-nonamère suivant la règle 12/23

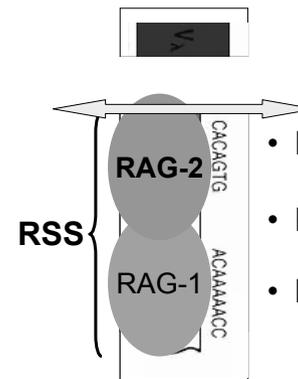


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

IF2010 BMC423 IF-IIa

18

Séquences signal de recombinaison

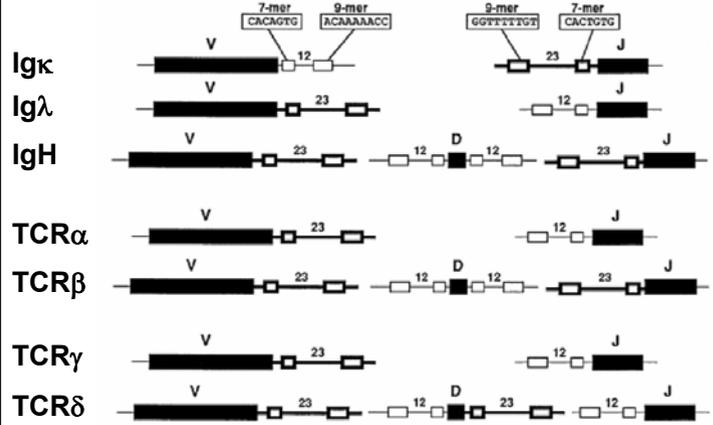


- Heptamère → CACA**G**TG
- Espaceur 12 ou 23
- Nonamère → ACAAAA**A**CC

IF2010 BMC423 IF-IIa

19

La règle 12/23 pour les Ig et TCR

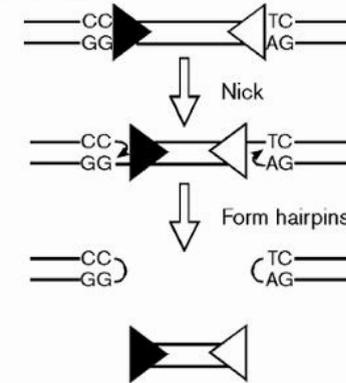


IF2010 BMC423 IF-IIa

20

La recombinaison V(D)J (2)

(a) Cleavage



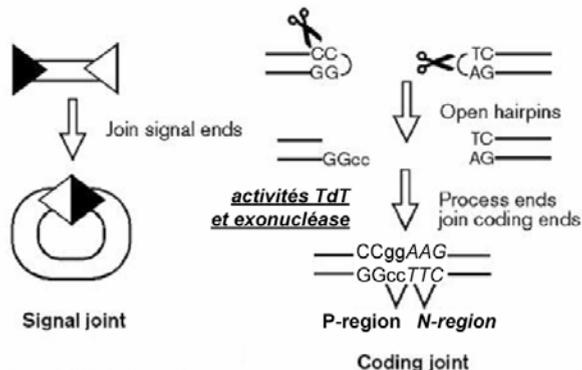
© 1996 Current Opinion in Immunology

IF2010 BMC423 IF-IIa

21

La recombinaison V(D)J (3)

(b) Joining



© 1996 Current Opinion in Immunology

IF2010 BMC423 IF-IIa

22

La recombinaison V(D)J (4)

Différentes protéines sont impliquées :

- RAG-1/RAG-2
- HMG1/2
- Ku70, Ku80, DNAPK, XRCC4, Ligase IV
- Artemis: hairpin/exonucléase → régions P
- TdT: polymérase → régions N

IF2010 BMC423 IF-IIa

23

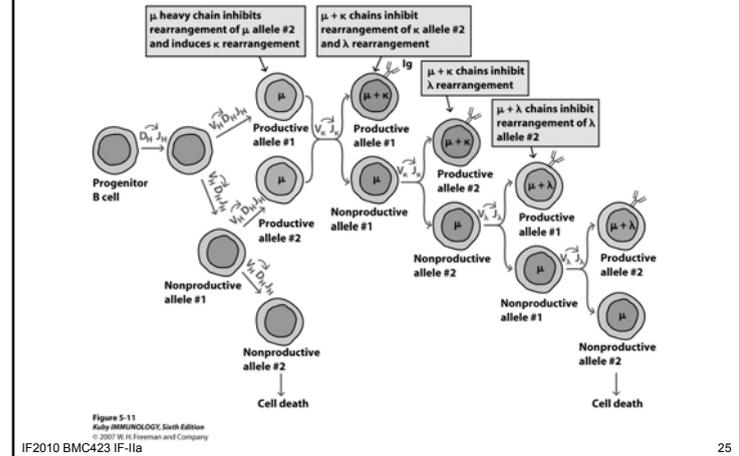
La recombinaison V(D)J (5)

Réarrangements en phase vs. hors phase :

- Parmi les réarrangements possibles impliquant les mêmes segments de gène V(D)J, 2/3 sont hors phase (-) et 1/3 sont en phase (+).

