

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

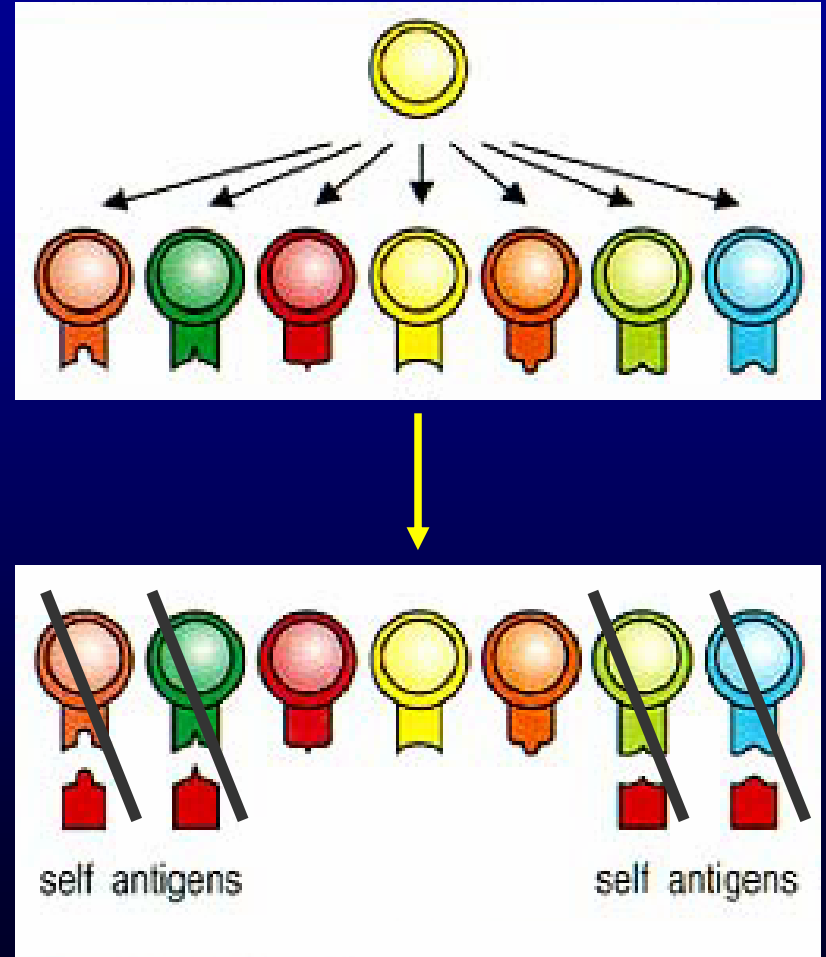
Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

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

Théorie de la sélection clonale (1)

Burnet (1899–1985)

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

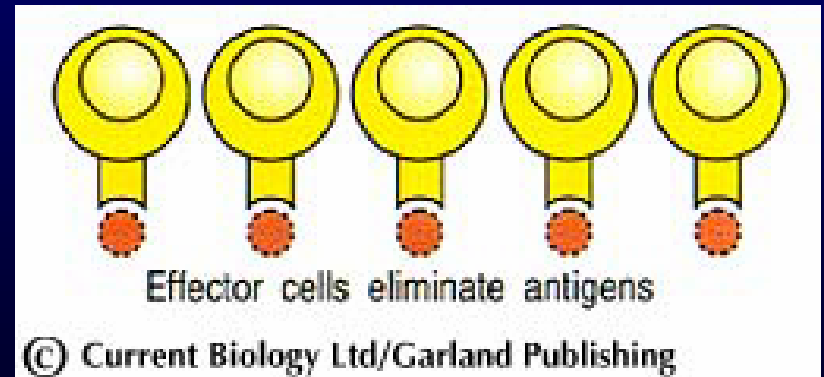


Théorie de la sélection clonale (2)

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



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



Un paradoxe génétique

- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
- ~25 000 gènes dans le génome humain

Mais...

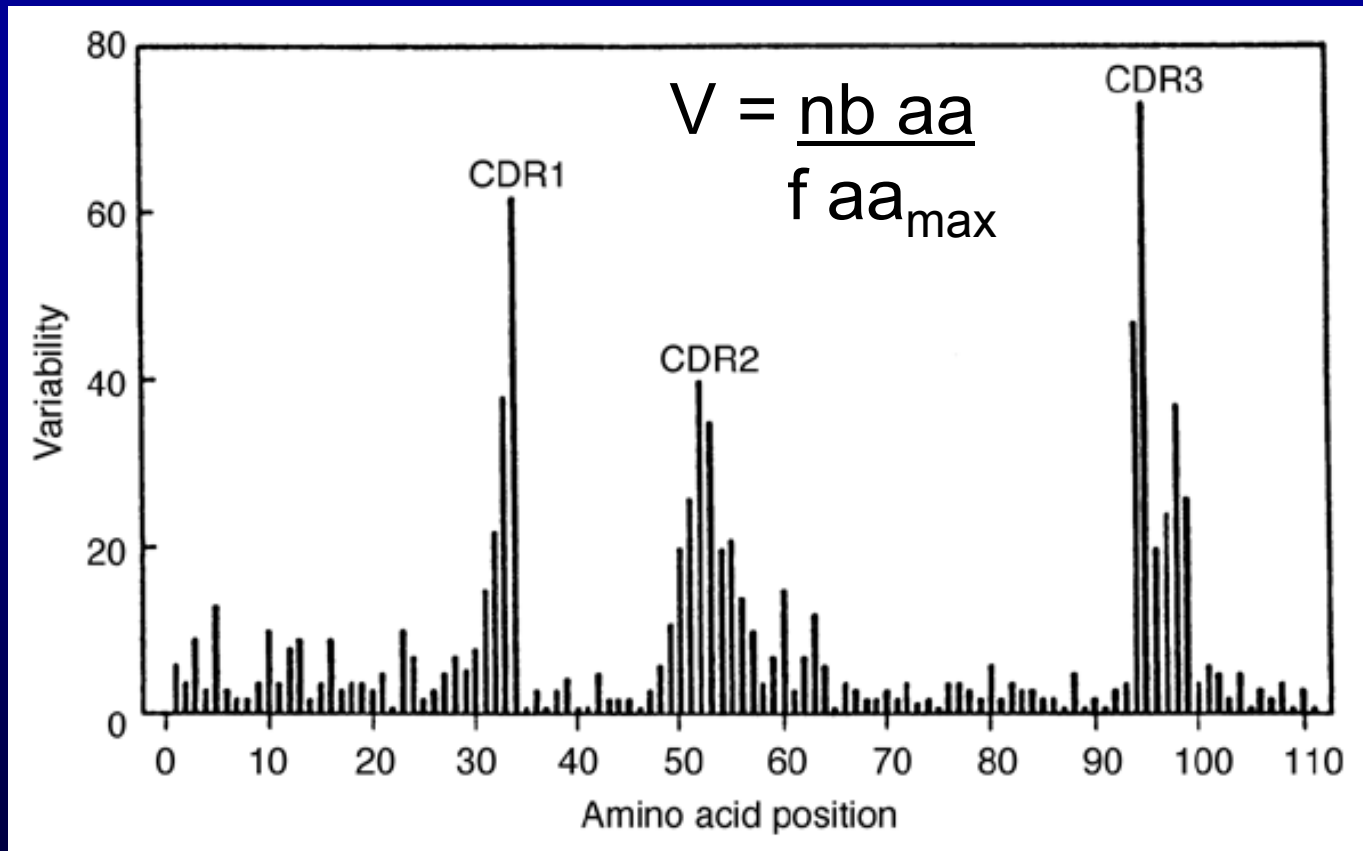
- Capacité de production d'une variété « infinie » d'Ig et de TCR (cf. Landsteiner)
- Constance des domaines constants vs. Diversité dans les domaines variables (cf. Edelman, 1969)
- Combien de gènes doit-on considérer ?

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

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

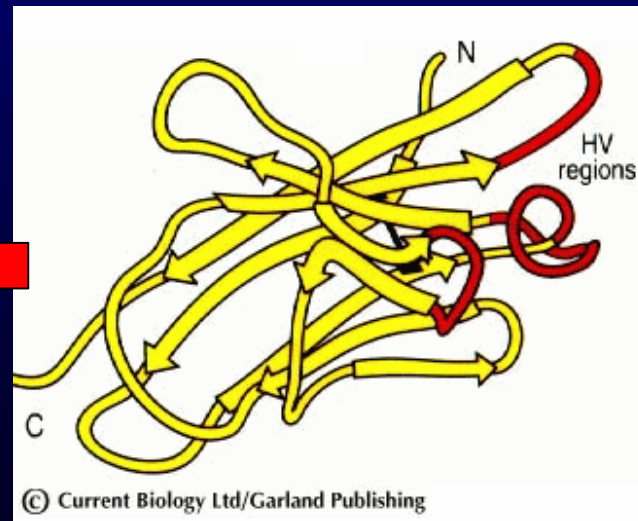
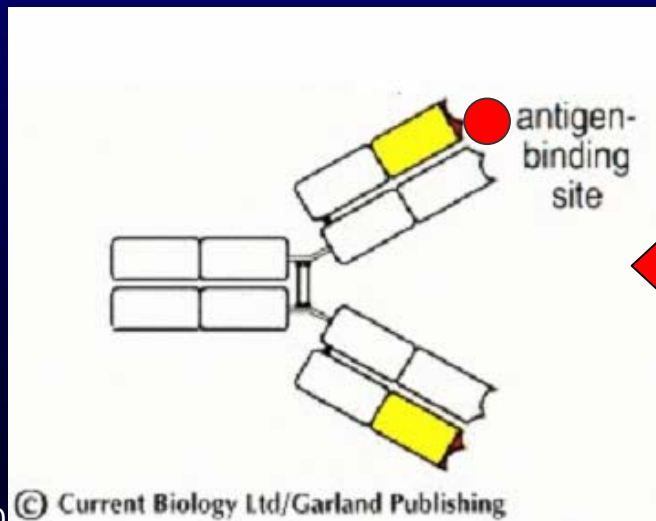
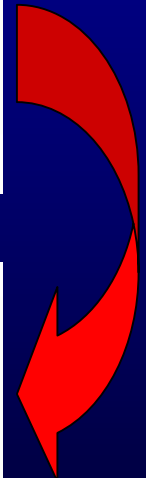
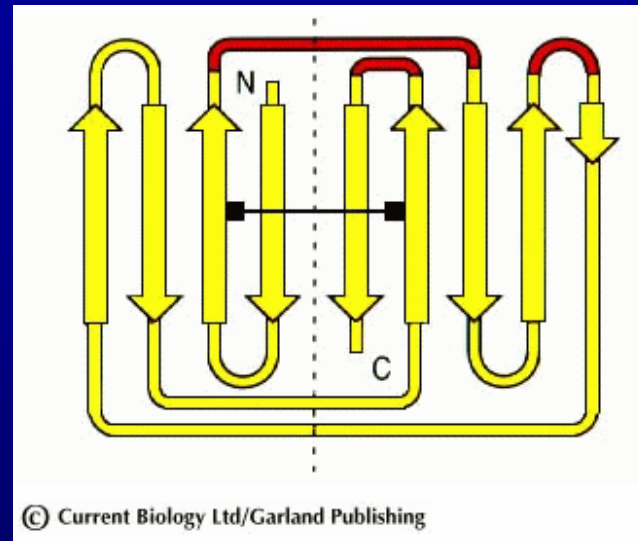
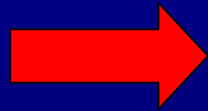
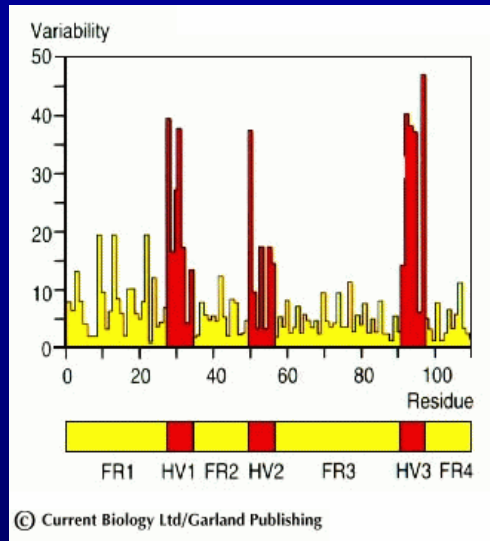
1. Introduction
- 2. Recombinaison V(D)J**
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

Les régions hypervariables (1)

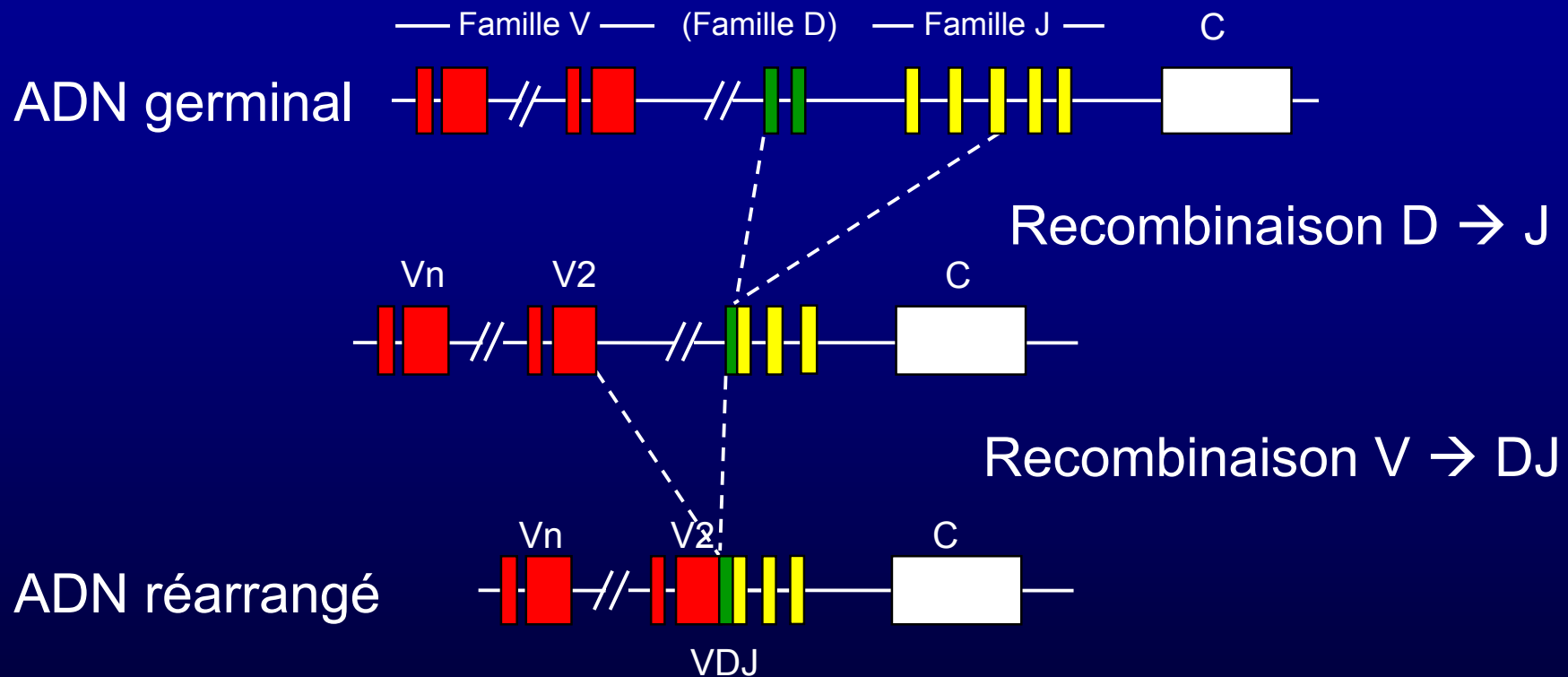


Si l'on aligne les séquences variables d'IgH ou IgL, on observe trois régions hypervariables dites régions «CDRs», qui forment le site de liaison à l'antigène...

Les régions hypervariables (2)



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



→ CDR1 & CDR2
sont codés dans
les segments V

CDR3 = jonction V(D)J

→ Contact avec l'antigène (Ig)

→ Contact avec le complexe CMH/peptide (TCR)

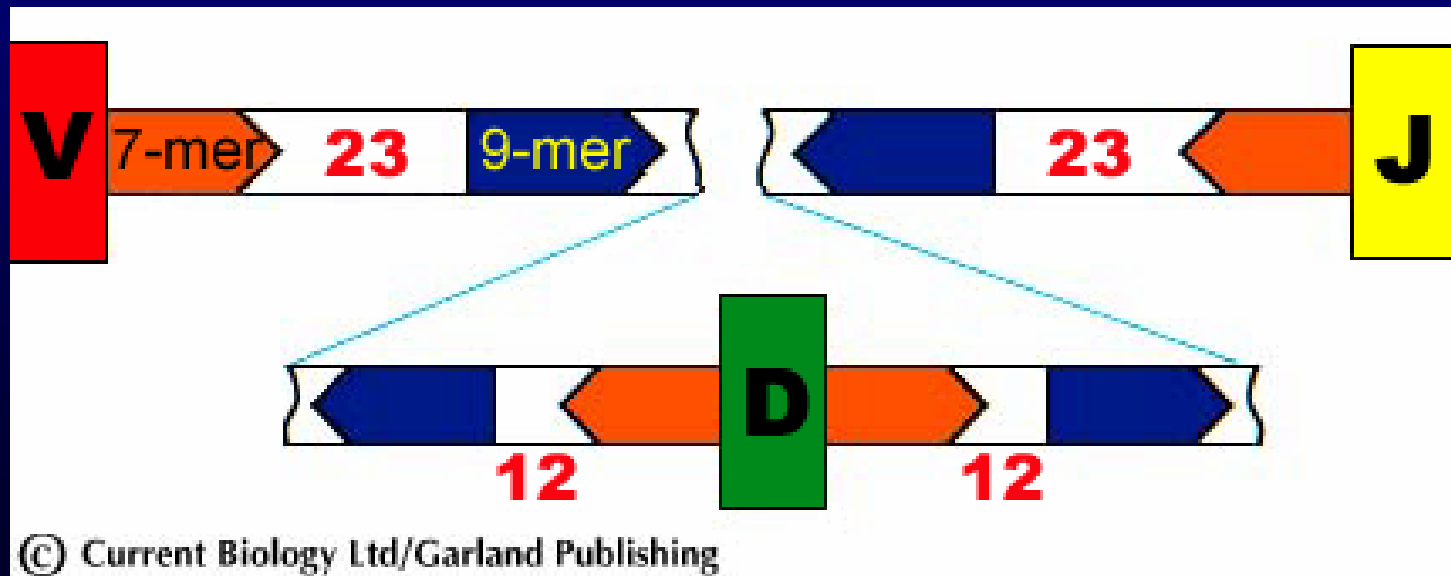
Les régions CDR1, CDR2 & CDR3

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.			

