

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes B

Adrien Six (adrien.six@upmc.fr)

Université Pierre et Marie Curie

octobre 2004

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes B

1. Généralités
2. Anticorps et complexe BCR
3. Recombinaison V(D)J
4. Différenciation des lymphocytes B
5. Sélection des répertoires

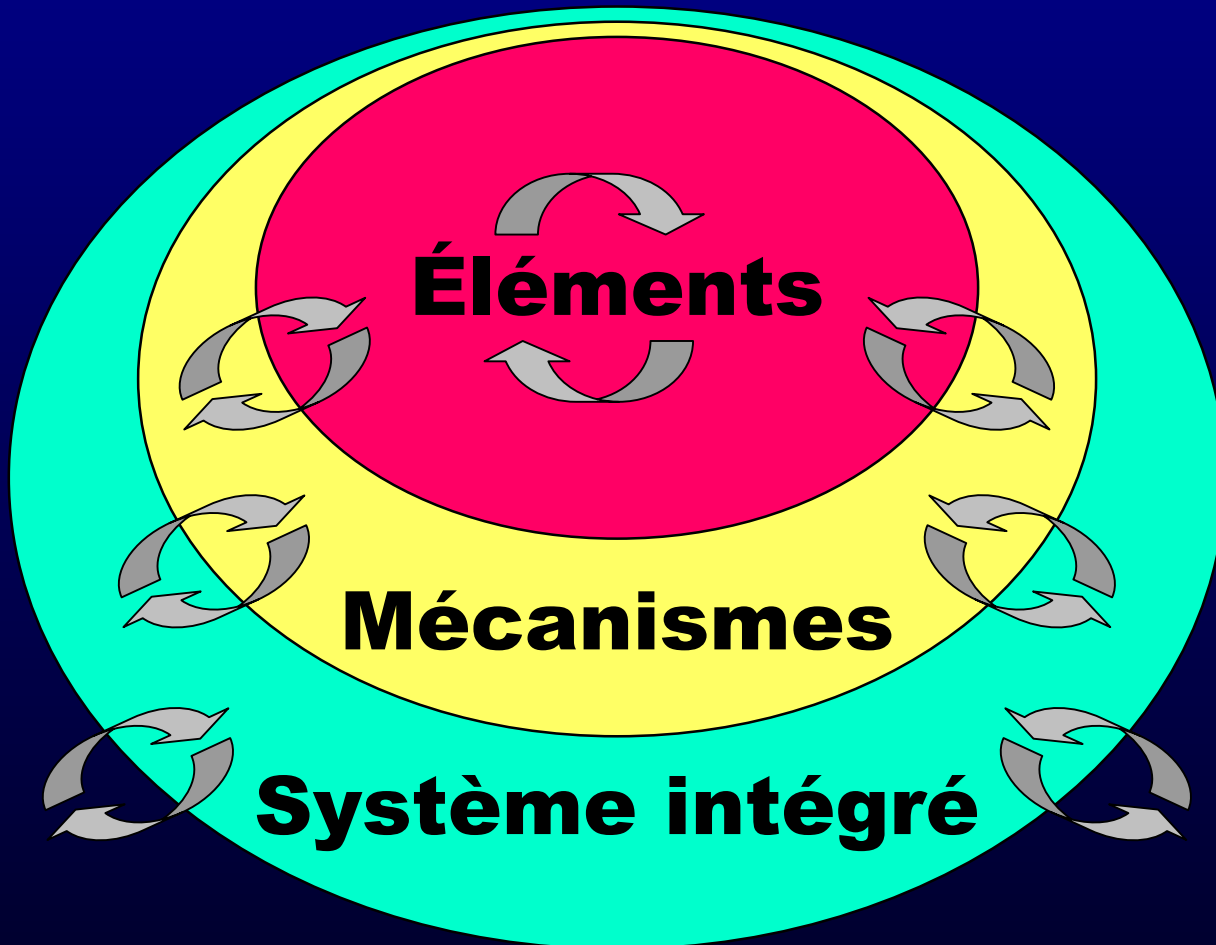
Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes B

1. Généralités
2. Anticorps et complexe BCR
3. Recombinaison V(D)J
4. Différenciation des lymphocytes B
5. Sélection des répertoires

Étude du système immunitaire

- Comprendre la physiologie:
Développement lymphocytaire, mécanismes d'activation, de sélection et de tolérance
 - Comprendre la pathologie:
Facteurs génétiques et environnementaux, auto-immunité, immunodéficiences (héritées ou acquises), persistance
 - Stratégies thérapeutiques:
Pronostic, diagnostic, transplantation, vaccination, thérapie anti-cancéreuse
- Transfert des technologies (clinique/industrie)

Étude du système immunitaire



Émergence de l'Immunologie

- À la fin du 19^{ème} siècle, de la microbiologie
- Développement de la vaccination par Louis Pasteur (1822–1895) (choléra, anthrax, rage)
- **Immunité naturelle:**
Phagocytose des microorganismes par les macrophages (Metchnikoff)
- **Immunité acquise:**
Découverte des anticorps ou immunoglobulines (von Behring et Kitasato) → spécificité et mémoire de la réponse anticorps

Théorie humorale de l'immunité

- La réponse immunitaire acquise est le résultat des anticorps sécrétés qui neutralisent les microorganismes
- Ces anticorps spécifiques peuvent être induits contre un vaste (infini?) ensemble d'antigènes

Théorie des chaînes latérales

P.Erhlich (1854–1915)

- Les anticorps sont des substances naturelles ancrées à la surface des cellules
- Leur spécificité est prédéterminée par une configuration stéréochimique
- Le nombre de spécificités différentes disponibles est énorme
- Pour induire la production d'un anticorps donné en quantité, il suffit que l'antigène se lie au récepteur approprié et ainsi stimule la cellule qui le porte à libérer l'anticorps dans le sérum