<i>Cys Ala ...V ></i>	N(D)N	<i>< J... Phe Gly</i>	
<i>TGT CGA CC</i>		<i>TCGC TTT GGT</i>	
<i>TGT CGA CC</i>	g aa	G CTT TGGT	-
<i>TGT CGA CC</i>	g gaa	GCT TTG GT	-
<i>TGT CGA CC</i>	g gaa g	GC TTT GGT	+
<i>TGT CGA CC</i>	g gaa gt	G CTT TGGT	-
<i>TGT CGA CC</i>	g gga agt	GCT TTG GT	-
<i>TGT CGA CC</i>	g gga agt t	GC TTT GGT	+

Réarrangements en série...

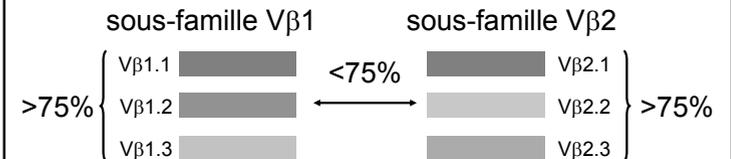


Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

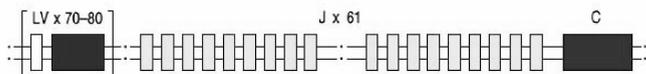
1. Introduction
2. Recombinaison V(D)J
3. **Organisation des locus TCR et Ig**
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

Sous-familles de gènes variables

- Deux segments de gène variables de chaîne de TCR ou d'immunoglobuline sont groupés dans une même sous-famille s'ils partagent au moins 75 % d'identité au niveau nucléique.



Organisation génomique du locus TCR α humain

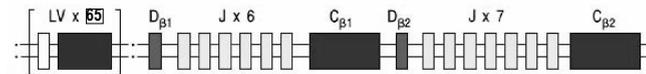


- Chromosome 14
- 1.1 Mb
- 50-60 V α groupés en 41 sous-familles
- 61 J α , un seul C α

IF2010 BMC423 IF-IIa

28

Organisation génomique du locus TCR β humain



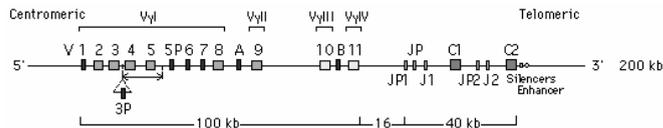
© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- Chromosome 7
- 685 kb
- 67 segments V β
- 30 sous-familles (1-9 membres)
- 2 D β , 13 J β , 2 C β , en deux répétitions

IF2010 BMC423 IF-IIa

29

Organisation génomique du locus TCR γ humain

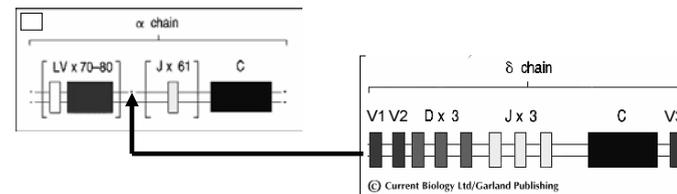


- Chromosome 7
- 14 V γ groupés en 4 sous-familles
- 5 J γ , 2 C γ , en deux répétitions
- Deux formes C γ 2 sans cystéine dans le peptide charnière → pas de pont disulfure avec la chaîne TCR δ

IF2010 BMC423 IF-IIa

30

Organisation génomique du locus TCR δ humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

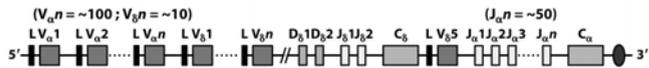
- Chromosome 14, inséré dans le locus TCR α
- 3 V δ principaux, 3 D δ , 3 J δ , un seul C δ
- Des V α sont utilisés par les chaînes TCR δ : V α / δ 14.1, V α / δ 23.1, V α / δ 29.1, V α / δ 36.1, V α / δ 38.2
- 2 ou 3 D δ souvent en tandem dans CDR3

IF2010 BMC423 IF-IIa

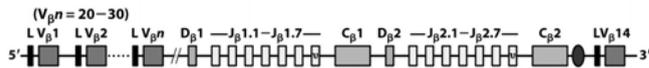
31

Organisation génomique des locus TCR chez la souris

Mouse TCR α -chain and δ -chain DNA (chromosome 14)