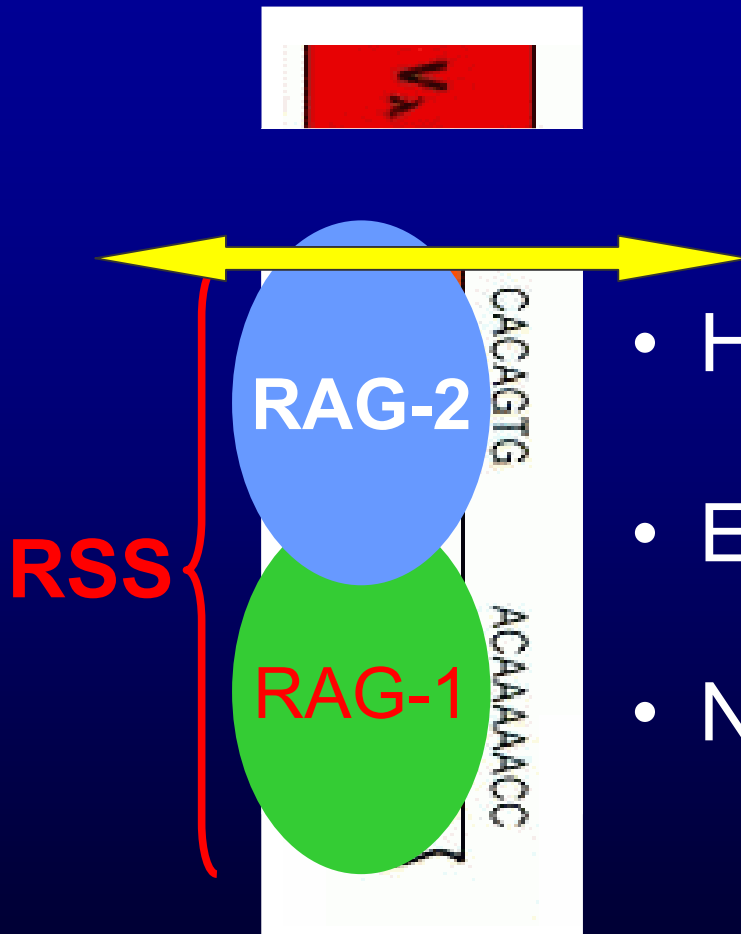
Table 5-3
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

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



Séquences signal de recombinaison



- Heptamère → **CACAGTG**
- Espaceur 12 ou 23
- Nonamère → ACAATA**AA**CC

La règle 12/23 pour les Ig et TCR

Ig κ

Ig λ

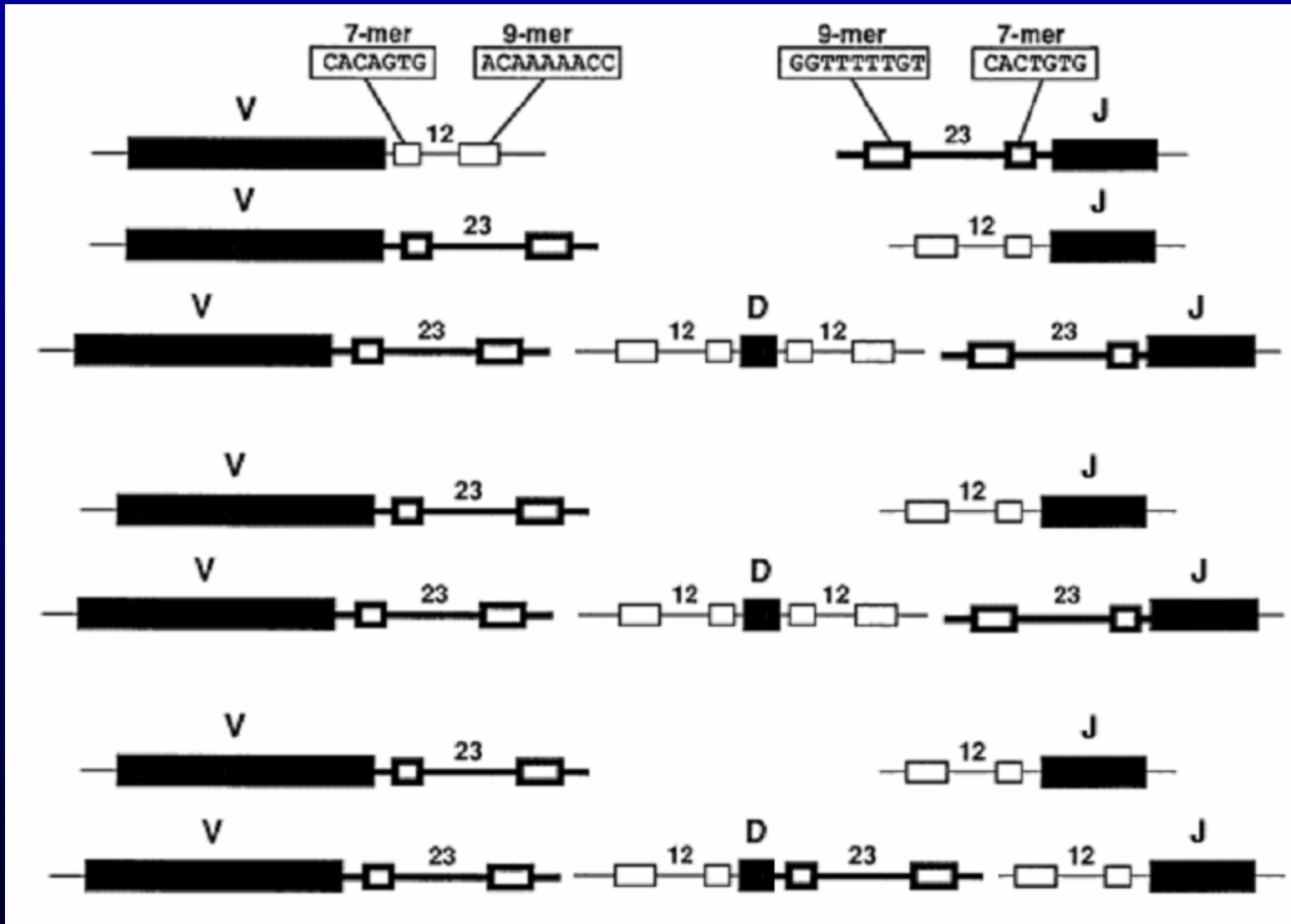
IgH

TCR α

TCR β

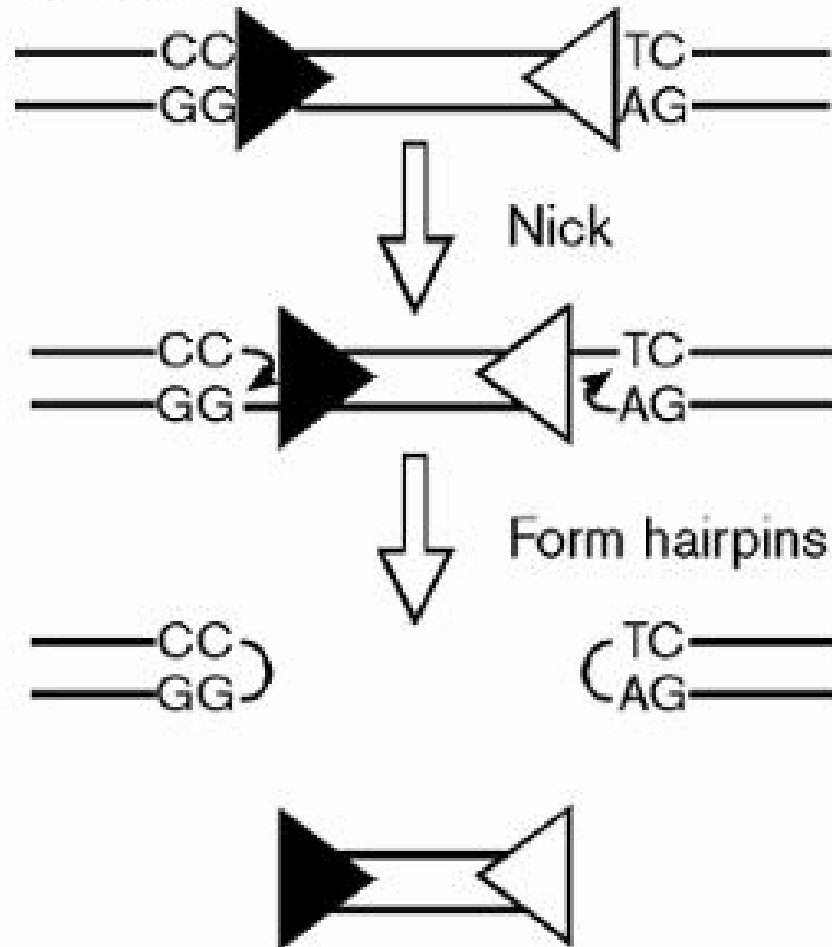
TCR γ

TCR δ



La recombinaison V(D)J (2)

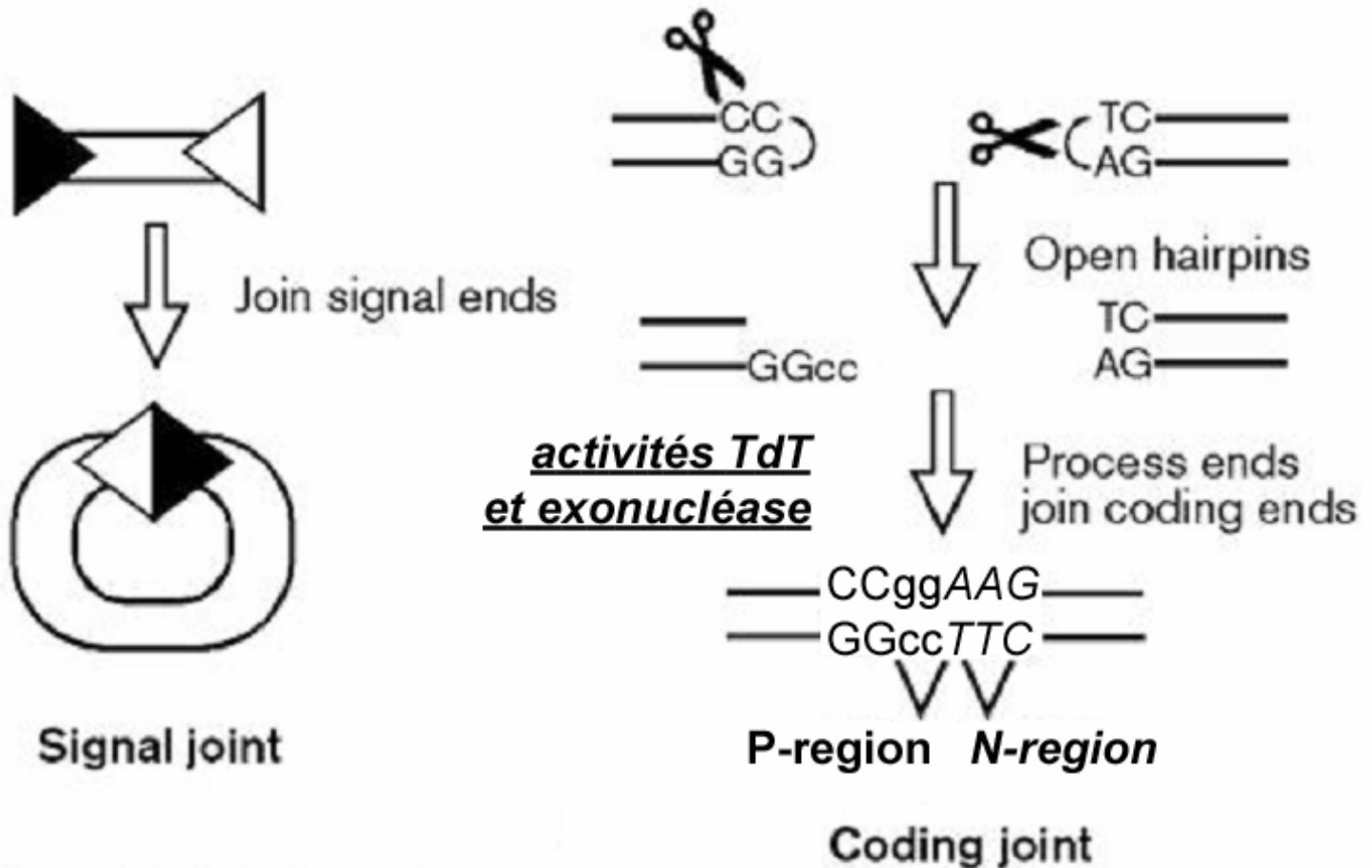
(a) Cleavage



© 1996 Current Opinion in Immunology

La recombinaison V(D)J (3)

(b) Joining



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

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

Réarrangements en série...

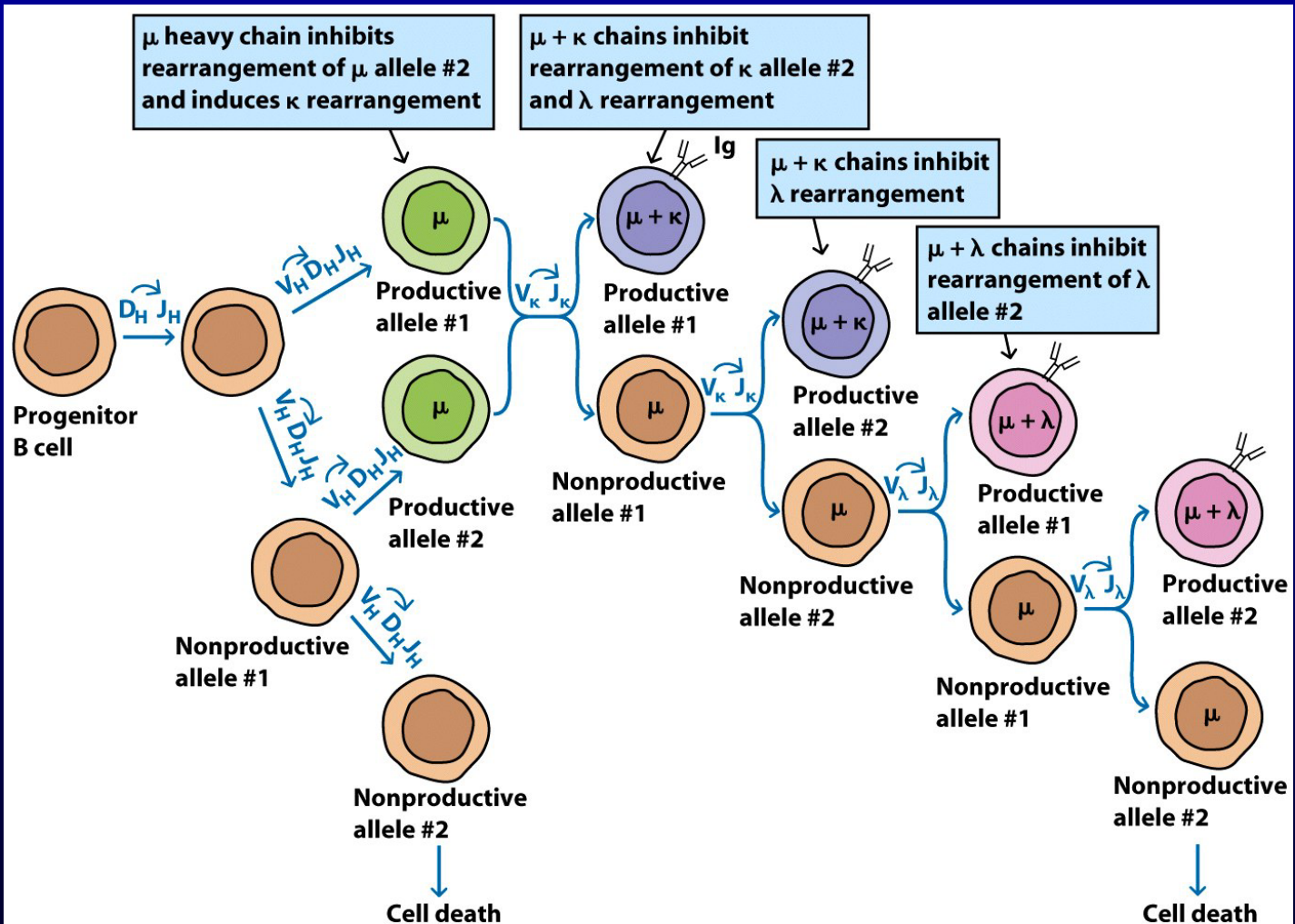


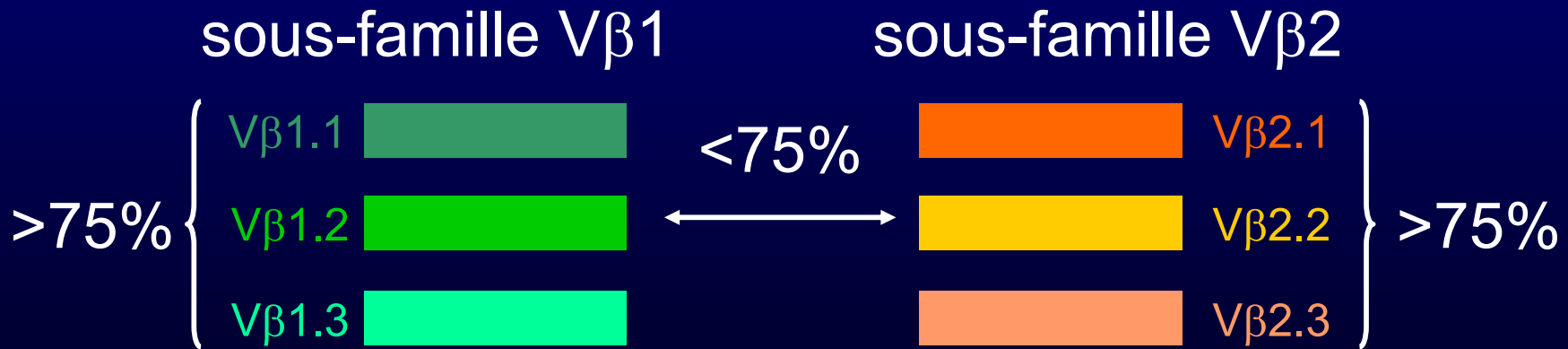
Figure 5-11
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

