

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

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

IF-IIb
février 2011

IF2011 MV423 IF-IIb

1

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

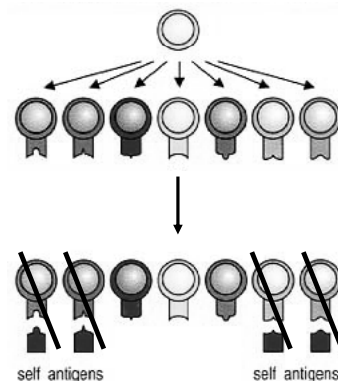
1. **Rappels**
2. Recombinaison V(D)J
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

IF2011 MV423 IF-IIb

4

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

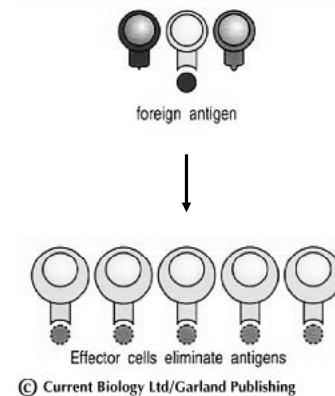


IF2011 MV423 IF-IIb

5

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



IF2011 MV423 IF-IIb

6

Un paradoxe génétique

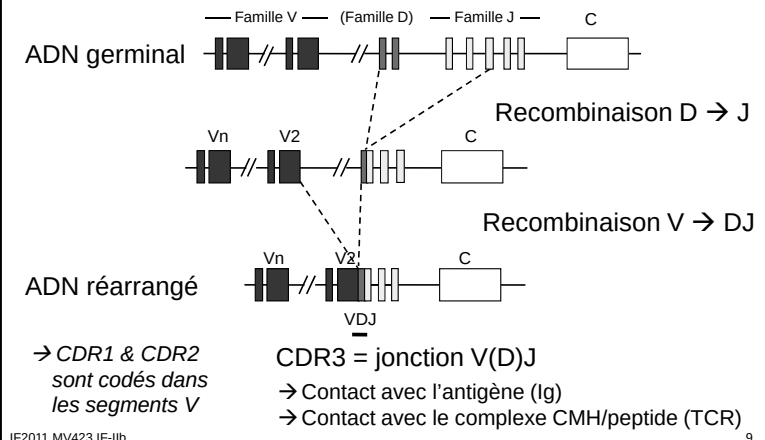
- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
- ~20 000 gènes dans le génome humain
- Mais...
- Capacité de production d'une variété « infinie » d'Ig et de TCR (cf. Landsteiner)
- Constance des domaines constants vs. Diversité dans les domaines variables (cf. Edelman, 1969)
- Combien de gènes doit-on considérer ?

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

IF2011 MV423 IF-IIb

8

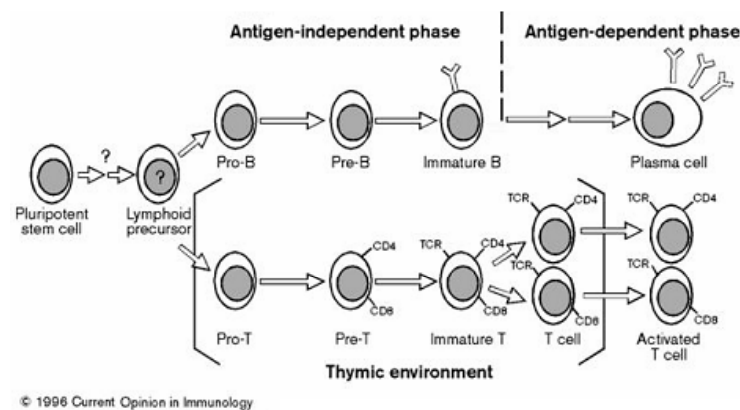
Les régions variables sont créées pendant la recombinaison V(D)J



IF2011 MV423 IF-IIb

9

Parallèle différenciations B et T



IF2011 MV423 IF-IIb

D'après Fitzsimmons et Hagman (1996) Curr. Op. Immunol. 8:166-174

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

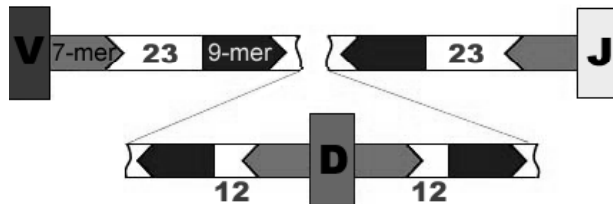
1. Rappels
2. **Recombinaison V(D)J**
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

IF2011 MV423 IF-IIb

12

La recombinaison V(D)J (1)

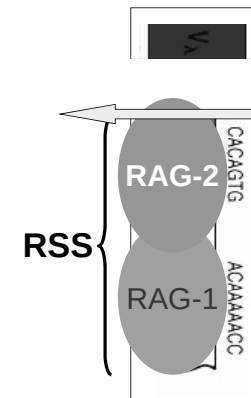
- Nécessite l'expression des protéines RAG-1 et RAG-2
- Nécessité de l'ouverture/accessibilité de la chromatine pour la recombinaison
- Reconnaissance de RSS : heptamère-espaceur-nonamère suivant la règle 12/23