Mouse TCR β -chain DNA (chromosome 6)



Mouse TCR γ -chain DNA (chromosome 13)



● = Enhancer
 ψ = pseudogene

Figure 9-5
 Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

Organisation génomique du locus IgH humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- Chromosome 14
- 1,2 Mb
- ~80 VH (dont ~50 fonctionnels) groupés en 7 sous-familles
- 27 DH, 6 JH, 9 CH

Organisation génomique du locus Ig κ humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- Chromosome 2
- 1,8 Mb
- ~80 V κ (dont ~40 fonctionnels) groupés en 7 sous-familles
- V κ organisés en deux répétitions en miroir
- 5 J κ , un seul C κ

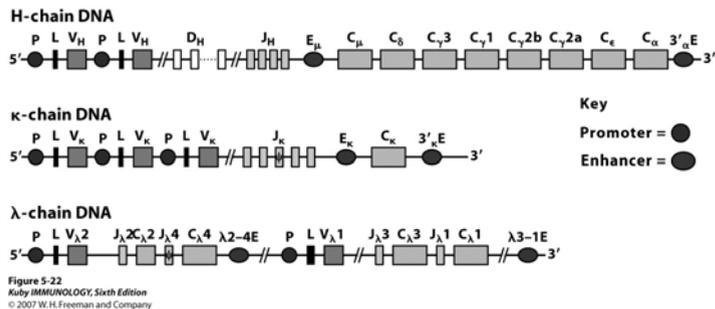
Organisation génomique du locus Ig λ humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- Chromosome 22
- 1 Mb
- ~70 V λ (dont ~30 fonctionnels) groupés en 11 sous-familles
- 7-11 clusters J-C λ (4-5 fonctionnels)

Organisation génomique des locus Ig chez la souris



IF2010 BMC423 IF-IIa

36

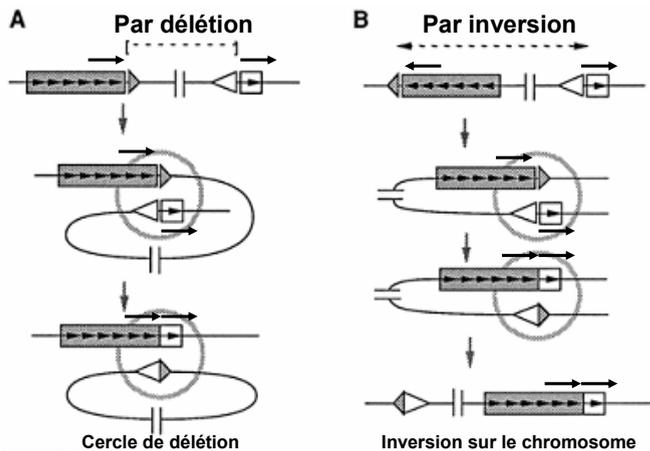
Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

1. Introduction
2. Recombinaison V(D)J
3. Organisation des locus TCR et Ig
- 4. Mécanismes de diversification**
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IIa

37

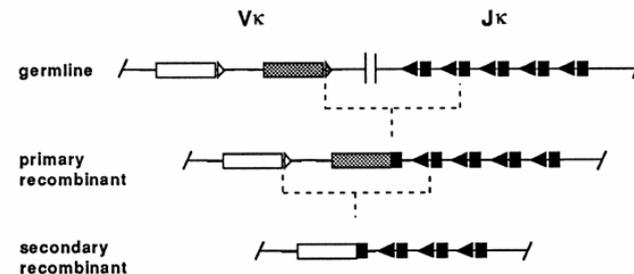
Différents types de réarrangements



IF2010 BMC423 IF-IIa

38

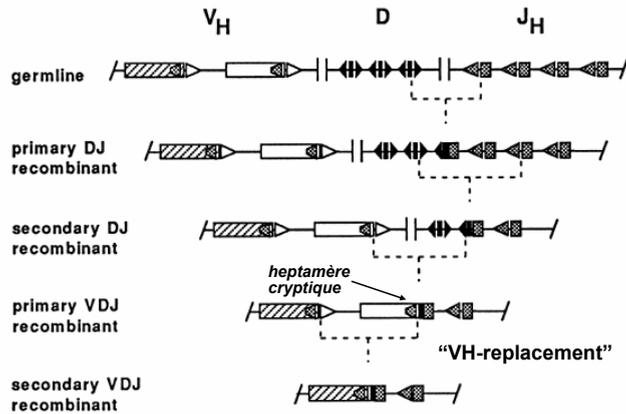
Réarrangements secondaires (1)