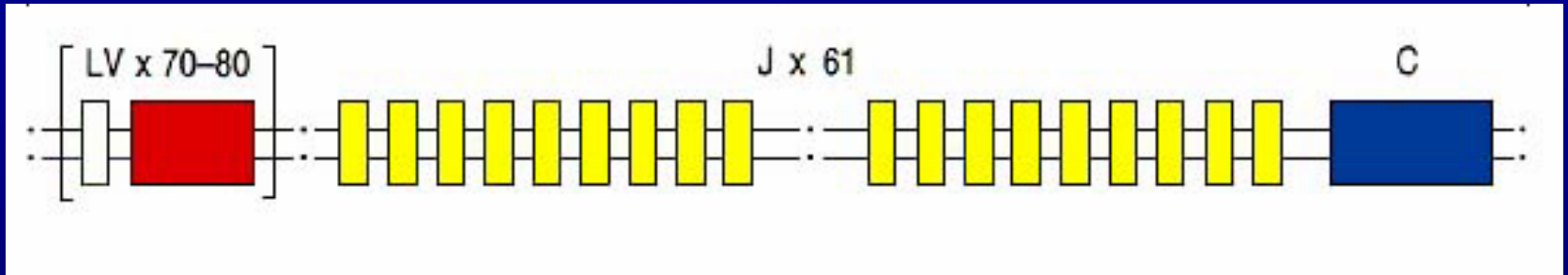
1. Introduction
2. Recombinaison V(D)J
- 3. Organisation des locus TCR et Ig**
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

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.

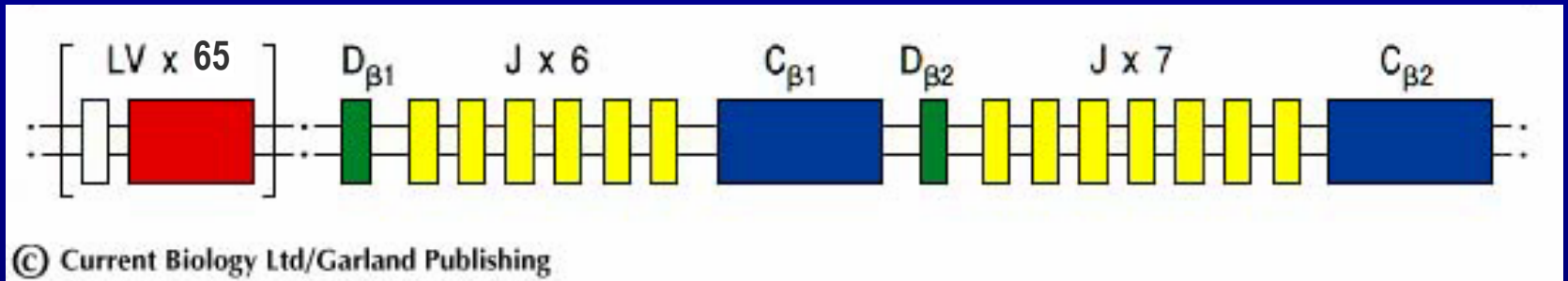


Organisation génomique du locus TCR α humain



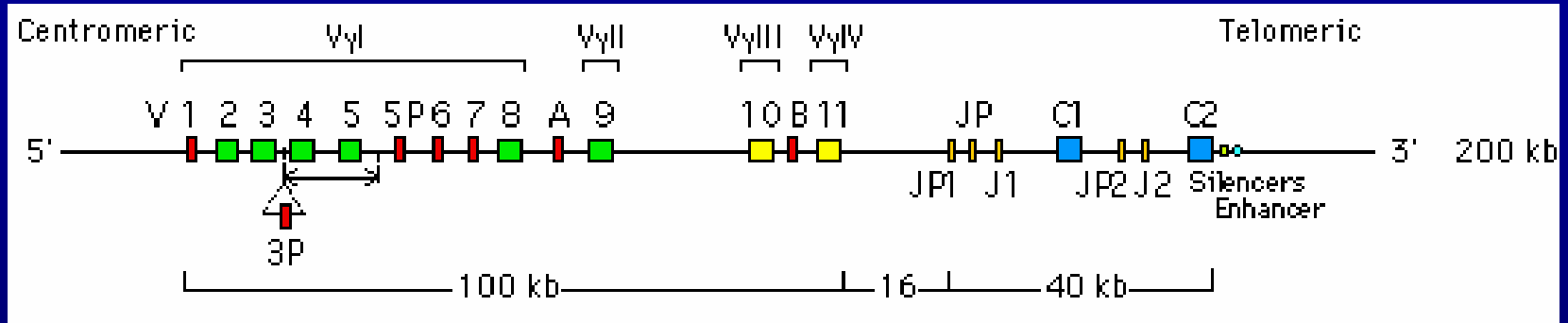
- Chromosome 14
- 1.1 Mb
- 50-60 V α groupés en 41 sous-familles
- 61 J α , un seul C α

Organisation génomique du locus TCR β humain



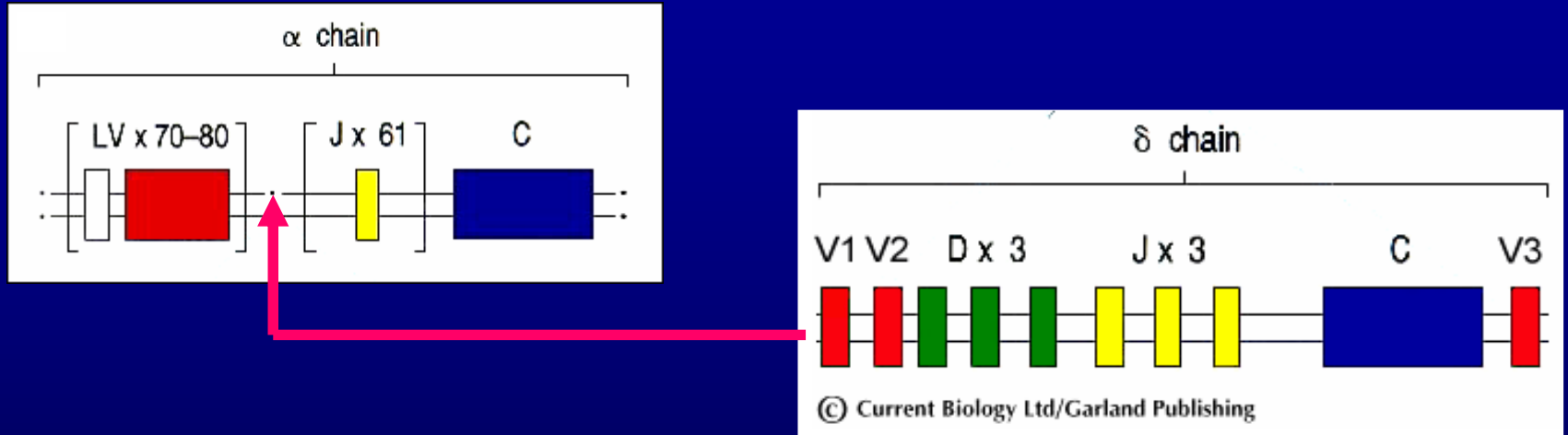
- Chromosome 7
- 685 kb
- 67 segments V β
- 30 sous-familles (1-9 membres)
- 2 D β , 13 J β , 2 C β , en deux répétitions

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

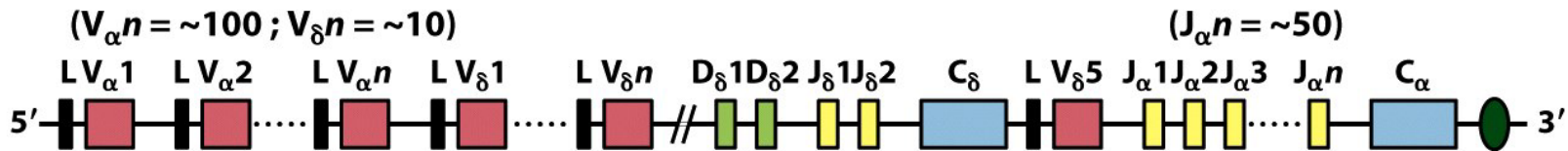
Organisation génomique du locus TCR δ humain



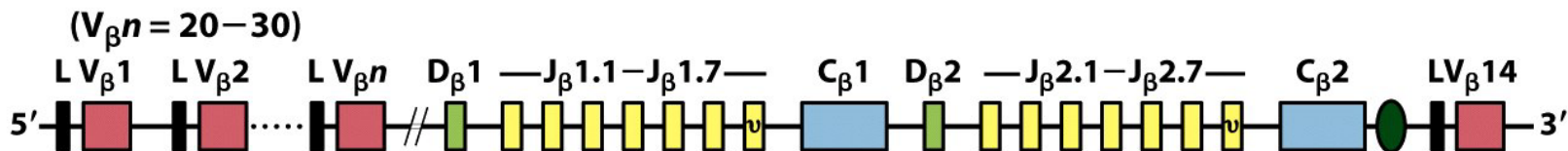
- Chromosome 14, inséré dans le locus TCR α
- 3 $V\delta$ principaux, 3 $D\delta$, 3 $J\delta$, un seul $C\delta$
- Des $V\alpha$ sont utilisés par les chaînes TCR δ : $V\alpha/\delta 14.1$, $V\alpha/\delta 23.1$, $V\alpha/\delta 29.1$, $V\alpha/\delta 36.1$, $V\alpha/\delta 38.2$
- 2 ou 3 $D\delta$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

Organisation génomique des locus TCR chez la souris

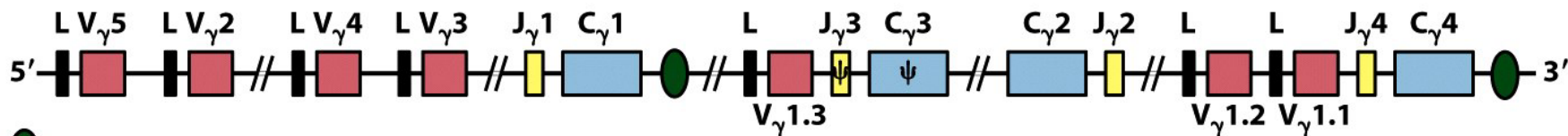
Mouse TCR α -chain and δ -chain DNA (chromosome 14)



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

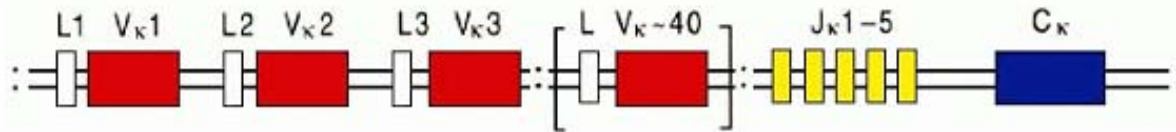
Organisation génomique du locus IgH humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- Chromosome 14
- 1,2 Mb
- ~80 V_H (dont ~50 fonctionnels) groupés en 7 sous-familles
- 27 D_H , 6 J_H, 9 C_H

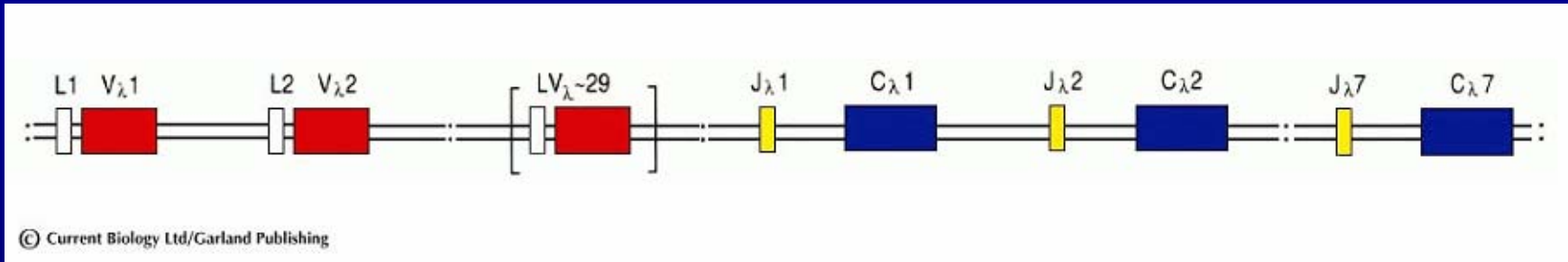
Organisation génomique du locus Ig κ humain



© 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

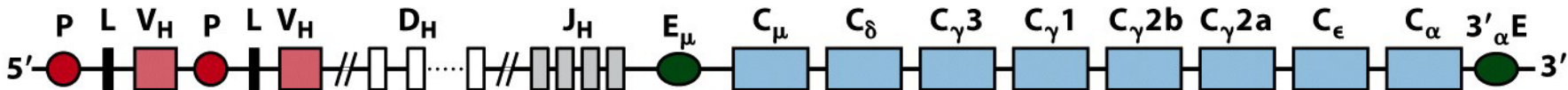
Organisation génomique du locus $Ig\lambda$ humain