© Current Biology Ltd/Garland Publishing
IF2011 MV423 IF-IIb

13

Séquences signal de recombinaison

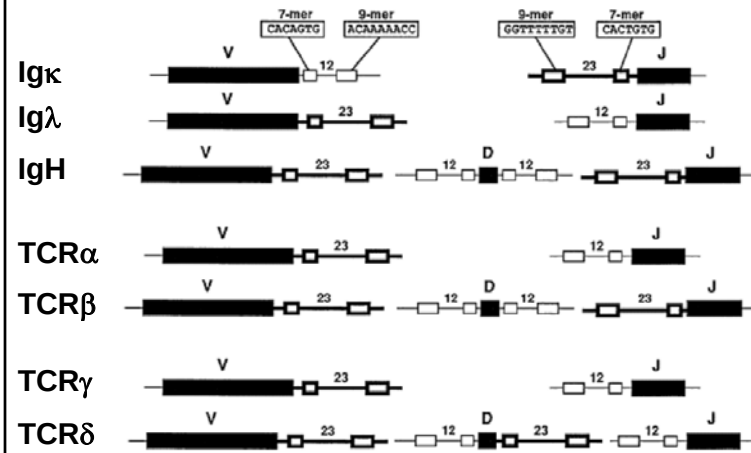


- Heptamère → **CACAGTG**
- Espaceur 12 ou 23
- Nonamère → **ACAAAAACC**

IF2011 MV423 IF-IIb

14

La règle 12/23 pour les Ig et TCR

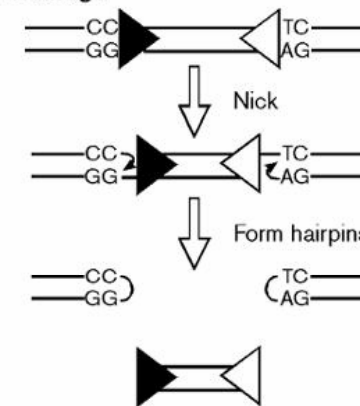


IF2011 MV423 IF-IIb

15

La recombinaison V(D)J (2)

(a) Cleavage



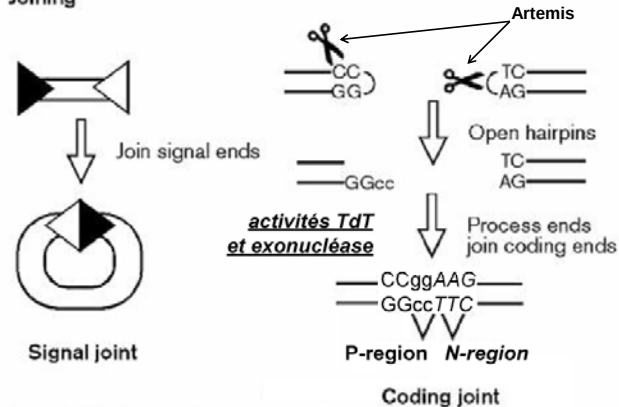
© 1996 Current Opinion in Immunology

IF2011 MV423 IF-IIb

16

La recombinaison V(D)J (3)

(b) Joining



© 1996 Current Opinion in Immunology

IF2011 MV423 IF-IIb

17

La recombinaison V(D)J (4)

Différentes protéines sont impliquées :

- RAG-1/RAG-2
- HMG1/2 (high mobility group protein)
- Ku70, Ku80, DNAPK, XRCC4, Ligase IV
- Artemis: hairpin/exonuclease → régions P
- TdT: polymerase → régions N

IF2011 MV423 IF-IIb

18

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 (+).

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

IF2011 MV423 IF-IIb

19

Les régions CDR1, CDR2 & CDR3

Source of variation	CDR1	CDR2	CDR3
Sequence encoded by:	V segment	V segment	IgL/TCRγ/TCRα V-J IgH/TCRδ/TCRβ V-D-J
Junctional flexibility	-	-	+
P-nucleotide addition	-	-	+
N-nucleotide addition*	-	-	+
Somatic hypermutation (Ig uniqueness)	+	+	+

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

IF2011 MV423 IF-IIb

22

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

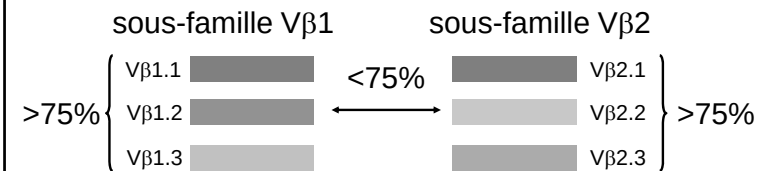
1. Rappels
2. Recombinaison V(D)J
3. **Organisation des locus TCR et Ig**
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

IF2011 MV423 IF-IIb

23

Sous-familles de gènes variables

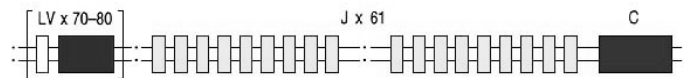
- Deux segments de gène variables de chaîne de TCR ou d'immunoglobuline sont groupés dans une même sous-famille s'ils partagent au moins 75 % d'identité au niveau nucléique.