IF2010 BMC423 IF-IIa

39

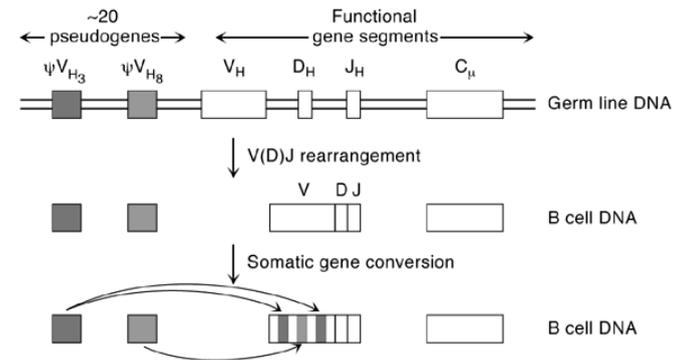
Réarrangements secondaires (2)



IF2010 BMC423 IF-IIa

40

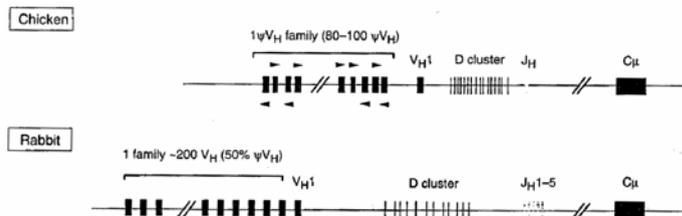
Conversion génique (1)



IF2010 BMC423 IF-IIa

41

Conversion génique (2)



IF2010 BMC423 IF-IIa

Weill and Reynaud (1987) *Science* 238:1094-1098

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

1. Introduction
2. Recombinaison V(D)J
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. **Différenciation lymphocytaire B et T**
6. Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IIa

53

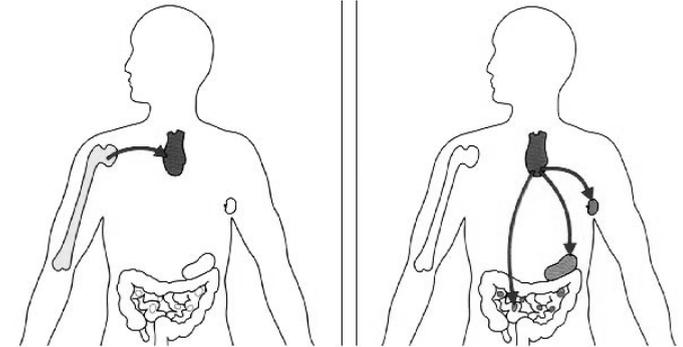
Questions

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

IF2010 BMC423 IF-IIa

54

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus

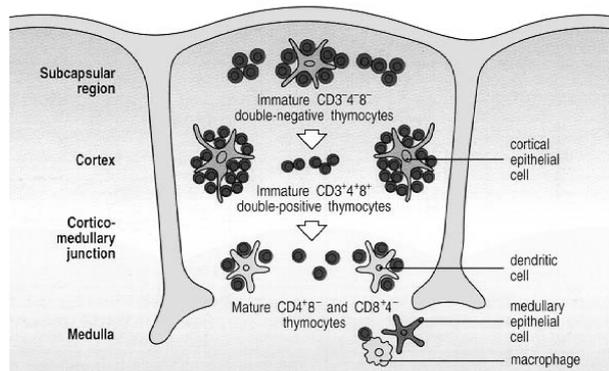


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

IF2010 BMC423 IF-IIa

55

Architecture cellulaire du thymus



IF2010 B. © Current Biology Ltd/Garland Publishing

57

Stades de différenciation des thymocytes

- Les différentes populations identifiées correspondent à des stades de différenciation des thymocytes
 - Chaque stade peut-être critique pour:
 - les réarrangements du TCR
 - la restriction par le CMH
 - la sélection positive ou négative
- notion de *points de contrôle (checkpoint)*

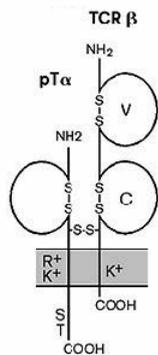
IF2010 BMC423 IF-IIa

58

Identification du pré-TCR

- Lors de stades précoces de différenciation, la chaîne TCR β est trouvée en surface sans la chaîne TCR α .