- 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

H-chain DNA



κ-chain DNA



Key

Promoter = 
Enhancer = 

λ-chain DNA

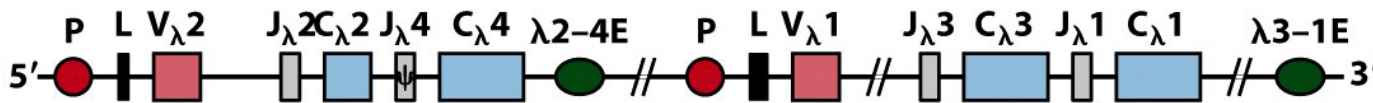
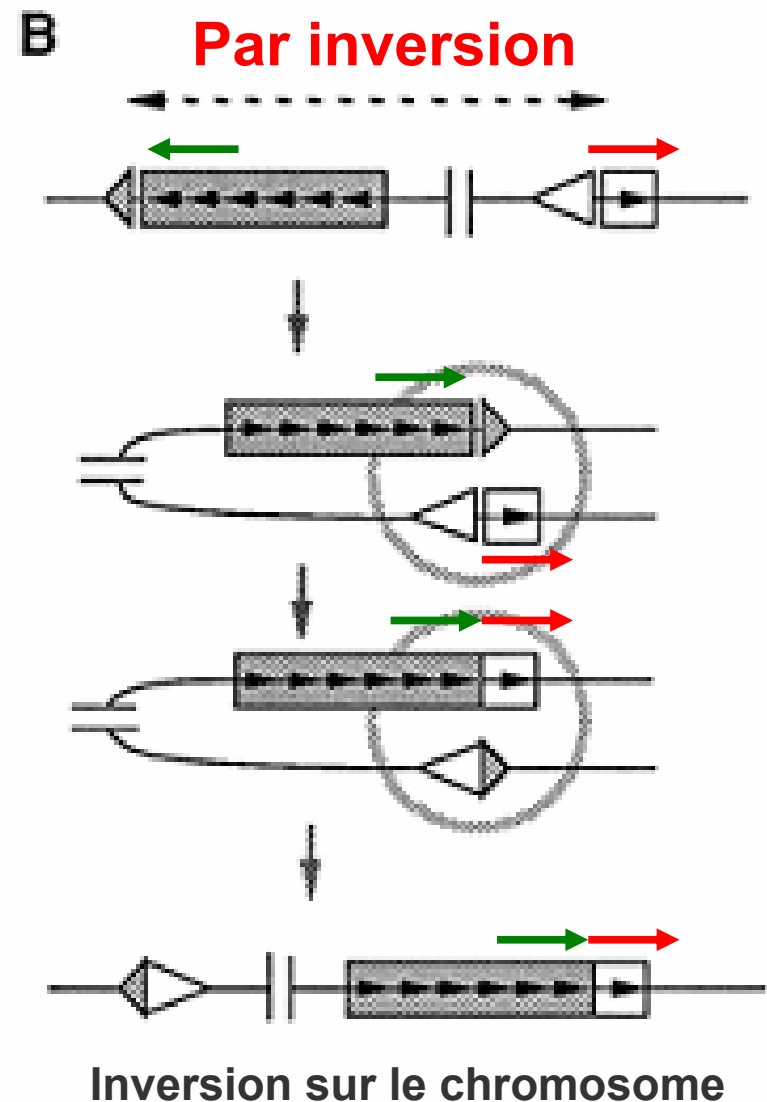
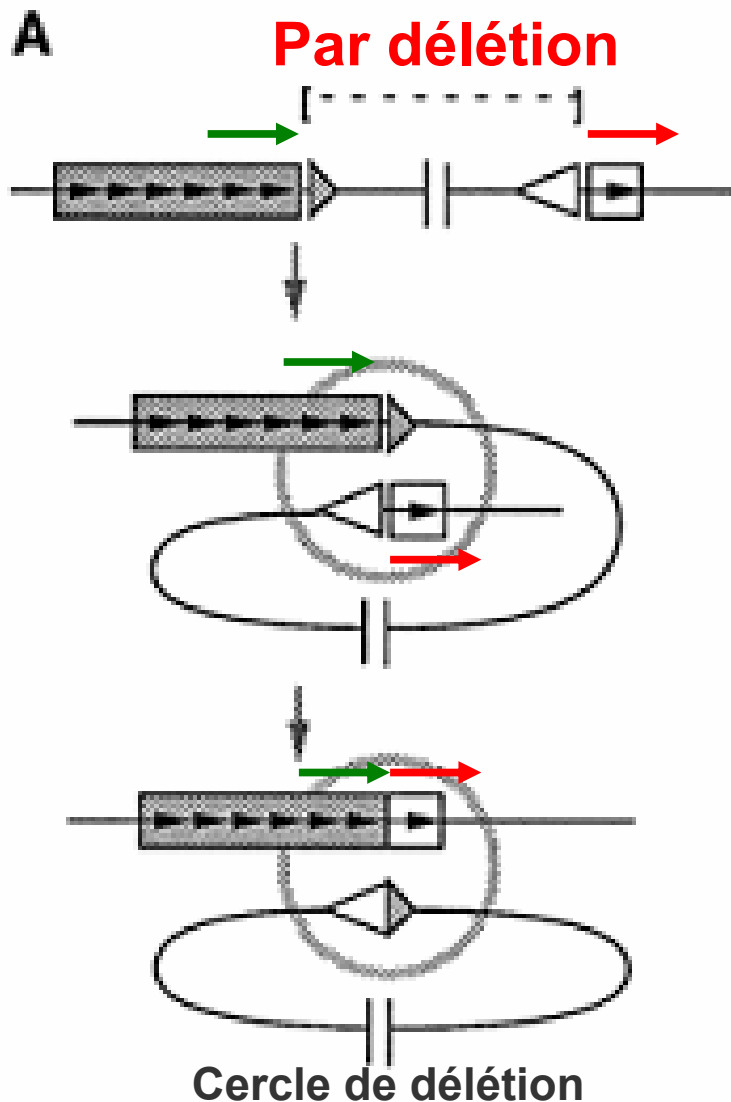


Figure 5-22
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

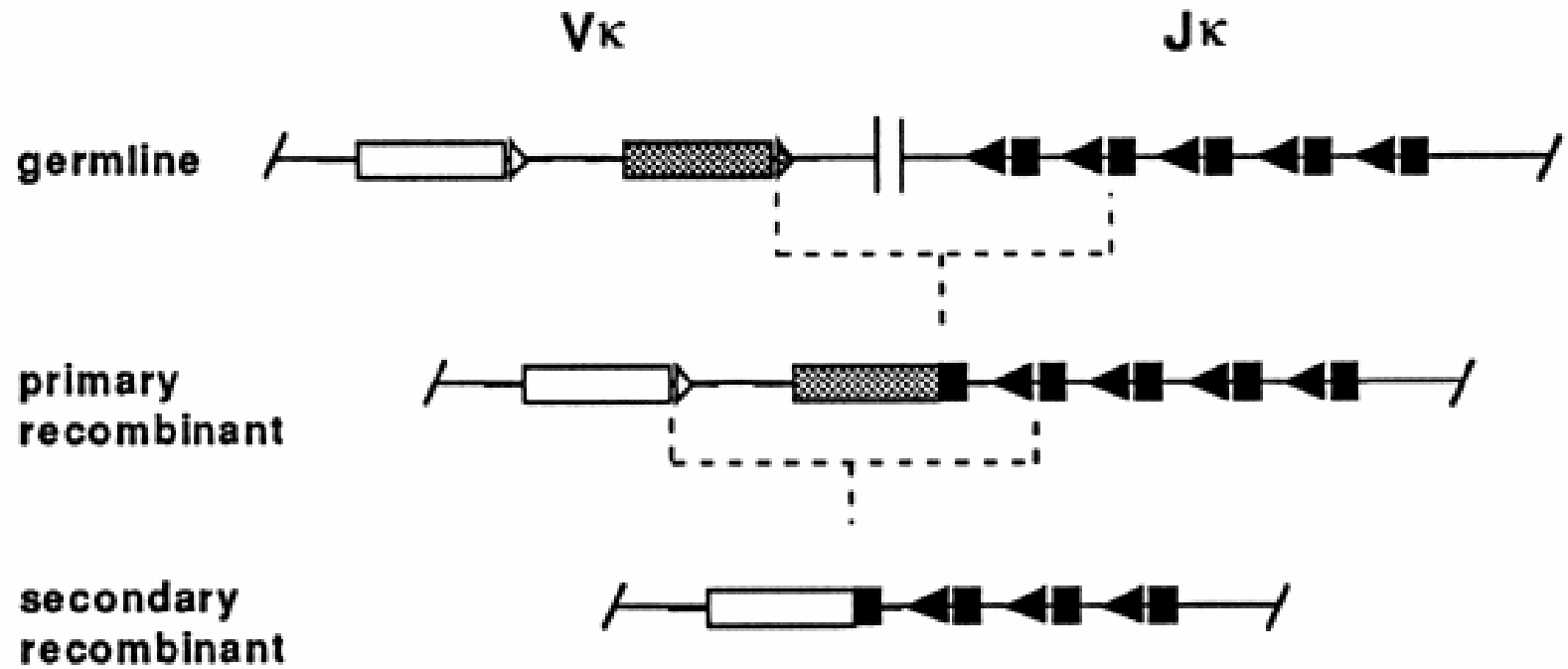
Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

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

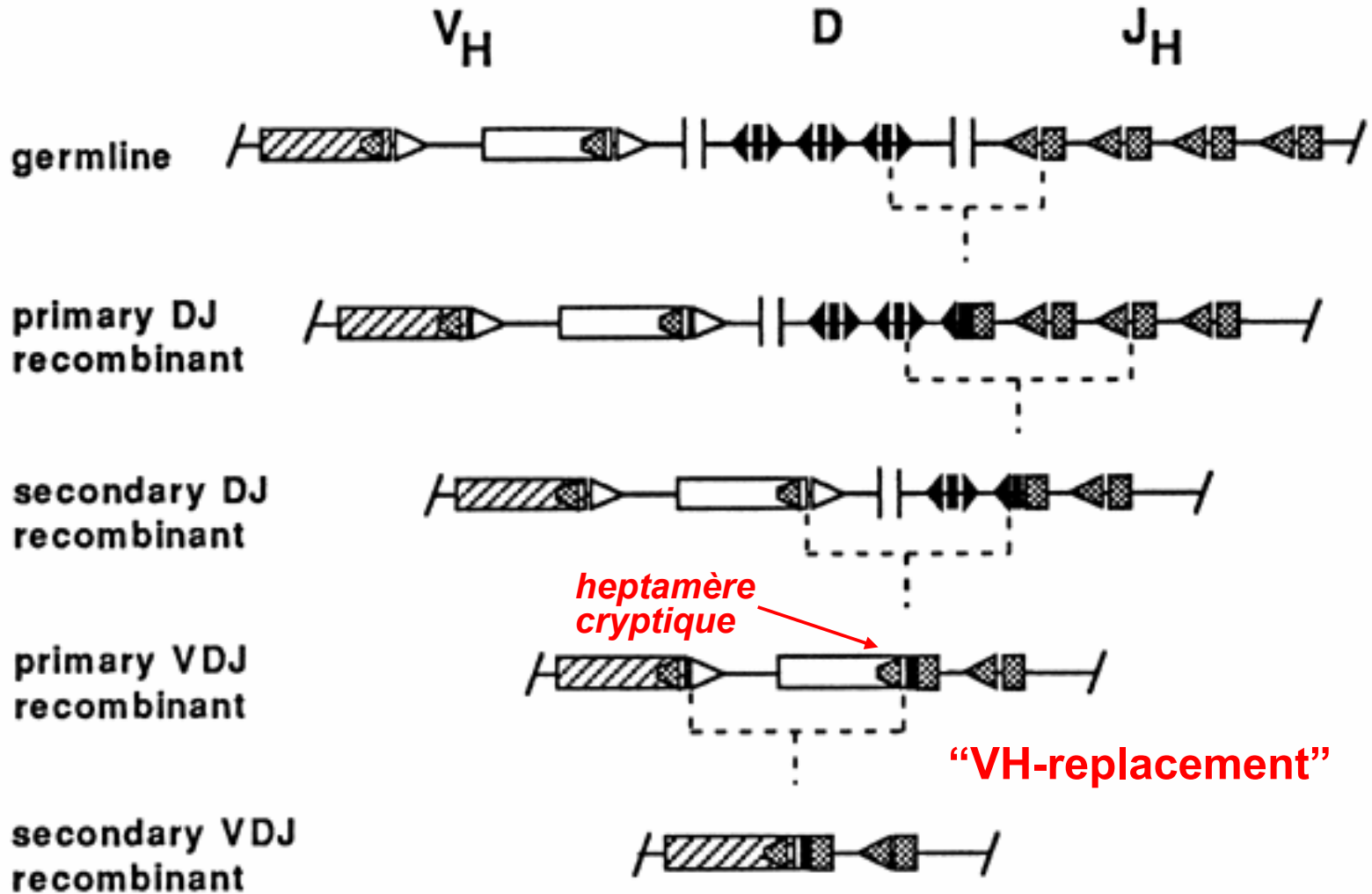
Différents types de réarrangements



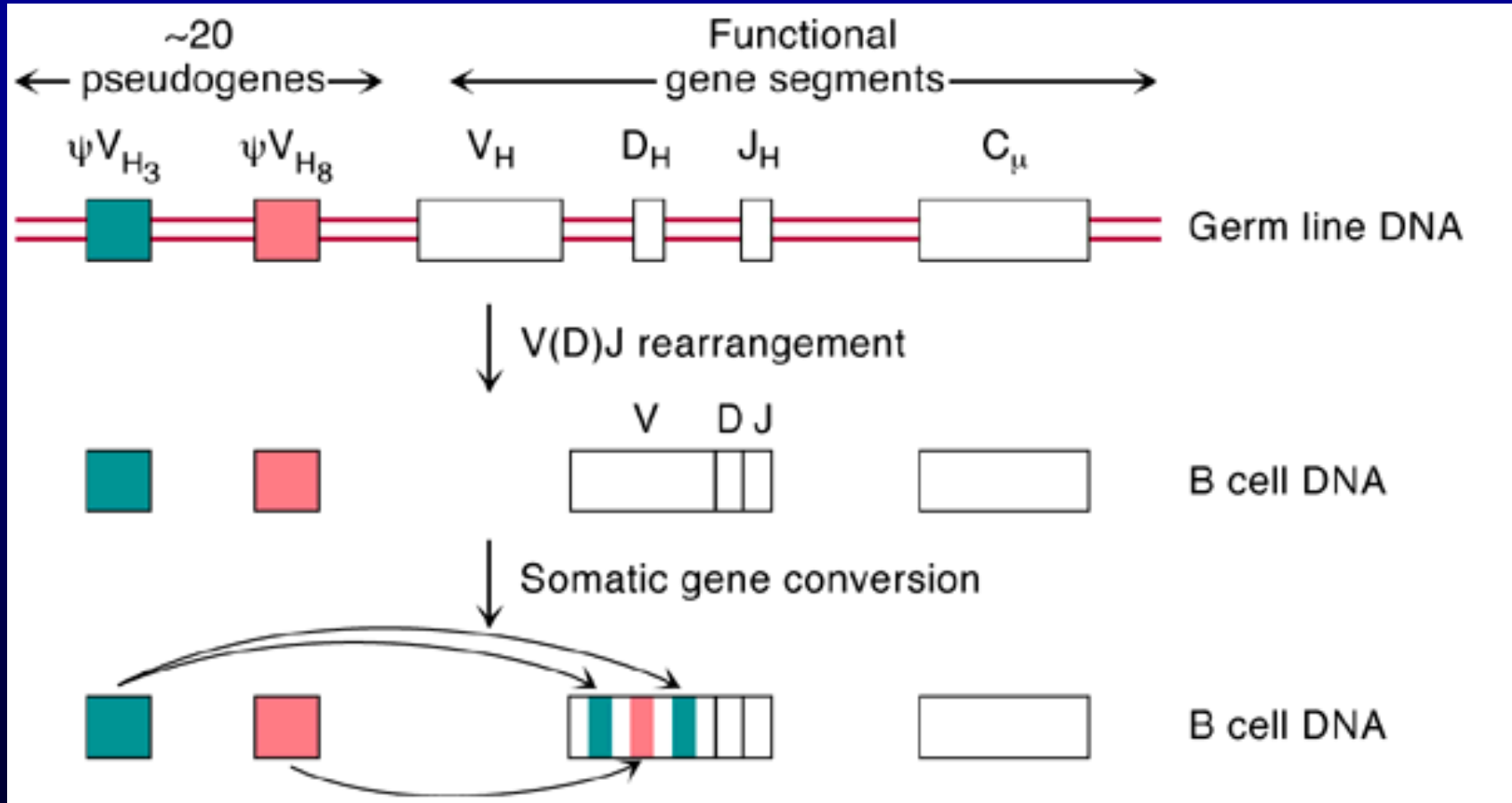
Réarrangements secondaires (1)



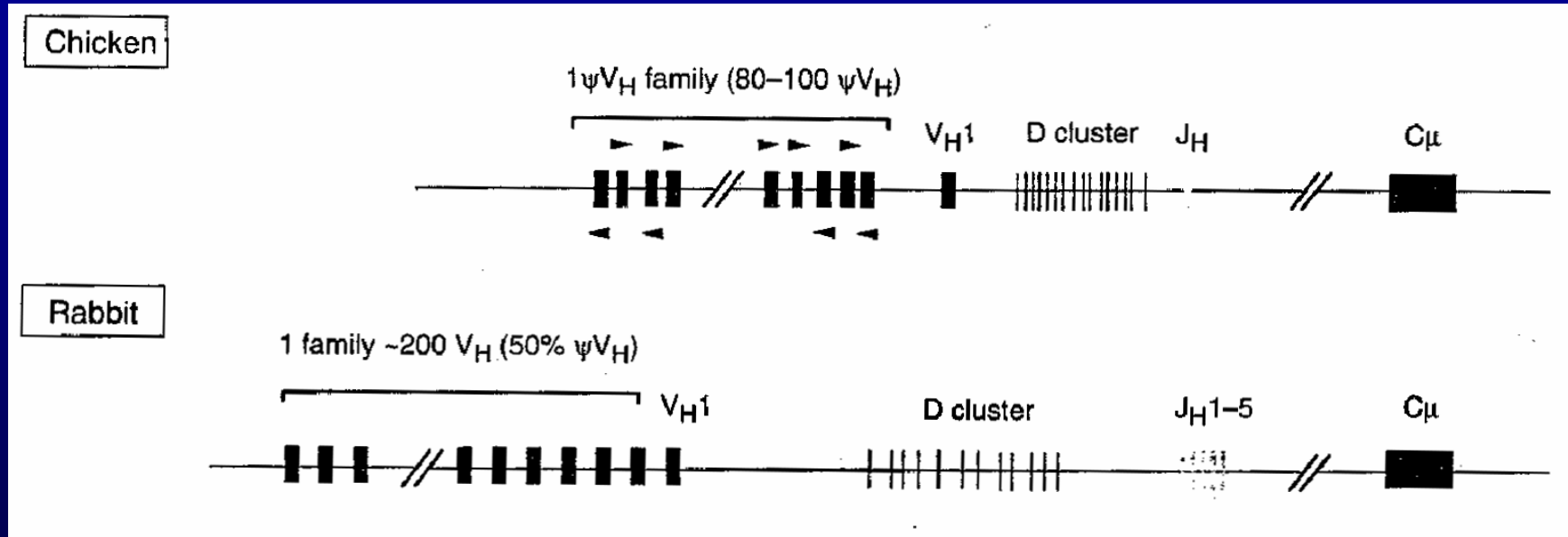
Réarrangements secondaires (2)



Conversion génique (1)



Conversion génique (2)