IF2011 MV423 IF-IIb

24

Organisation génomique du locus TCR α humain

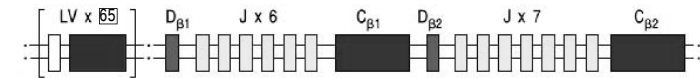


- Chromosome 14
- 1.1 Mb
- 50-60 V α groupés en 41 sous-familles
- 61 J α , un seul C α

IF2011 MV423 IF-IIb

25

Organisation génomique du locus TCR β humain



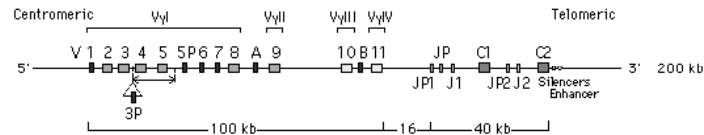
© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- 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

IF2011 MV423 IF-IIb

26

Organisation génomique du locus TCR γ humain

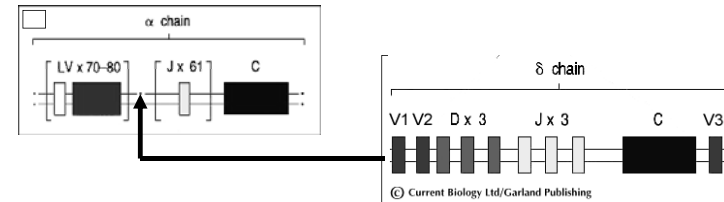


- Chromosome 7
- 14 V γ groupés en 4 sous-familles
- 5 J γ , 2 C γ , en deux répétitions
- Deux formes C γ 2 sans cystéine dans le peptide charnière → pas de pont disulfure avec la chaîne TCR δ

IF2011 MV423 IF-IIb

27

Organisation génomique du locus TCR δ humain



- 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

IF2011 MV423 IF-IIb

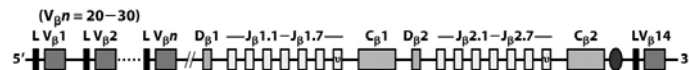
28

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)



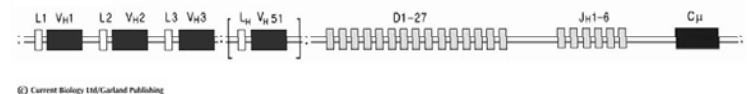
● = Enhancer
 ψ = pseudogene

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

IF2011 MV423 IF-IIb

29

Organisation génomique du locus IgH humain

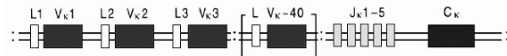


- Chromosome 14
- 1,2 Mb
- ~80 VH (dont ~50 fonctionnels) groupés en 7 sous-familles
- 27 DH, 6 JH, 9 CH

IF2011 MV423 IF-IIb

30

Organisation génomique du locus Igκ humain



© Current Biology Ltd/Carland Publishing

- Chromosome 2
- 1,8 Mb
- ~80 Vκ (dont ~40 fonctionnels) groupés en 7 sous-familles
- Vκ organisés en deux répétitions en miroir
- 5 Jκ, un seul Cκ

IF2011 MV423 IF-IIb

31

Organisation génomique du locus Igλ humain



© Current Biology Ltd/Carland Publishing

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

IF2011 MV423 IF-IIb

32

Organisation génomique des locus Ig chez la souris

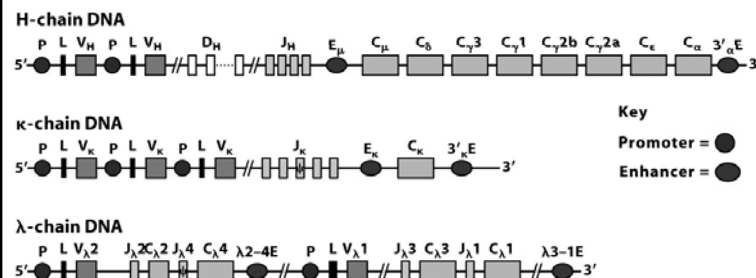


Figure 5-22
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

IF2011 MV423 IF-IIb

33

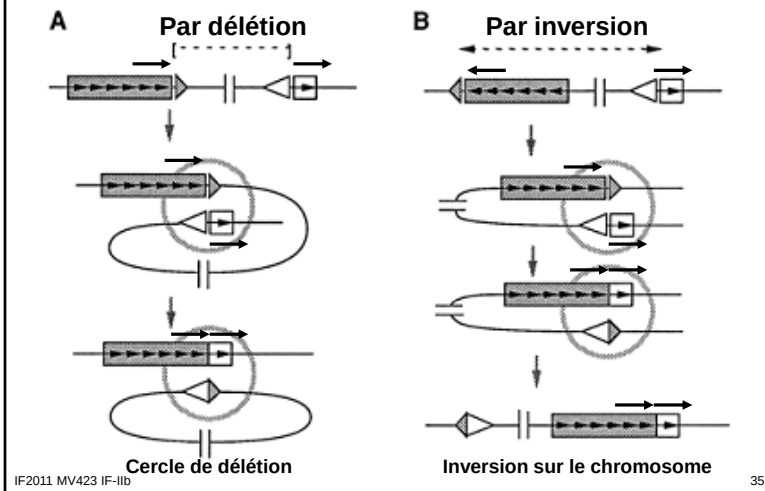
Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