=> identification de la chaîne pT α



IF2010 BMC423 IF-IIa

D'après Borst *et al.* (1996) *Curr. Op. Immunol.* 8:181-199

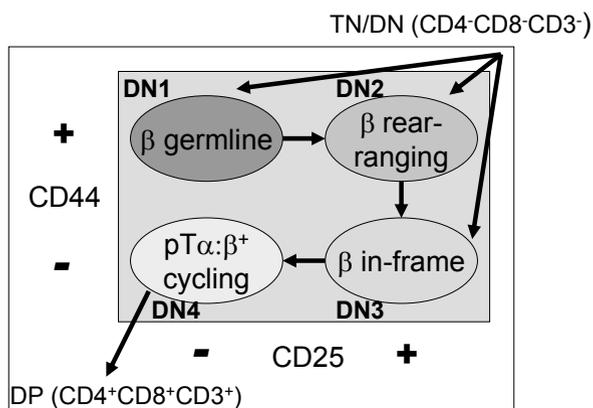
Rôle critique du pré-TCR

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

IF2010 BMC423 IF-IIa

60

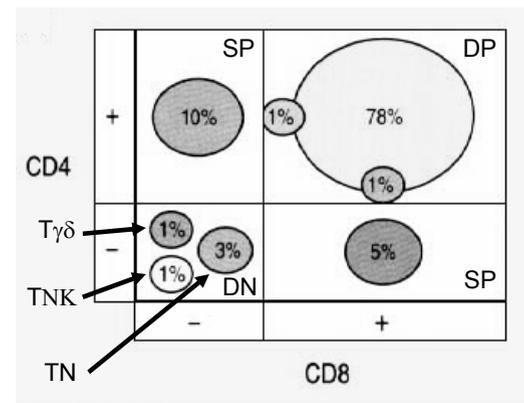
Différenciation des thymocytes (1)



IF2010 BMC423 IF-IIa

61

Différenciation des thymocytes (2)

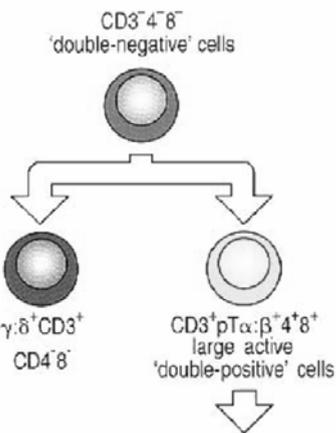


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

IF2010 BMC423 IF-IIa

62

Différenciation des thymocytes (3)



Engagement
CD3 cytoplasmique

Réarrangements β, γ, δ
pT α cytoplasmique
Engagement $\alpha\beta/\gamma\delta$

Expression CD4/CD8
Exclusion allélique β
Prolifération
Réarrangement TCR α

IF2010 BMC423 IF-IIa

65

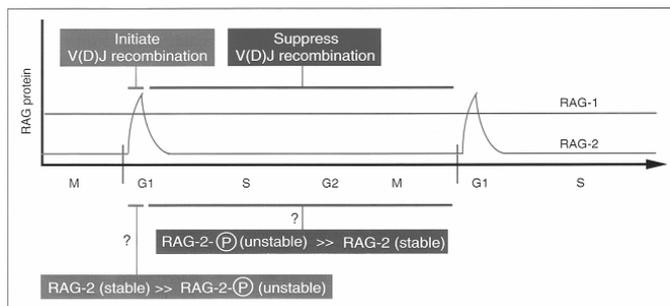
Exclusion allélique

- Un réarrangement TCR β productif sur un locus TCR β entraîne l'arrêt de la recombinaison V(D)J sur l'autre locus
- une seule chaîne TCR β par cellule T, en accord avec la théorie de sélection clonale

IF2010 BMC423 IF-IIa

66

Régulation de l'expression de RAG



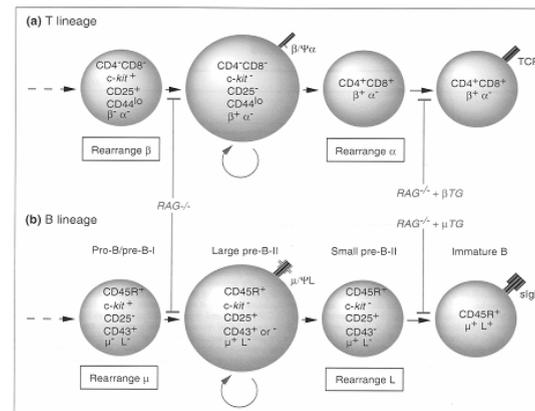
Au cours du cycle cellulaire:

- l'expression de RAG-1 est constante
- l'expression de RAG-2 active est limitée à la phase G1