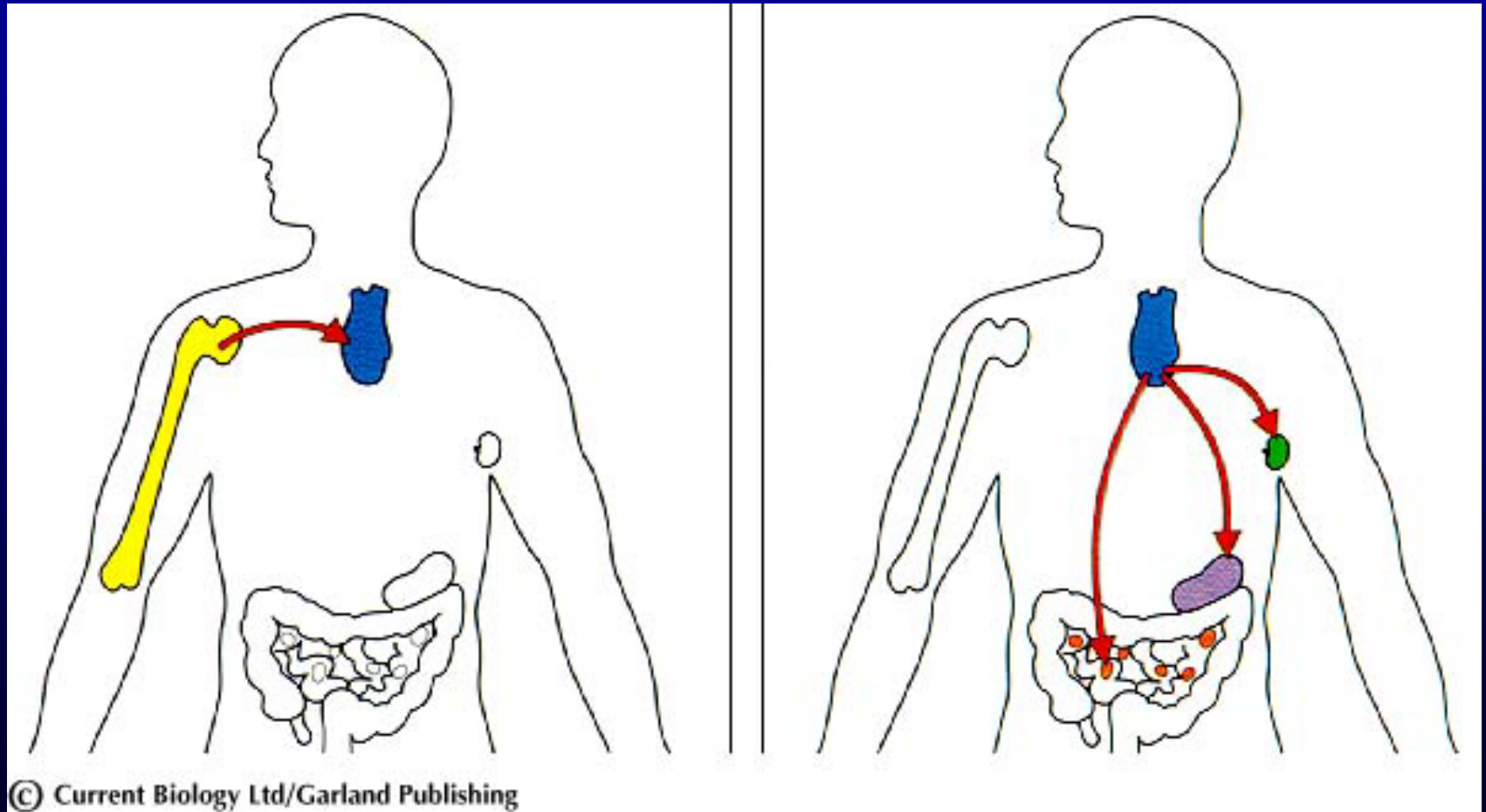
Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

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

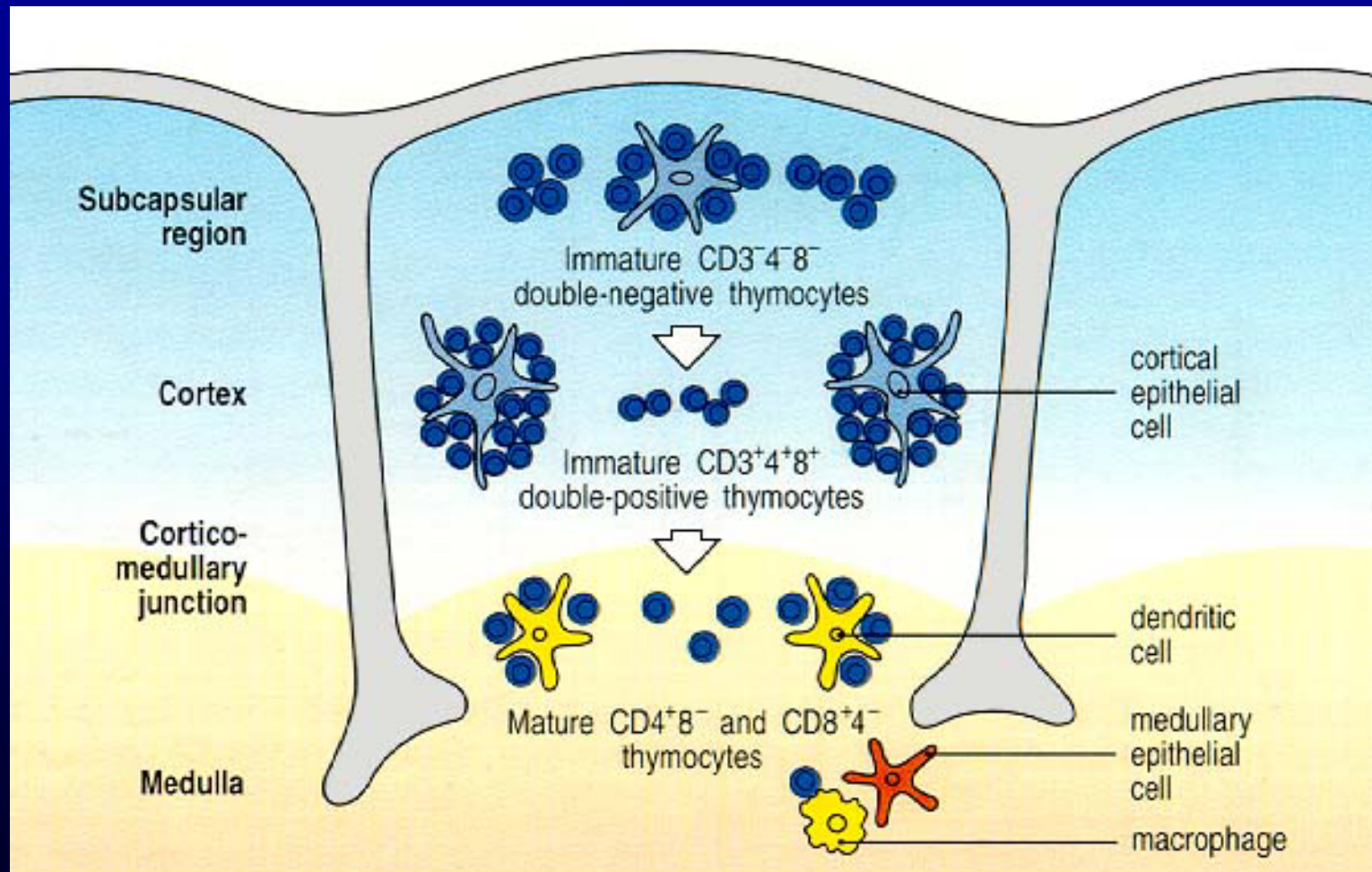
Questions

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

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus



Architecture cellulaire du thymus



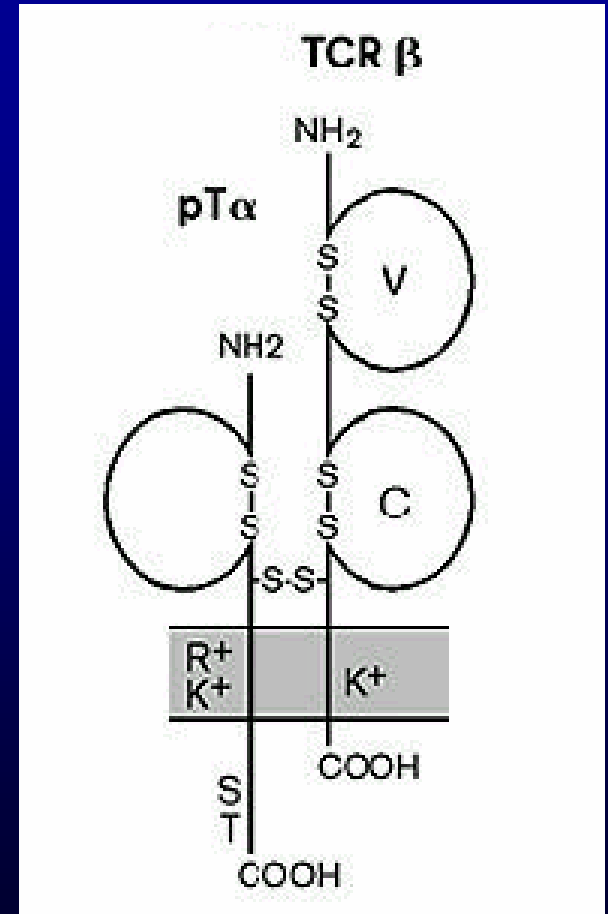
Stades de différenciation des thymocytes

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

Identification du pré-TCR

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

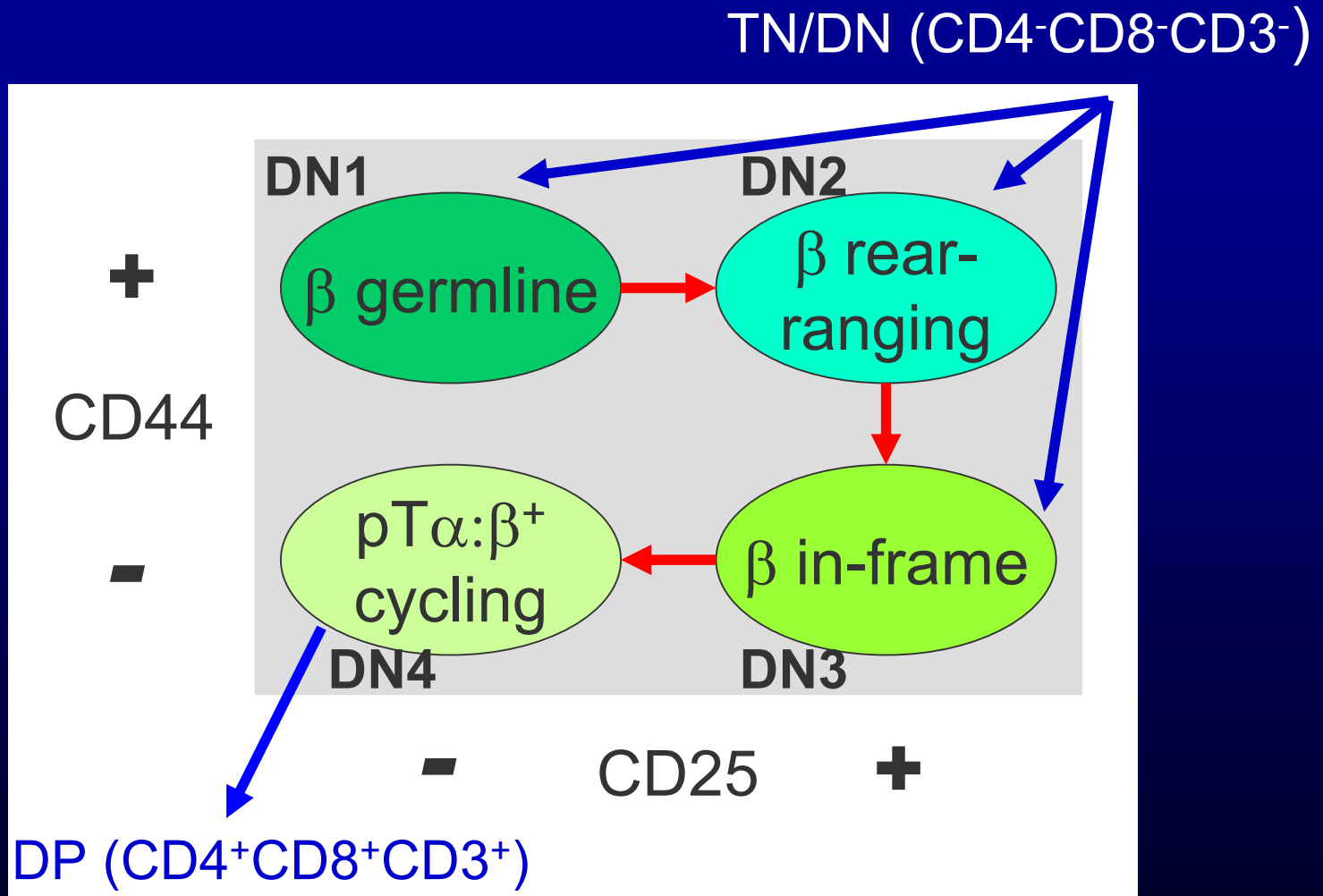
=> identification de la chaîne pT α



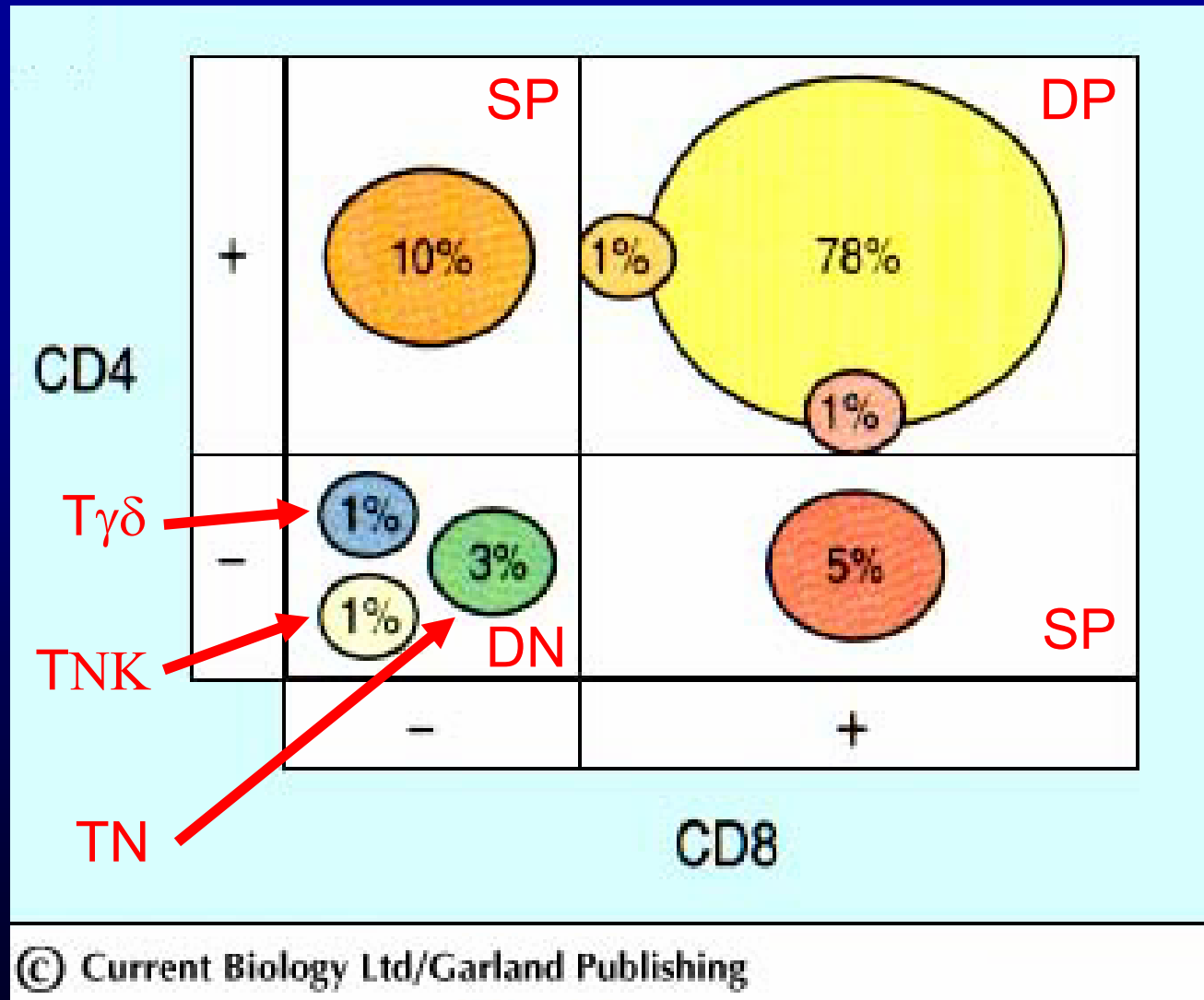
Rôle critique du pré-TCR

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

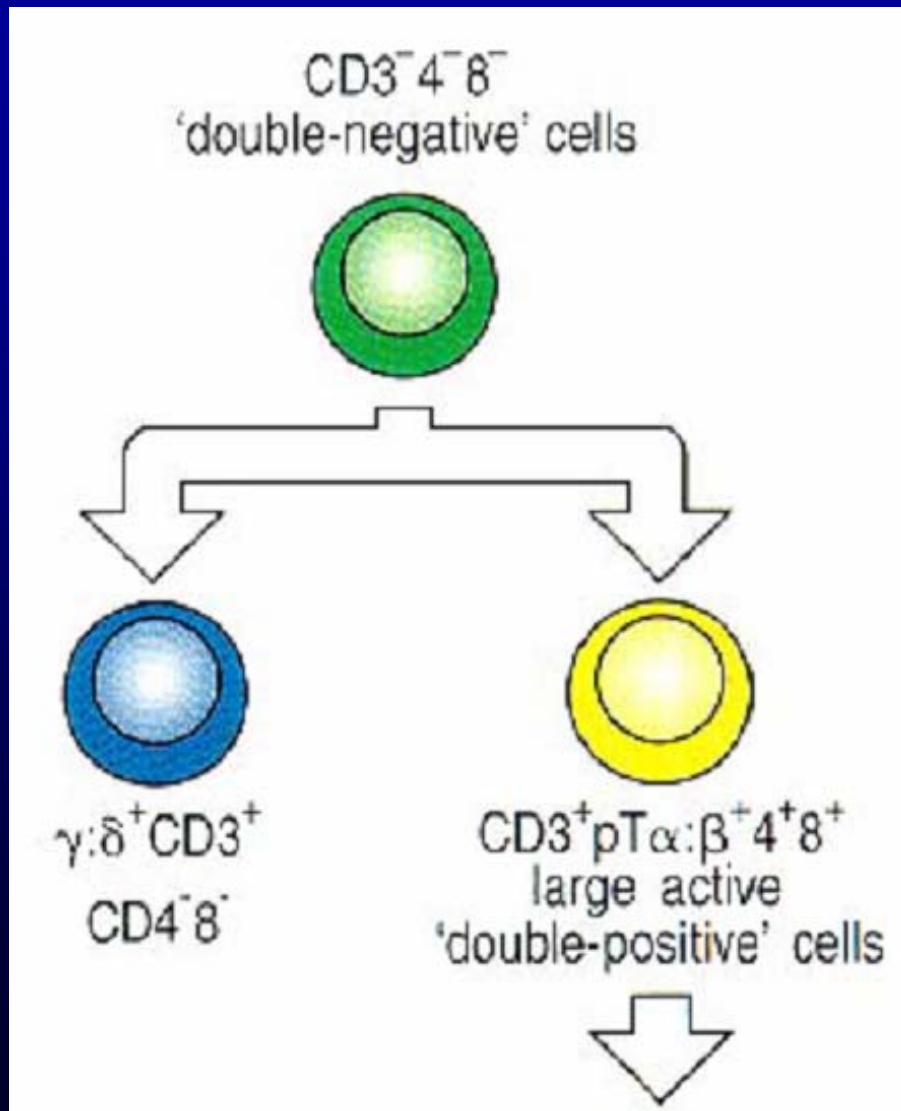
Différenciation des thymocytes (1)