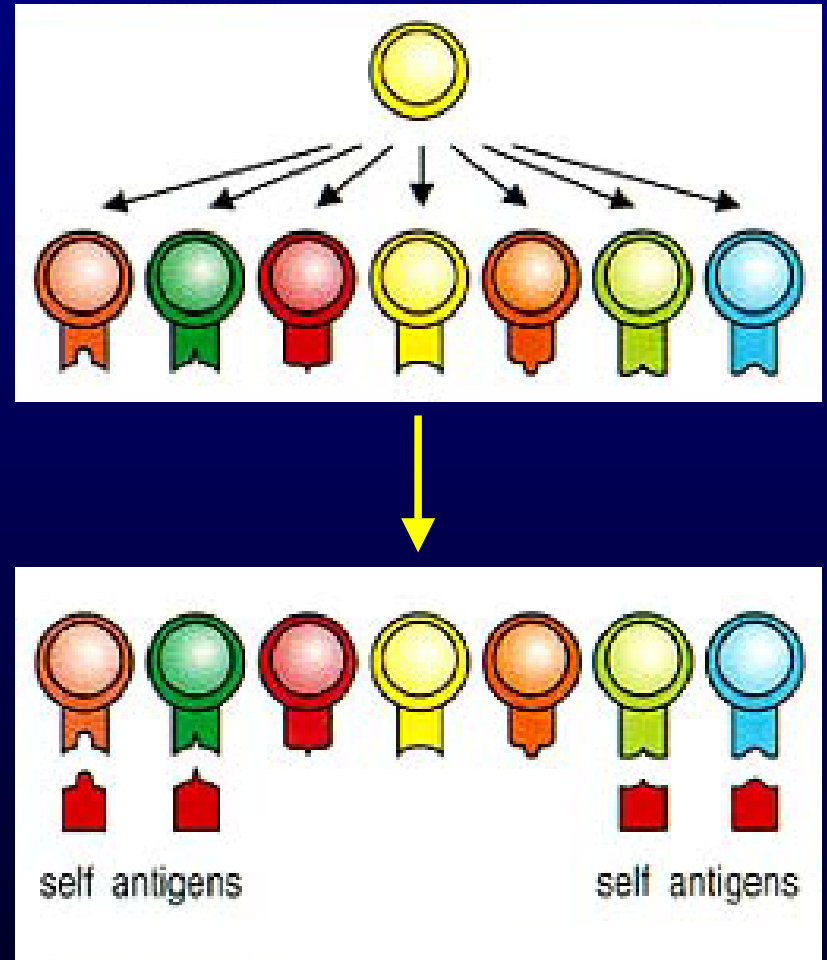
Théories de la diversité des Ac

- **Théorie sélective** de Erhlich réfutée par Landsteiner
→ anticorps contre des antigènes artificiels
- Comment la sélection naturelle conserve des gènes codant des anticorps dirigés contre des molécules qui n'existait pas auparavant?
⇒ Émergence des **théories instructives et directives**
- Développements de la génétique impliquent qu'un tel phénomène suppose une modification de la séquence ADN après l'interaction pré-Ac/Ag
⇒ Retour aux **théories sélectives** (Burnet/Jerne)

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

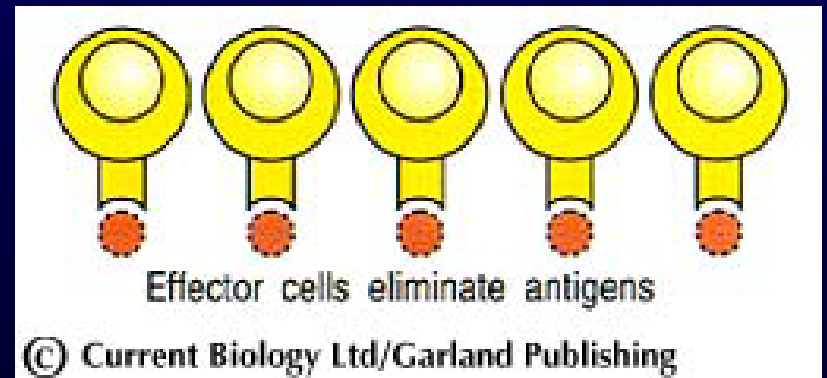


Théorie de la sélection clonale (2)

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



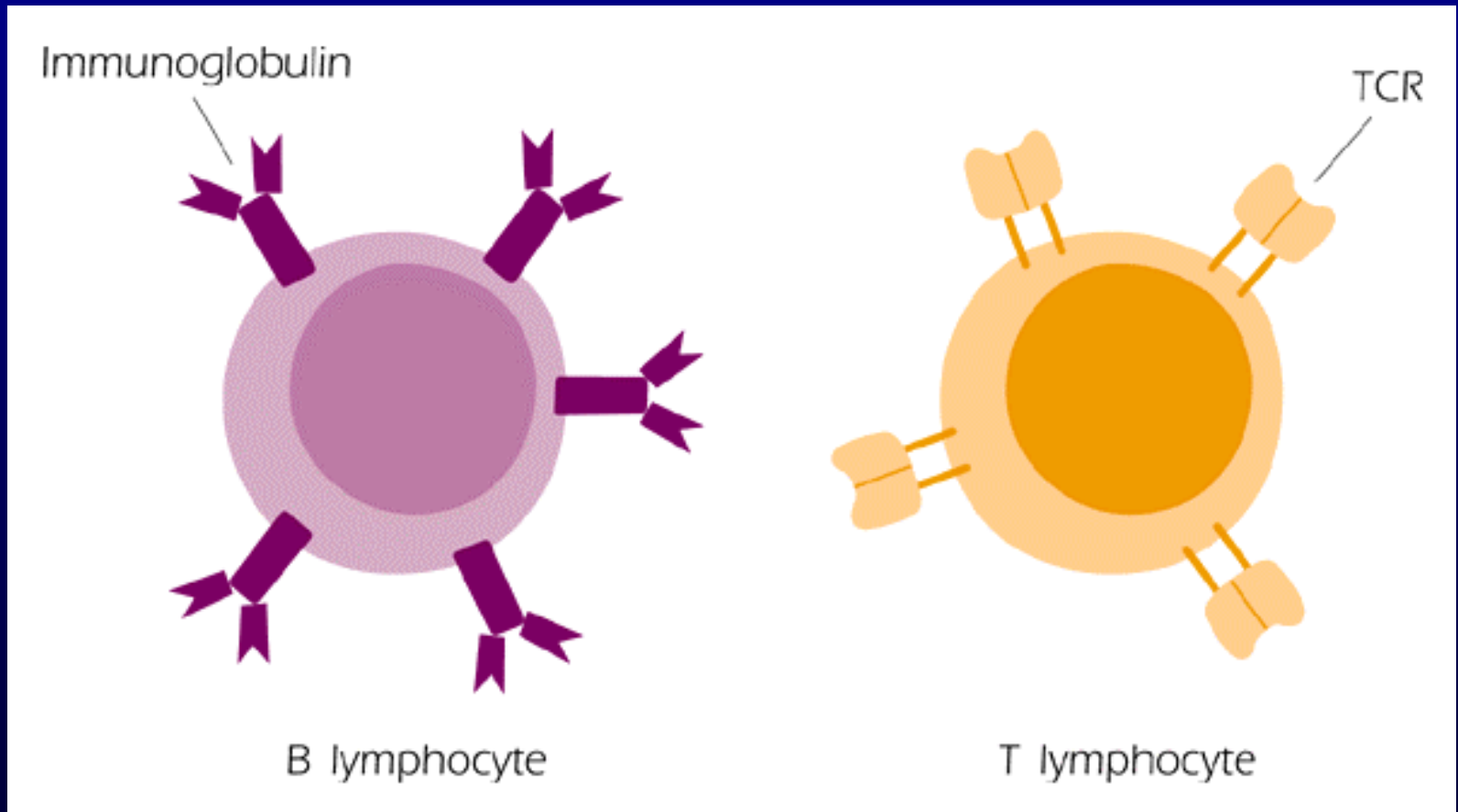
- Les cellules effectrices différenciées à partir d'un lymphocyte activé donné expriment des récepteurs de même spécificité