IF2010 BMC423 IF-IIa

Lin and Desiderio (1995) *Immunol. Today* 16:279-289, 67

Régulation de la recombinaison V(D)J



IF2010 BMC423 IF-IIa

Lin and Desiderio (1995) *Immunol. Today* 16:279-289, 68

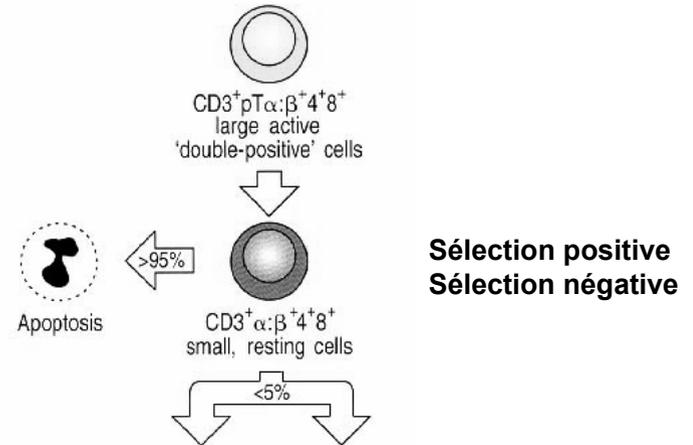
Régulation des réarrangements

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

IF2010 BMC423 IF-IIa

69

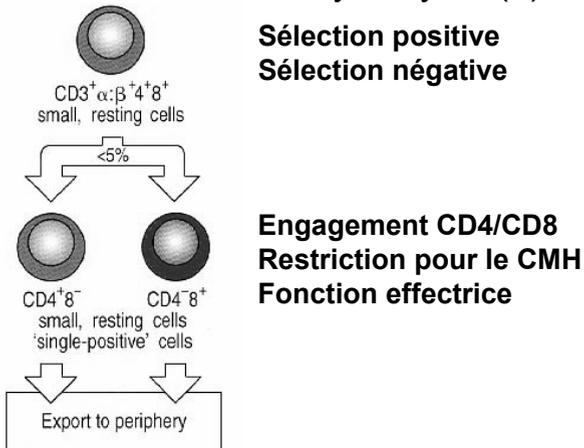
Différenciation des thymocytes (4)



IF2010 BMC423 IF-IIa

70

Différenciation des thymocytes (5)



IF2010 BMC4 © Current Biology Ltd/Garland Publishing

71

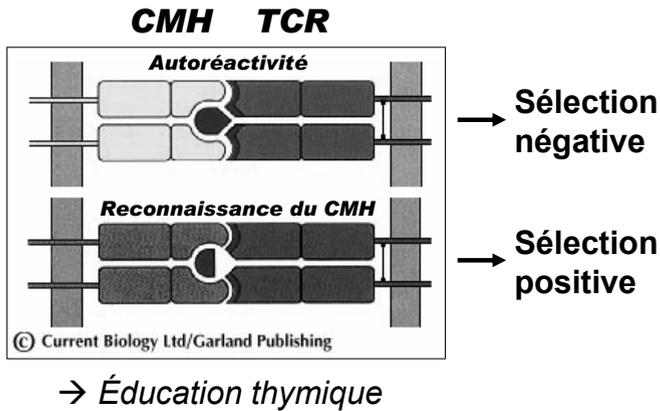
Sélections positive et négative (1)

- Sélection positive: le TCR doit avoir une certaine réactivité avec une molécule du CMH du soi
- L'expression du co-récepteur CD4/CD8 suit la restriction pour le CMH \rightarrow CD4/classe II et CD8/classe I
- Sélection négative: les cellules T autoréactives (reconnaissant CMH +.peptide du soi) sont éliminées

IF2010 BMC423 IF-IIa

72

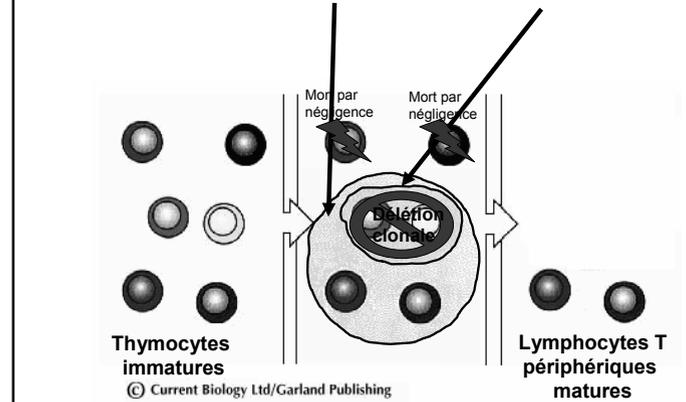
Sélections positive et négative (2)



IF2010 BMC423 IF-IIa

73

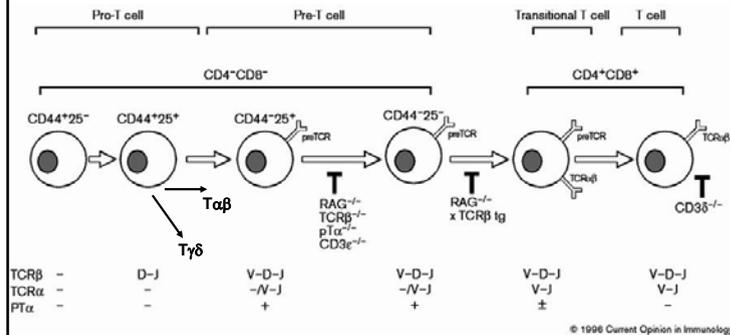
Sélections positive et négative (3)