Différenciation des thymocytes (2)



Différenciation des thymocytes (3)



Engagement
CD3 cytoplasmique

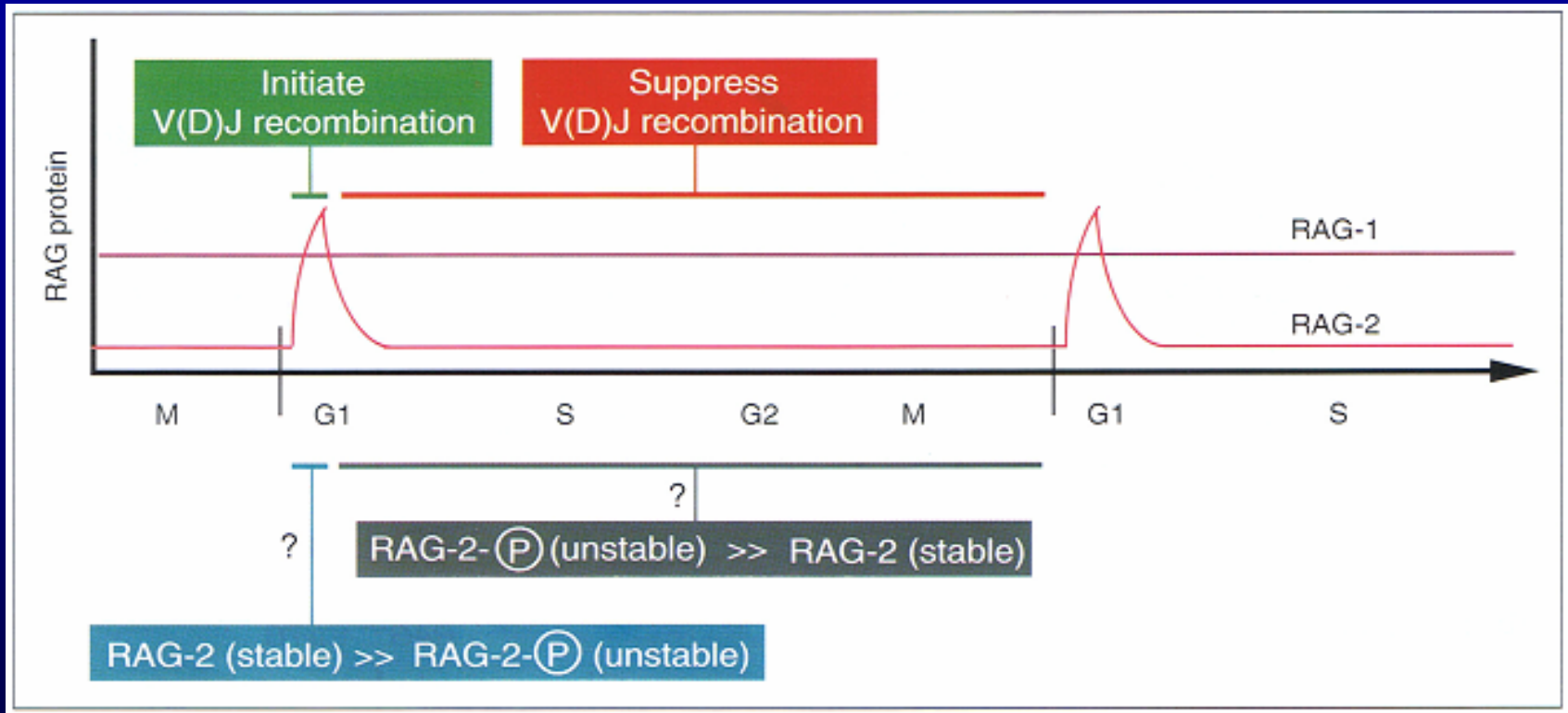
Réarrangements β , γ , δ
pT α cytoplasmique
Engagement $\alpha\beta/\gamma\delta$

Expression CD4/CD8
Exclusion allélique β
Prolifération
Réarrangement TCR α

Exclusion allélique

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

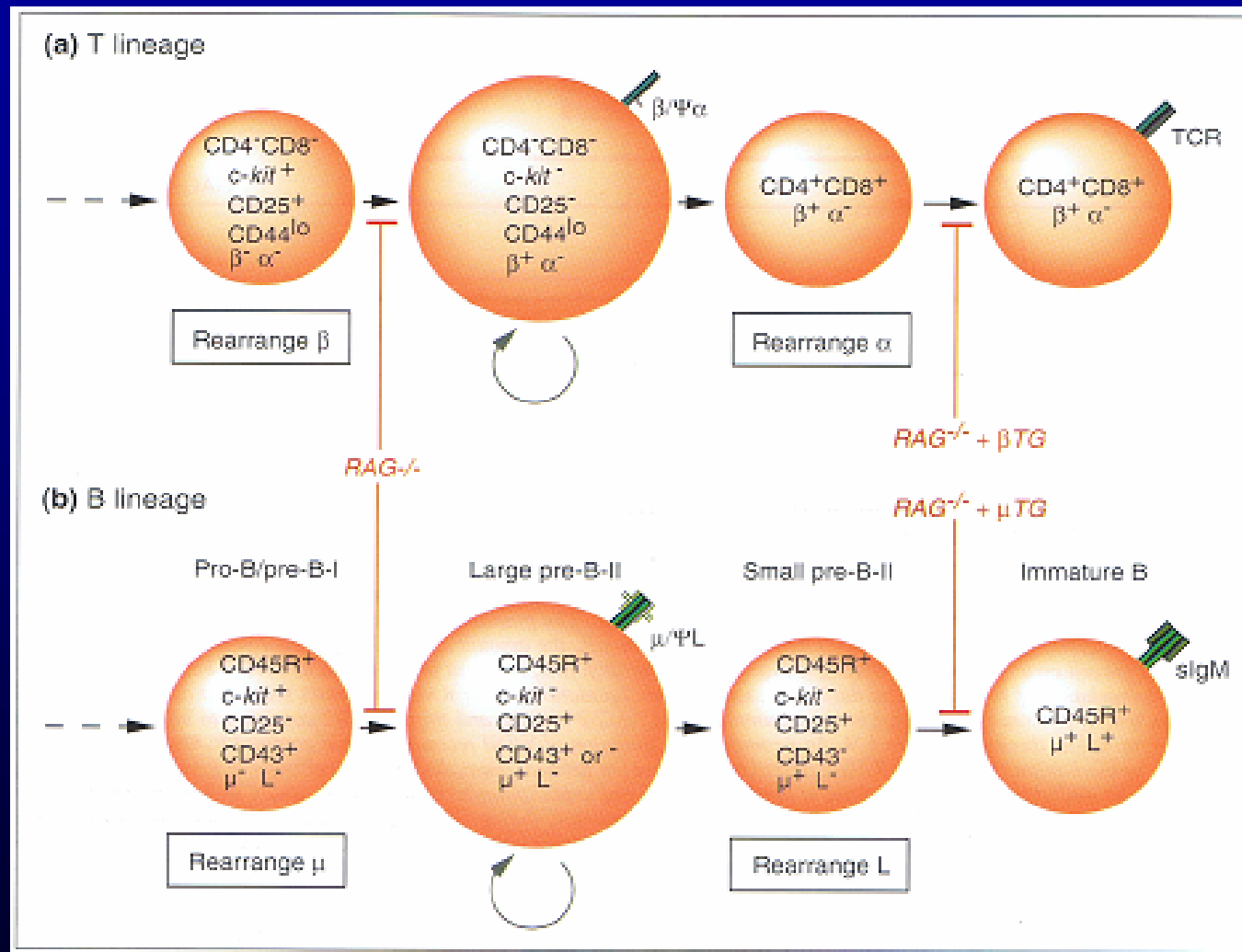
Régulation de l'expression de RAG



Au cours du cycle cellulaire:

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

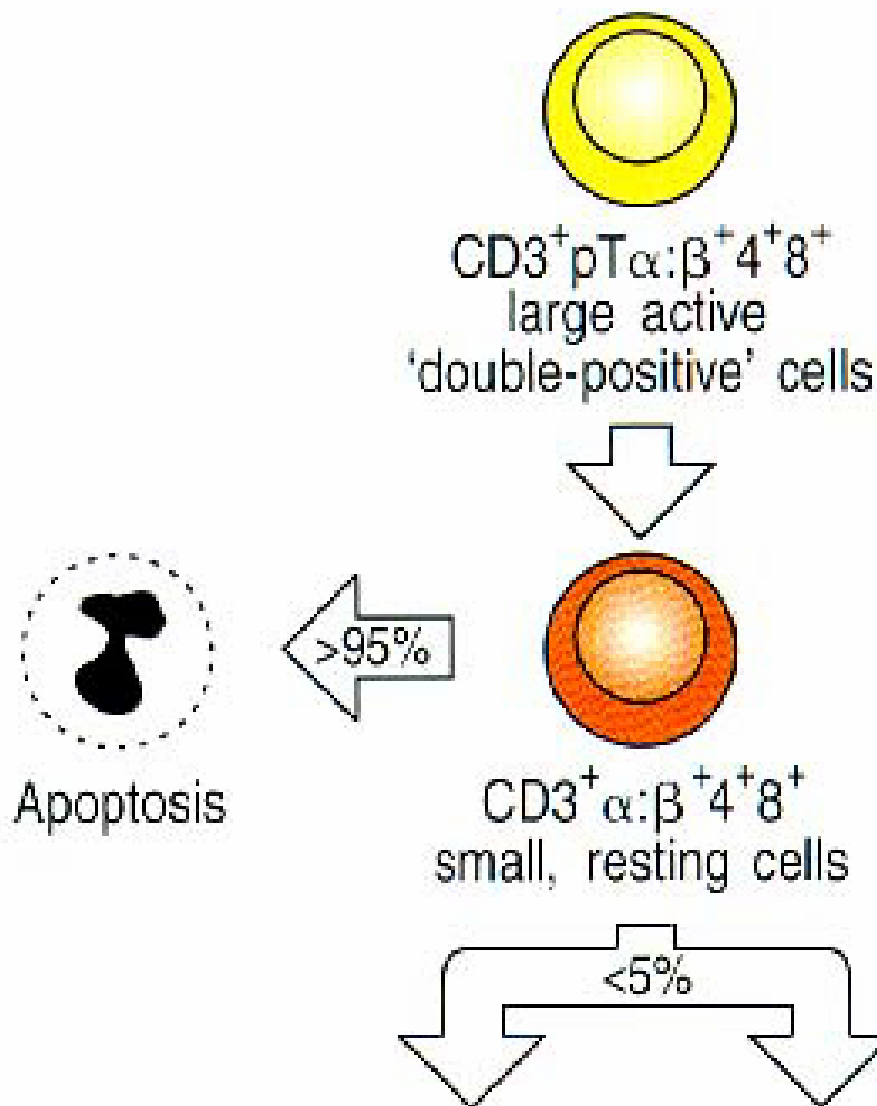
Régulation de la recombinaison V(D)J



Régulation des réarrangements

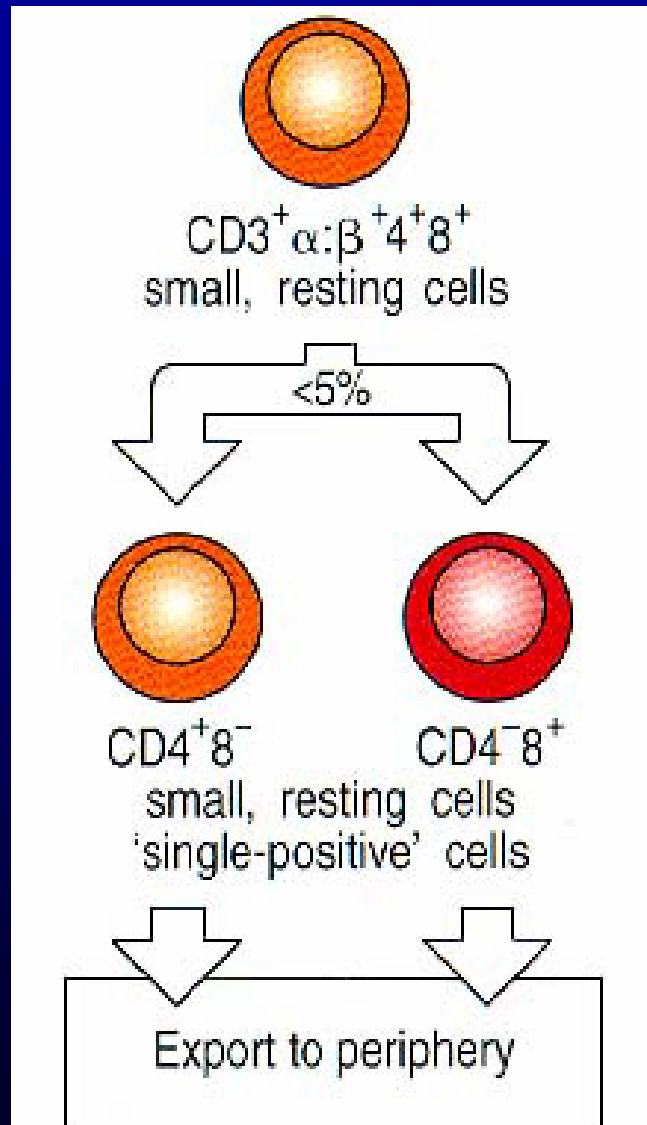
- TCR δ , TCR γ et TCR β réarrangent en même temps au stade pro-T
- Les réarrangements TCR α sont limités aux thymocytes pré-T DP engagés vers la lignée $\alpha\beta$ et exprimant TCR β
- A l'inverse de TCR β , les réarrangements TCR α ont lieu sur les deux chromosomes → l'exclusion allélique a lieu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

Différenciation des thymocytes (4)



Sélection positive
Sélection négative

Différenciation des thymocytes (5)



Sélection positive
Sélection négative

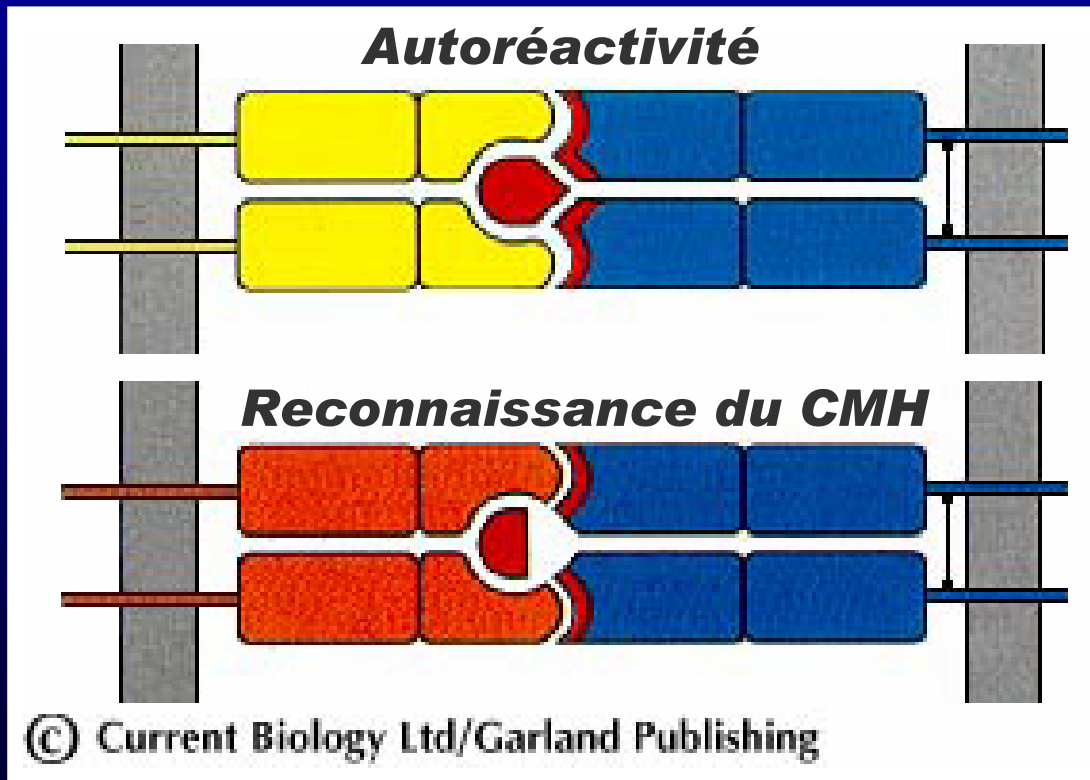
Engagement CD4/CD8
Restriction pour le CMH
Fonction effectrice