Composants cellulaires du système immunitaire

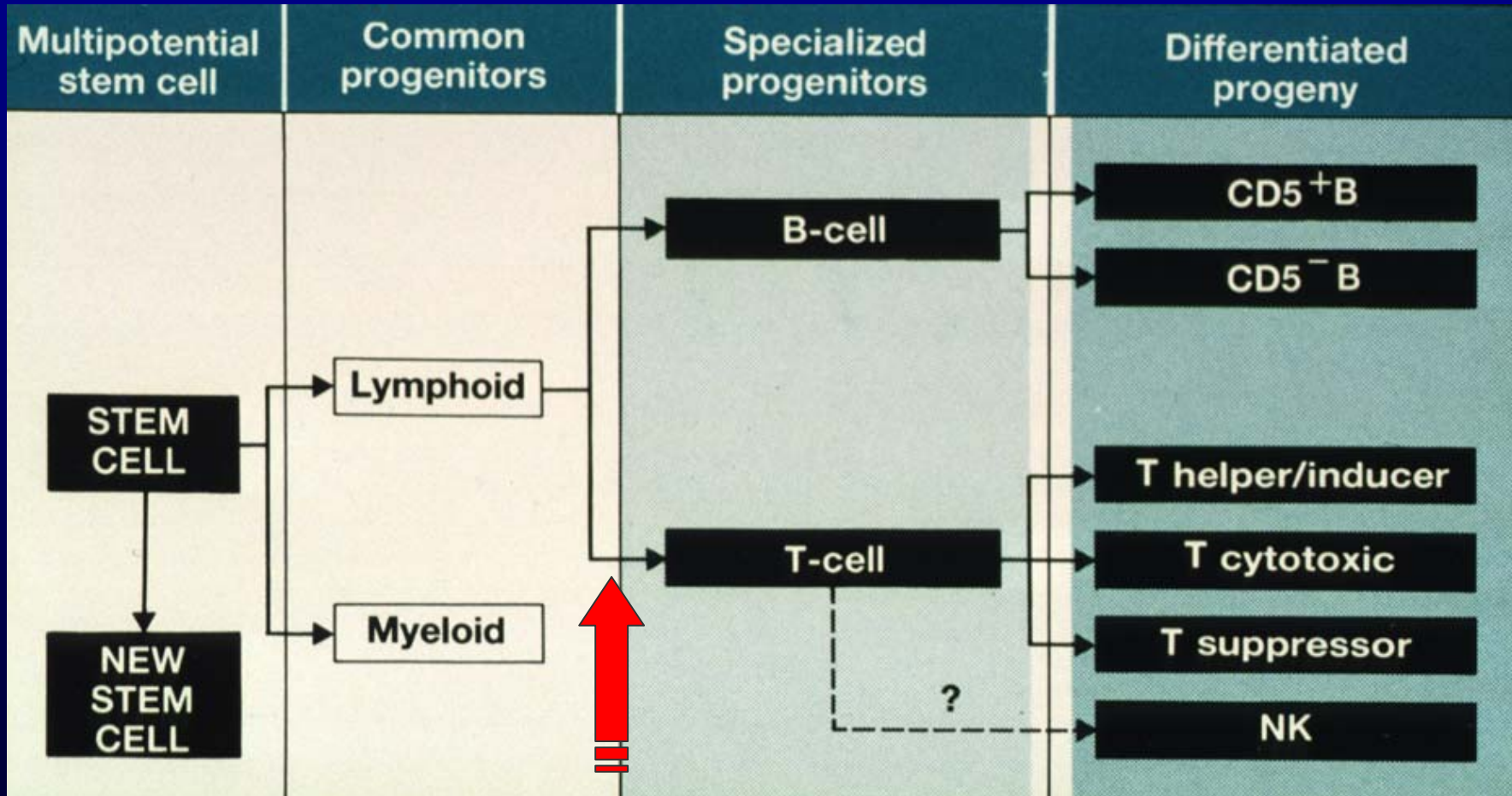
- Immunité naturelle et Immunité acquise dépendent de l'activité des **leucocytes** (globules blancs)
- L'immunité naturelle est essentiellement due à l'activité des **cellules myéloïdes**
- L'immunité acquise est principalement due à l'activité des **lymphocytes B et T**
- Ces cellules font partie du **système hématopoïétique** et ont une origine commune, la **moelle osseuse**