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

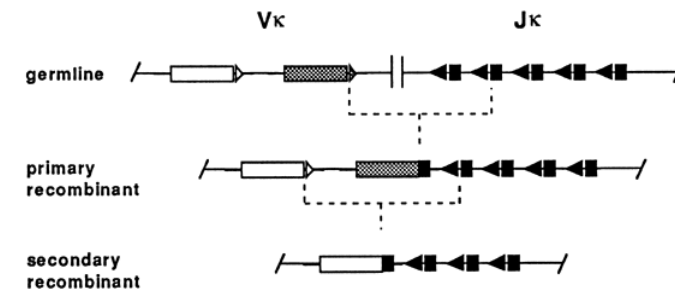
IF2011 MV423 IF-IIb

34

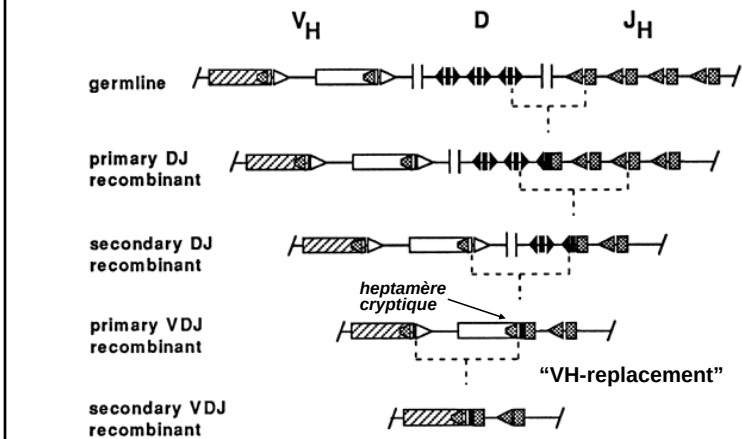
Différents types de réarrangements



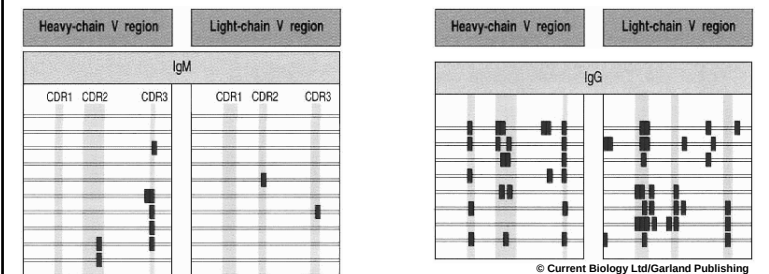
Réarrangements secondaires (1)



Réarrangements secondaires (2)



La maturation d'affinité



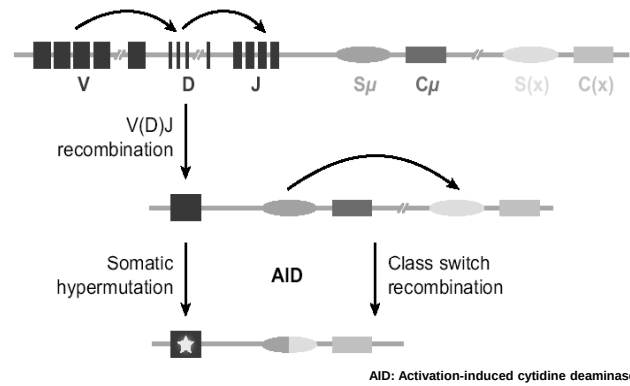
« Réponse primaire »
7 jours après la 1^{ère} immunisation → « Réponse secondaire »
7 jours après la 2^{ème} immunisation au jour 14

→ *Hypermutation somatique dans les centres germinatifs*

IF2011_MV423_IF-IIb

42

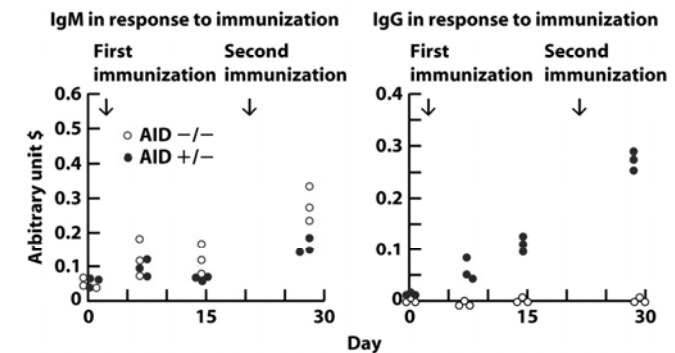
AID est nécessaire pour la commutation et l'hypermutation (1)

Teng & Papavasiliou (2007) *Annu.Rev.Genet.* 41:107.