Sélections positive et négative (1)

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

Sélections positive et négative (2)

CMH TCR

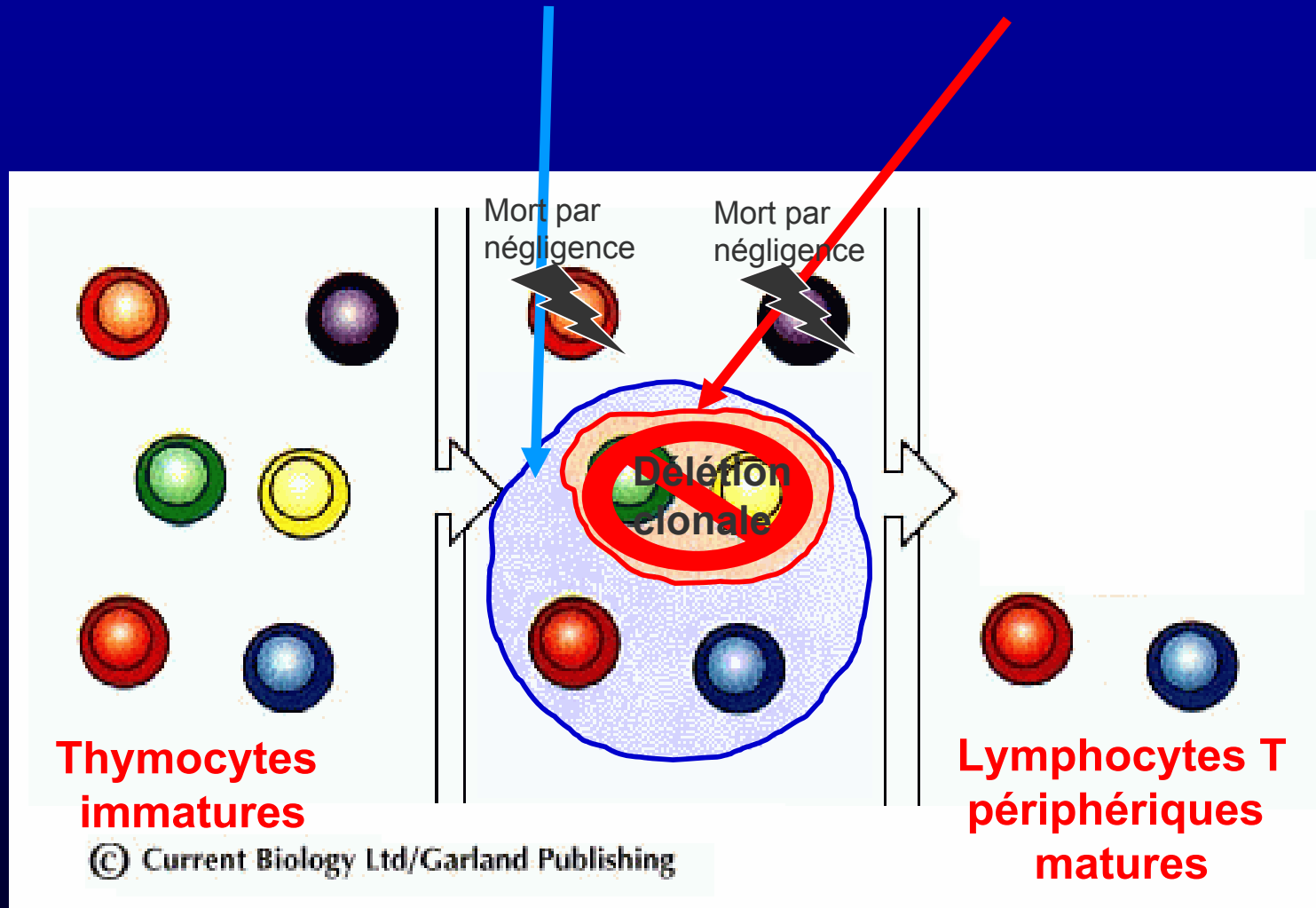


→ **Sélection négative**

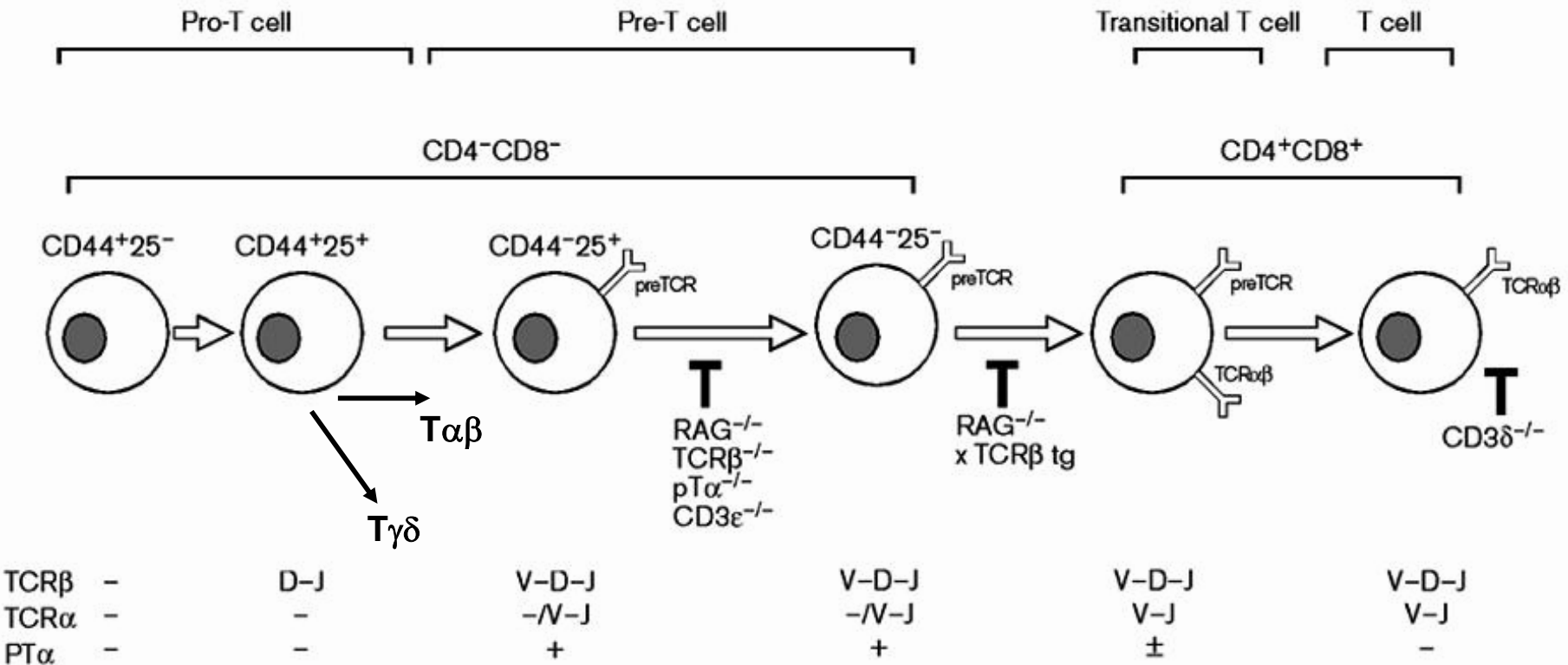
→ **Sélection positive**

→ *Éducation thymique*

Sélections positive et négative (3)

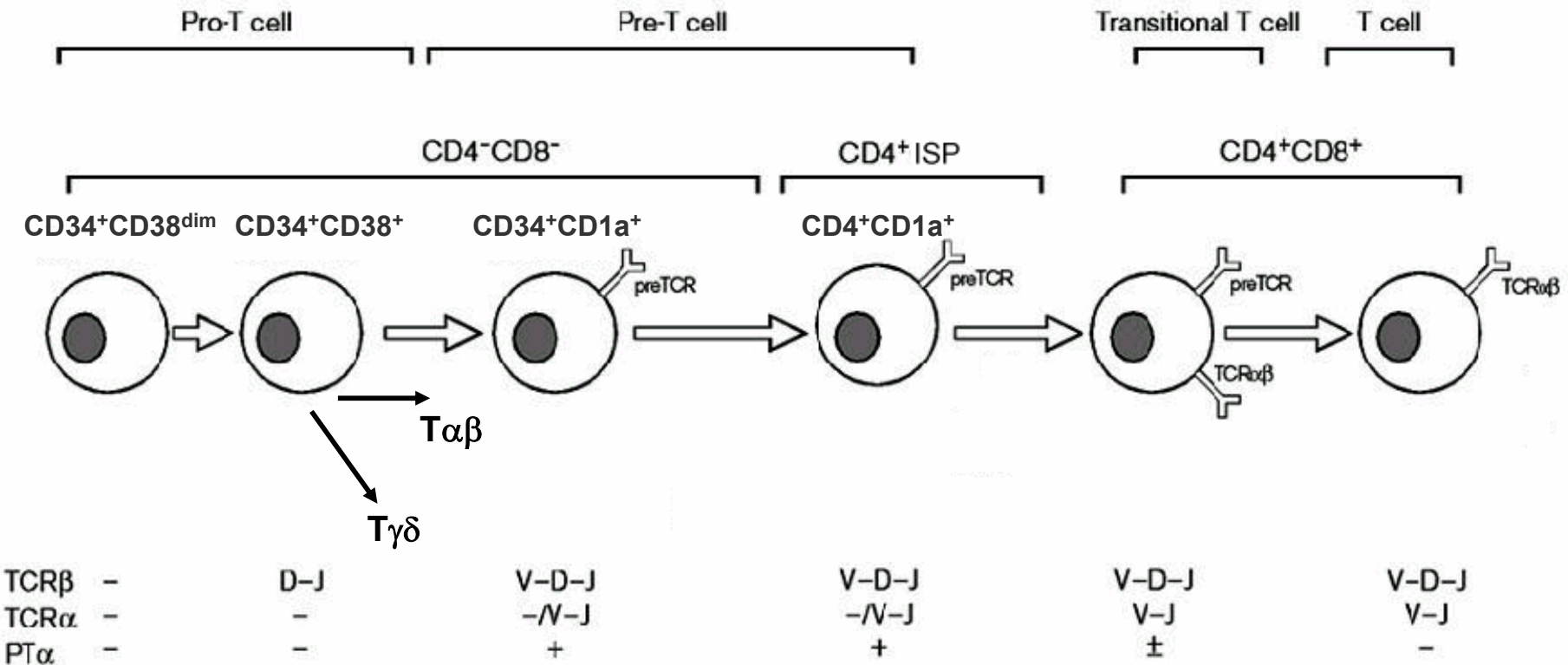


Différenciation thymique: souris



© 1996 Current Opinion in Immunology

Différenciation thymique: homme

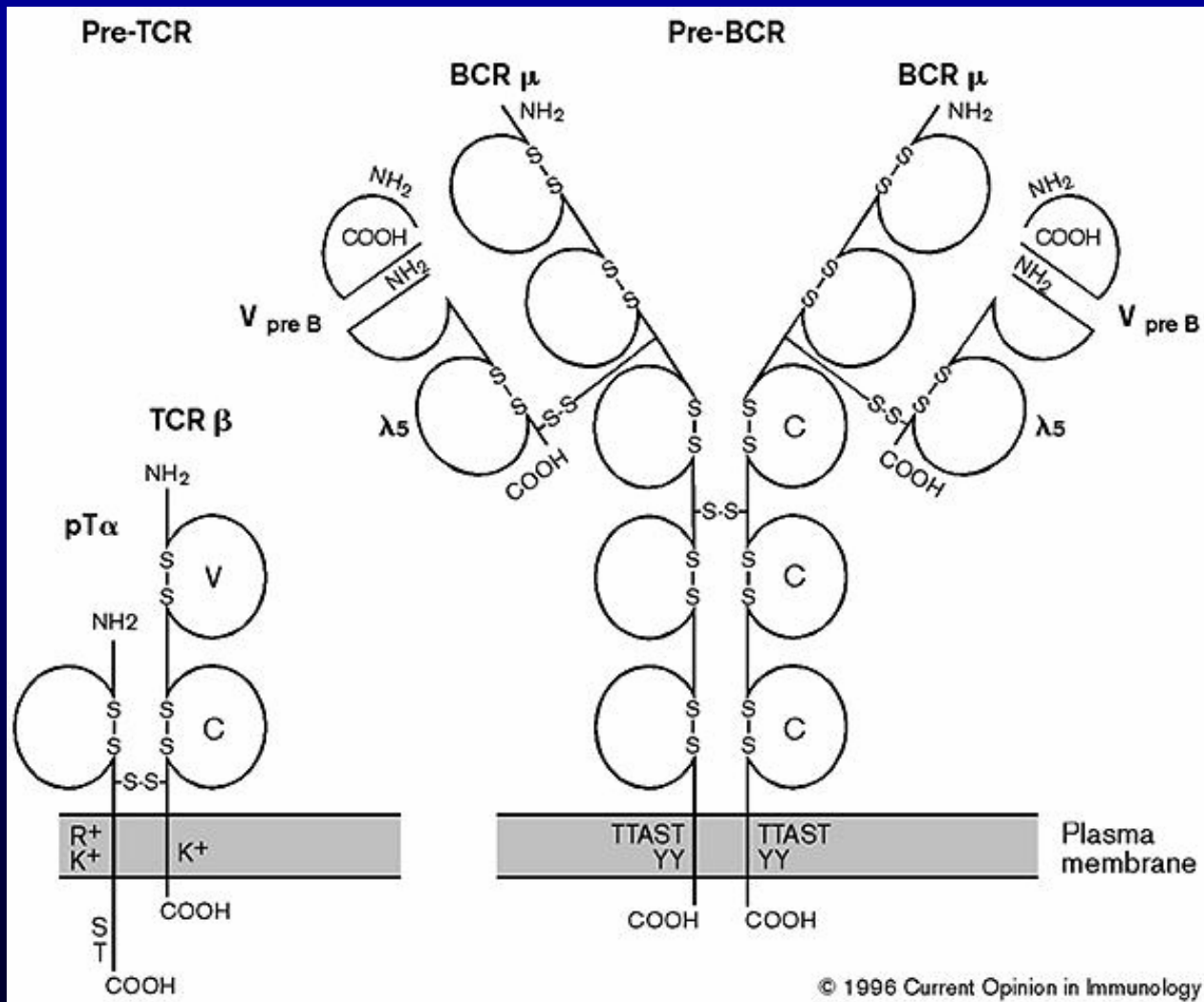


© 1996 Current Opinion in Immunology

Développement T chez l'homme (2)