Les lymphocytes B et T



→ caractérisés par leur récepteur spécifique d'antigène

La lignée lymphocytaire



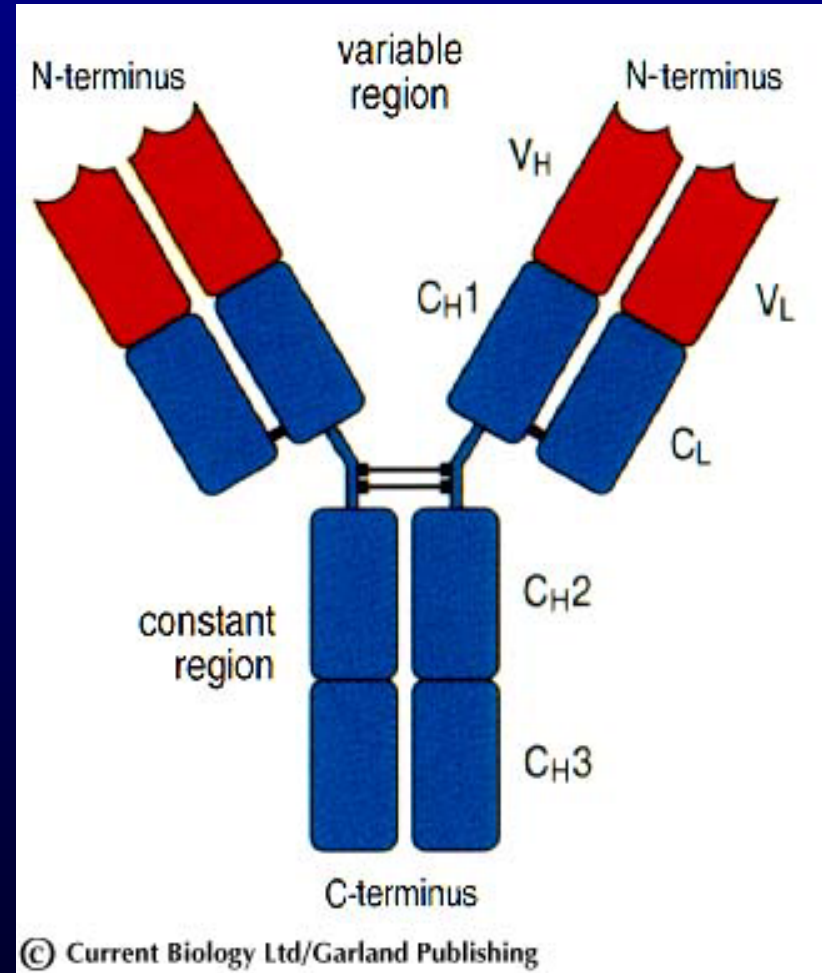
*Environnement
Cytokines*

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes B

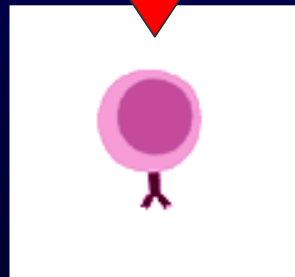
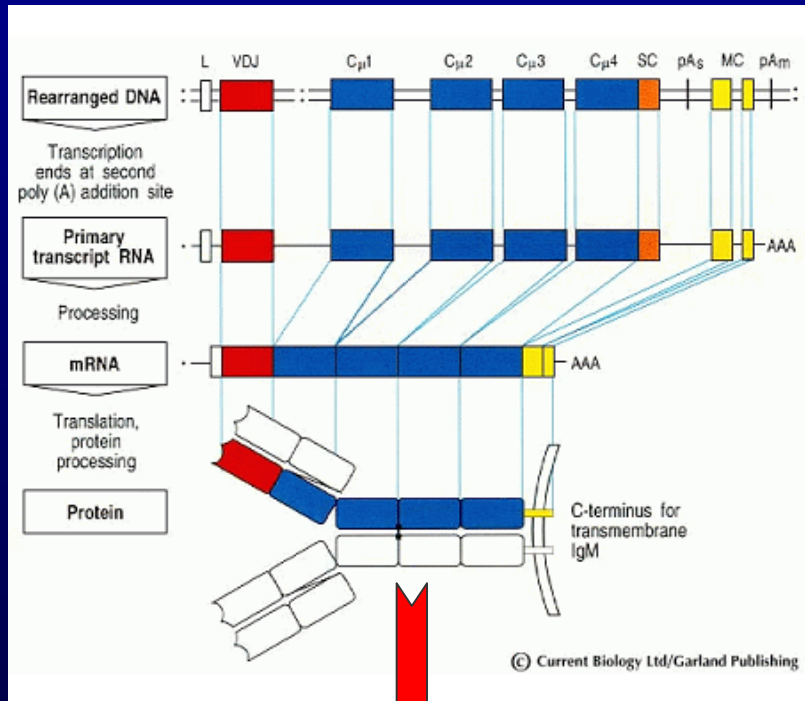
1. Généralités
2. Anticorps et complexe BCR
3. Recombinaison V(D)J
4. Différenciation des lymphocytes B
5. Sélection des répertoires

La molécule anticorps

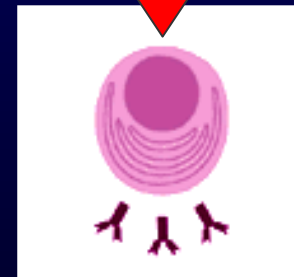
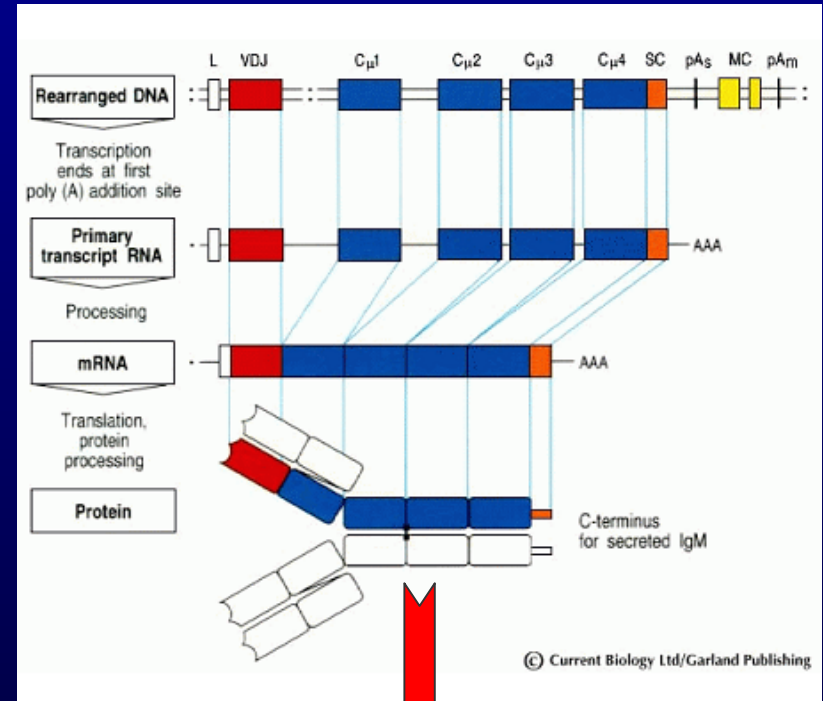
- La molécule anticorps ou immunoglobuline est composée de 2 chaînes lourdes (IgH) et 2 chaînes légères (Igκ ou Igλ)
- Chaque chaîne comprend une région constante et une région variable
- La région variable porte le site de liaison à l'antigène



Ig membranaire – Ig sécrétée

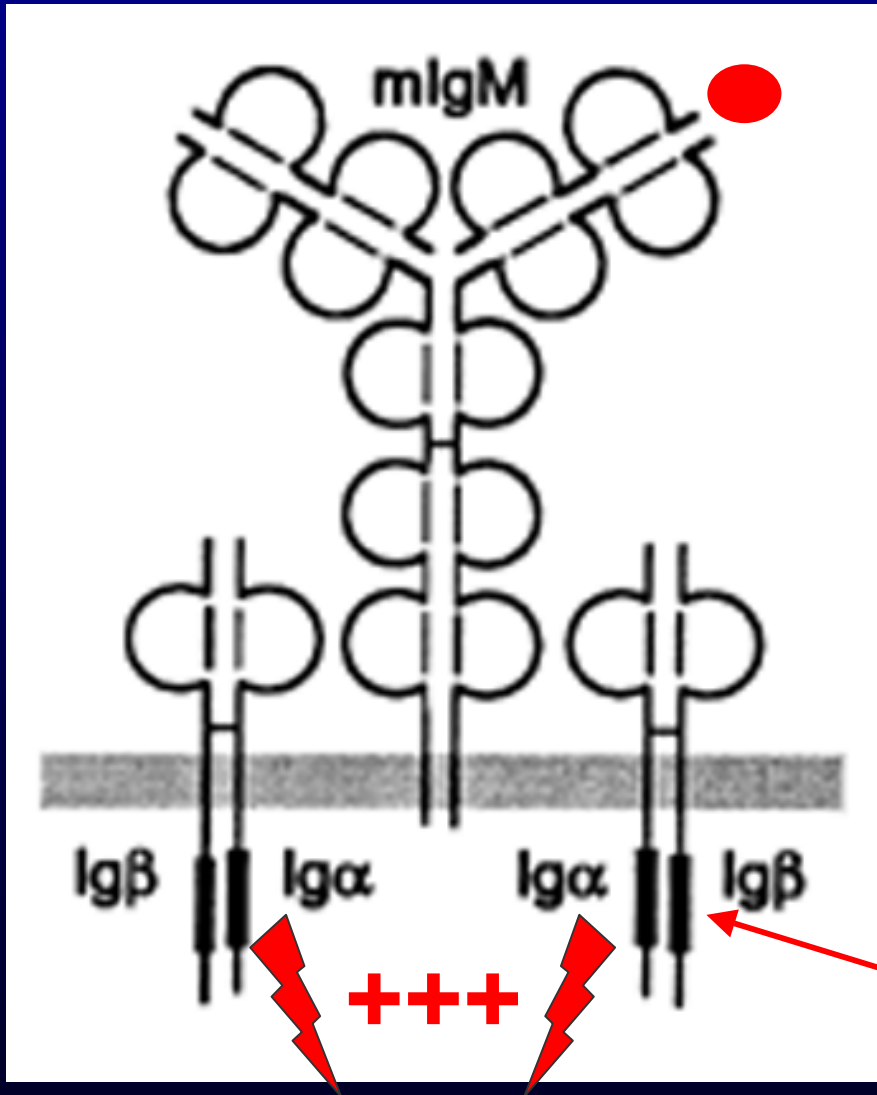


lymphocyte B



plasmocyte

Transduction du signal BCR



Reconnaissance de l'antigène par l'Ig

Transduction du signal par Igα/Igβ (CD79α/CD79β)