IF2011 MV423 IF-IIb

43

AID est nécessaire pour la commutation et l'hypermutation (2)

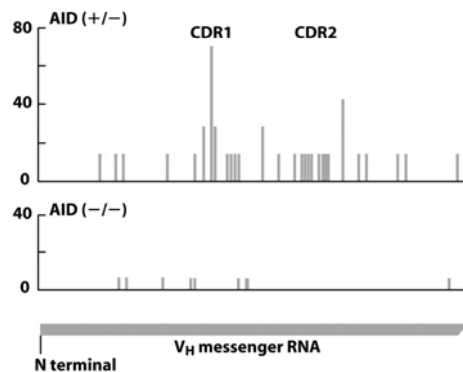
Figure 5-17a
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

IF2011 MV423 IF-IIb

45

AID est nécessaire pour la commutation et l'hypermutation (3)

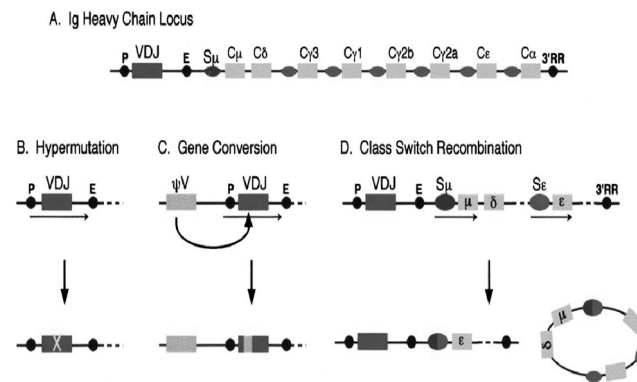
Mutations in variable-region mRNA

Figure 5-17b
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

IF2011 MV423 IF-IIb

46

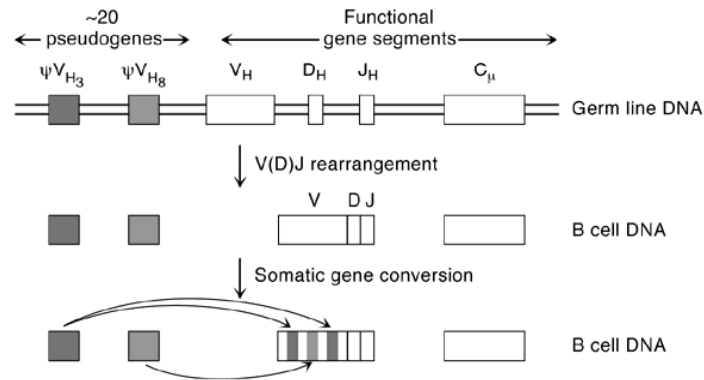
AID est également nécessaire pour la conversion génique

Papavasiliou & Schatz (2002) *Cell* 109:S35.

IF2011 MV423 IF-IIb

47

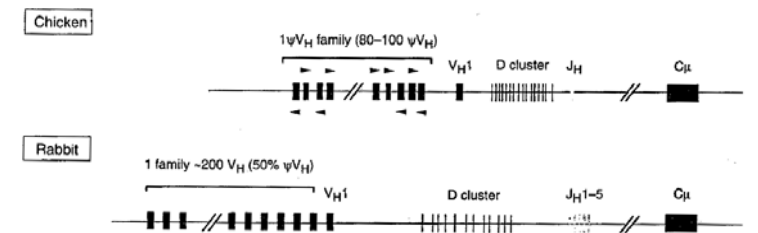
Conversion génique (1)



IF2011 MV423 IF-IIb

48

Conversion génique (2)



IF2011 MV423 IF-IIb

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

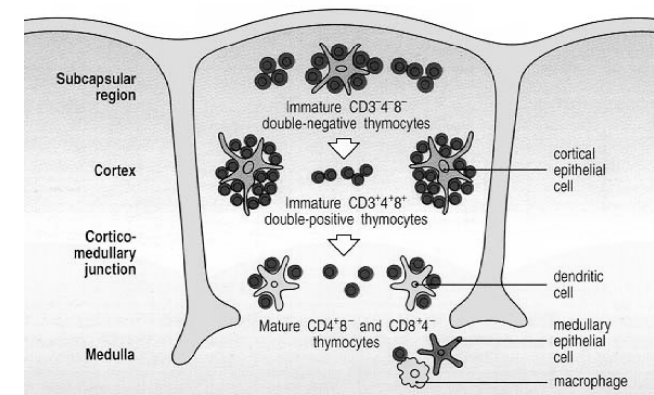
Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

