

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

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

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

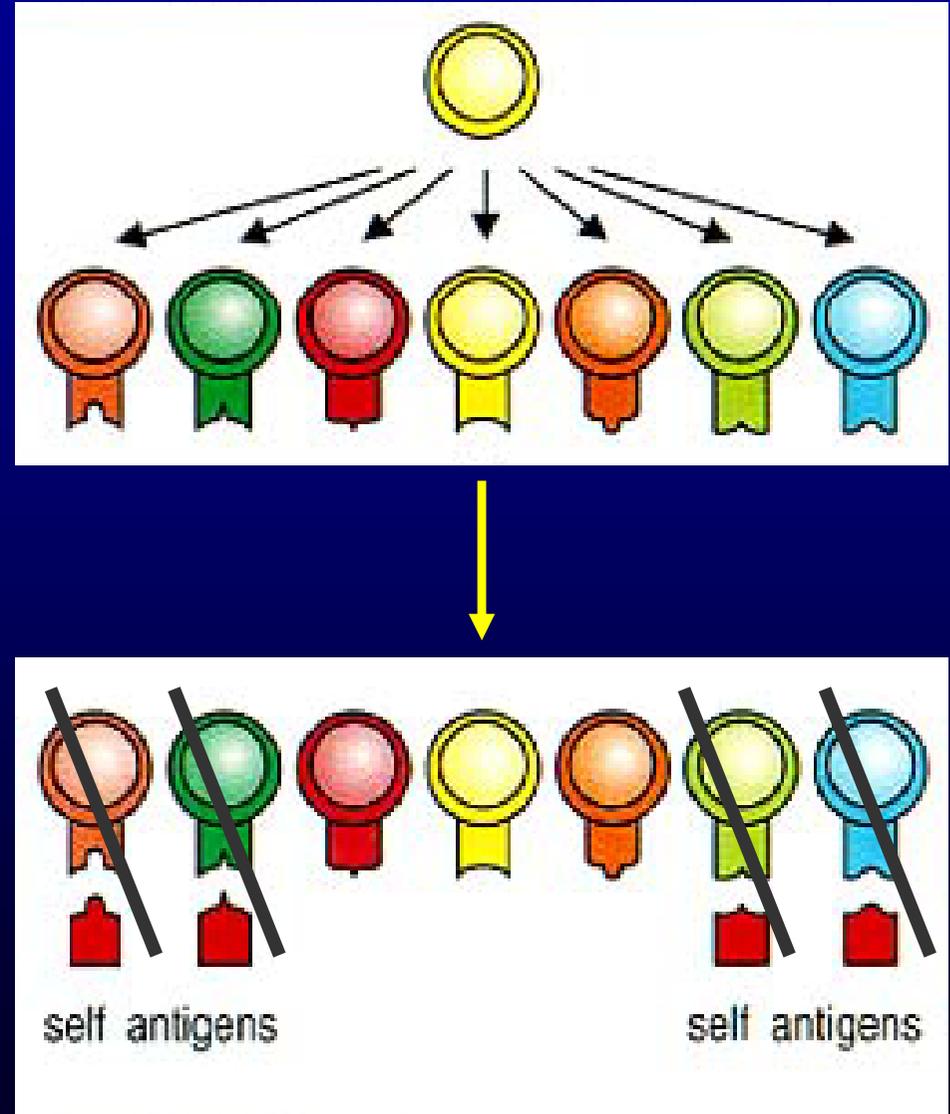
5. Différenciation lymphocytaire B et T

6. Conclusion

Théorie de la sélection clonale (1)

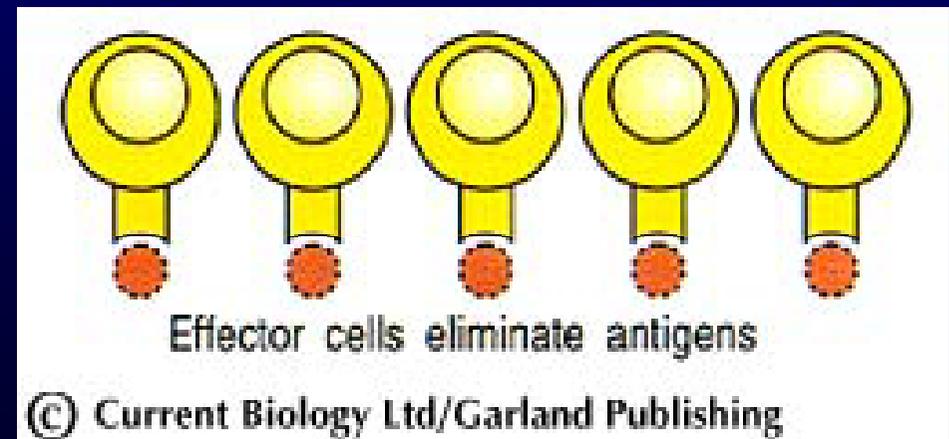
Burnet (1899–1985)

- 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

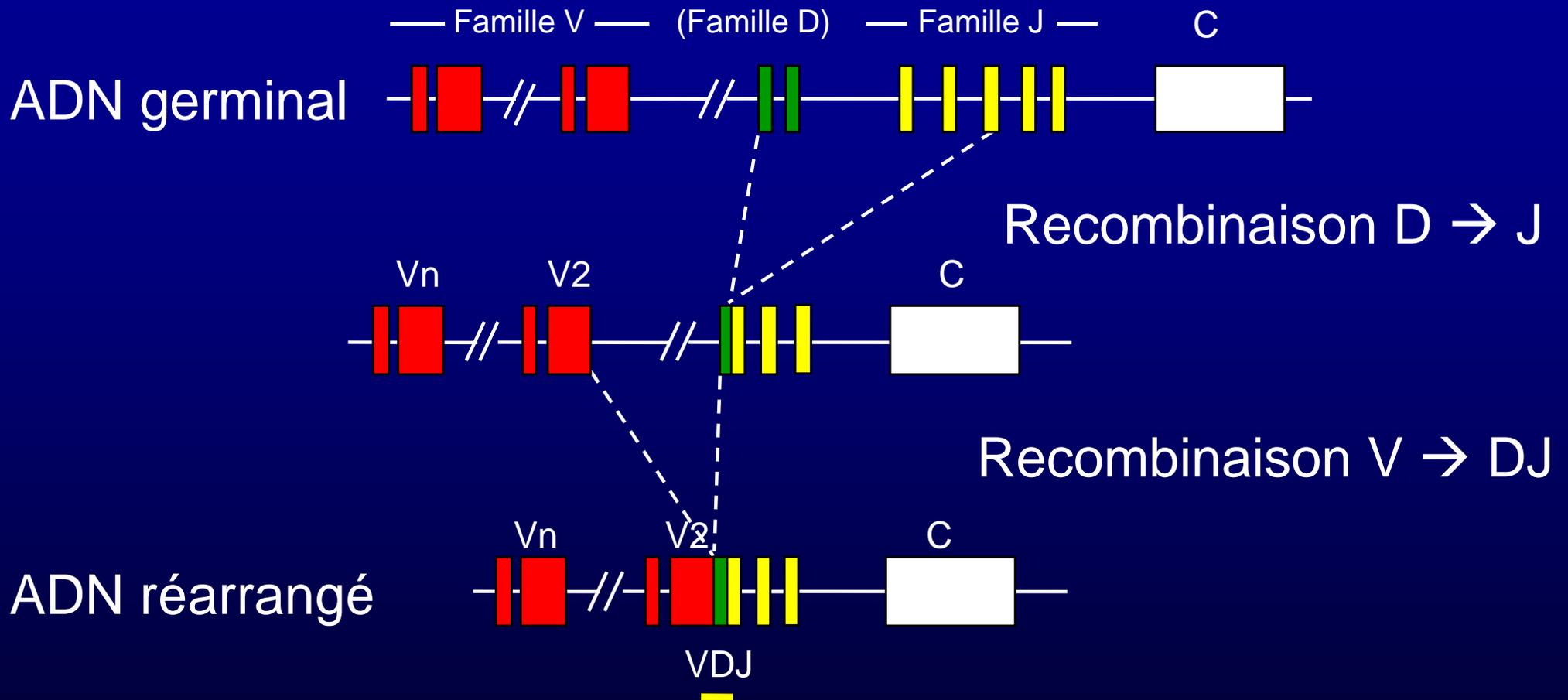
- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
- ~20 000 gènes dans le génome humain

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)

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



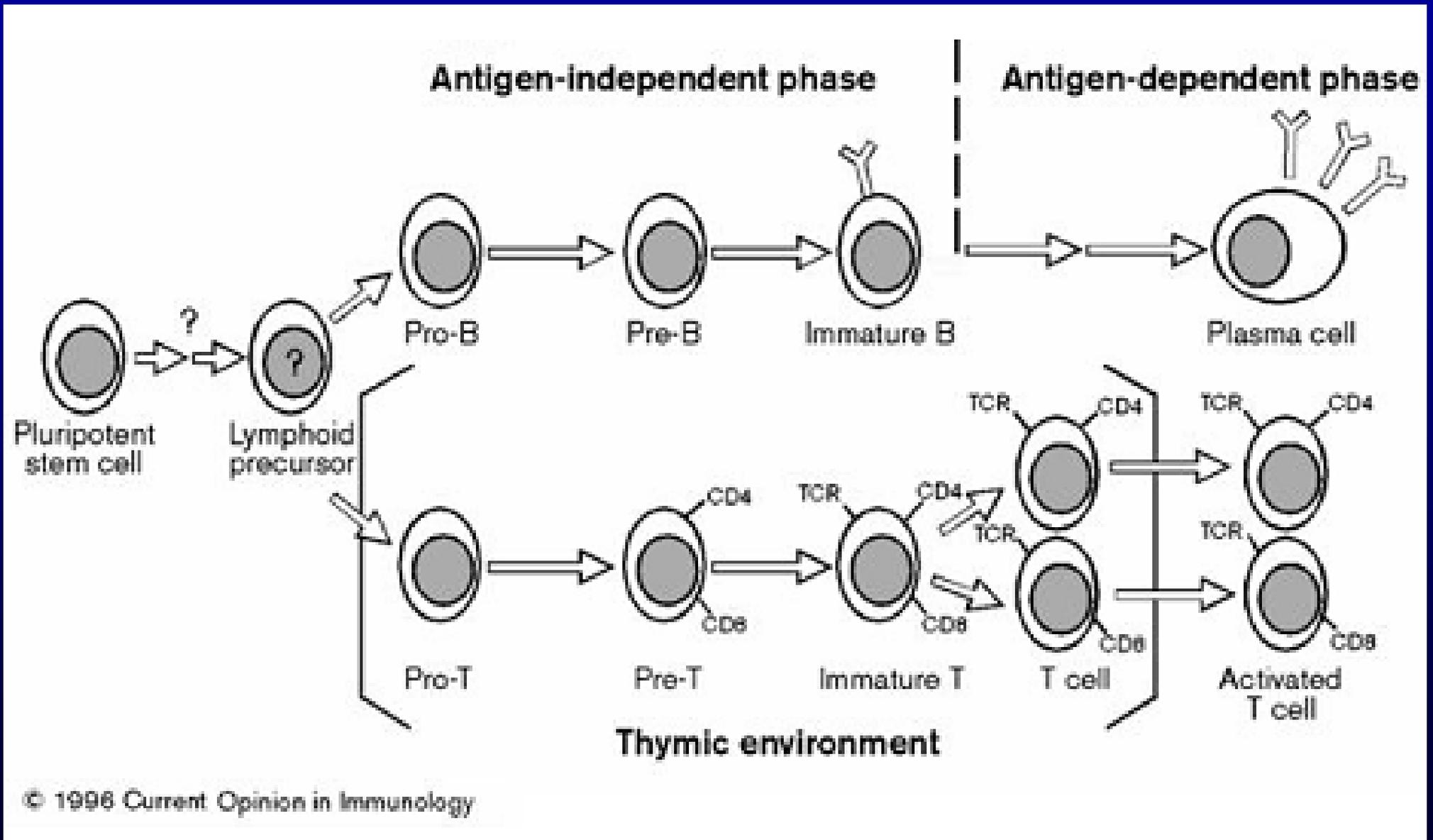
→ *CDR1 & CDR2*
sont codés dans
les segments V

CDR3 = jonction V(D)J

→ Contact avec l'antigène (Ig)

→ Contact avec le complexe CMH/peptide (TCR)

Parallèle différenciations B et T

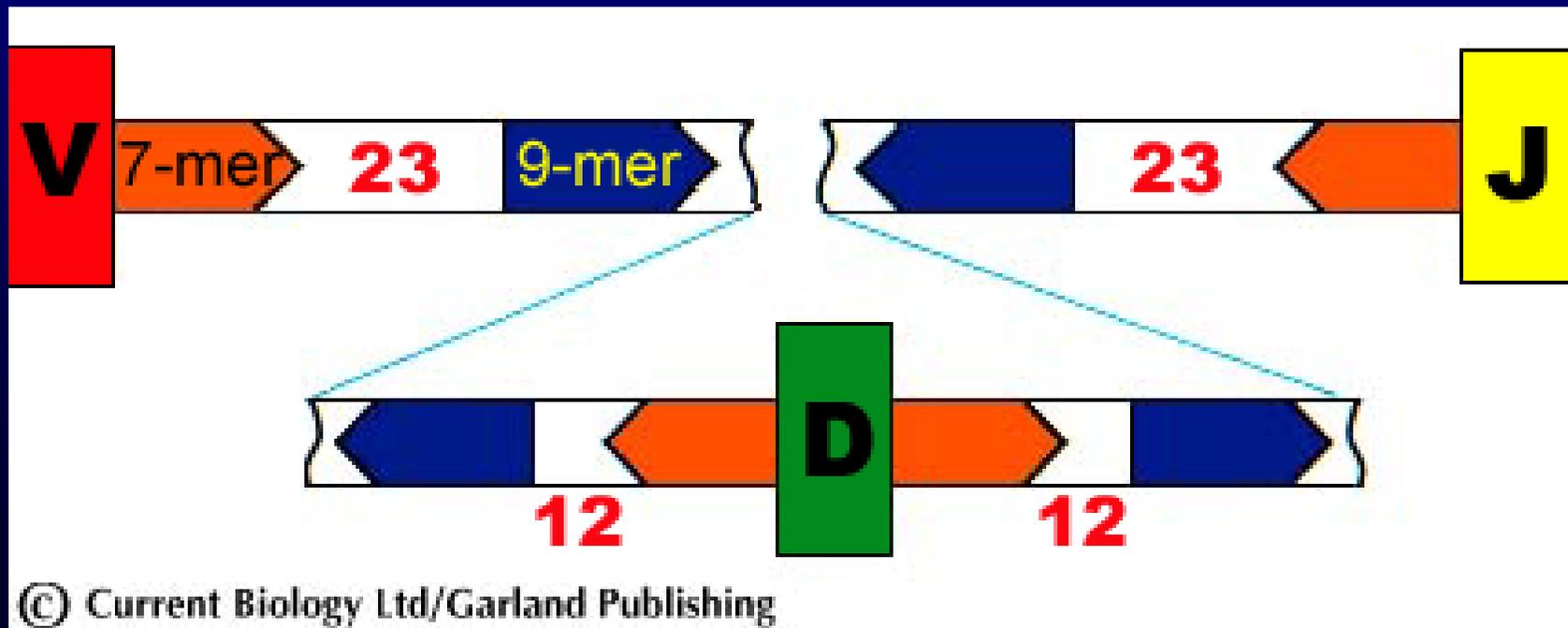


Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

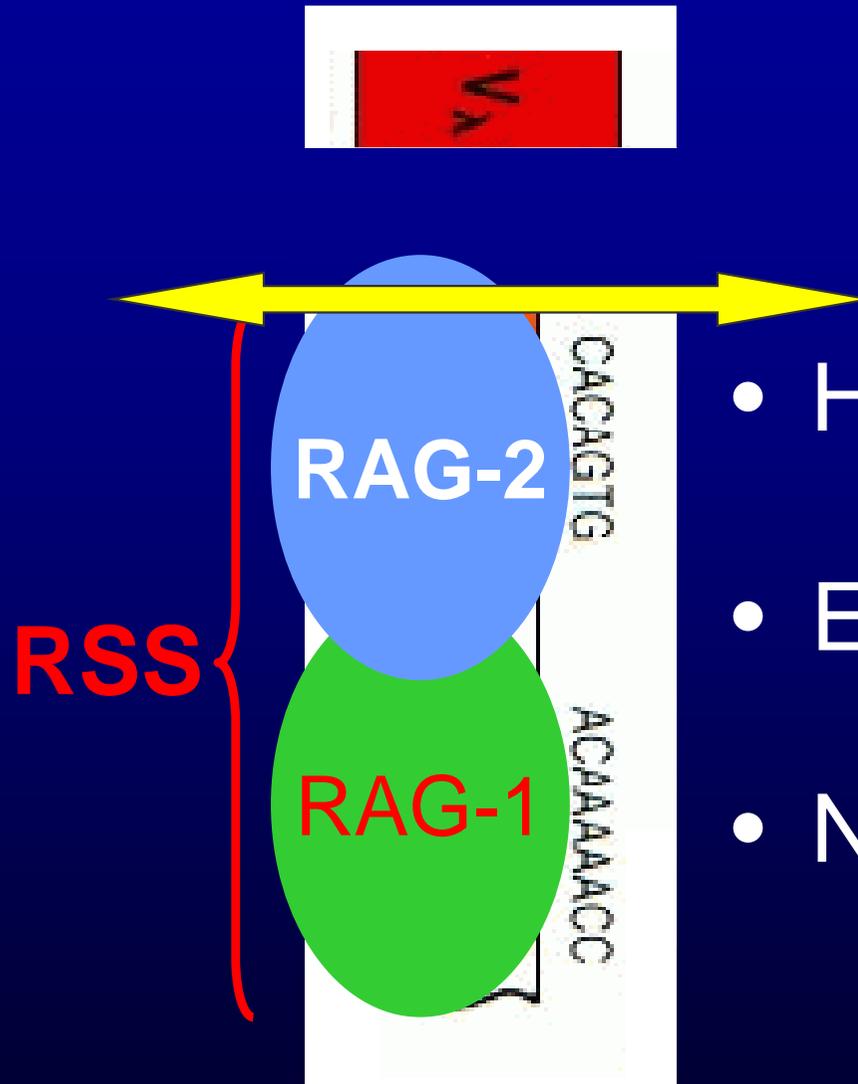
1. Rappels
- 2. Recombinaison V(D)J**
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