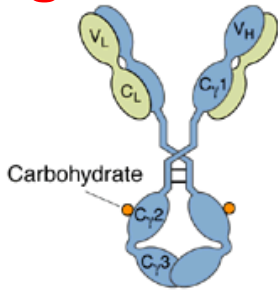
Motif ITAM:

immunoreceptor tyrosine-based activation motif

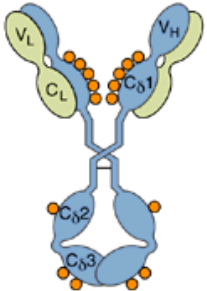
$(D/E)XXYXXLX_{(6-8)}YXXL$

Les classes d'immunoglobulines

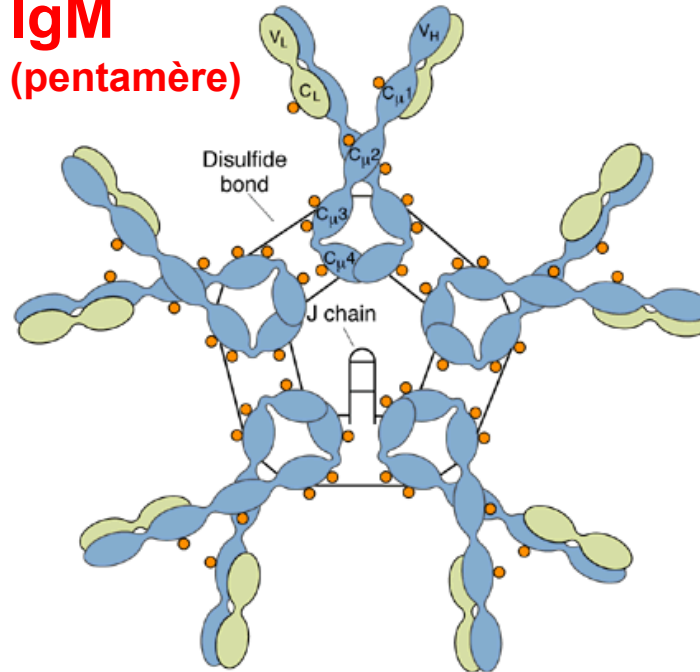
IgG



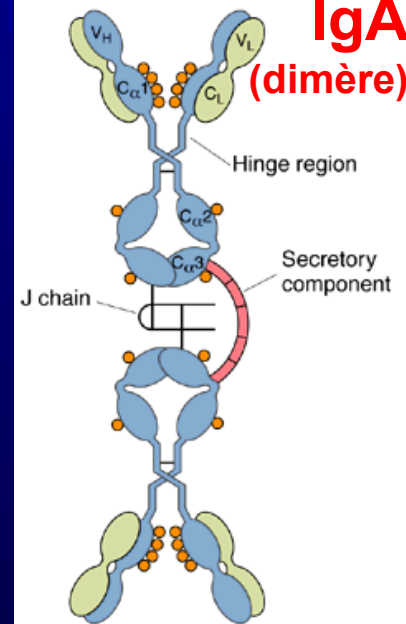
IgD



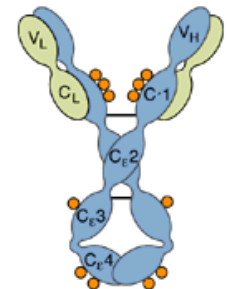
IgM (pentamère)



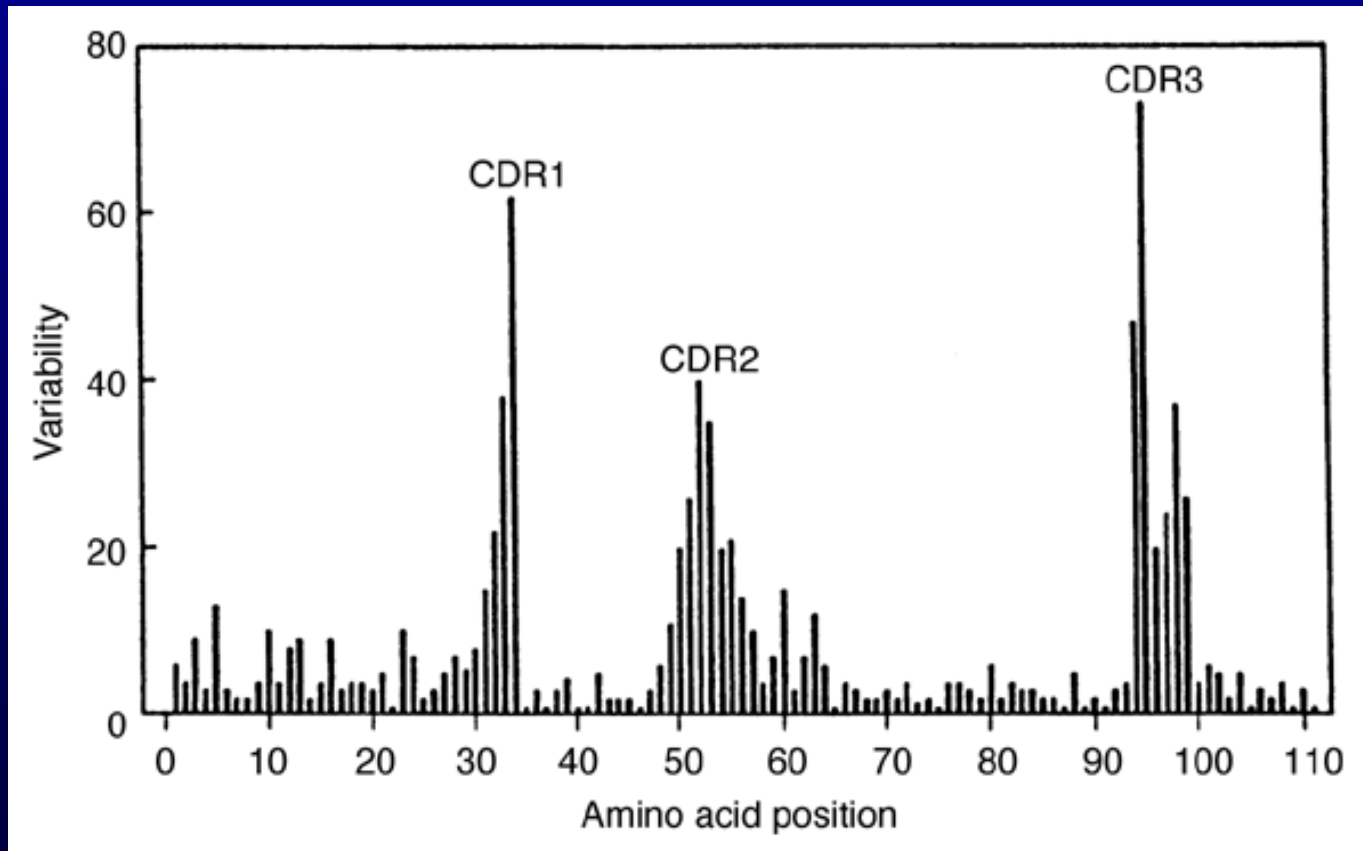
IgA (dimère)