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

IF2011 MV423 IF-IIb

50

Architecture cellulaire du thymus



IF2011 M... © Current Biology Ltd/Garland Publishing

54

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)*

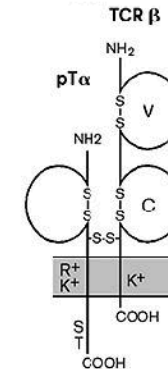
IF2011 MV423 IF-IIb

55

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



IF2011 MV423 IF-IIb

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

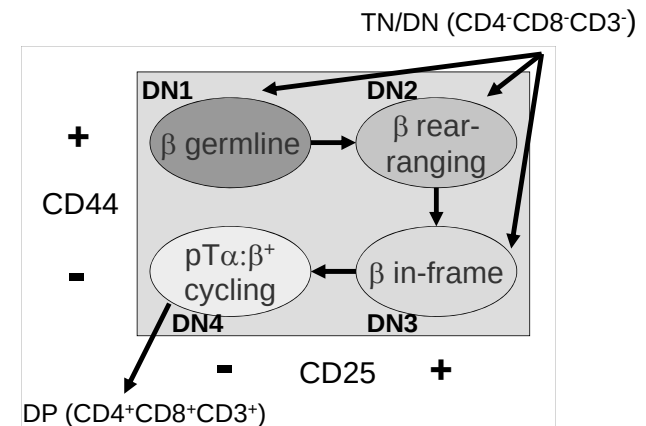
Rôle critique du pré-TCR

- 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

IF2011 MV423 IF-IIb

57

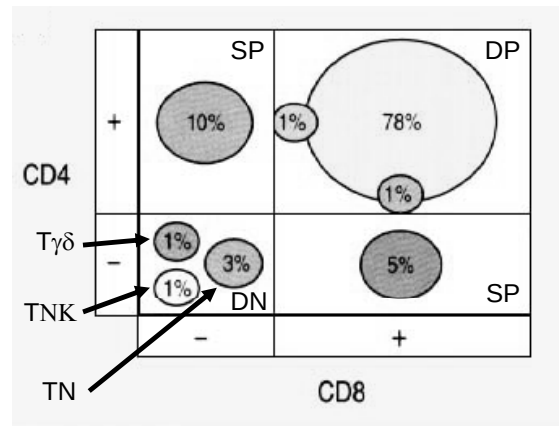
Différenciation des thymocytes (1)



IF2011 MV423 IF-IIb

58

Différenciation des thymocytes (2)

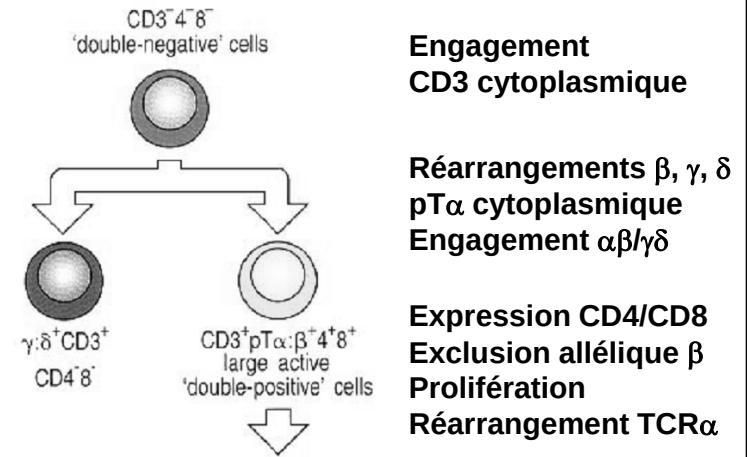


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

IF2011 MV423 IF-IIb

59

Différenciation des thymocytes (3)



IF2011 MV423 IF-IIb

62

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

IF2011 MV423 IF-IIb

63

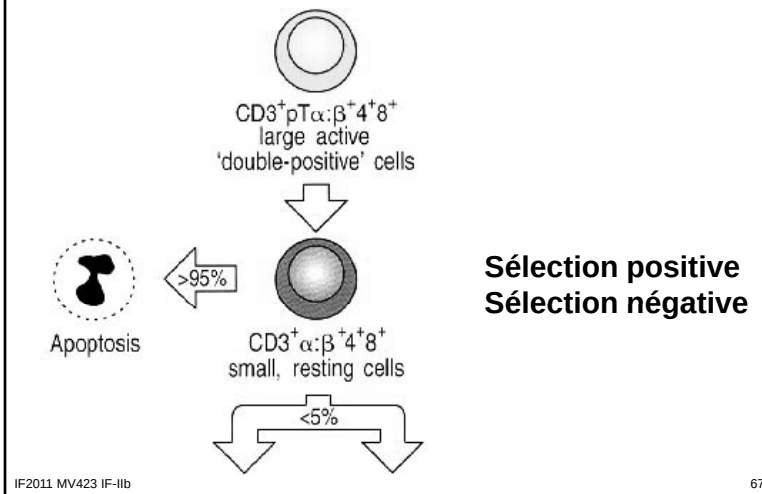
Régulation des réarrangements

- 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%)

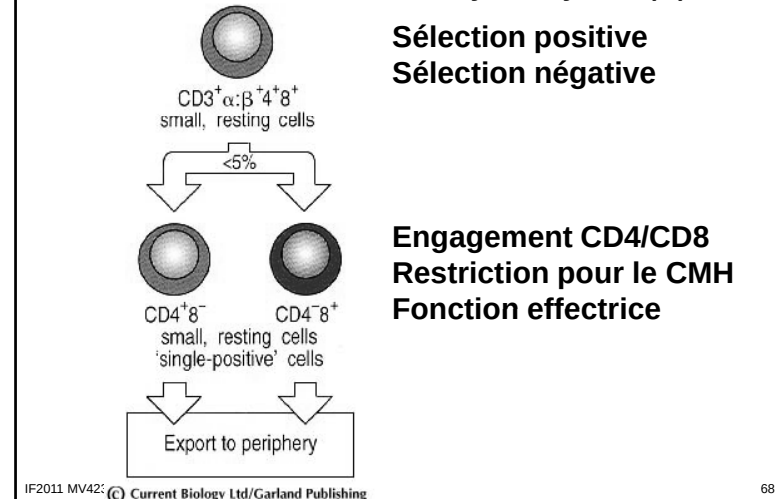
IF2011 MV423 IF-IIb

66

Différenciation des thymocytes (4)