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 → *ACAAAAACC*

La règle 12/23 pour les Ig et TCR

Ig κ

Ig λ

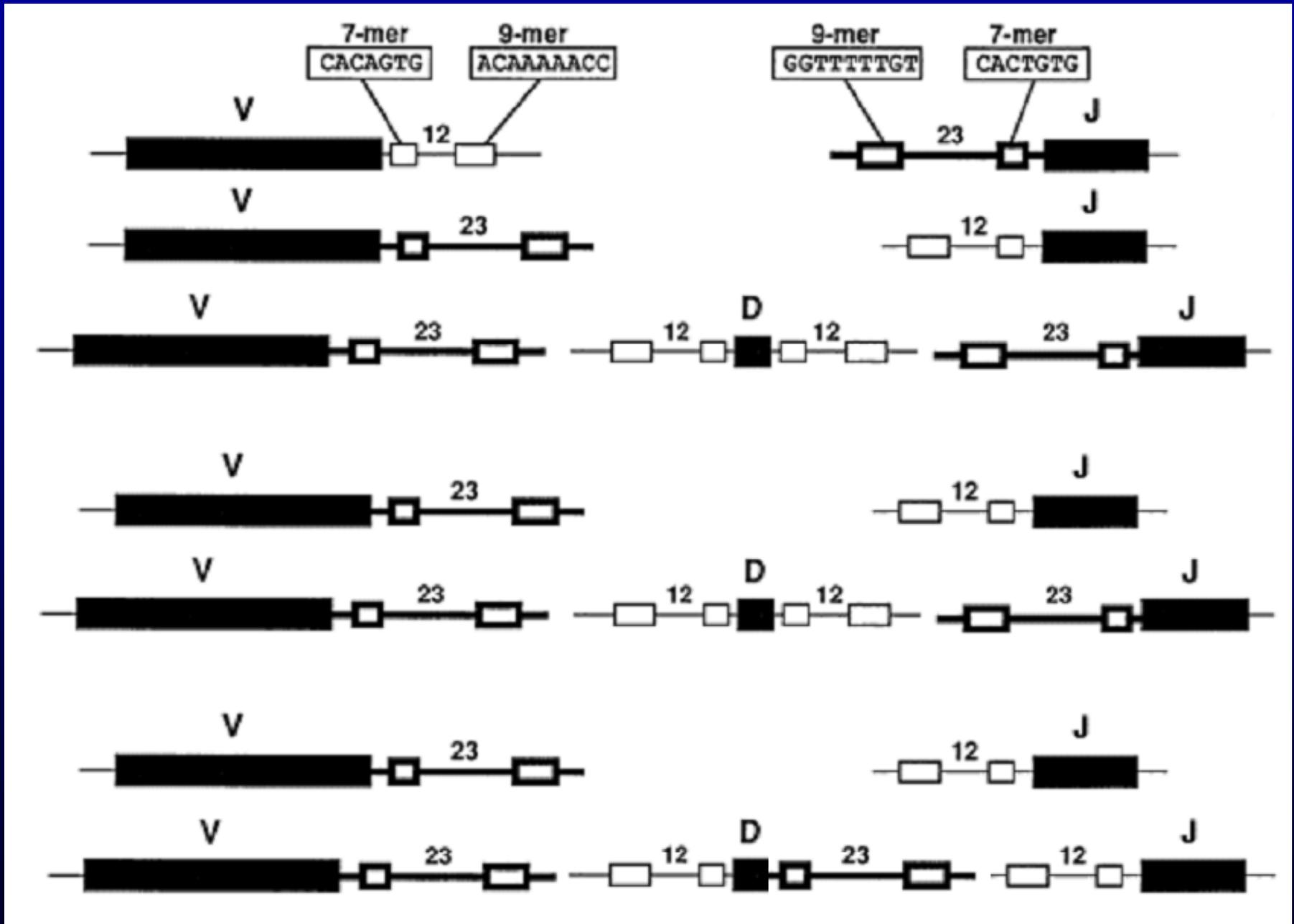
IgH

TCR α

TCR β

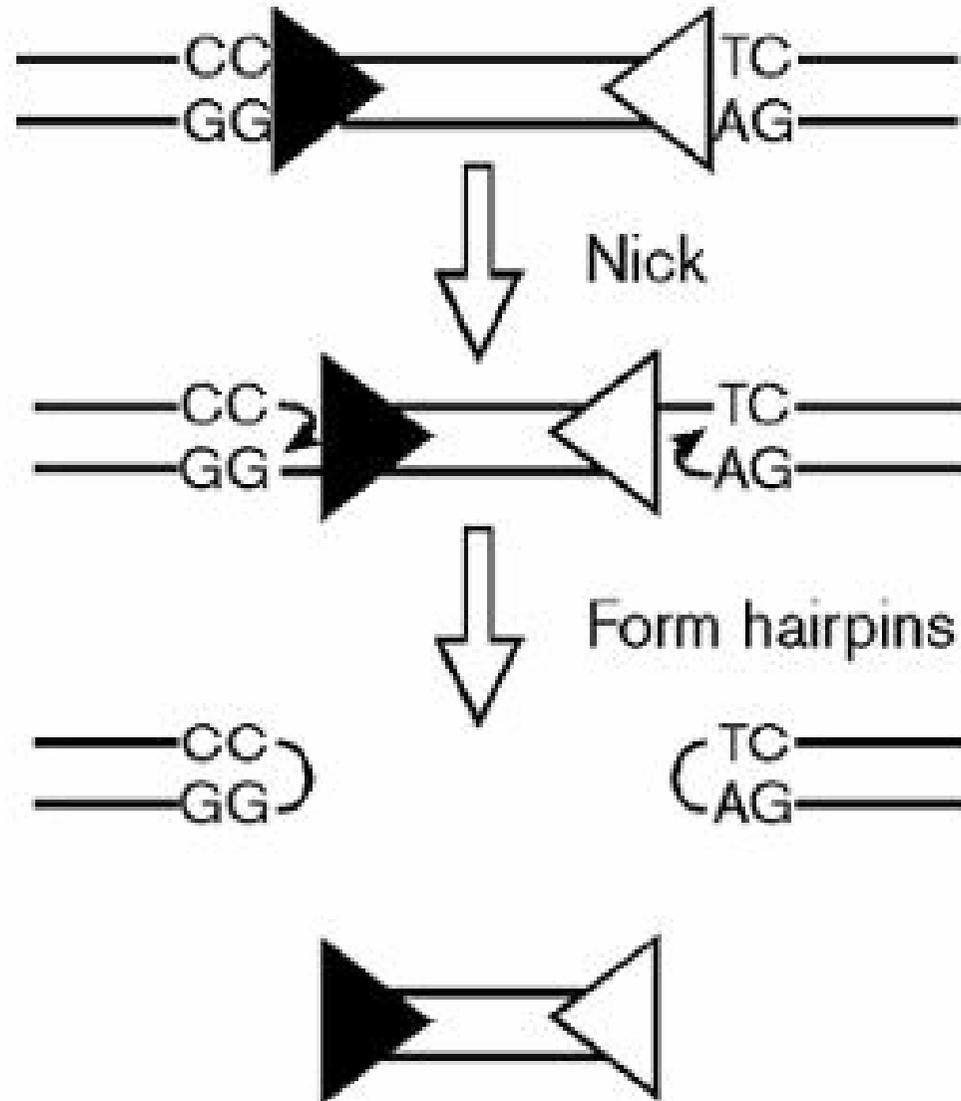
TCR γ

TCR δ



La recombinaison V(D)J (2)

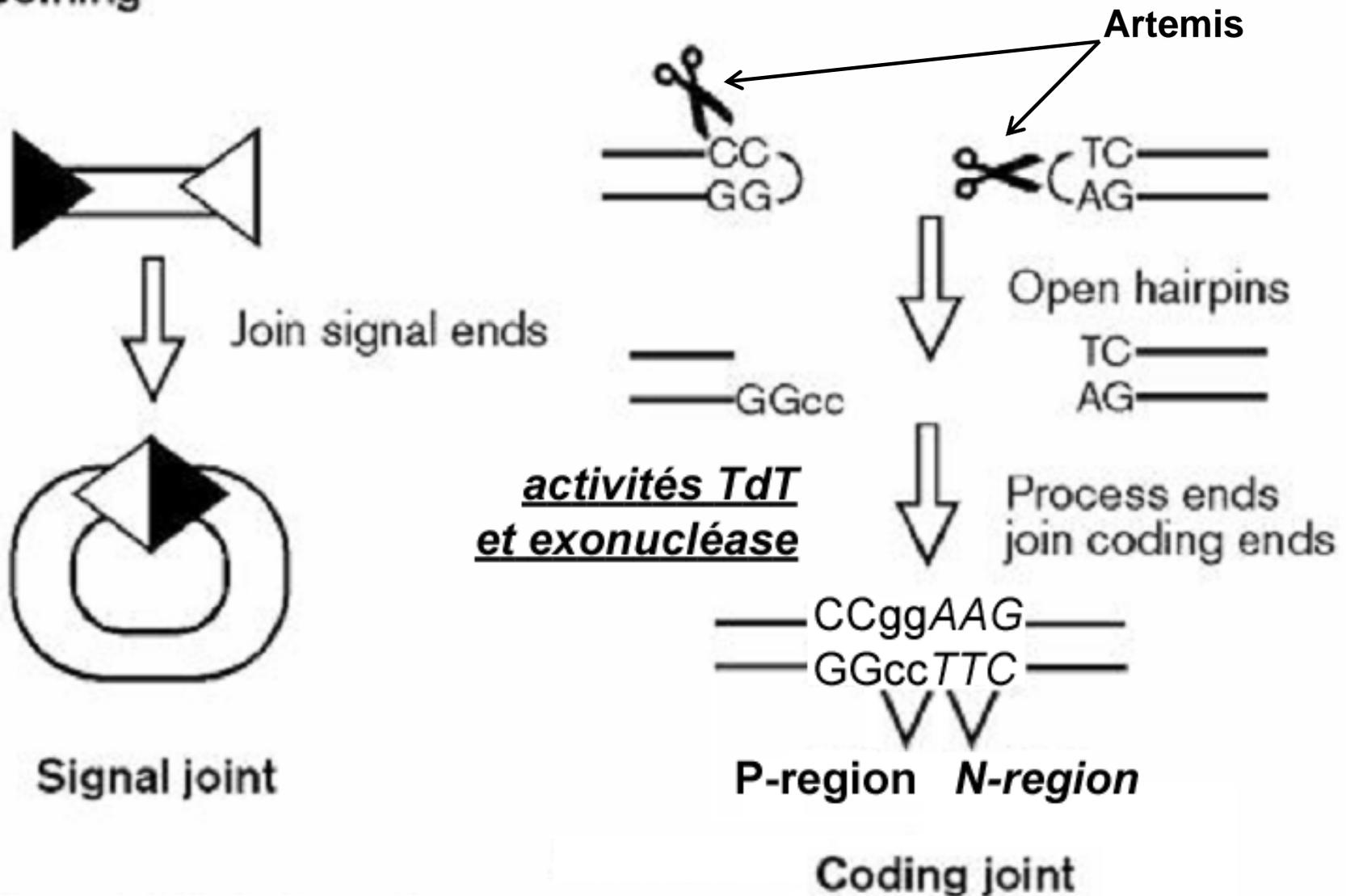
(a) Cleavage



© 1996 Current Opinion in Immunology

La recombinaison V(D)J (3)

(b) Joining



© 1996 Current Opinion in Immunology

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/exonucléase → régions P
- TdT: polymerase → 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> | |
|------------|------------|------|---|-------------|---|------|------------|------------|---|
| 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 | + |

Les régions CDR1, CDR2 & CDR3

| Source of variation | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
|--|-------------|-------------|---|
| Sequence encoded by: | V segment | V segment | IgL/TCR γ /TCR α V-J IgH/TCR δ /TCR β V-D-J |
| Junctional flexibility | — | — | + |
| P-nucleotide addition | — | — | + |
| N-nucleotide addition* | — | — | + |
| Somatic hypermutation (Ig uniqueness) | + | + | + |

*N nucleotide addition occurs in TCR & IgH chain DNA (not IgL chain)

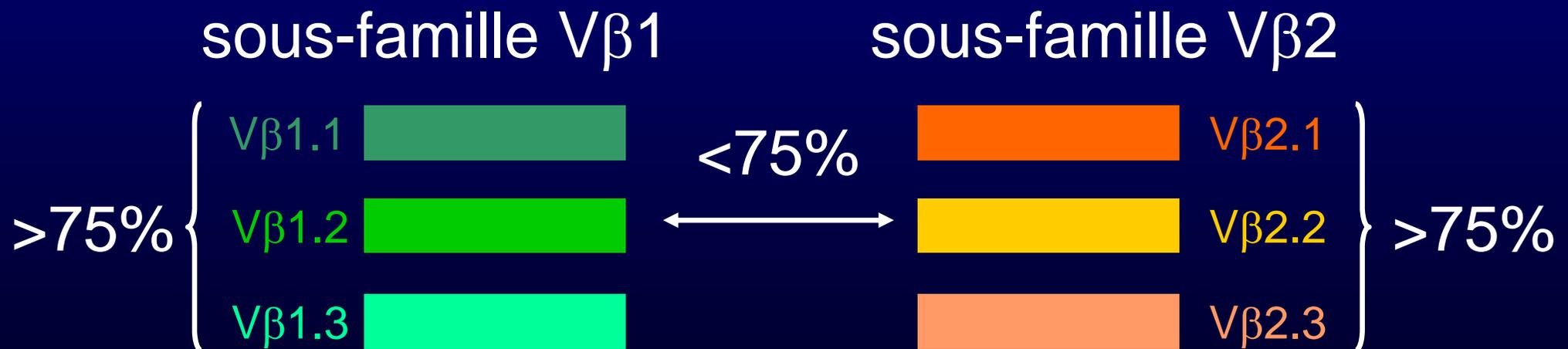
Table 5-3
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

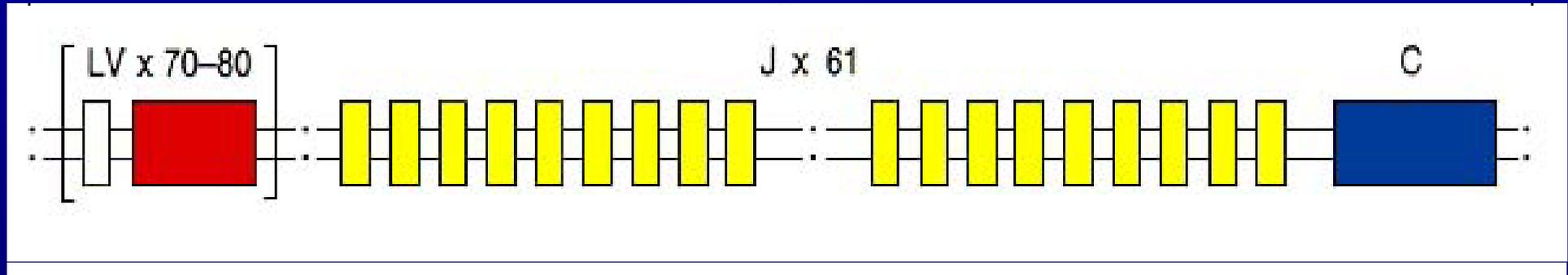
1. Rappels
2. Recombinaison V(D)J
- 3. Organisation des locus TCR et Ig**
4. Mécanismes de diversification
5. Différenciation lymphocytaire B et T
6. Conclusion

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.