IgE

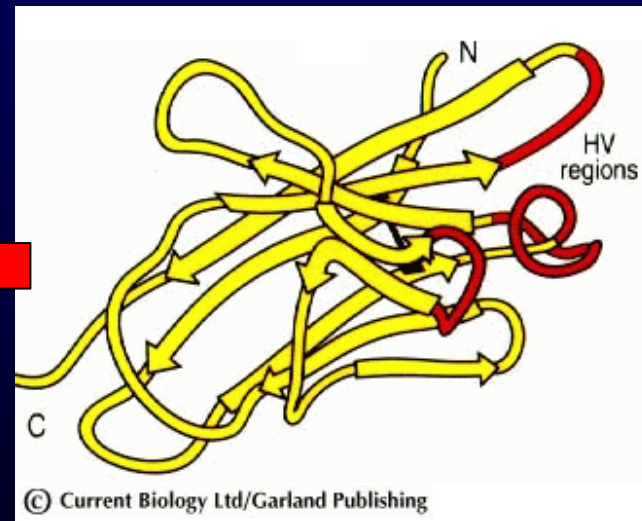
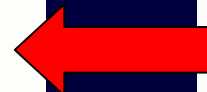
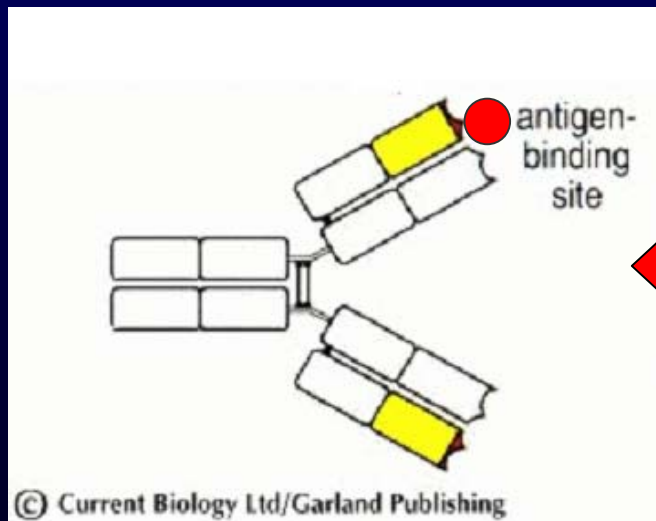
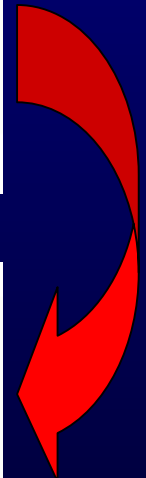
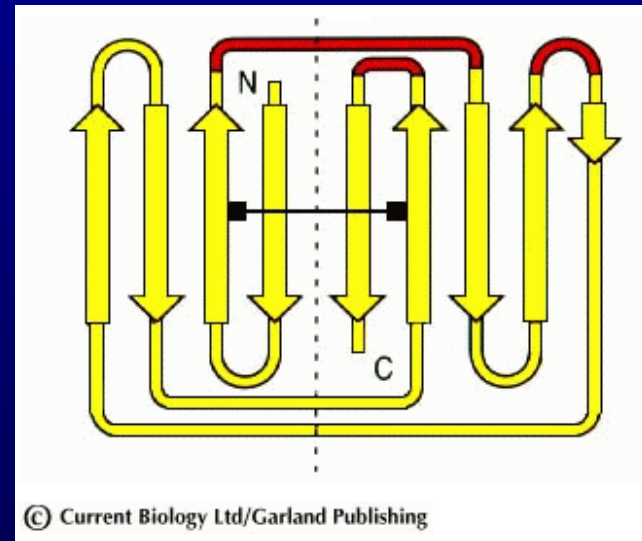
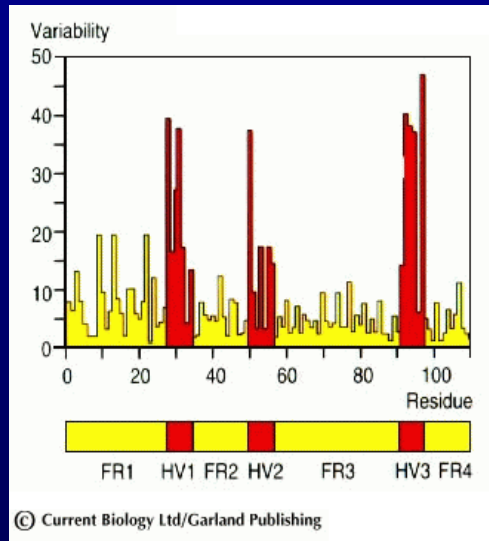


Les régions hypervariables (1)



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)



Théorie de la sélection clonale (3)

La théorie sélective pose néanmoins le problème de l'origine génétique de la diversité :

- Comment expliquer l'extraordinaire diversité ? (Landsteiner a montré qu'elle est « illimitée »)
- Comment expliquer la constance des domaines constants alors que la diversité se concentre dans les domaines variables (Edelman, 1969) ?
- Combien de gènes doit-on considérer ?

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes B

1. Généralités
2. Anticorps et complexe BCR
3. Recombinaison V(D)J
4. Différenciation des lymphocytes B
5. Sélection des répertoires

Un paradoxe génétique

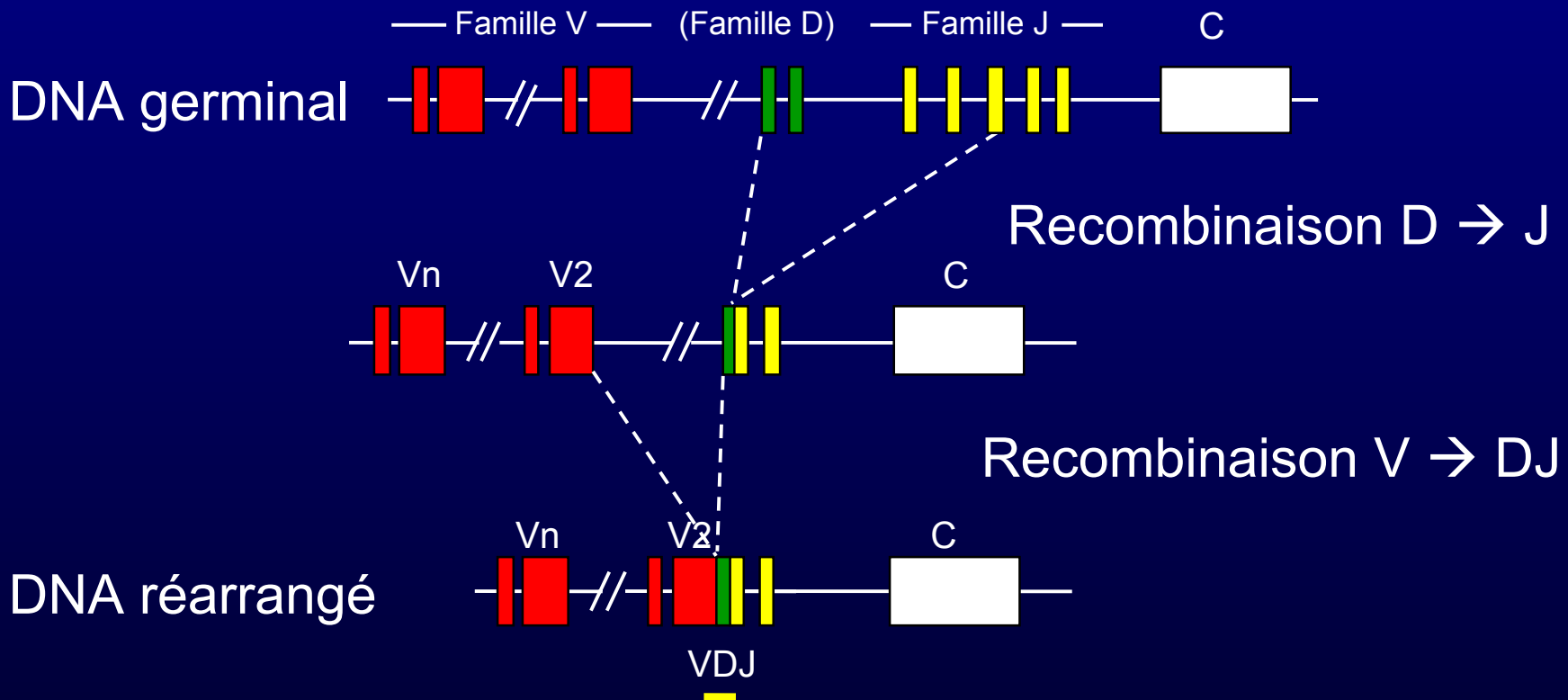
- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
- ~50 000 gènes dans le génome humain
- Capacité de production d'une variété « infinie » d'anticorps et de récepteurs T différents