Différenciation des thymocytes (5)



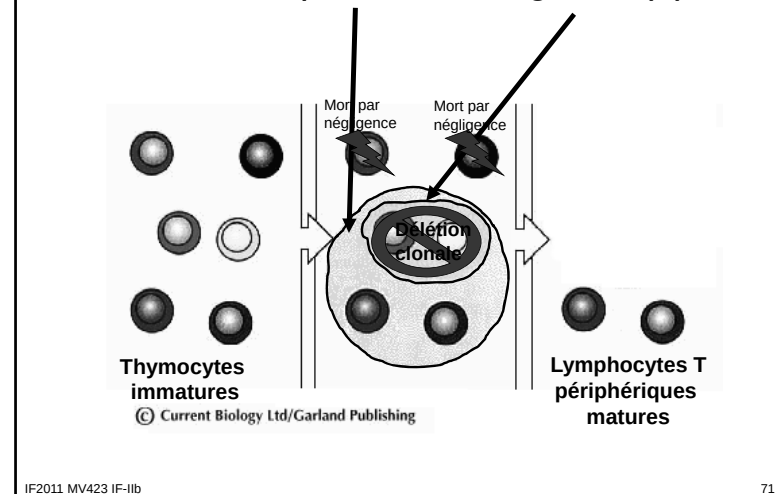
Sélections positive et négative (1)

- 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

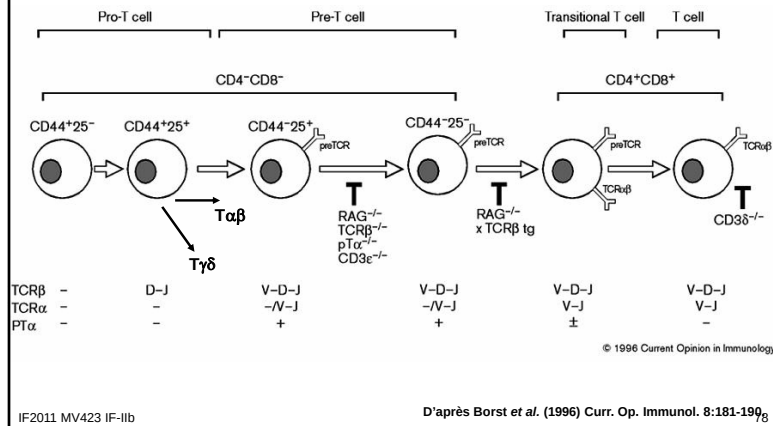
IF2011 MV423 IF-IIb

69

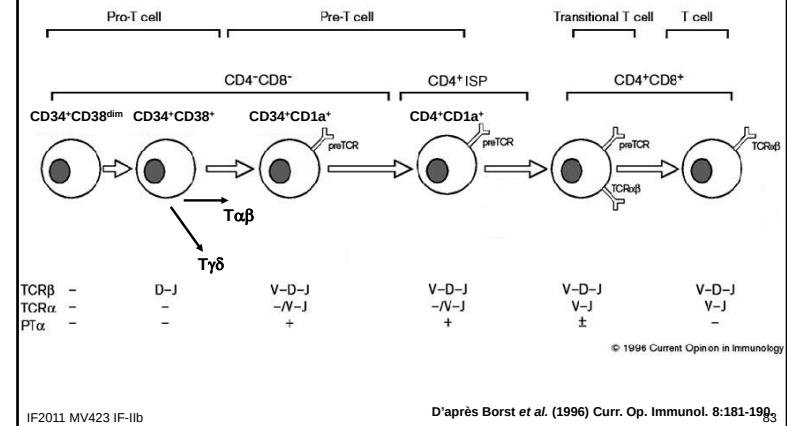
Sélections positive et négative (3)