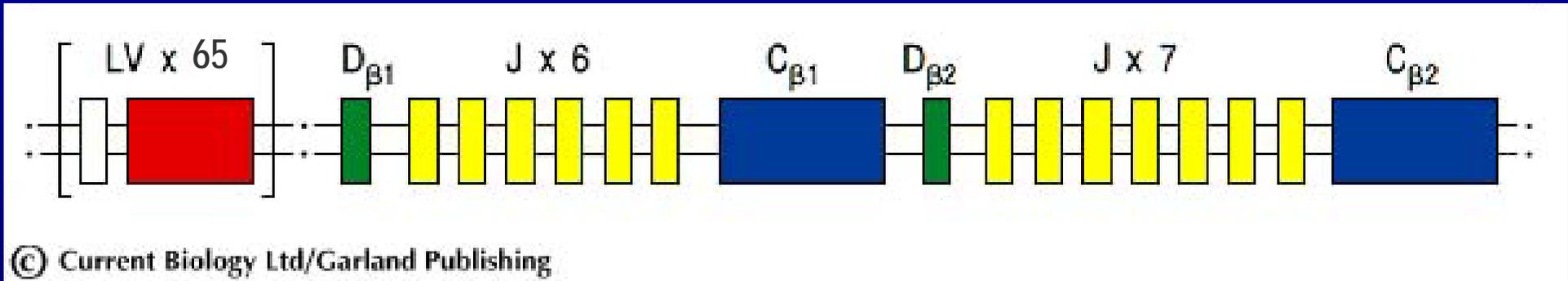


Organisation génomique du locus TCR α humain



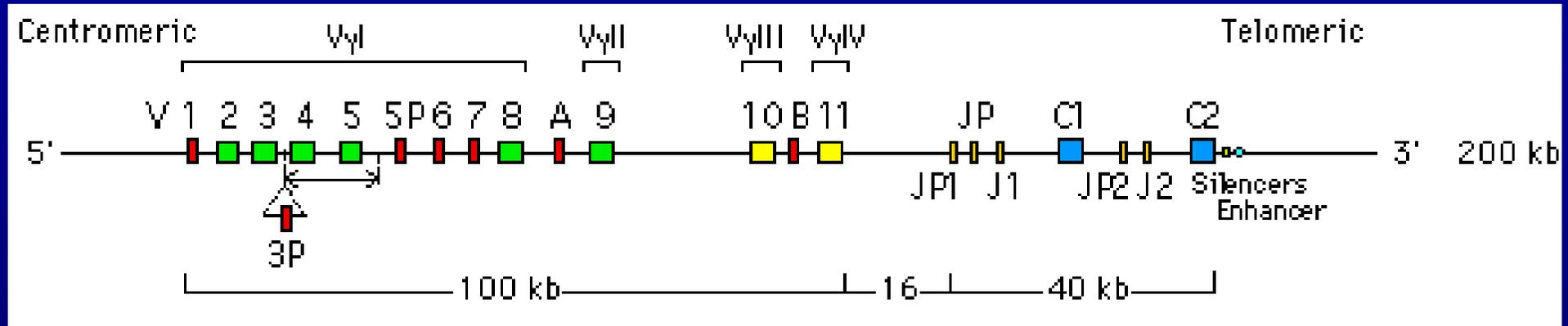
- Chromosome 14
- 1.1 Mb
- 50-60 V α groupés en 41 sous-familles
- 61 J α , un seul C α

Organisation génomique du locus TCR β humain



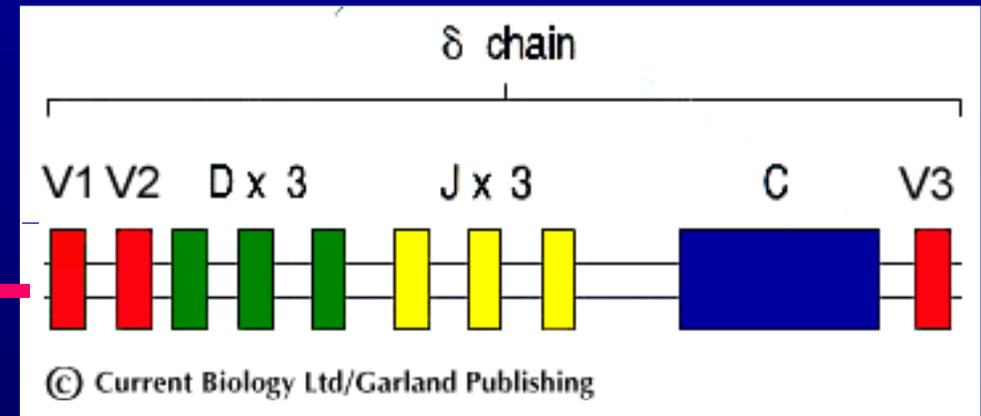
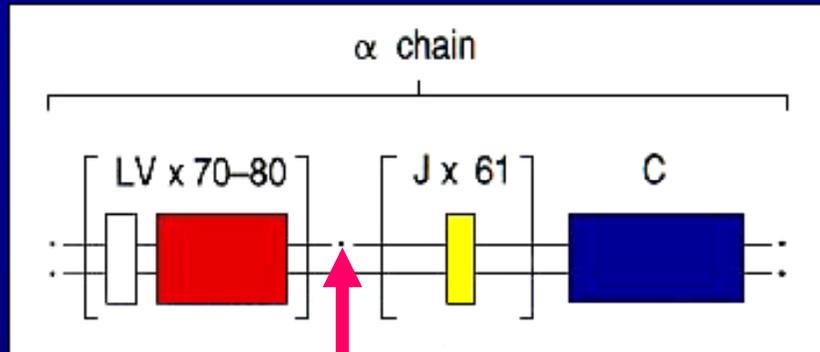
- Chromosome 7
- 685 kb
- 67 segments V β
- 30 sous-familles (1-9 membres)
- 2 D β , 13 J β , 2 C β , en deux répétitions

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

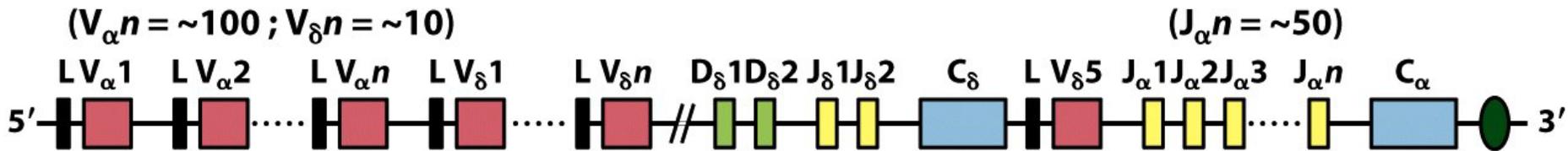
Organisation génomique du locus TCR δ humain



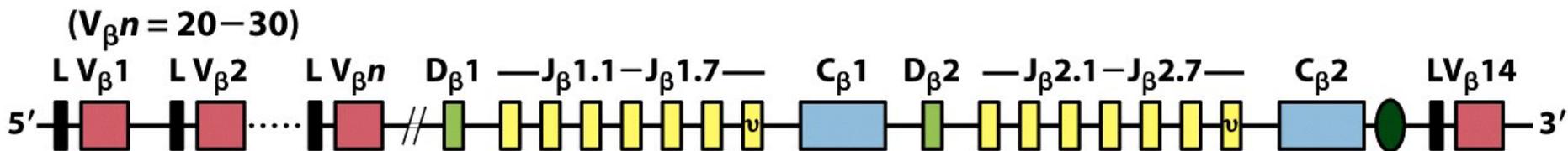
- Chromosome 14, inséré dans le locus TCR α
- 3 V δ principaux, 3 D δ , 3 J δ , un seul C δ
- Des V α sont utilisés par les chaînes TCR δ :
V α / δ 14.1, V α / δ 23.1, V α / δ 29.1, V α / δ 36.1, V α / δ 38.2
- 2 ou 3 D δ souvent en tandem dans CDR3

Organisation génomique des locus TCR chez la souris

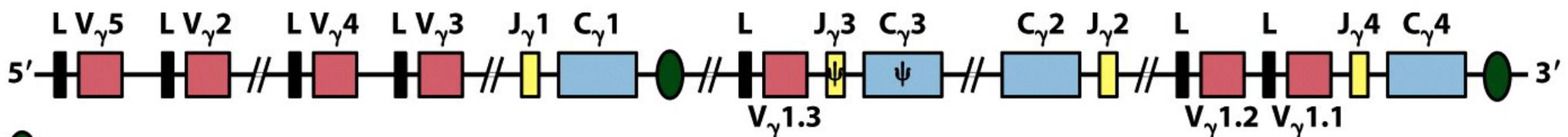
Mouse TCR α -chain and δ -chain DNA (chromosome 14)



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

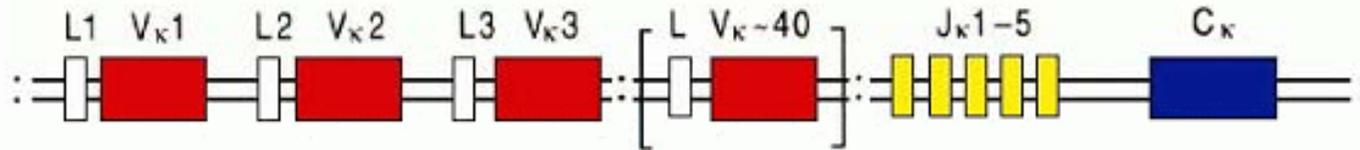
Organisation génomique du locus IgH humain



© 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

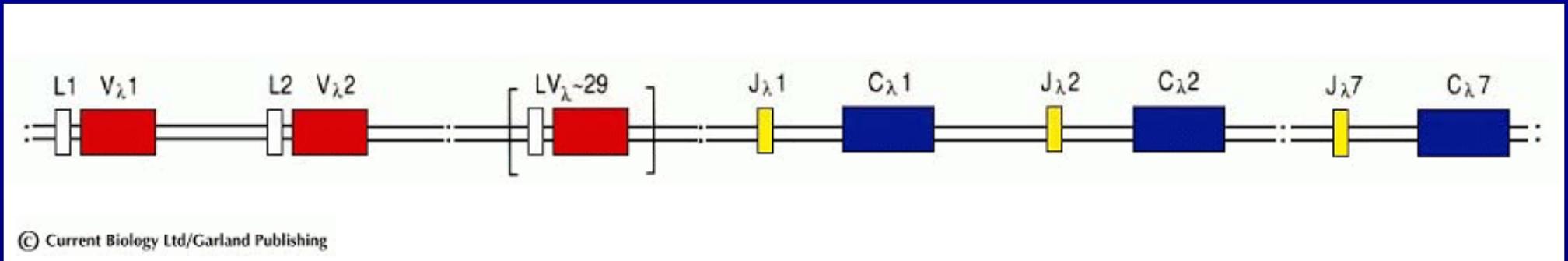
Organisation génomique du locus $Ig\kappa$ humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

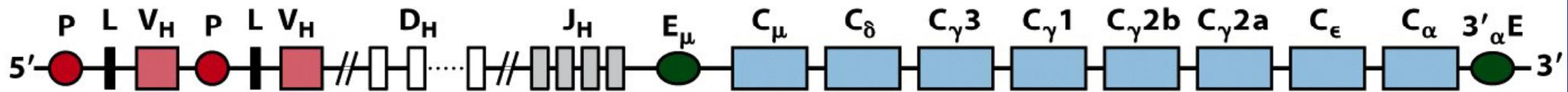
Organisation génomique du locus $Ig\lambda$ humain



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

Organisation génomique des locus Ig chez la souris

H-chain DNA



κ-chain DNA



Key



λ-chain DNA

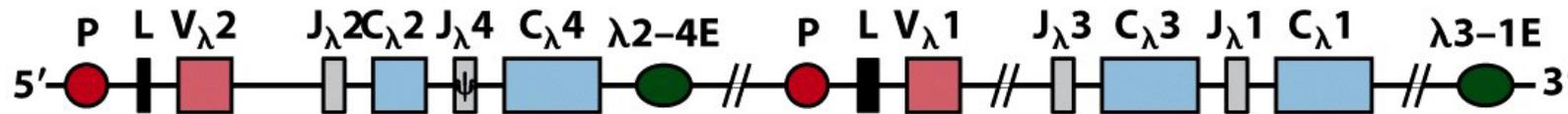


Figure 5-22

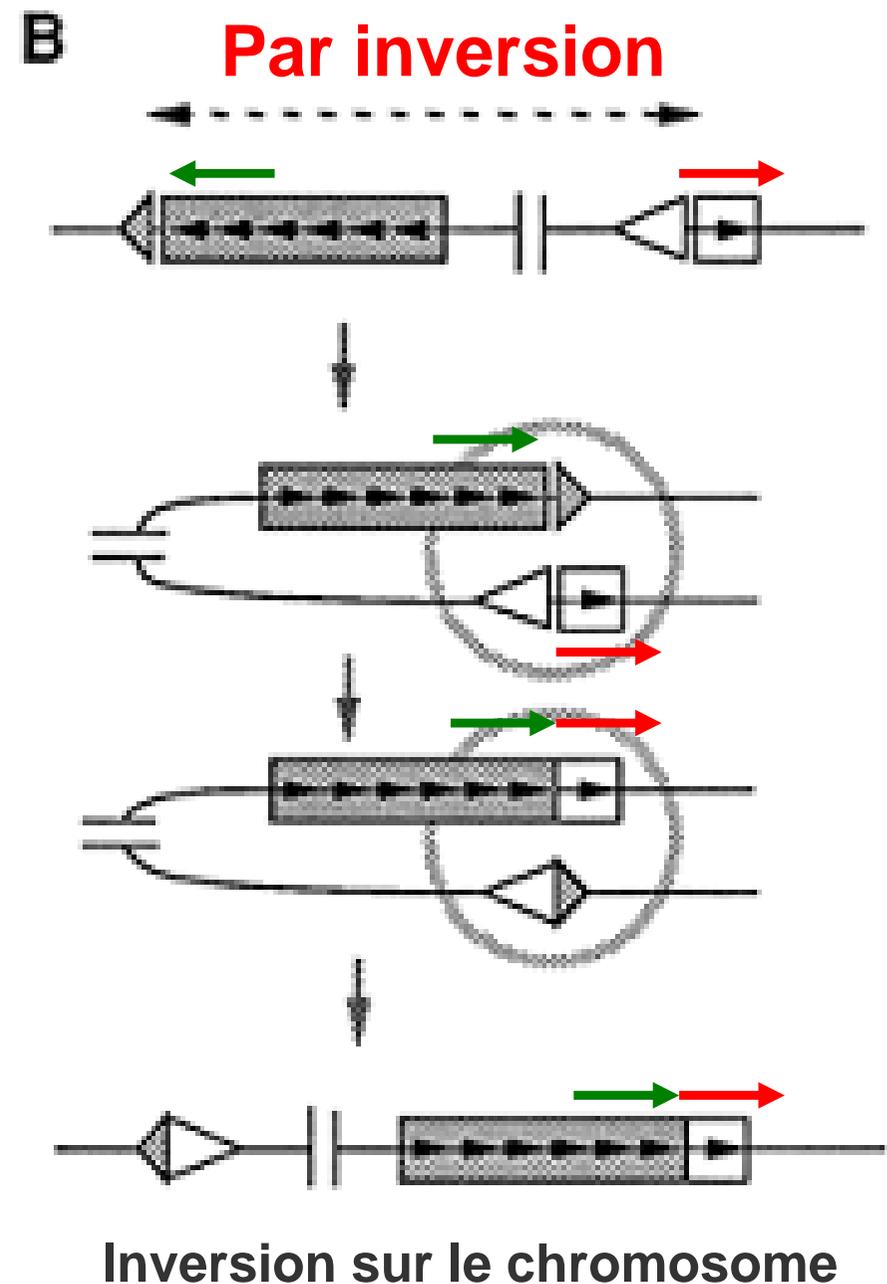
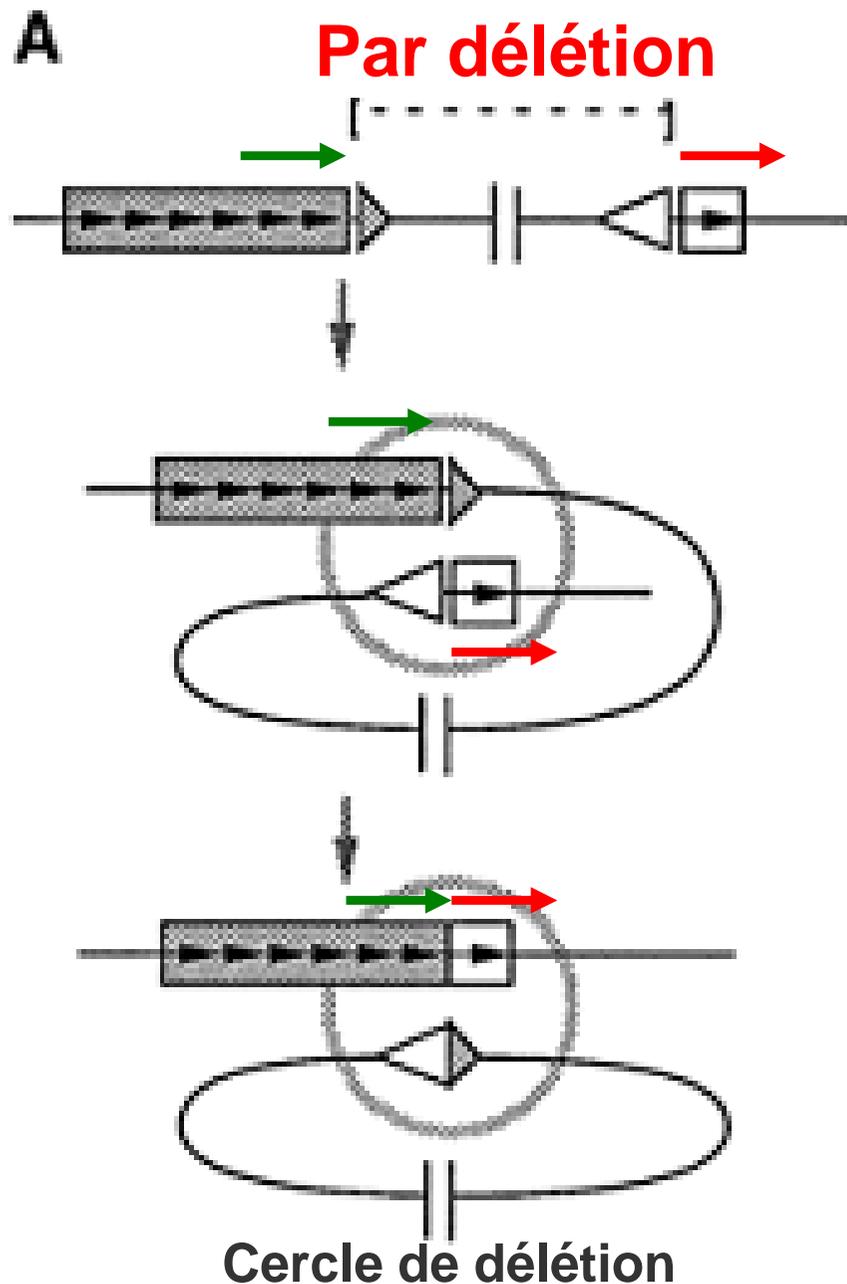
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition