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

« Si les smokings étaient faits d'une seule pièce, et que les gens devaient se faufiler à l'intérieur par un trou dans le dos, les magasins de location de smokings devraient stocker un nombre encore plus grand de ces habits qu'ils ne le font. Heureusement, on peut mélanger des pantalons, des vestes, des chemises et des chaussures de tailles et pointures différentes. »

La sagesse des gènes, Christopher Wills.

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



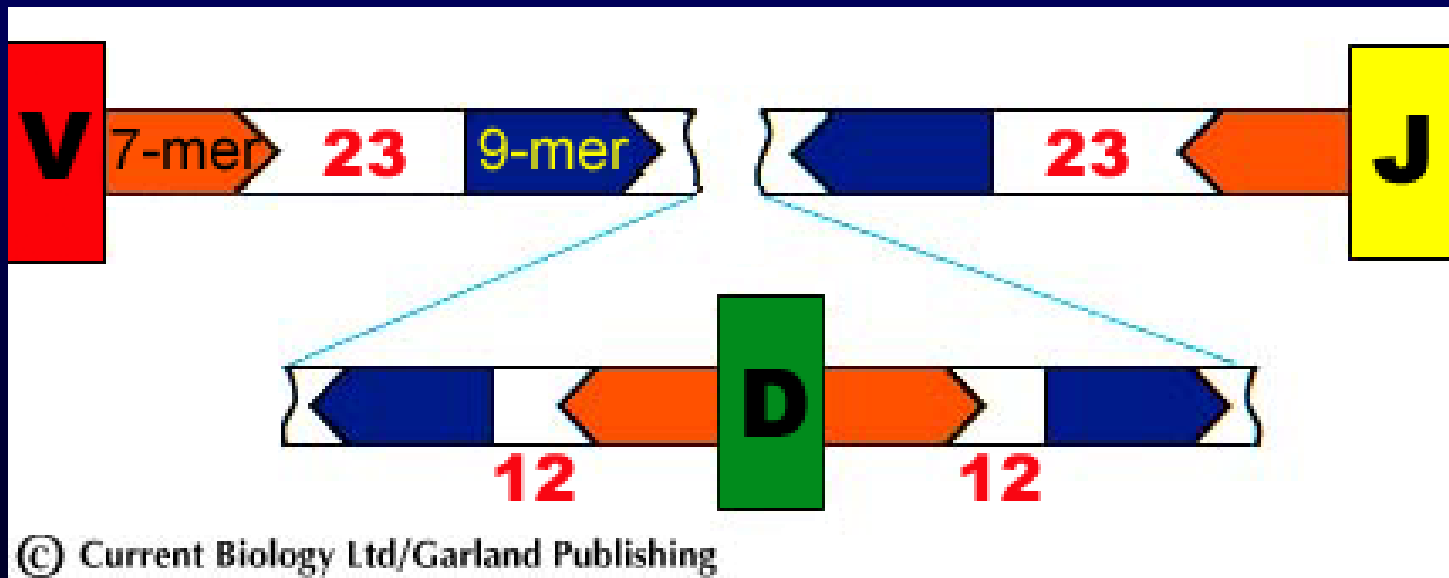
CDR3 = jonction V(D)J

→ Contact avec l'antigène (Ig)

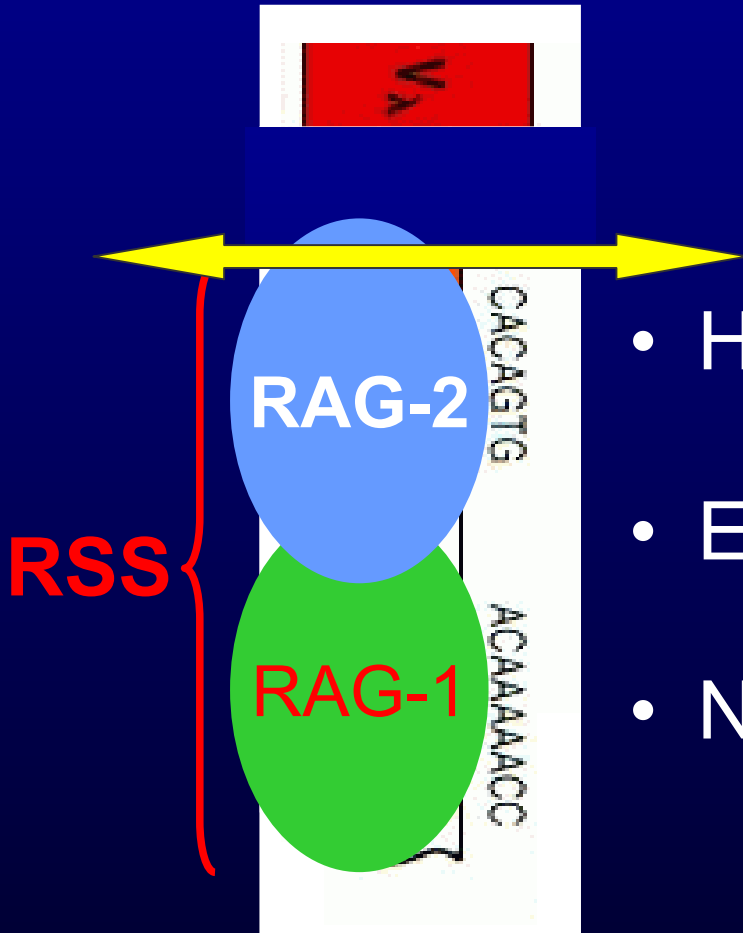
→ Contact avec le complexe CMH/peptide (TCR)

La recombinaison V(D)J (1)

- Expression des protéines RAG-1 et RAG-2
- Accessibilité du locus → Ouverture de la chromatine pour permettre le réarrangement
- Reconnaissance de RSS → Heptamère-espaceur-nonamère suivant la règle 12/23