IF2010 BMC423 IF-IIa

74

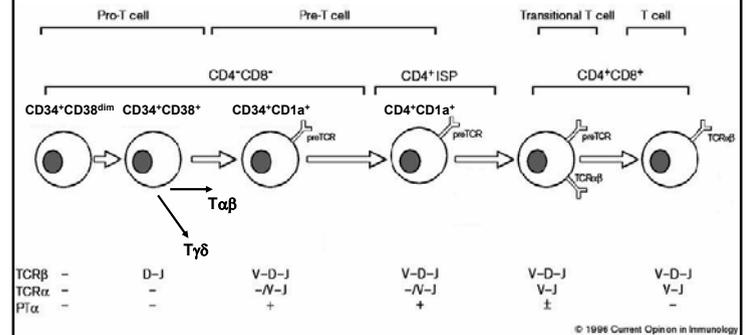
Différenciation thymique: souris



IF2010 BMC423 IF-IIa

D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-190₁

Différenciation thymique: homme



IF2010 BMC423 IF-IIa

D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-190₆

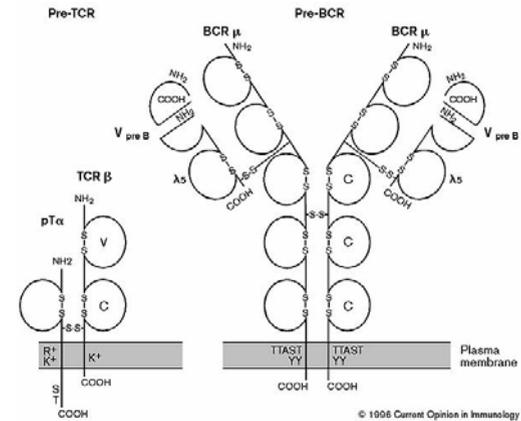
Développement T chez l'homme (2)

- Dès huit semaines de gestation, on observe la synthèse de chaînes TCRβ en même temps que la colonisation du thymus par des précurseurs T
- Les premières cellules γδ et αβ apparaissent en même temps
- Le répertoire T est en place dès la fin du premier trimestre de gestation

IF2010 BMC423 IF-IIa

87

Caractérisation du pré-BCR



IF2010 BMC423 IF-IIa

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

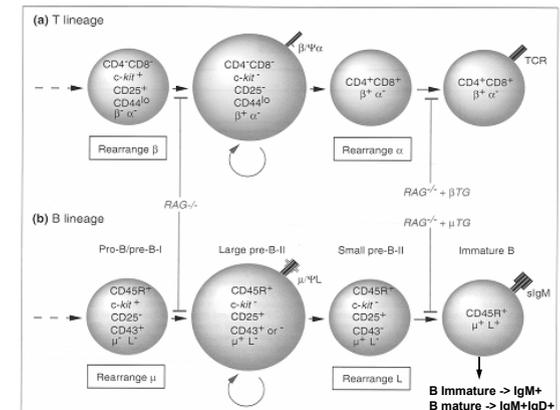
Rôle du pré-BCR

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

IF2010 BMC423 IF-IIa

90

Différenciation des lymphocytes B



IF2010 BMC423 IF-IIa

Lin and Desiderio (1995) Immunol. Today 16:279-289, 91

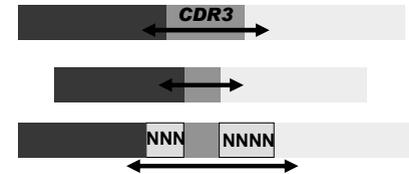
Conclusion

IF2010 BMC423 IF-IIa

93

Diversité des chaînes Ig et TCR

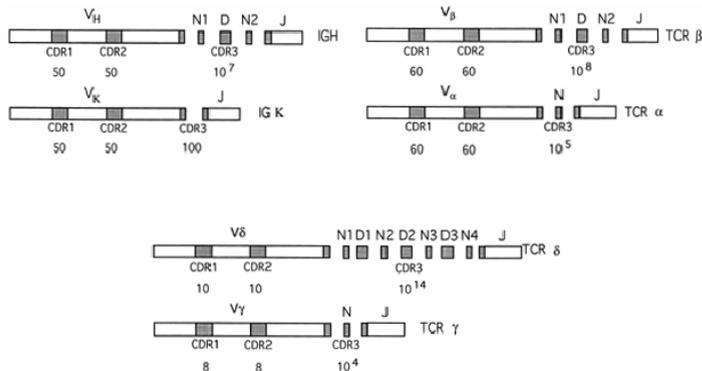
- La diversité des chaînes d'Ig et de TCR est le produit de :
 - Combinatoire des segments V(D)J
 - Appariement IgH/L, TCR α / β or TCR γ / δ
 - Ajout/élimination aléatoire de nucléotides à la jonction des segments géniques (CDR3)