© 2007 W. H. Freeman and Company

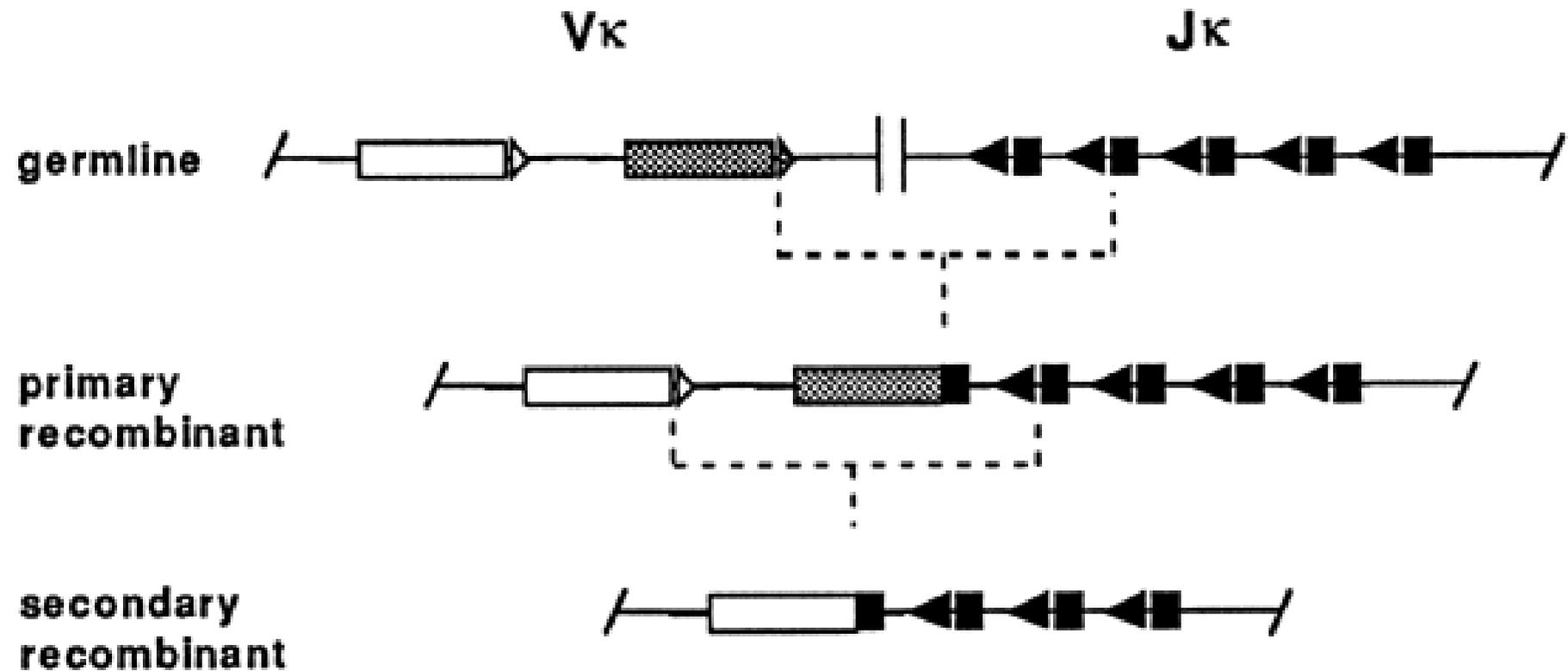
Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

1. 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

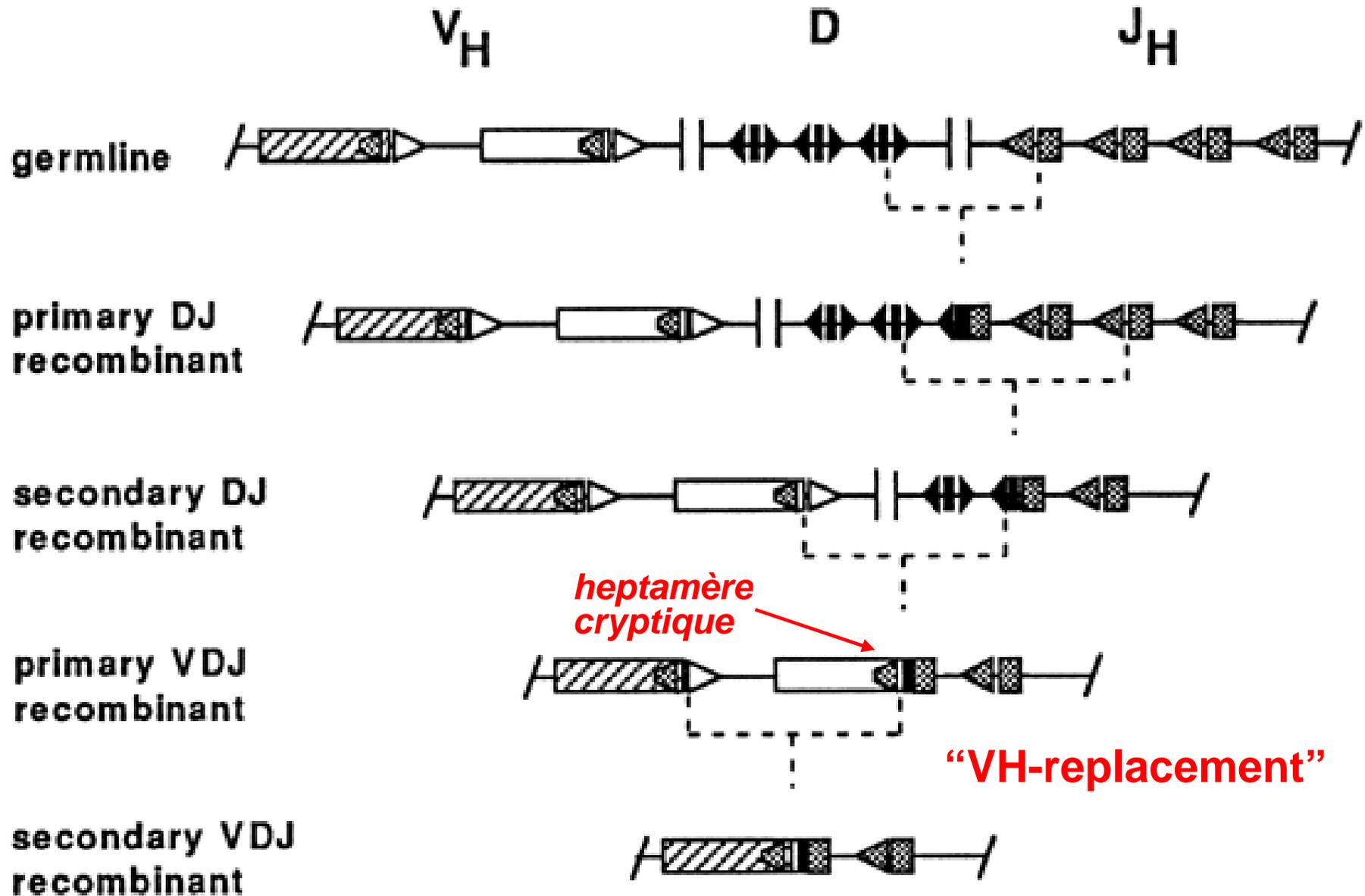
Différents types de réarrangements



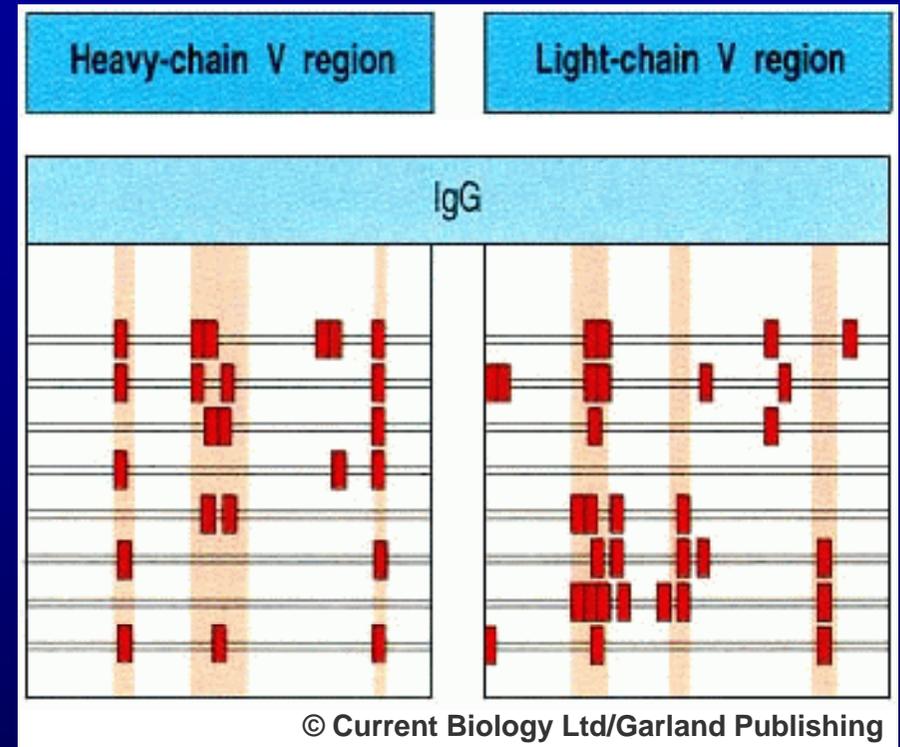
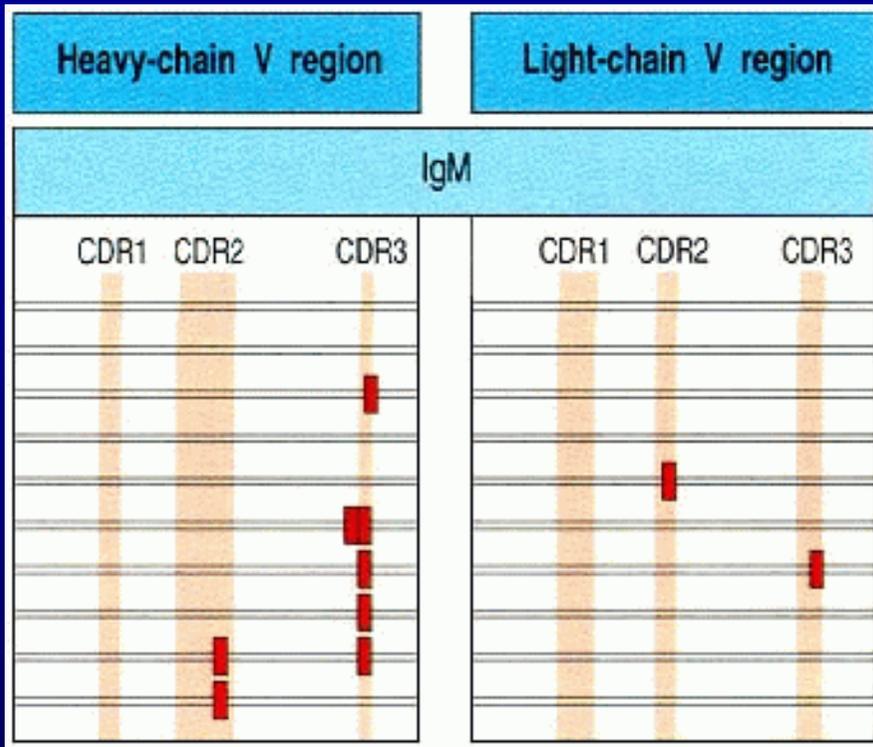
Réarrangements secondaires (1)



Réarrangements secondaires (2)



La maturation d'affinité



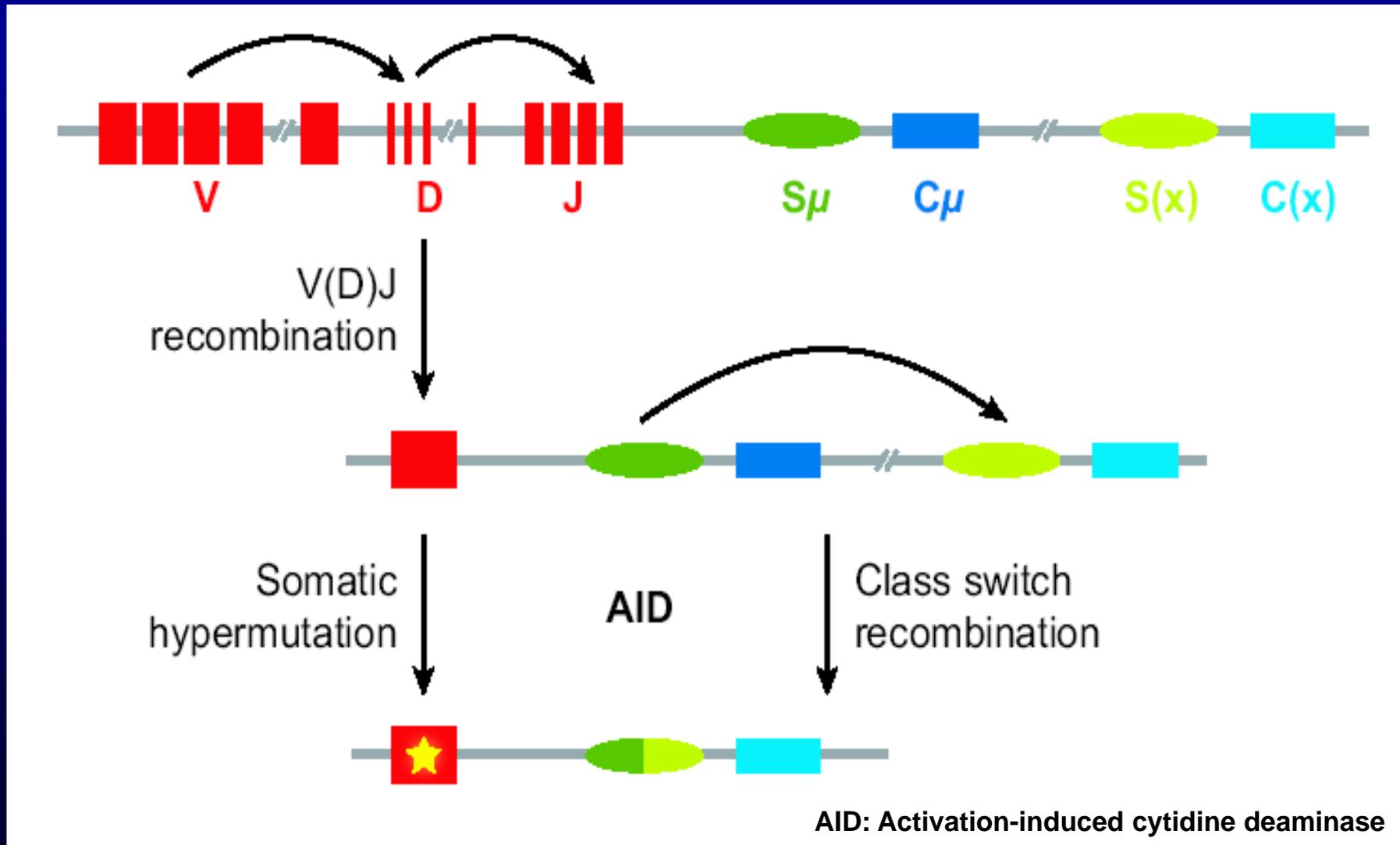
« Réponse primaire »
7 jours après la 1^{ère}
immunisation



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

→ *Hypermutation somatique dans les centres germinatifs*

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



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

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

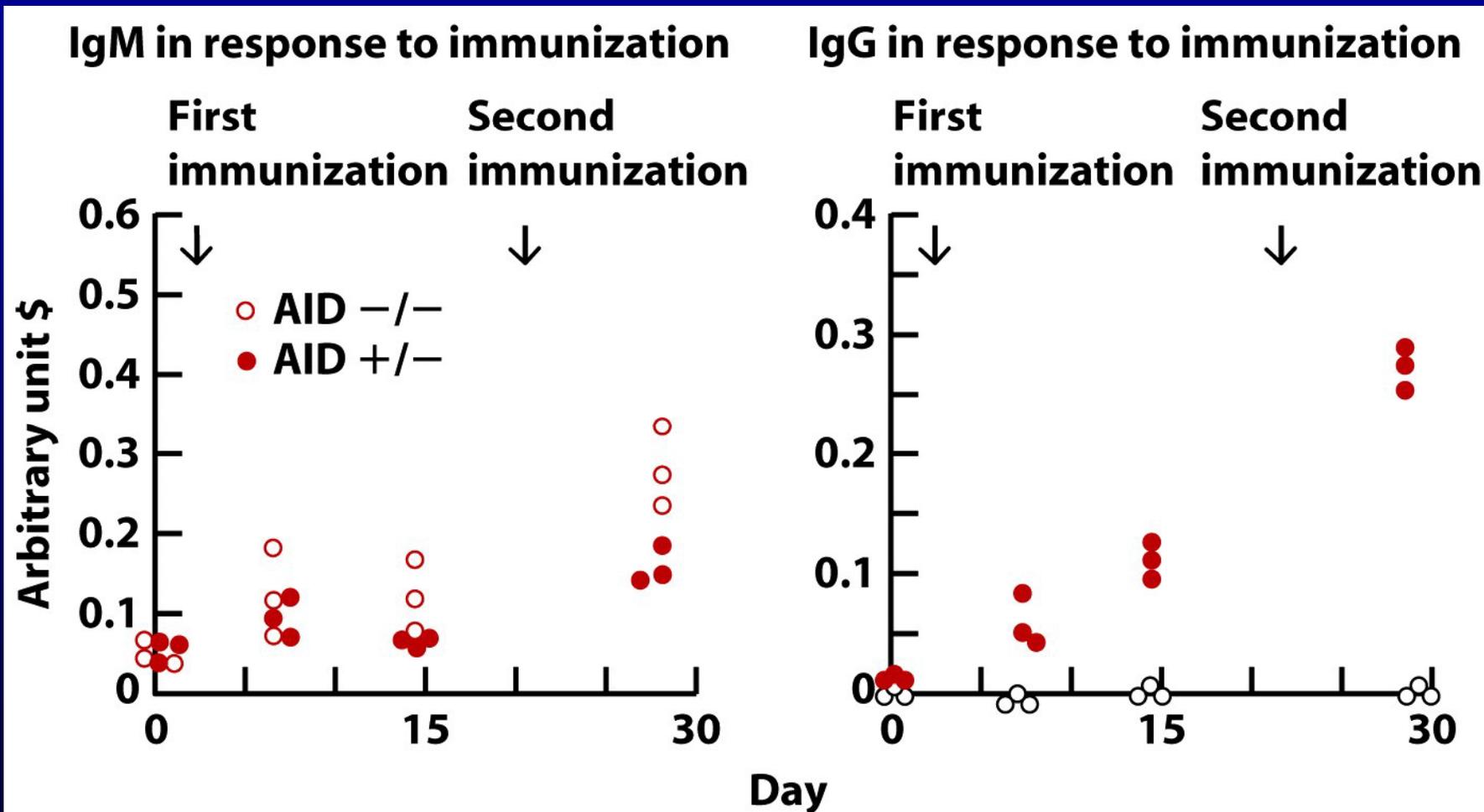
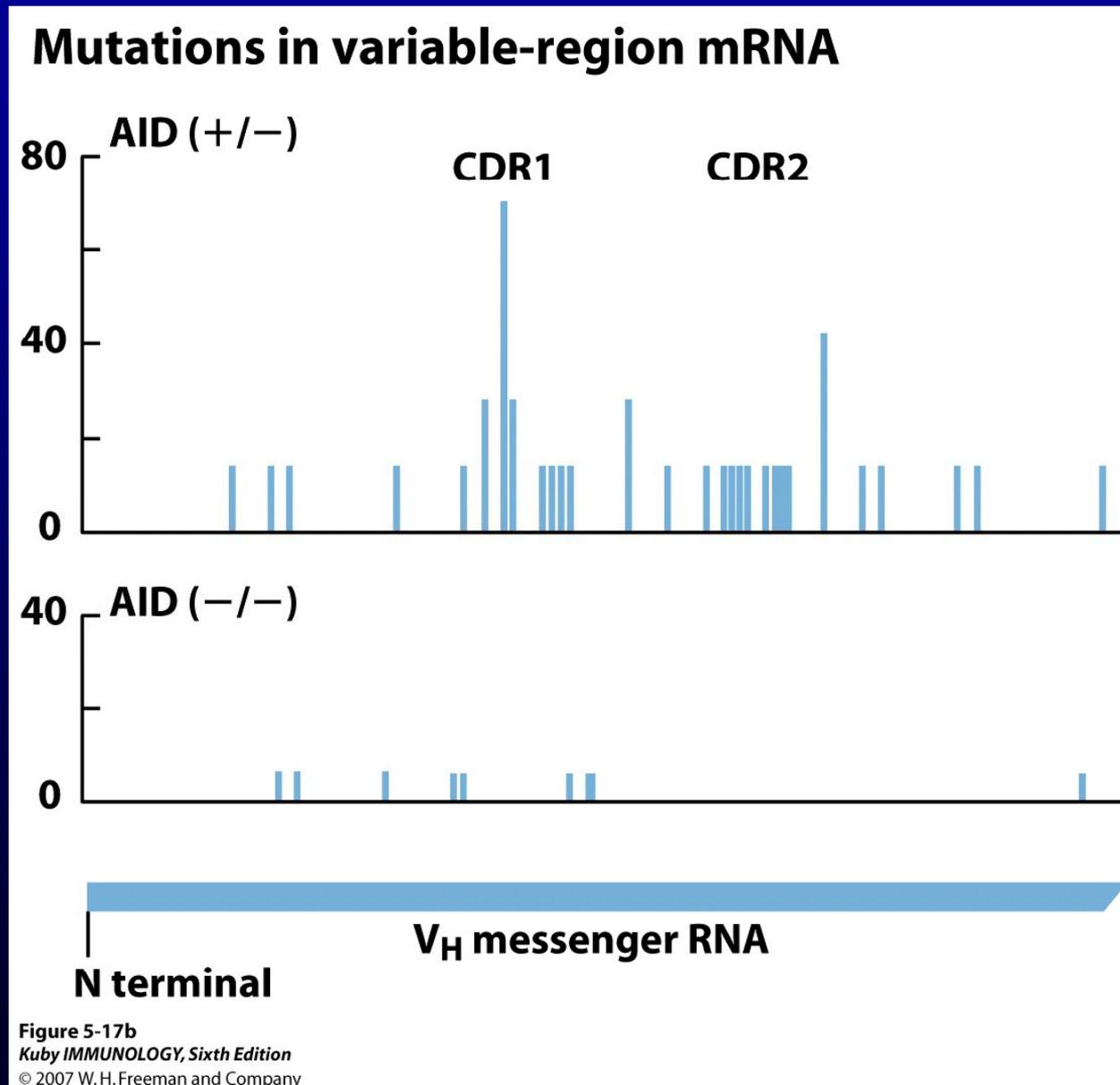