Différenciation thymique: souris



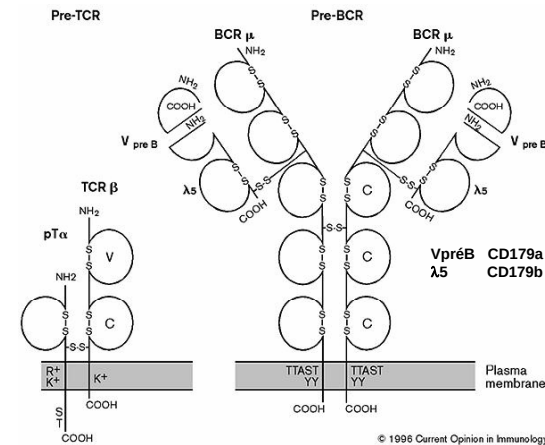
Différenciation thymique: homme



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



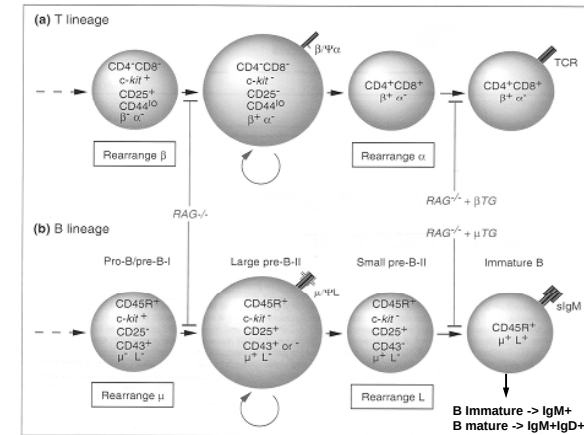
Rôle du pré-BCR

- *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

IF2011 MV423 IF-IIb

87

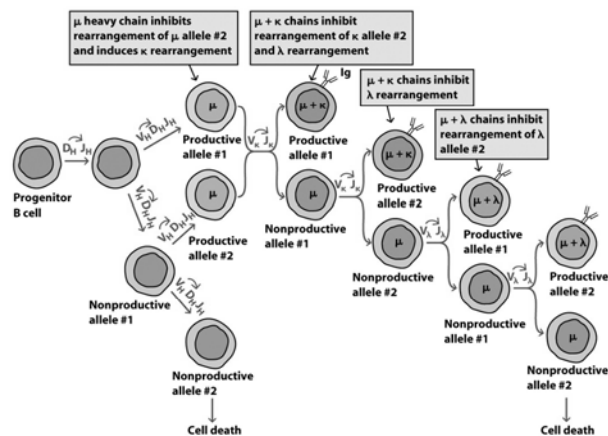
Différenciation des lymphocytes B



IF2011 MV423 IF-IIb

Lin and Desiderio (1995) *Immunol. Today* 16:279-289. 88

Réarrangements en série...

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

IF2011 MV423 IF-IIb

89

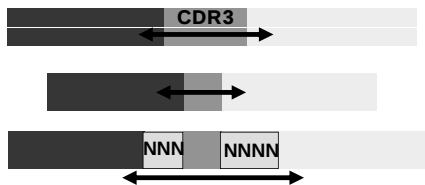
Conclusion

IF2011 MV423 IF-IIb

91

Diversité des chaînes Ig et TCR

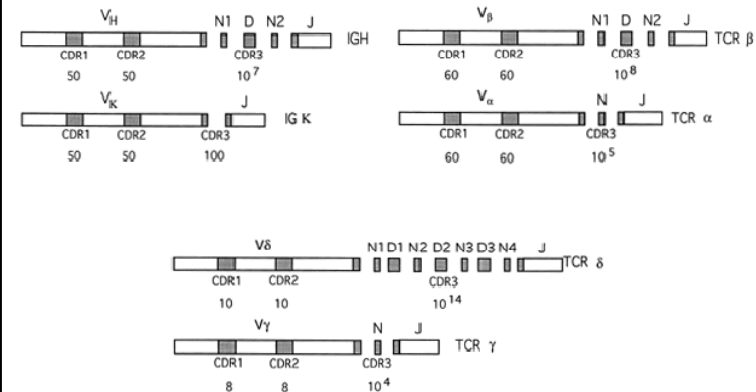
- La diversité des chaînes d'Ig et de TCR est le produit de :
 - Combinatoire des segments V(D)J
 - Appariement IgH/L, TCR α / β or TCR γ / δ
 - Ajout/élimination aléatoire de nucléotides à la jonction des segments géniques (CDR3)



IF2011 MV423 IF-IIb

92

Diversité jonctionnelle CDR3 : une stratégie générale



IF2011 MV423 IF-IIb

93

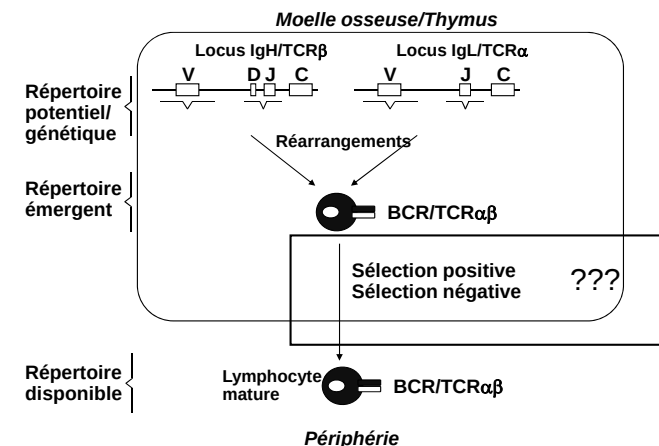
Estimation de la diversité (2)

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	$6 \times 2 \times 2$
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 ^b	+	$\sim 10^{12}$	+	$\sim 10^{15}$	+	$\sim 10^{18}$
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.^aA plus sign (+) indicates mechanism makes a significant contribution to diversity but to an unknown extent.^bA minus sign (-) indicates mechanism does not operate.^cSee Figure 9-8d for theoretical number of combinations generated by N-region addition.Table 9-3
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

95

Mise en place des répertoires



IF2011 MV423 IF-IIb

99