IF2010 BMC423 IF-IIa

94

Diversité jonctionnelle CDR3 : une stratégie générale



IF2010 BMC423 IF-IIa

95

Estimation de la diversité (1)

N-region nucleotide addition

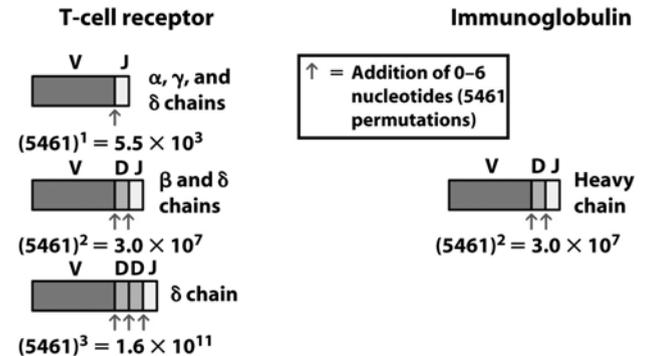


Figure 9-8d
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

IF2010 BMC423 IF-IIa

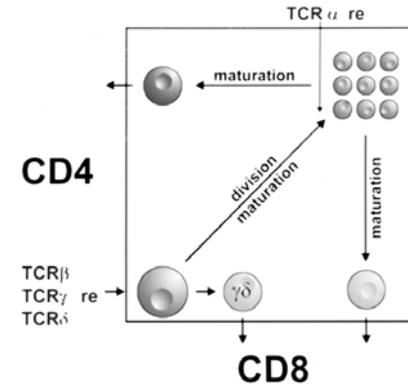
97

Estimation de la diversité (2)

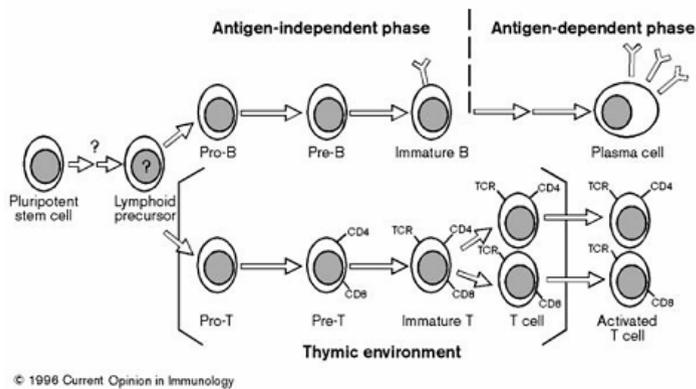
Mechanism of diversity	IMMUNOGLOBULINS		αβ T-CELL RECEPTOR		γδ T-CELL RECEPTOR	
	H Chain	κ Chain	α Chain	β Chain	γ Chain	δ Chain
ESTIMATED NUMBER OF FUNCTIONAL GENE SEGMENTS*						
V	101	85	79	21	7	6
D	13	0	0	2	0	2
J	4	4	38	11	3	2
POSSIBLE NUMBER OF COMBINATIONS*						
Combinatorial V-J	$101 \times 13 \times 4$	85×4	79×38	$21 \times 2 \times 11$	7×3	$6 \times 2 \times 2$
and V-D-J joining	5.3×10^3	3.4×10^2	3.0×10^3	4.6×10^2	21	24
Alternative joining of D gene segments	-	-	-	(some)	-	(often)
Junctional flexibility	+	+	+	+	+	+
N-region nucleotide addition [†]	+	~10 ¹²	+	~10 ¹⁵	+	~10 ¹⁸
P-region nucleotide addition	+	+	+	+	+	+
Somatic mutation	+	+	-	-	-	-
Combinatorial association of chains	+	+	+	+	+	+

*Immunoglobulin data from Table 5-3; TCR data from Baum et al., 2004, *Nucleic Acids Research* 32:D51.
[†]A plus sign (+) indicates mechanism makes a significant contribution to diversity but to an unknown extent.
 A minus sign (-) indicates mechanism does not operate.
[‡]See Figure 9-8d for theoretical number of combinations generated by N-region addition.

Rappel différenciation T



Parallèle différenciations B et T



Mise en place des répertoires