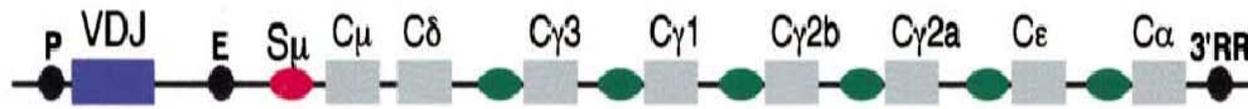
Figure 5-17a
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

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

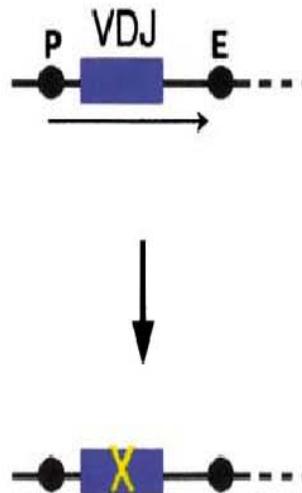


AID est également nécessaire pour la conversion génique

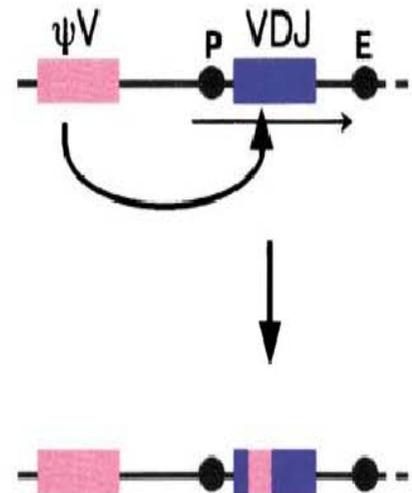
A. Ig Heavy Chain Locus



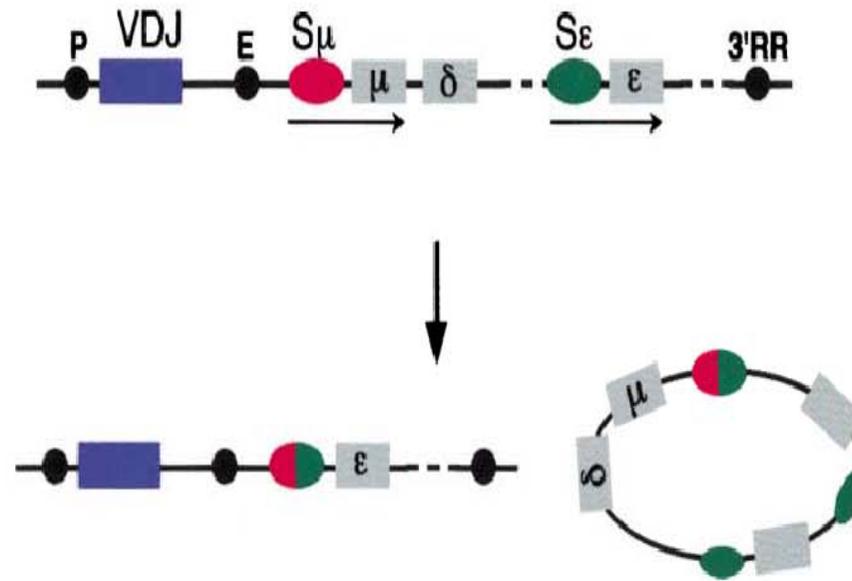
B. Hypermutation



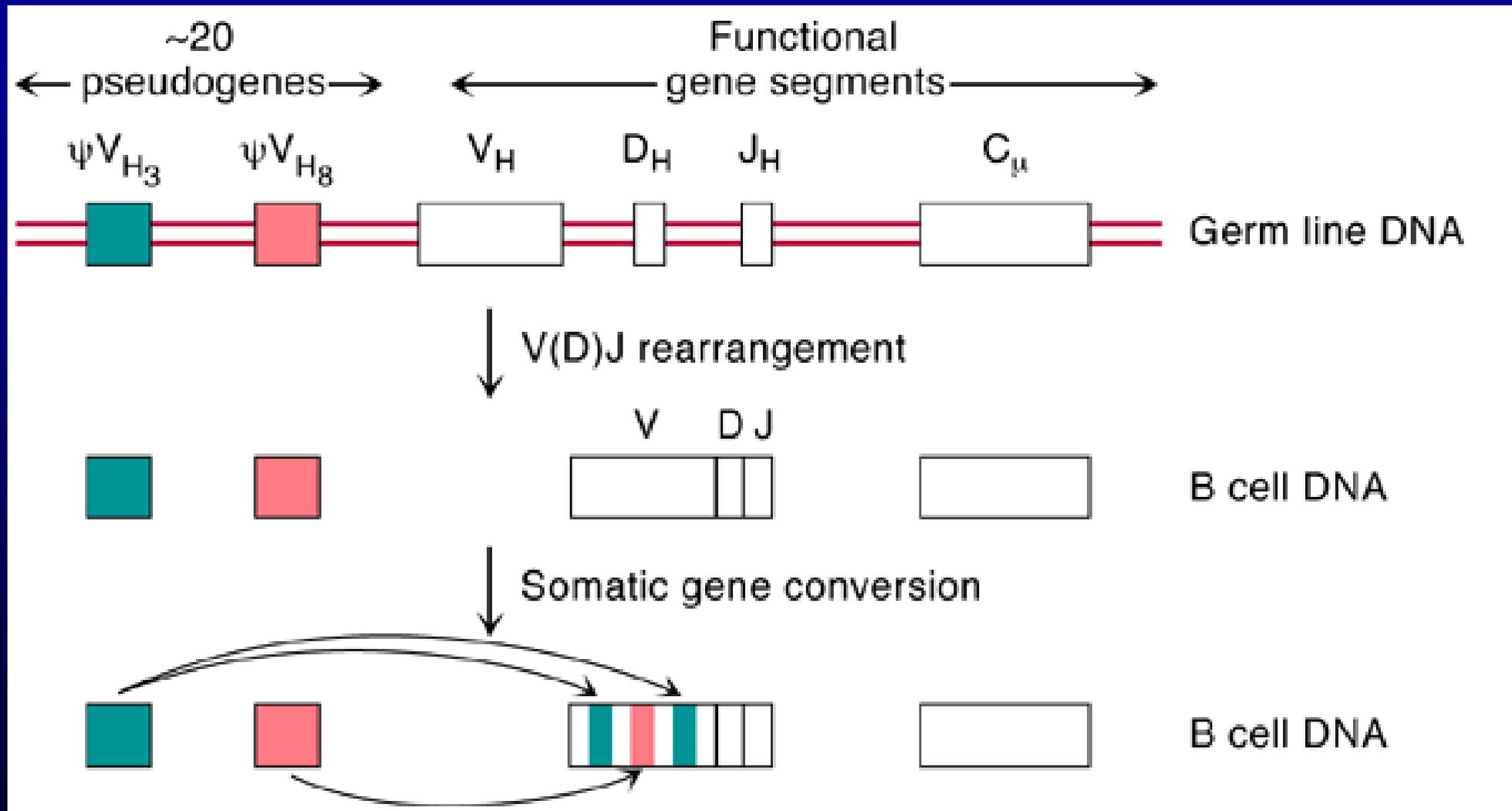
C. Gene Conversion



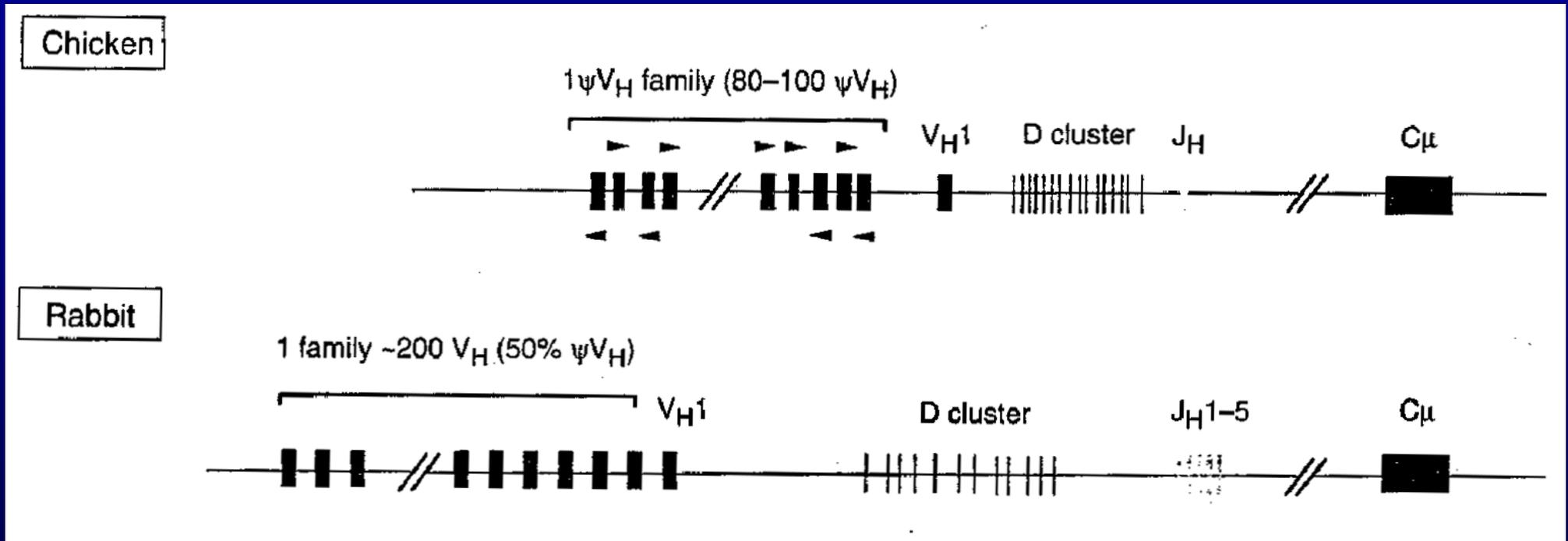
D. Class Switch Recombination



Conversion génique (1)



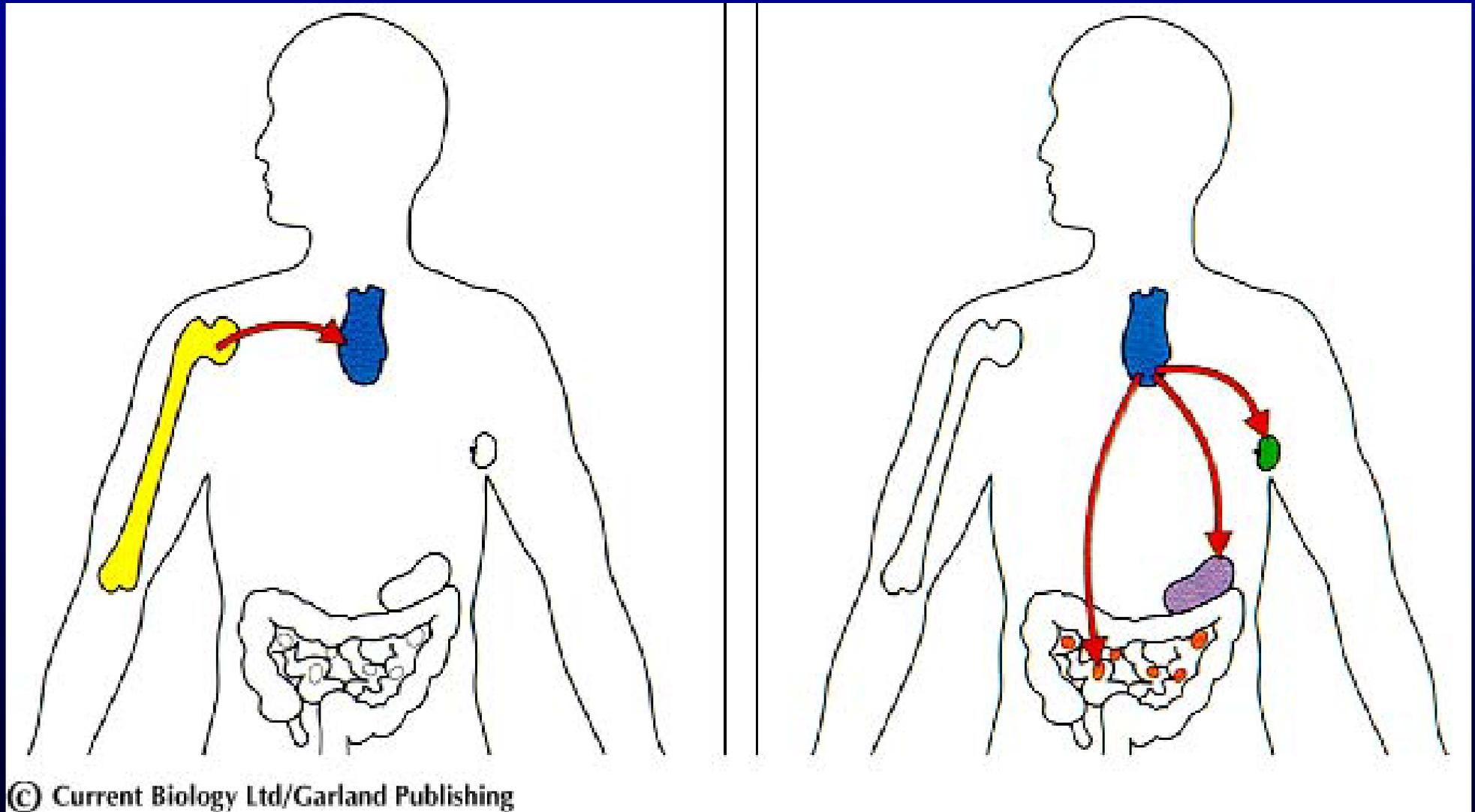
Conversion générique (2)