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

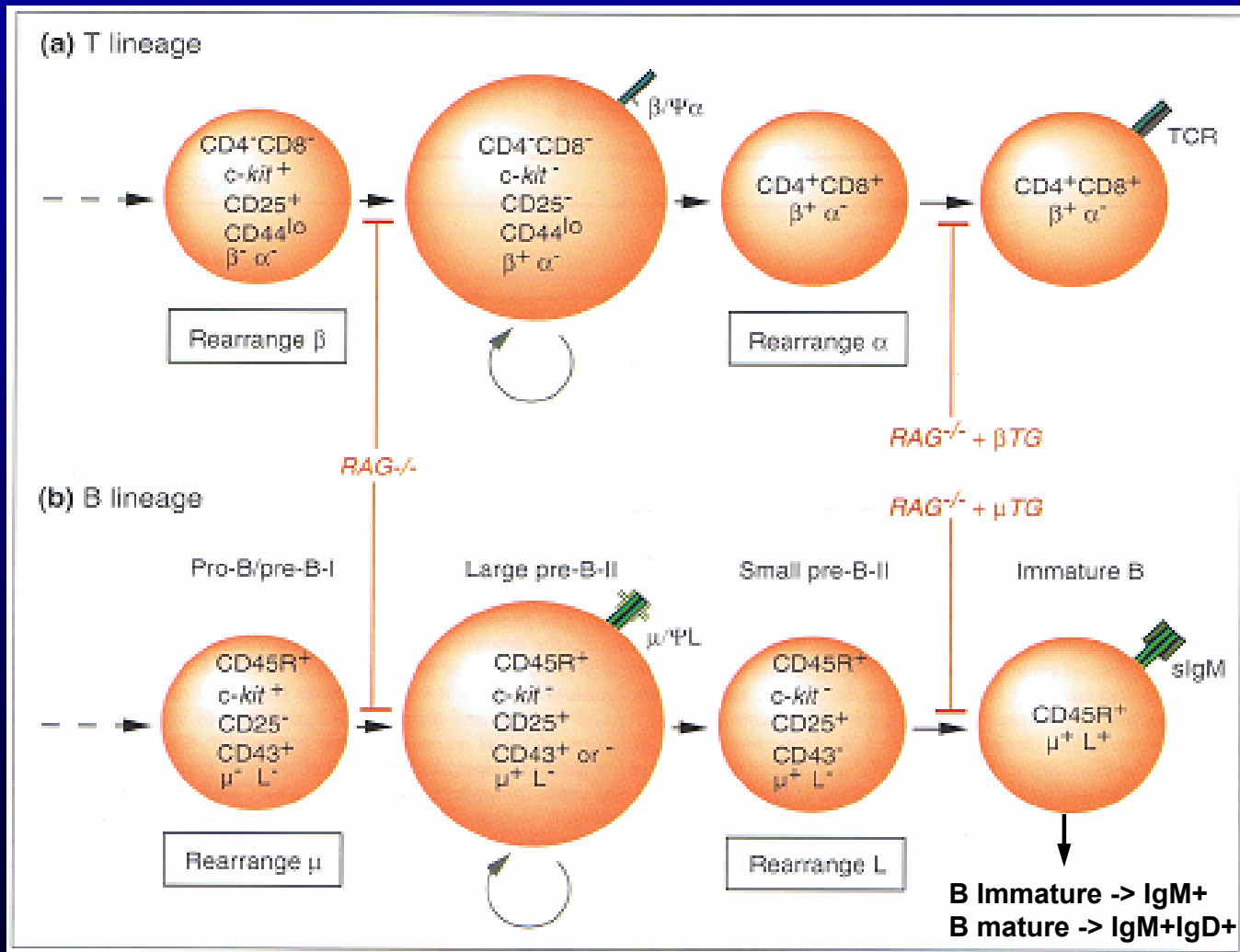
Caractérisation du pré-BCR



Rôle du pré-BCR

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

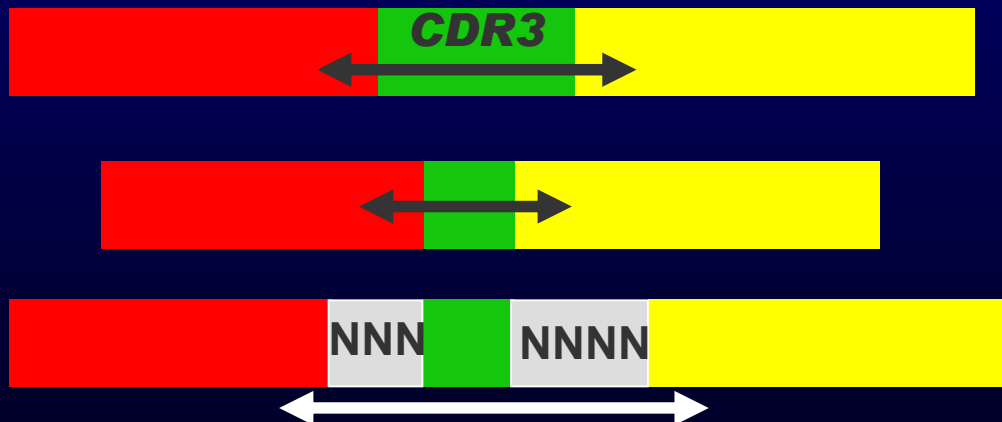
Différenciation des lymphocytes B



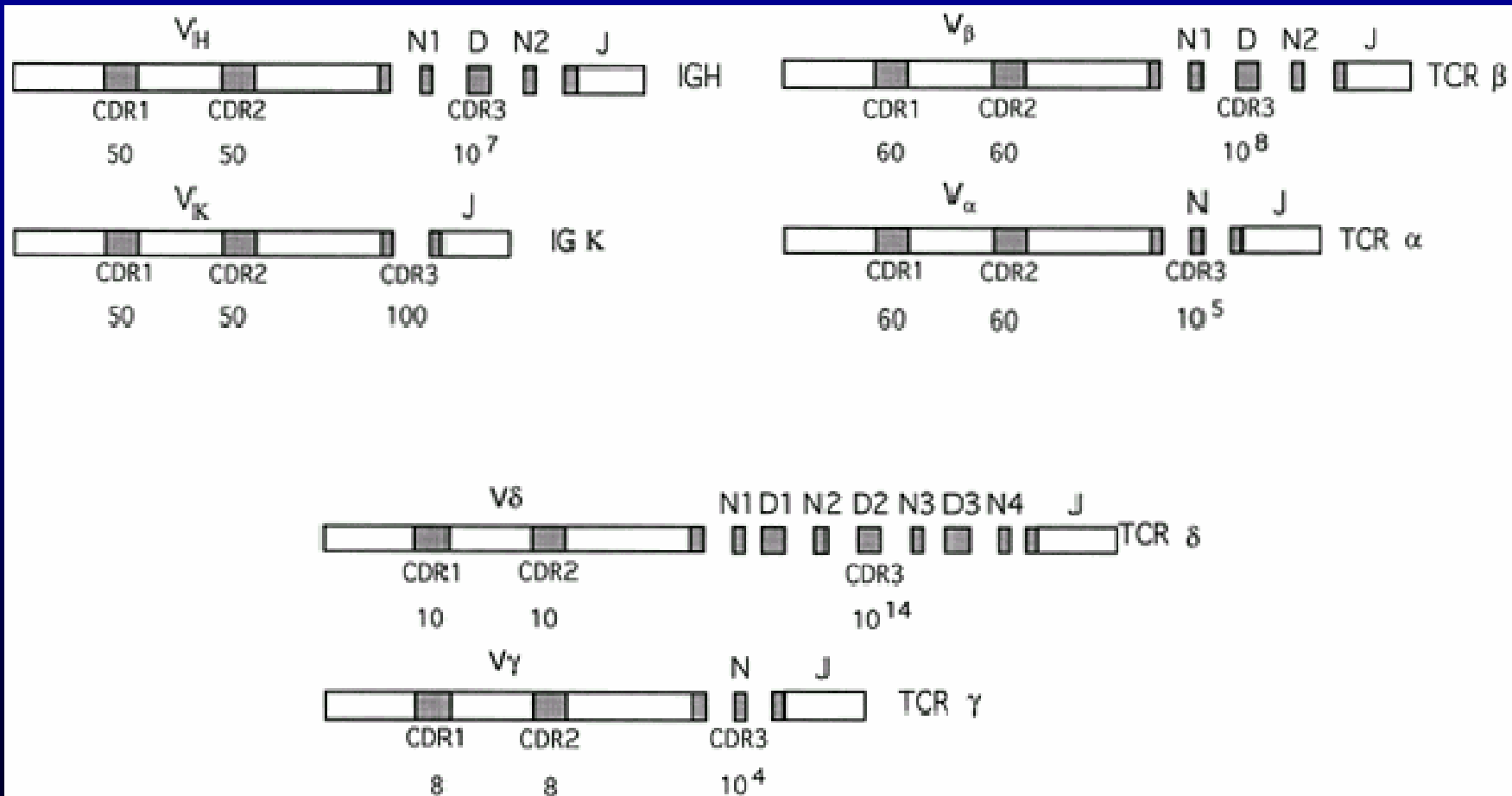
Conclusion

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)



Diversité jonctionnelle CDR3 : une stratégie générale

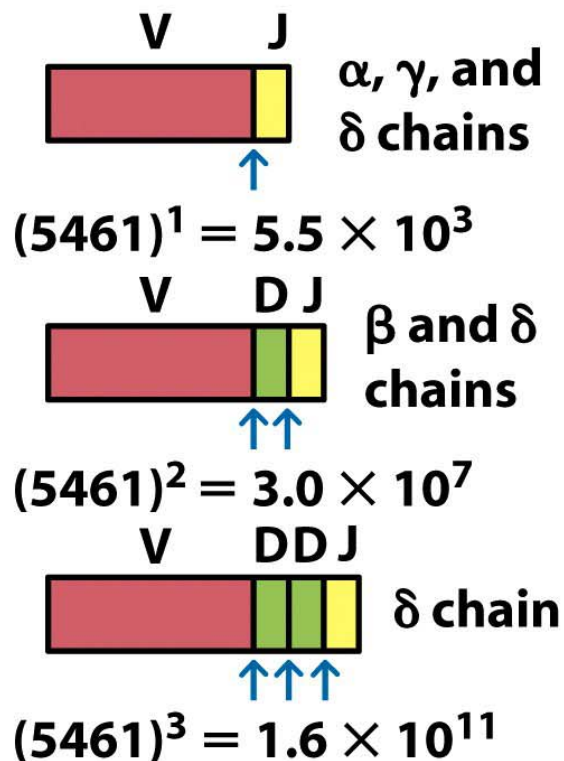


Estimation de la diversité (1)

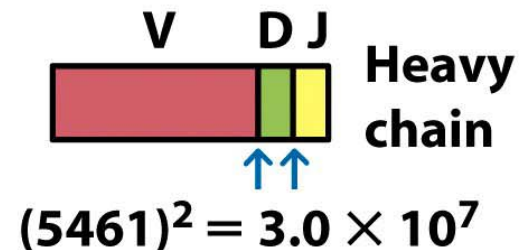
N-region nucleotide addition

T-cell receptor

Immunoglobulin



↑ = Addition of 0–6 nucleotides (5461 permutations)



Estimation de la diversité (2)

TABLE 9-3 Sources of possible diversity in mouse immunoglobulin and TCR genes

Mechanism of diversity	IMMUNOGLOBULINS		$\alpha\beta$ T-CELL RECEPTOR		$\gamma\delta$ 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‡	+	$\sim 10^{12}$	+	$\sim 10^{15}$	+	$\sim 10^{18}$
P-region nucleotide addition	+	+	+	+	+	+
Somatic mutation	+	+	-	-	-	-
Combinatorial association of chains	+		+		+	

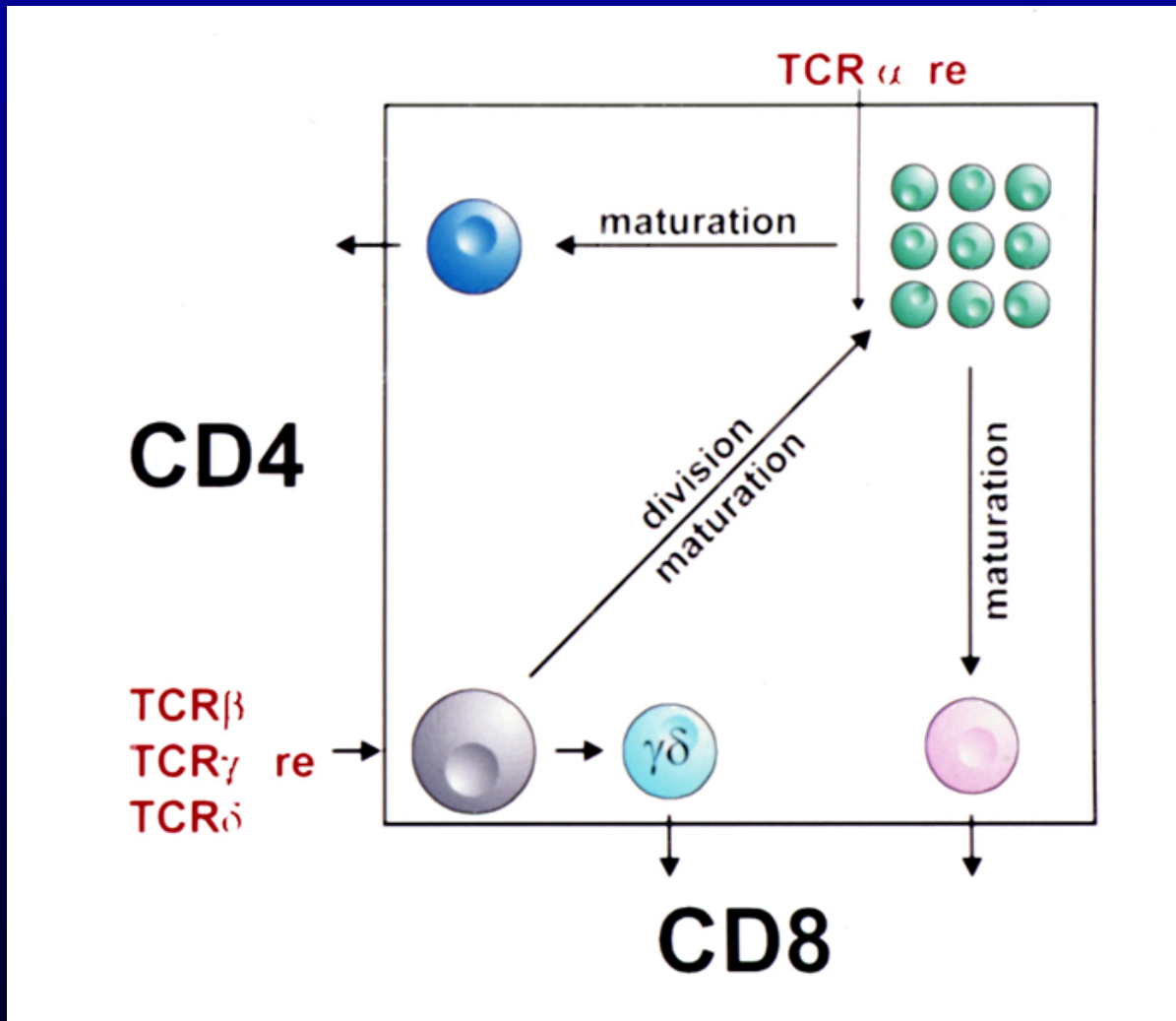
*Immunoglobulin data from Table 5-2; TCR data from Baum et al., 2004, *Nucleic Acids Research* **32**:D51.

†A plus sign (+) indicates mechanism makes a significant contribution to diversity but to an unknown extent.

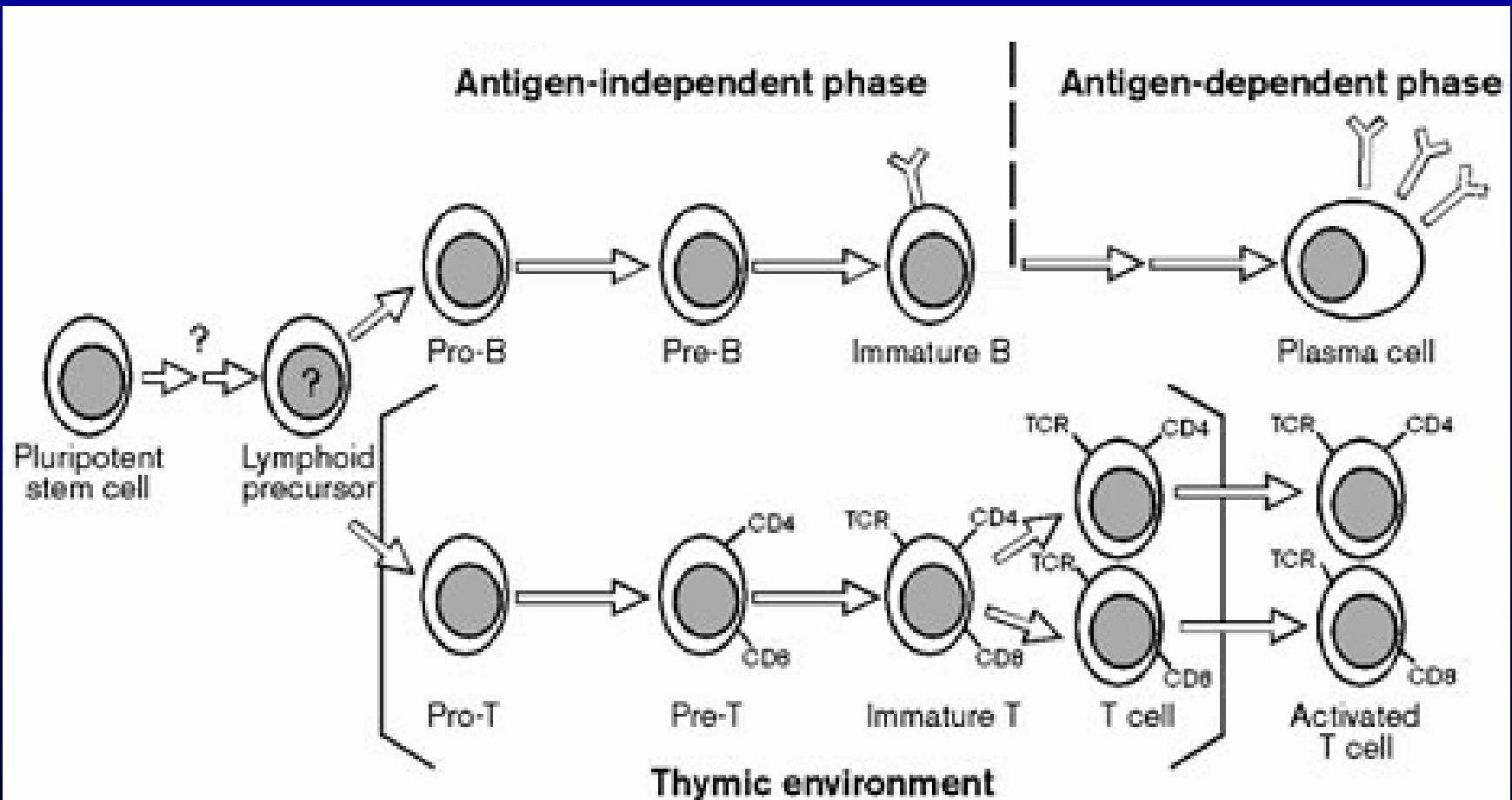
A minus sign (-) indicates mechanism does not operate.

‡See Figure 9-8d for theoretical number of combinations generated by N-region addition.

Rappel différenciation T



Parallèle différenciations B et T



© 1998 Current Opinion in Immunology

Mise en place des répertoires