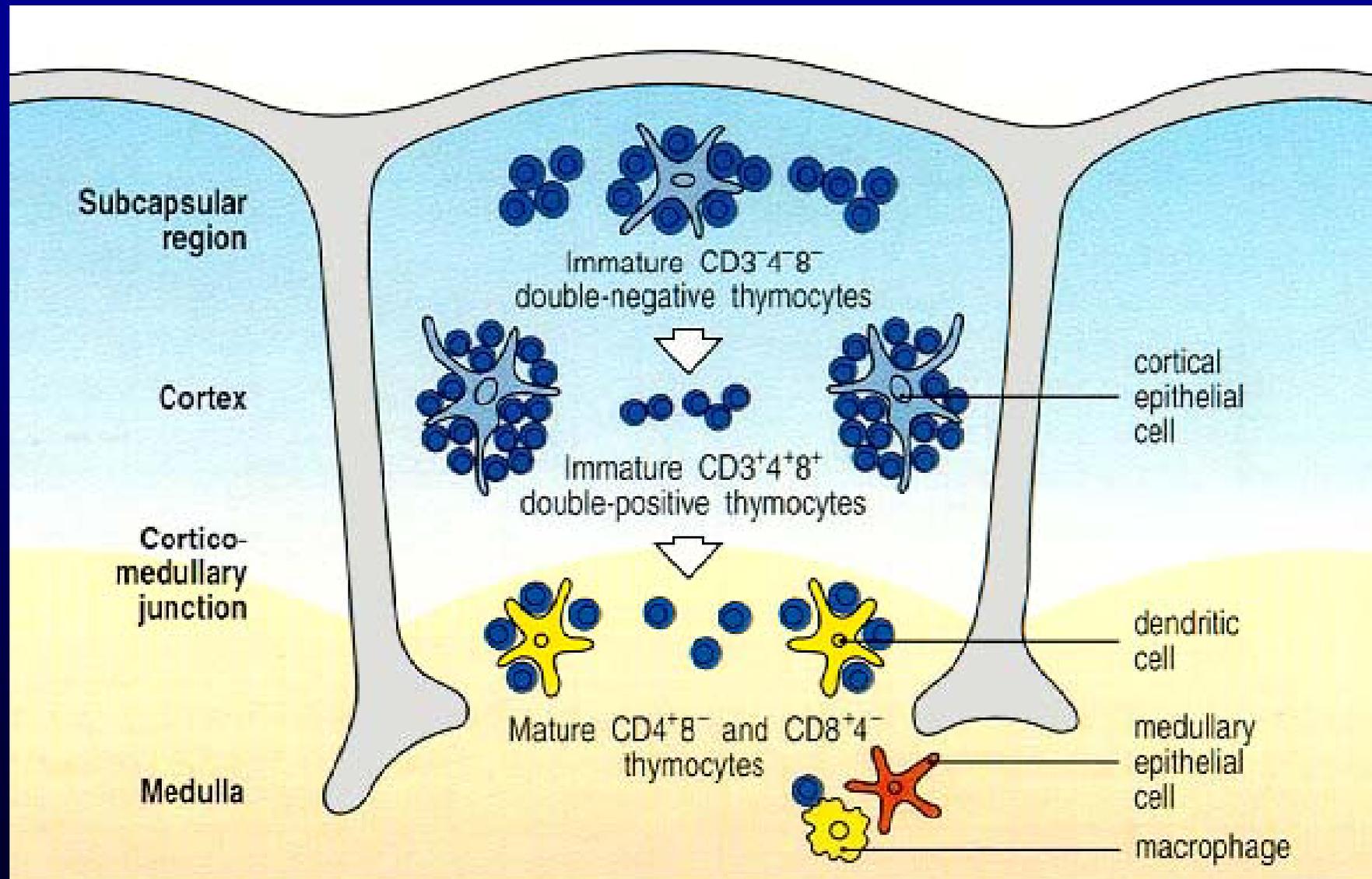
Diversité & Mise en place des répertoires lymphocytaires B et T

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

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus



Architecture cellulaire du thymus



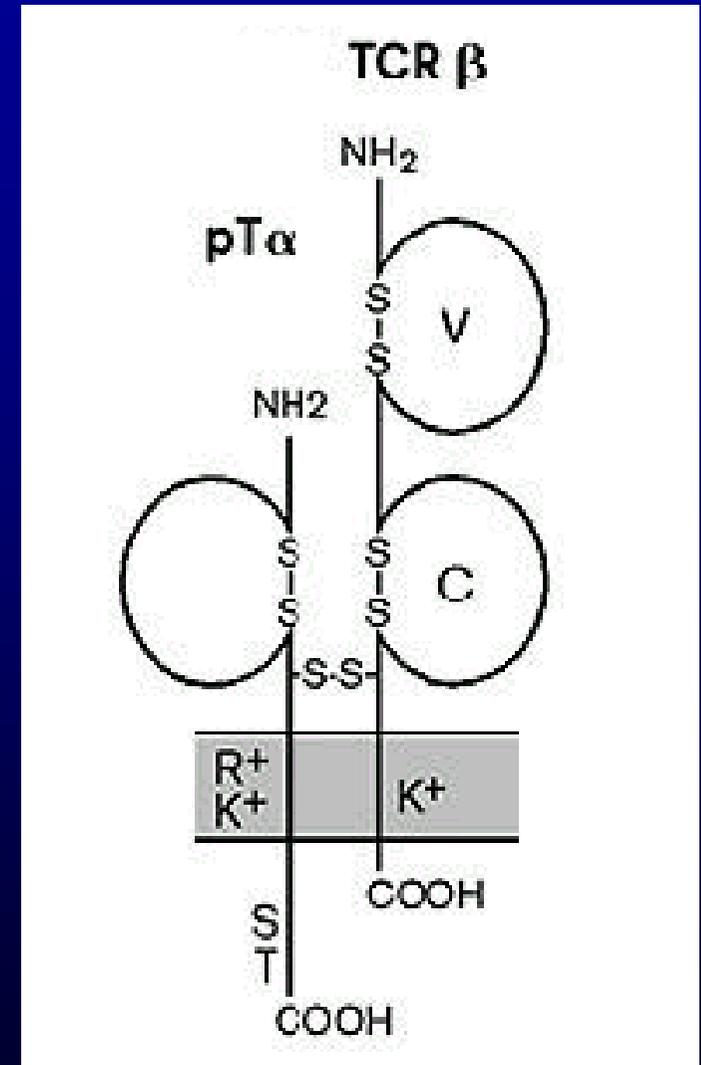
Stades de différenciation des thymocytes

- 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

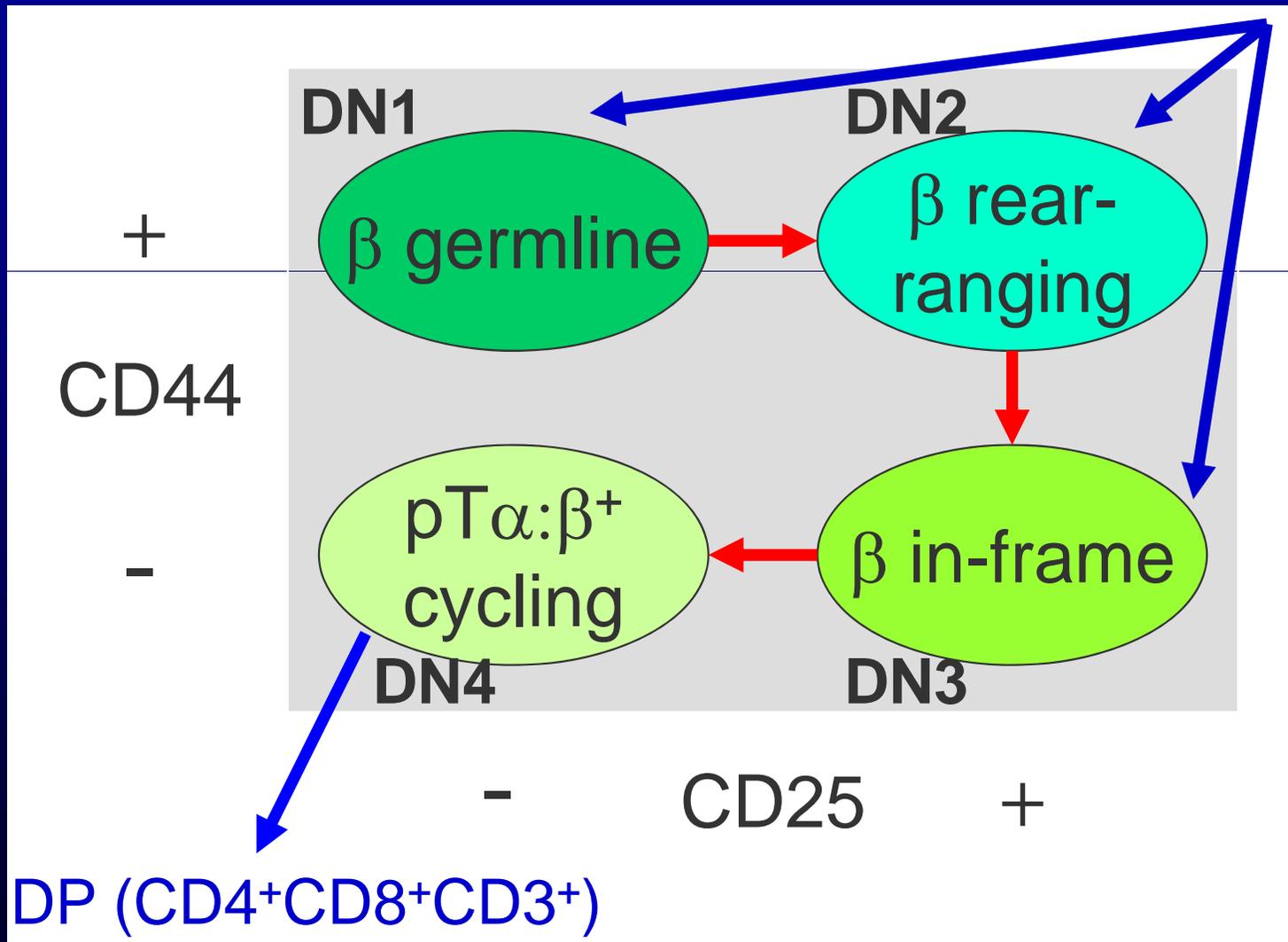


Rôle critique du pré-TCR

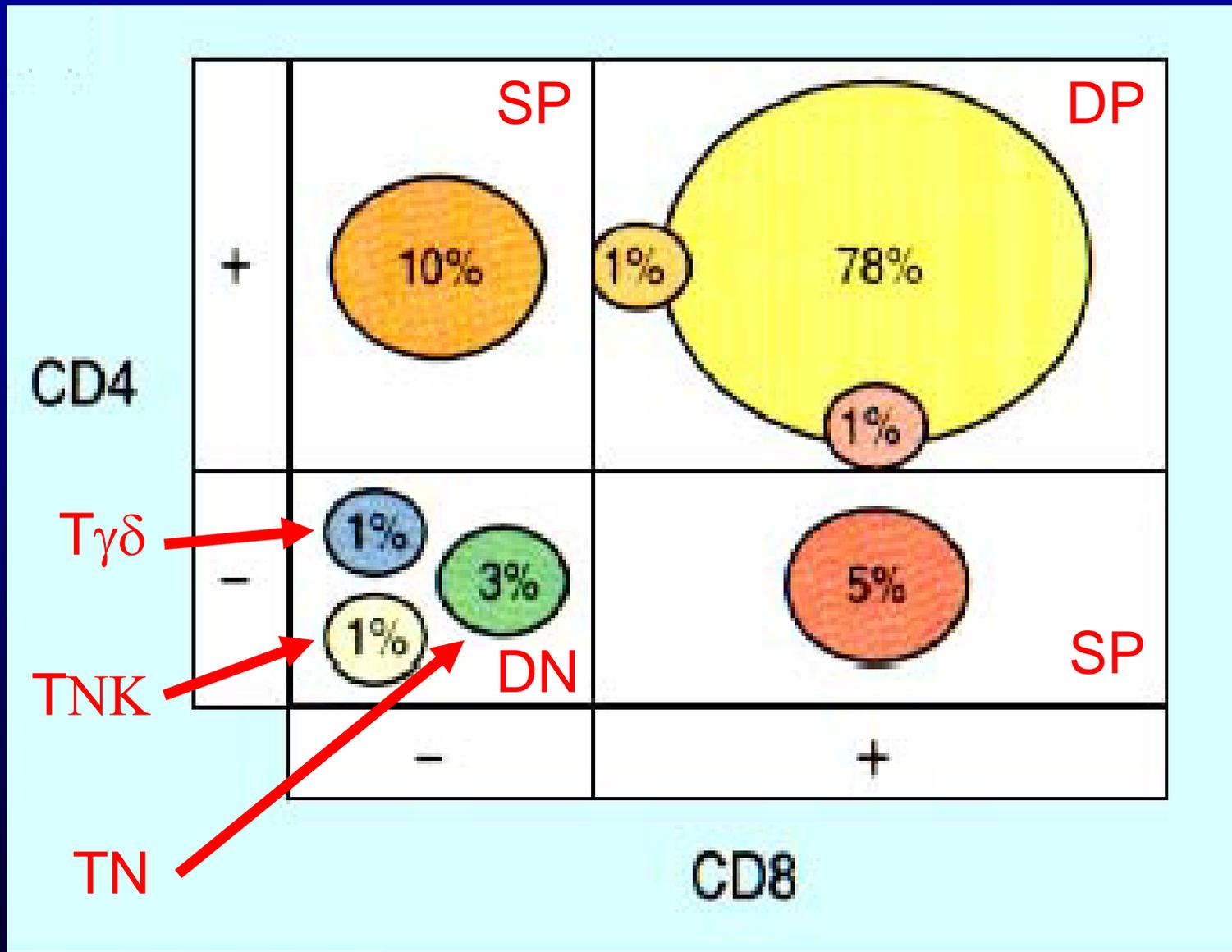
- pT α (gp33) exprimée tôt dans l'ontogénie et associée à CD3/TCR β
- L'expression du pré-TCR à la surface du thymocyte permet :
 - transition du stade double négatif CD4 $^-$ CD8 $^-$ (DN) vers le stade double positif CD4 $^+$ CD8 $^+$ (DP)
 - exclusion allélique (arrêt des réarrangements TCR β)
 -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

Différenciation des thymocytes (1)

TN/DN (CD4⁻CD8⁻CD3⁻)

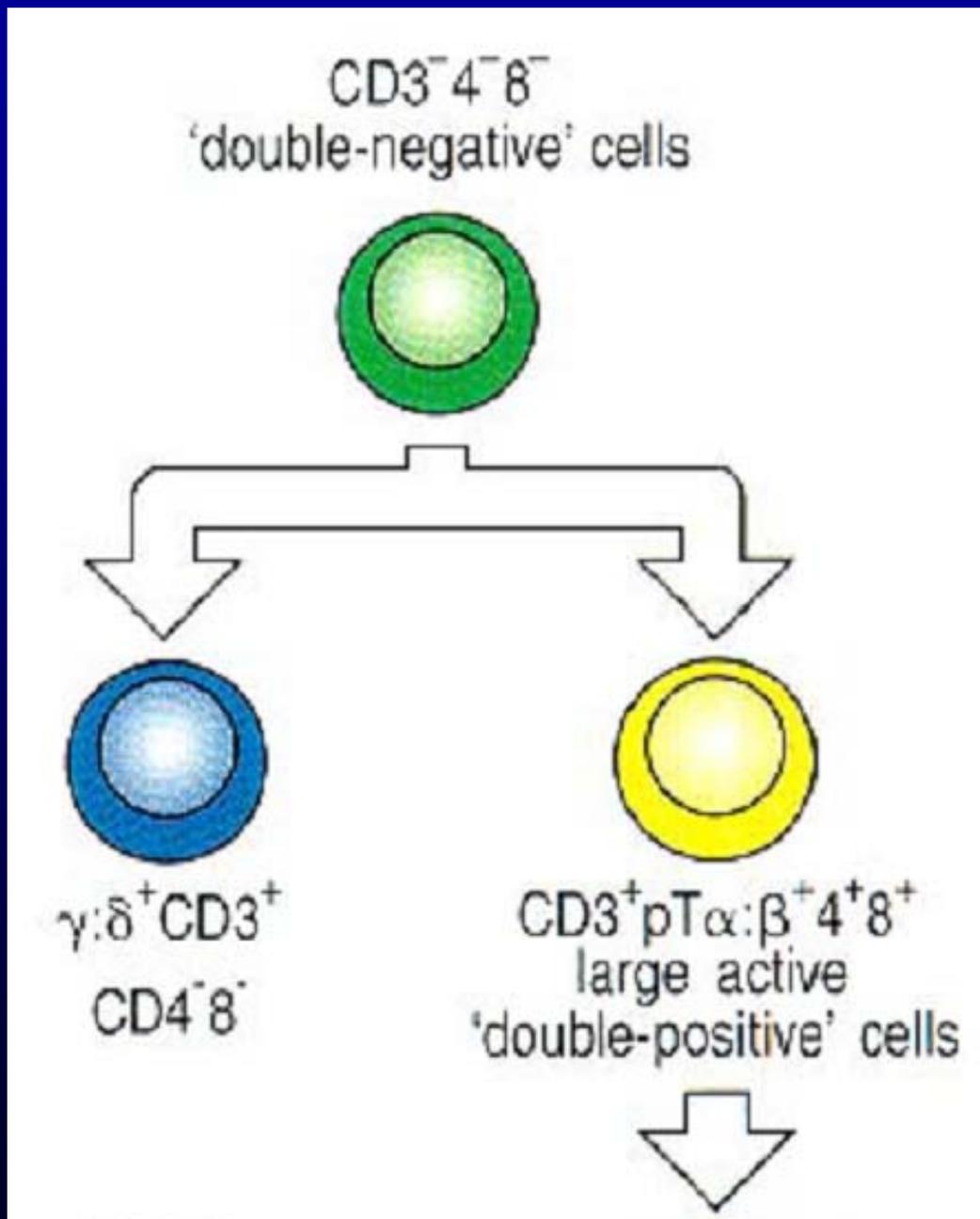


Différenciation des thymocytes (2)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

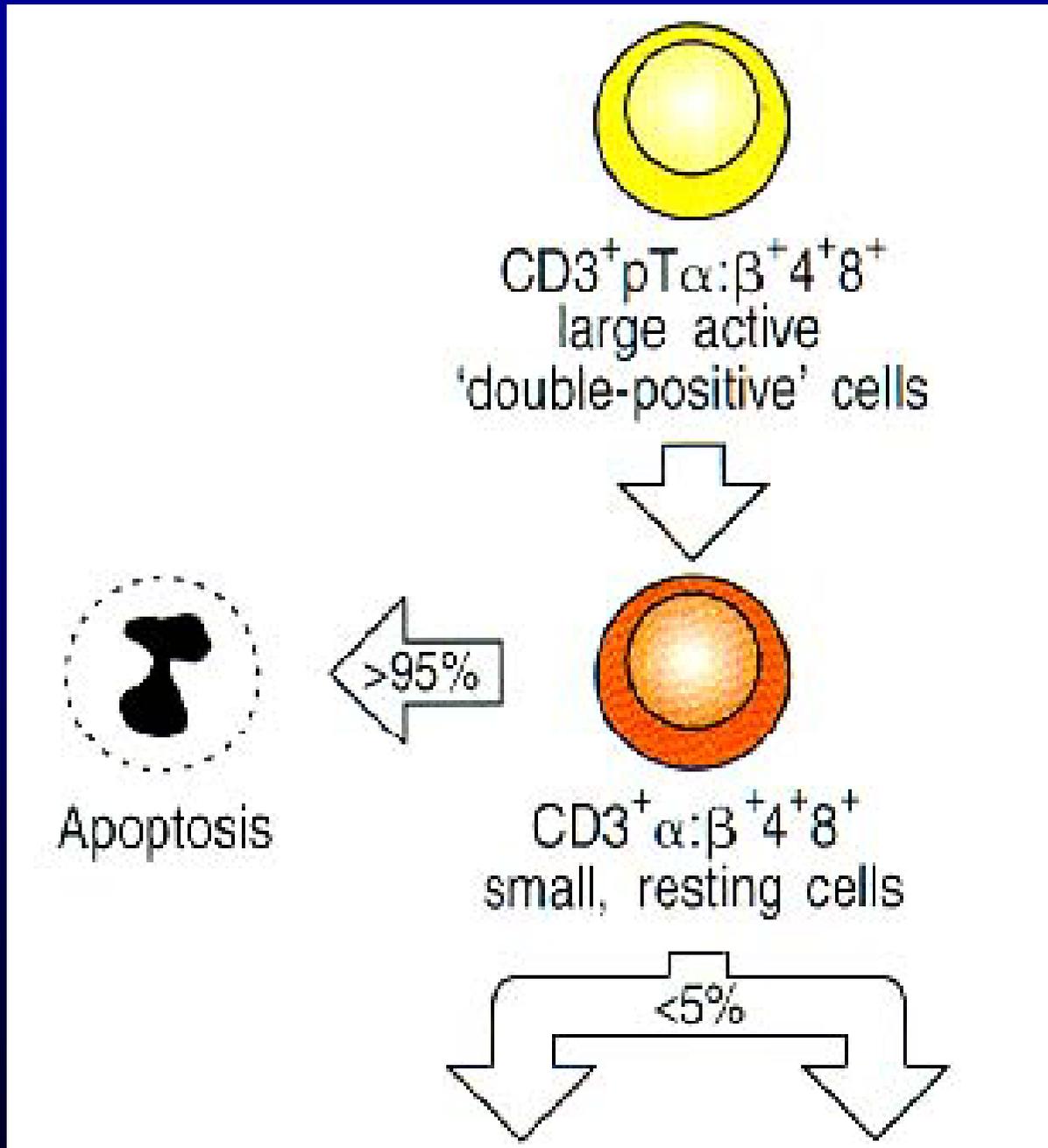
Exclusion allélique

- 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 des réarrangements

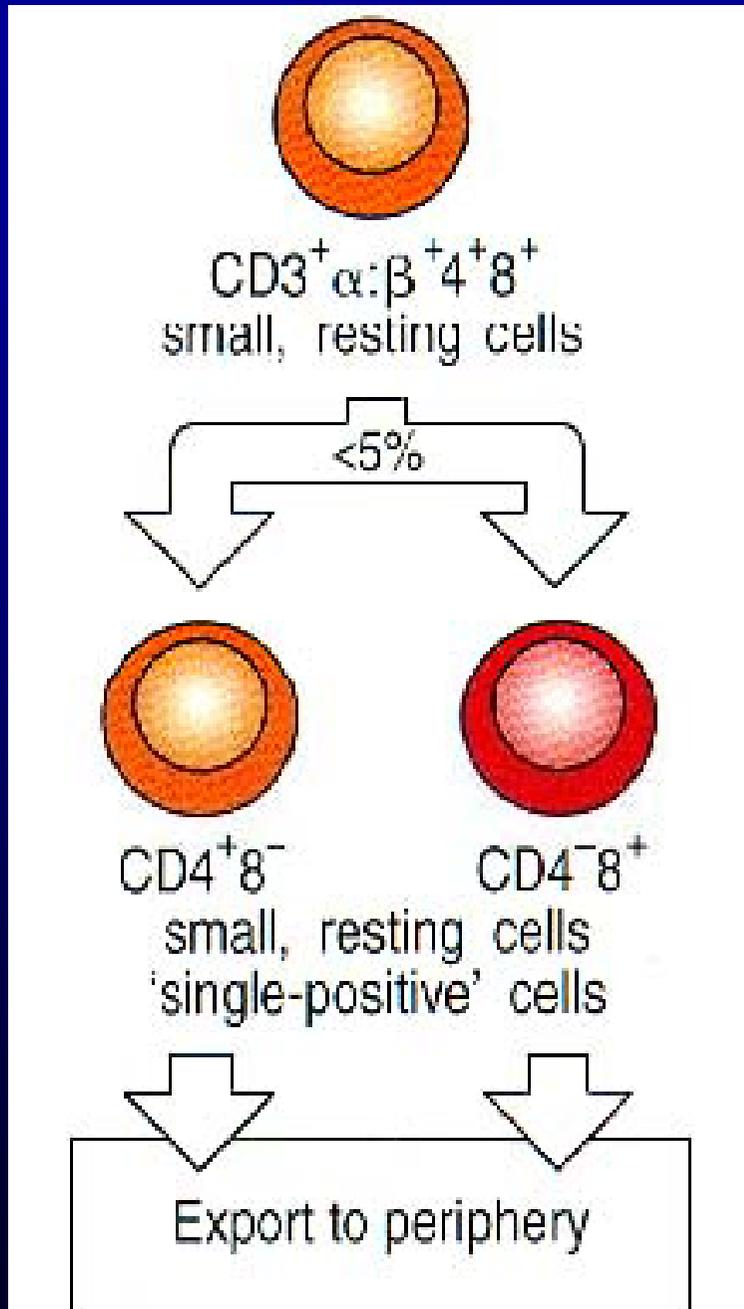
- TCR δ , TCR γ et TCR β réarrangent en même temps au stade pro-T
- Les réarrangements TCR α sont limités aux thymocytes pré-T DP engagés vers la lignée $\alpha\beta$ et exprimant TCR β
- A l'inverse de TCR β , les réarrangements TCR α ont lieu sur les deux chromosomes \rightarrow l'exclusion allélique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

Différenciation des thymocytes (4)



Sélection positive
Sélection négative

Différenciation des thymocytes (5)



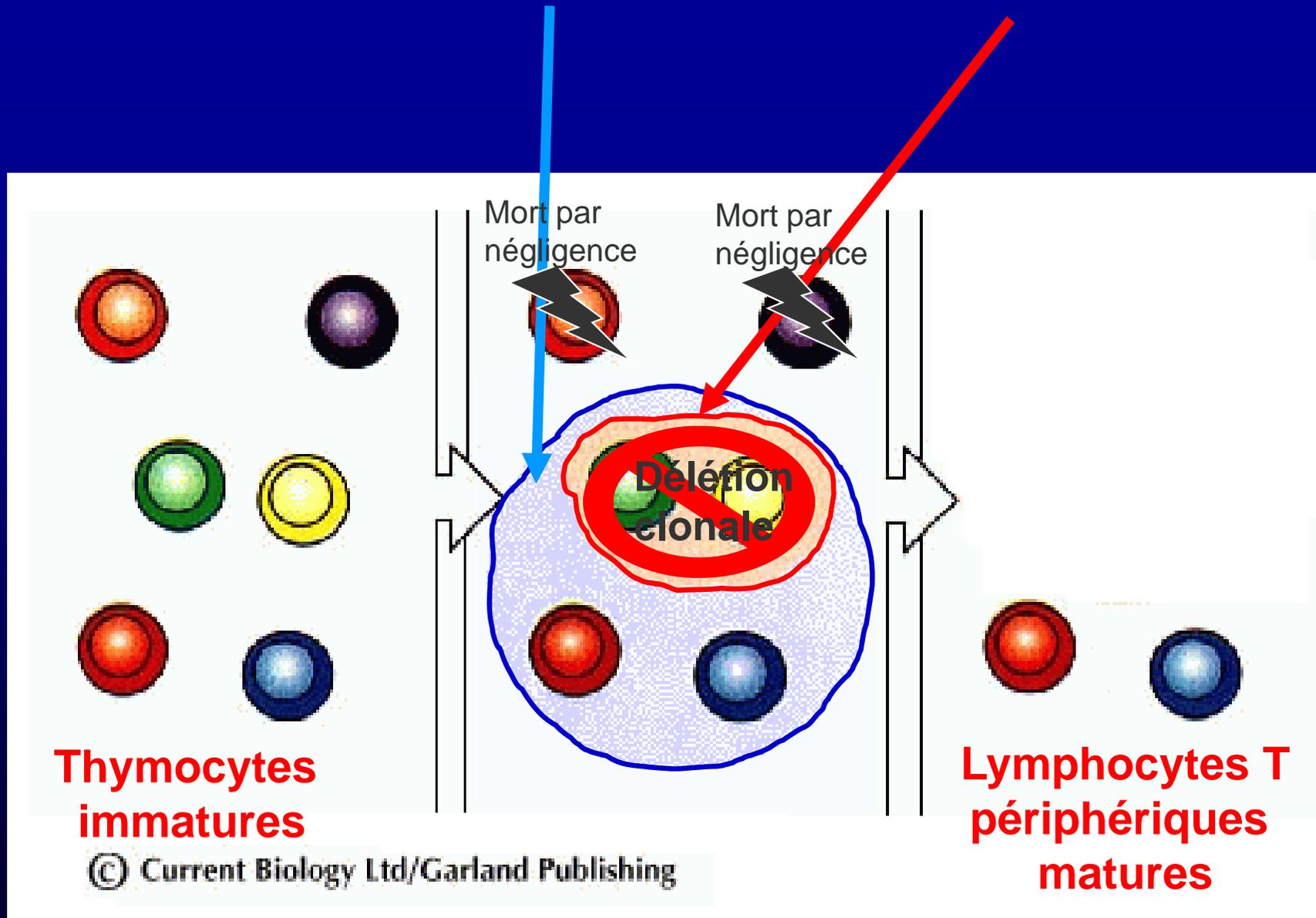
Sélection positive
Sélection négative

Engagement CD4/CD8
Restriction pour le CMH
Fonction effectrice

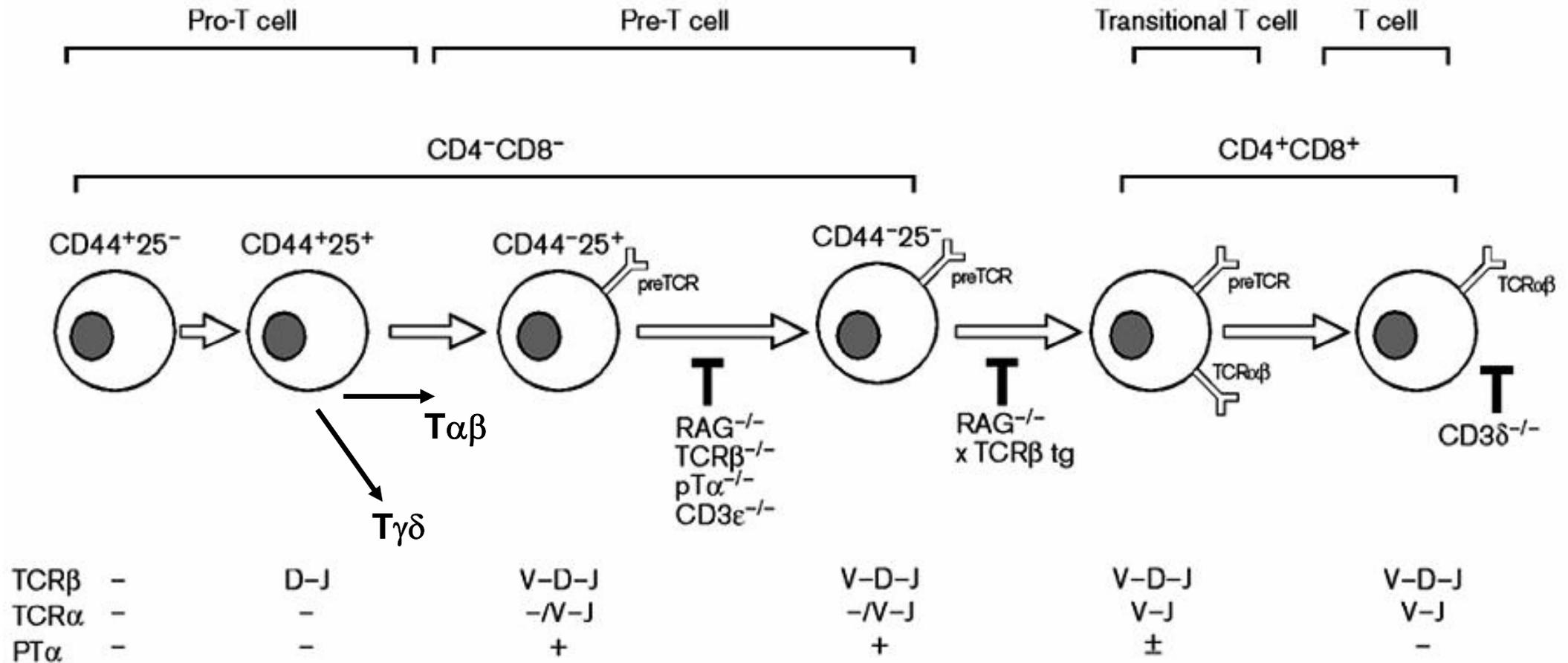
Sélections positive et négative (1)

- **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 (3)

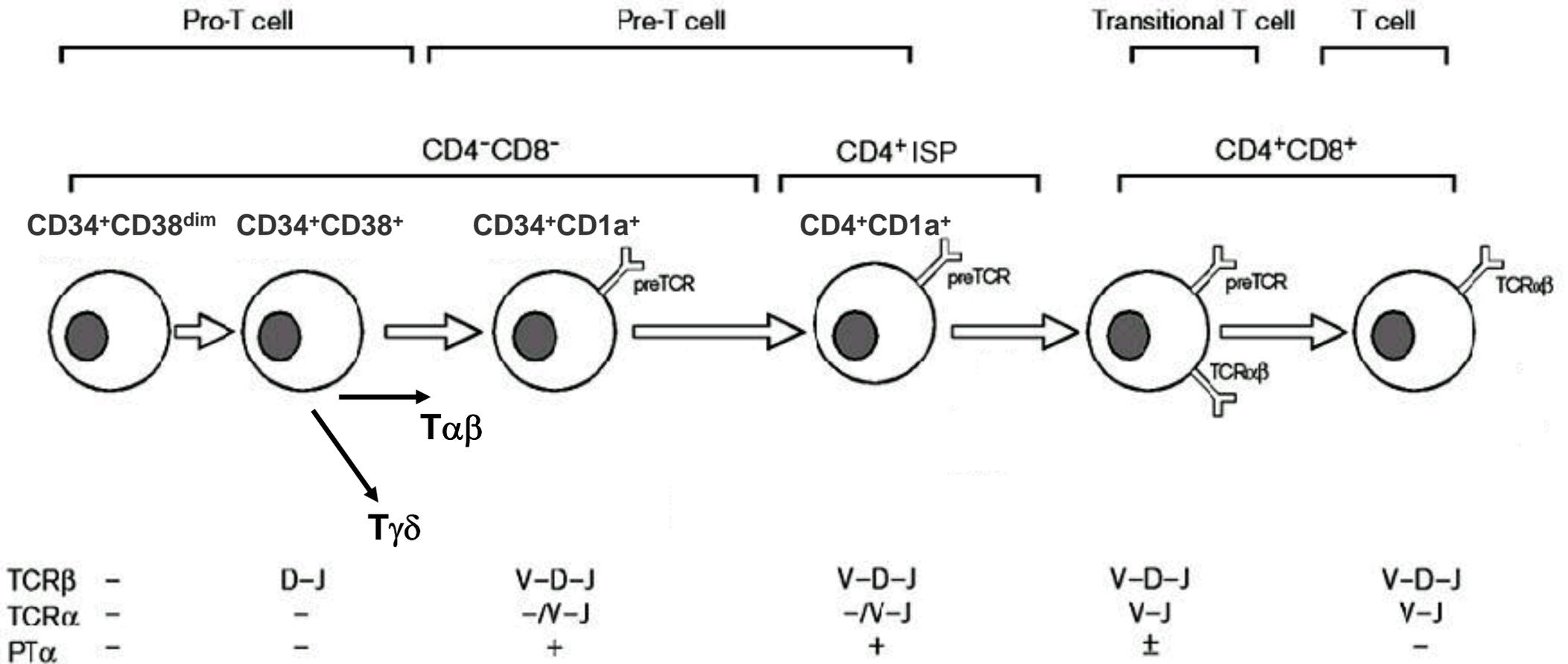


Différenciation thymique: souris



© 1996 Current Opinion in Immunology

Différenciation thymique: homme

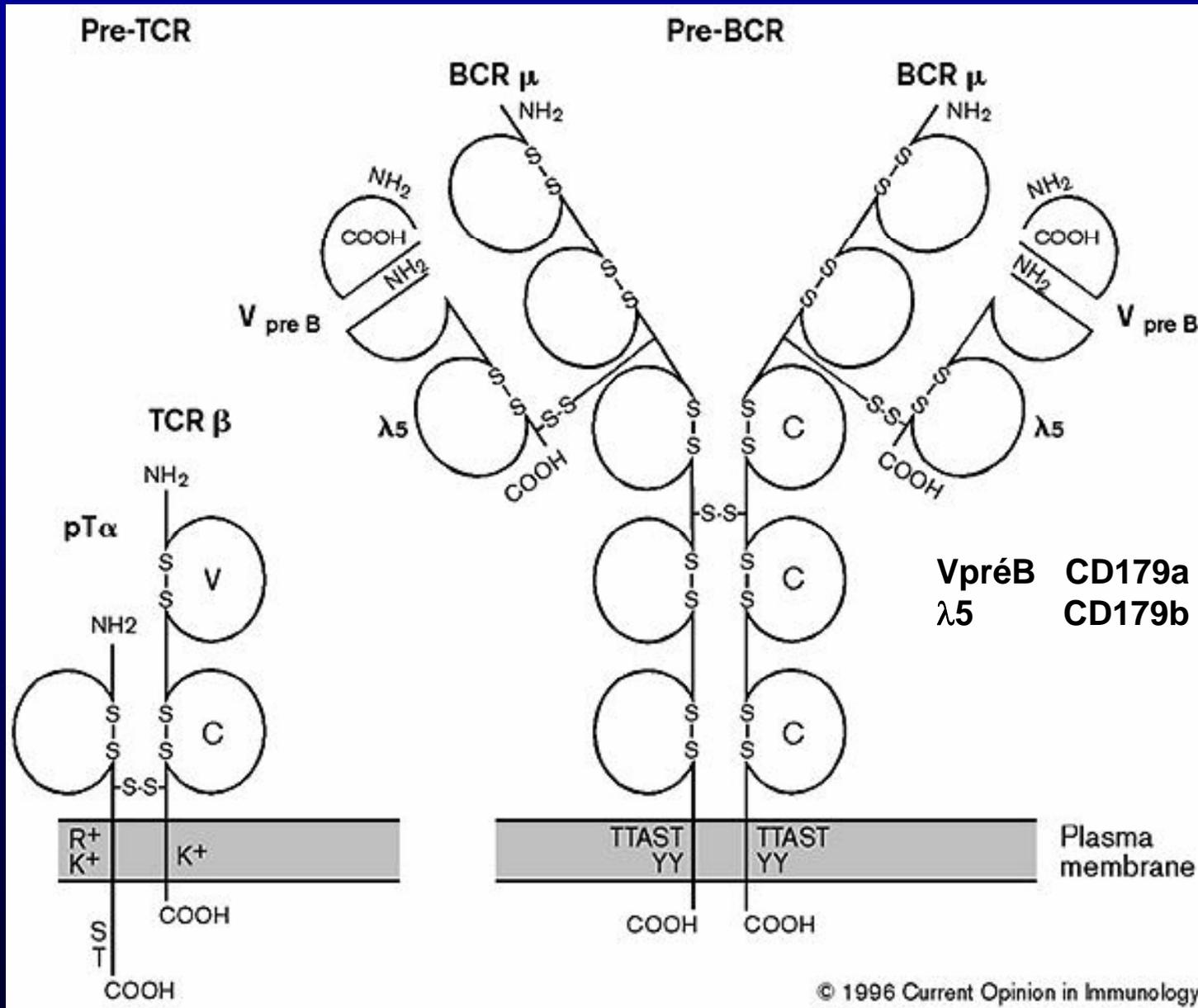


© 1996 Current Opinion in Immunology

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

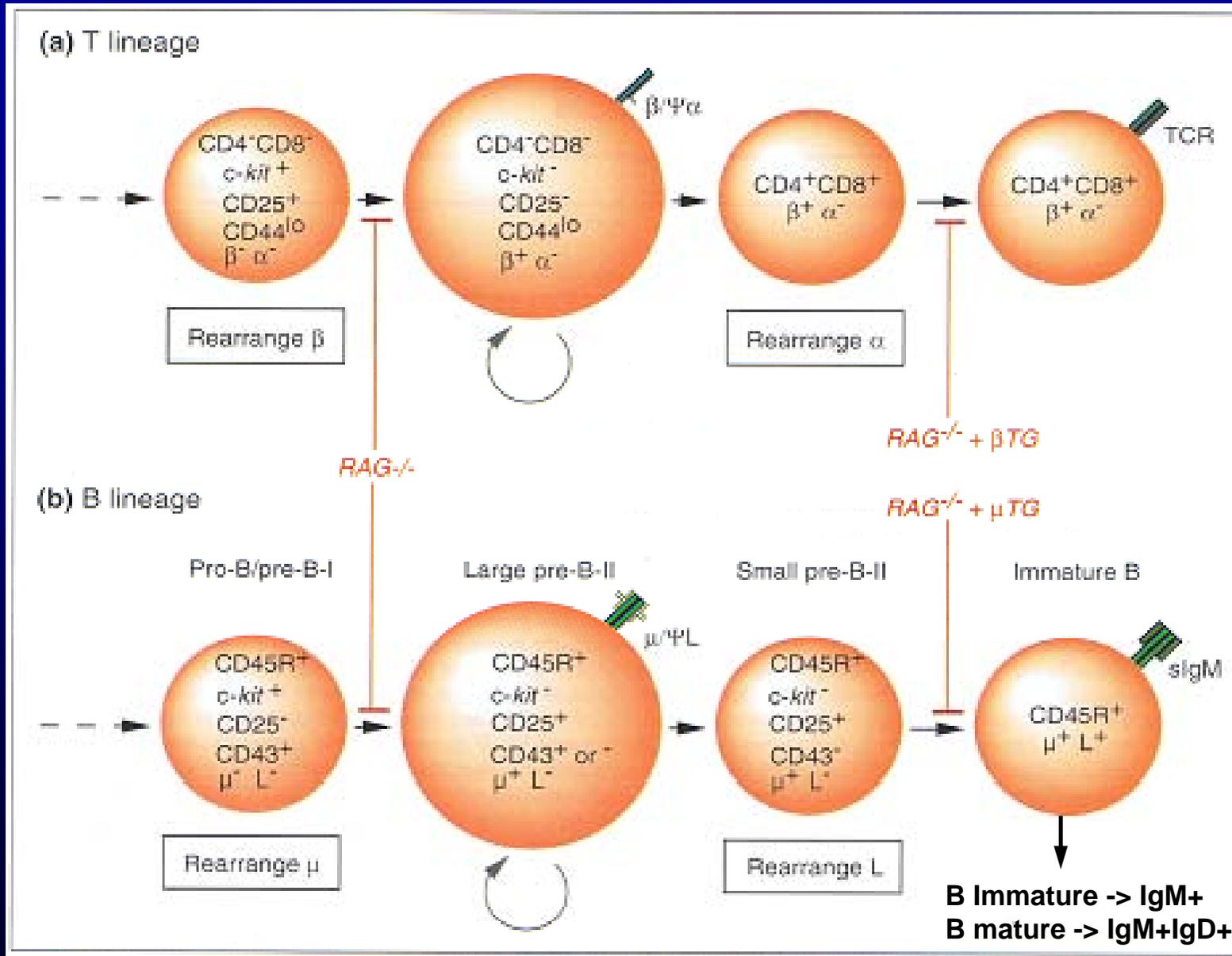
Caractérisation du pré-BCR



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



Réarrangements en série...

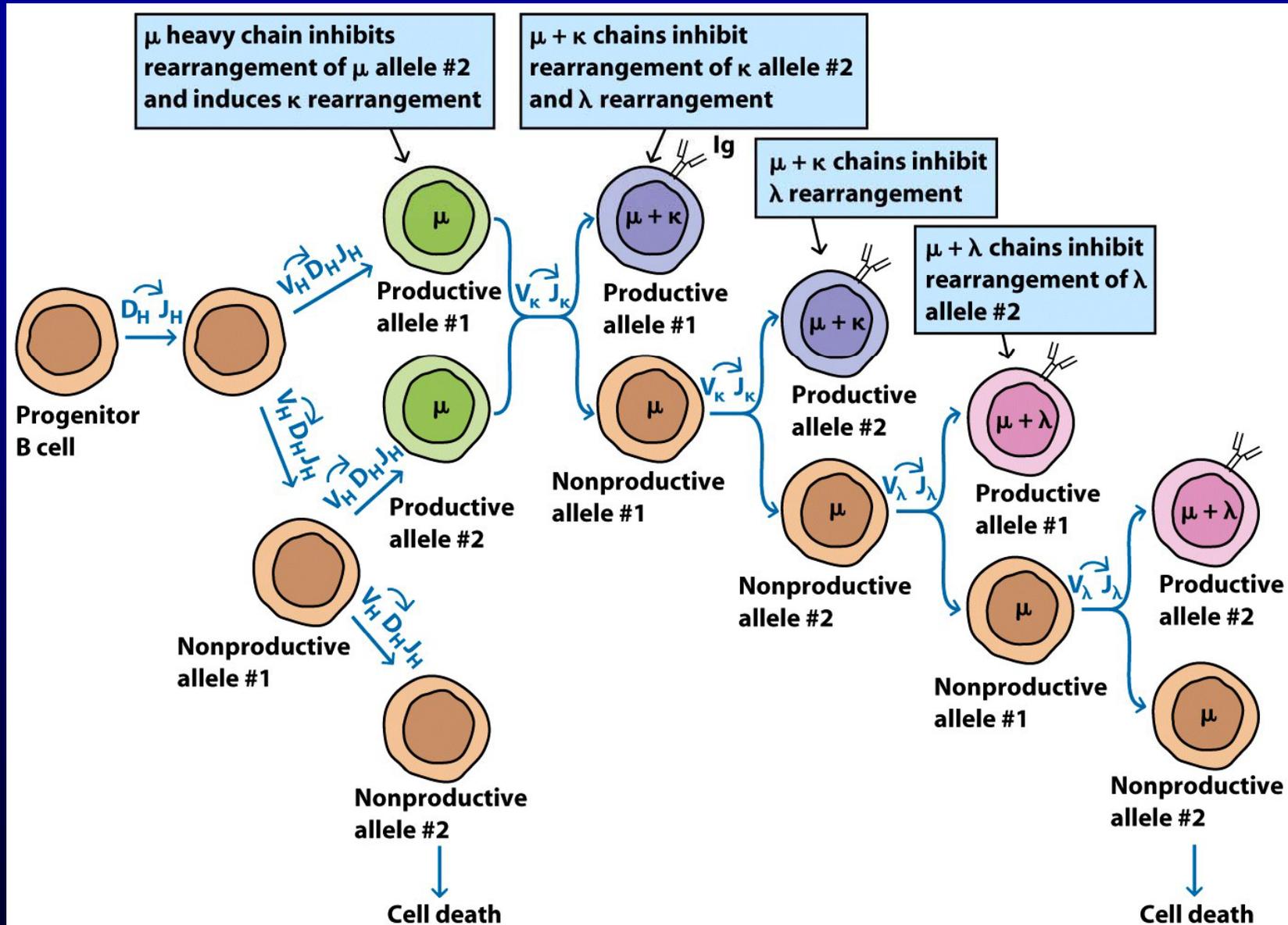
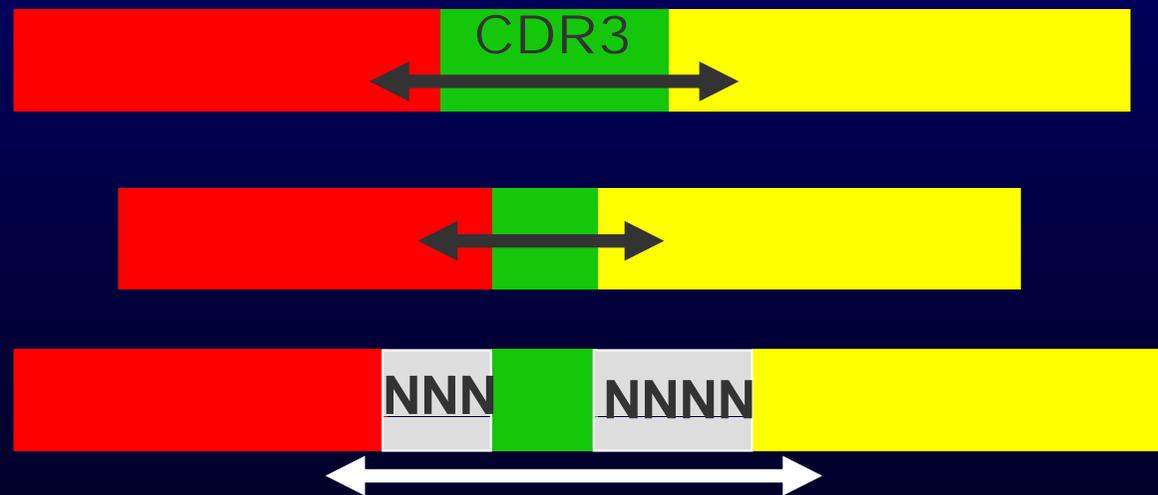


Figure 5-11
 Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

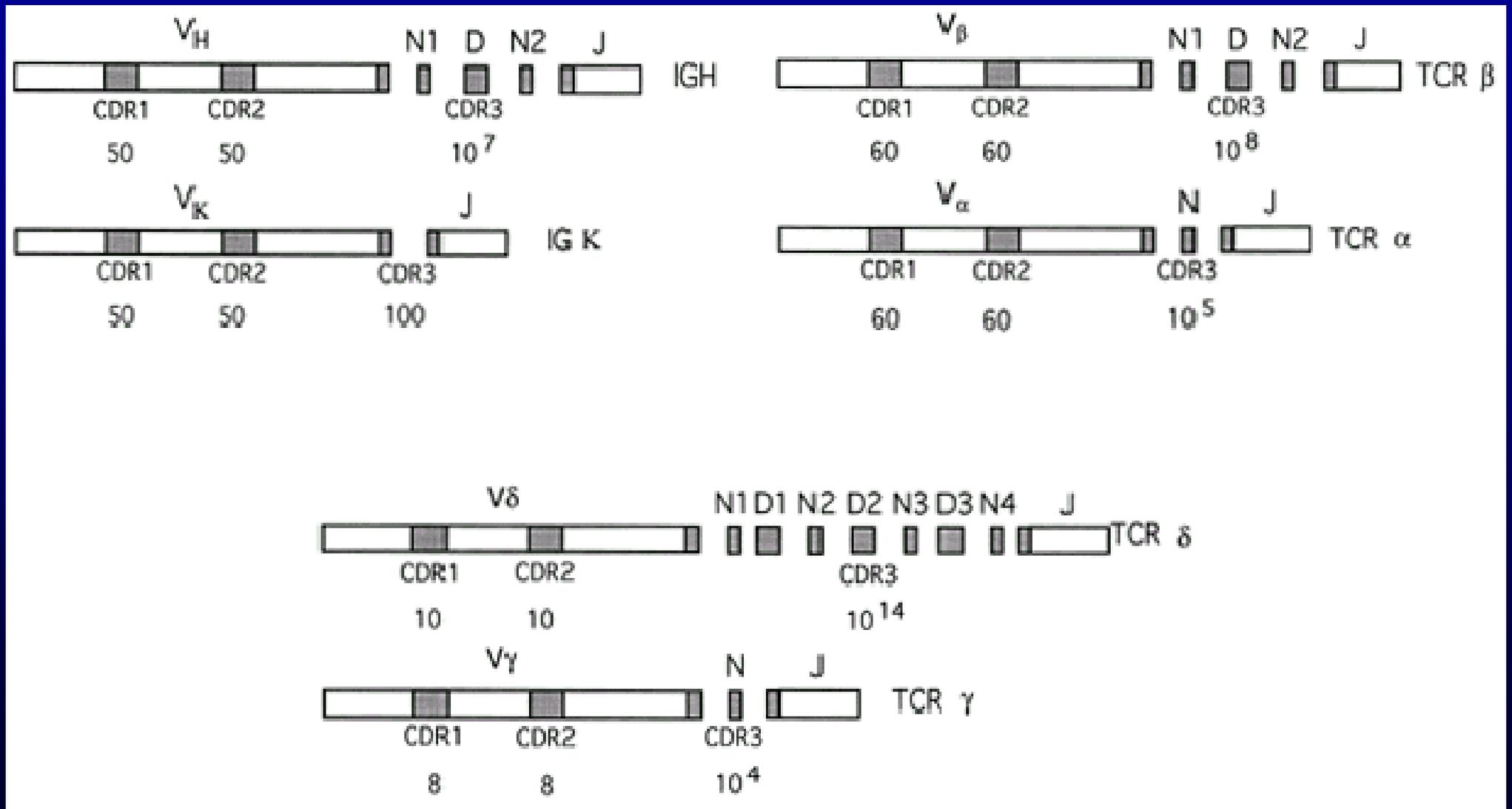
Conclusion

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)



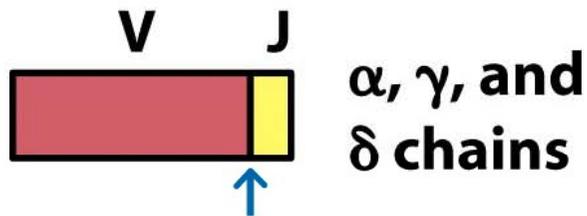
Diversité jonctionnelle CDR3 : une stratégie générale



Estimation de la diversité (1)

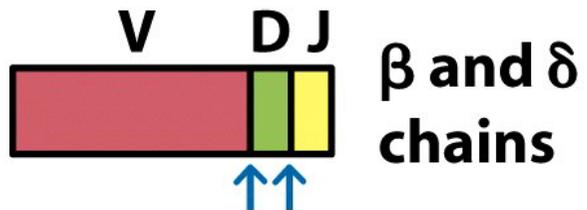
N-region nucleotide addition

T-cell receptor



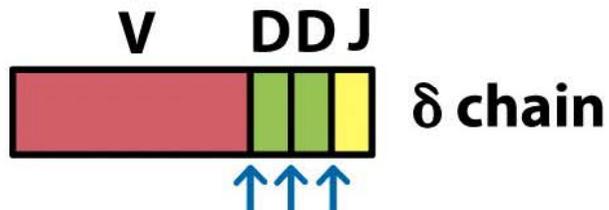
α , γ , and δ chains

$$(5461)^1 = 5.5 \times 10^3$$



β and δ chains

$$(5461)^2 = 3.0 \times 10^7$$

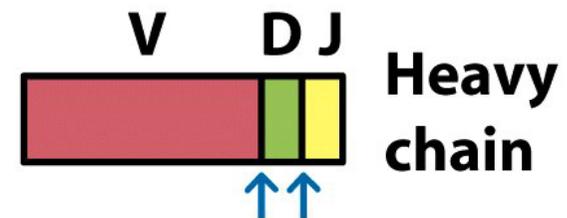


δ chain

$$(5461)^3 = 1.6 \times 10^{11}$$

Immunoglobulin

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



Heavy chain

$$(5461)^2 = 3.0 \times 10^7$$

Estimation de la diversité (2)

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

| 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 and V-D-J joining | $101 \times 13 \times 4$ 5.3×10^3 | 85×4 3.4×10^2 | 79×38 3.0×10^3 | $21 \times 2 \times 11$ 4.6×10^2 | 7×3 21 | $6 \times 2 \times 2$ 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.

Mise en place des répertoires