Séquences signal de recombinaison



- Heptamère → **CACAGTG**
- Espaceur 12 ou 23
- Nonamère → ACAA**AA**ACC

La règle 12/23 pour les Ig et TCR

Ig κ

Ig λ

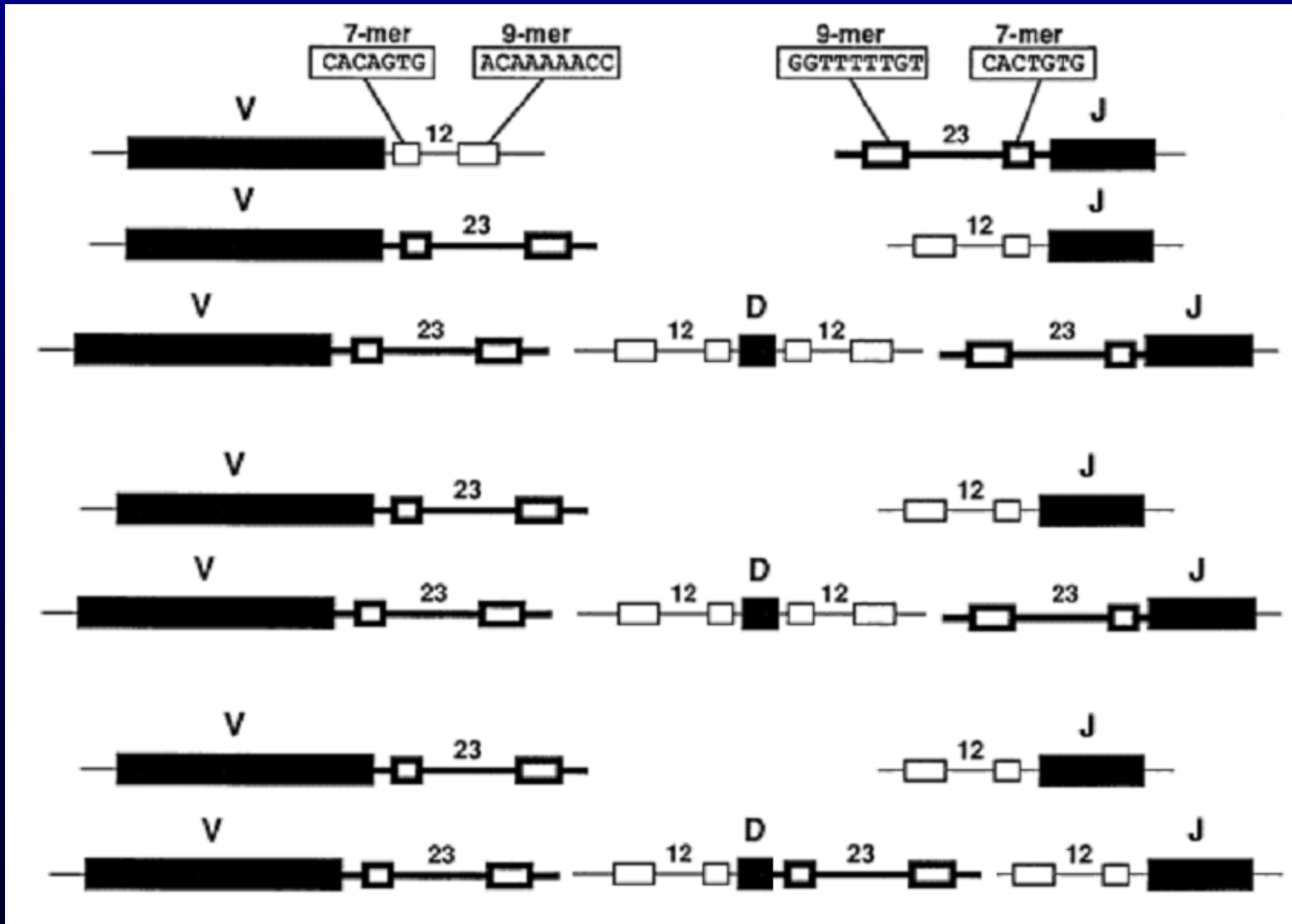
IgH

TCR α

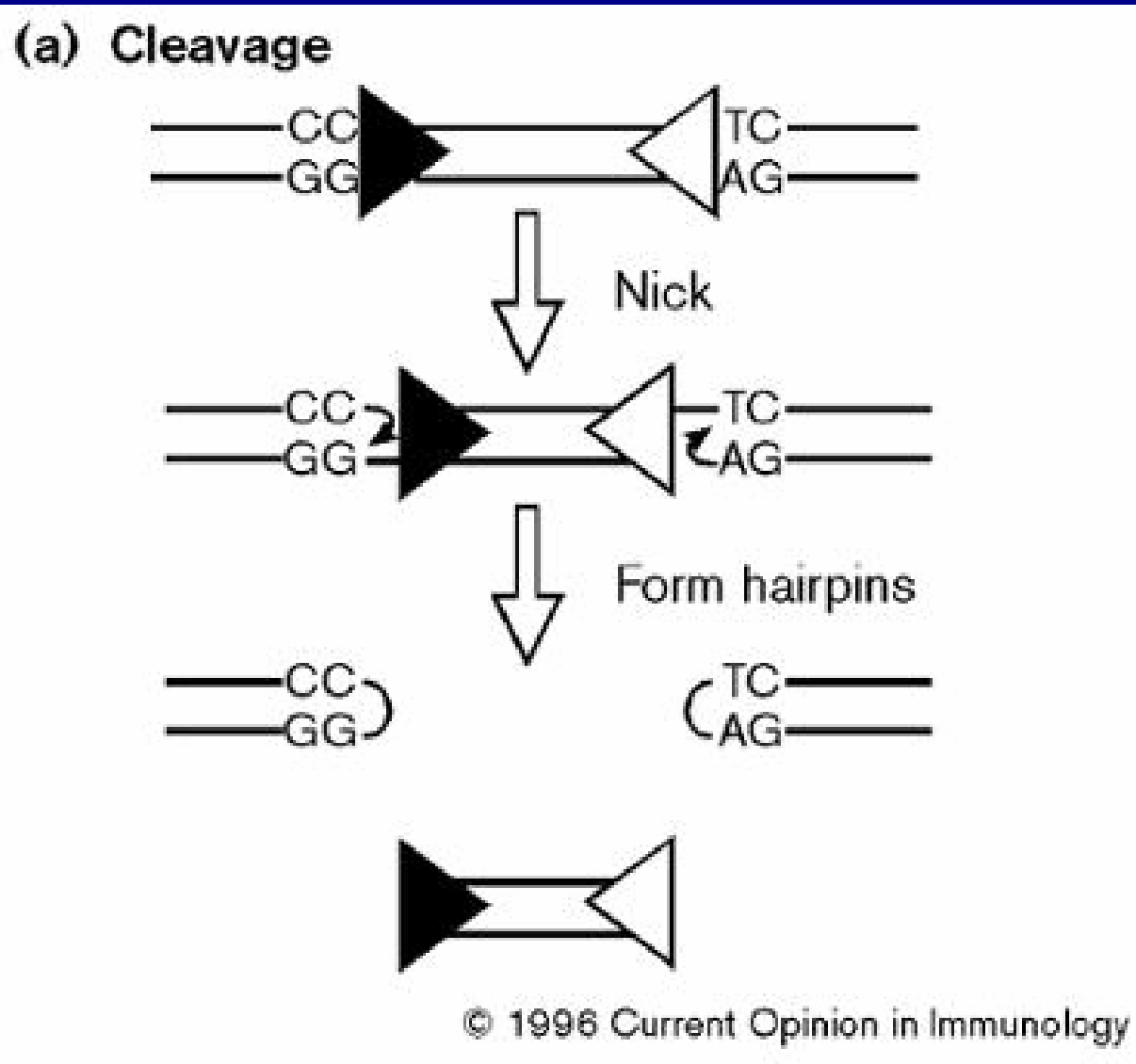
TCR β

TCR γ

TCR δ

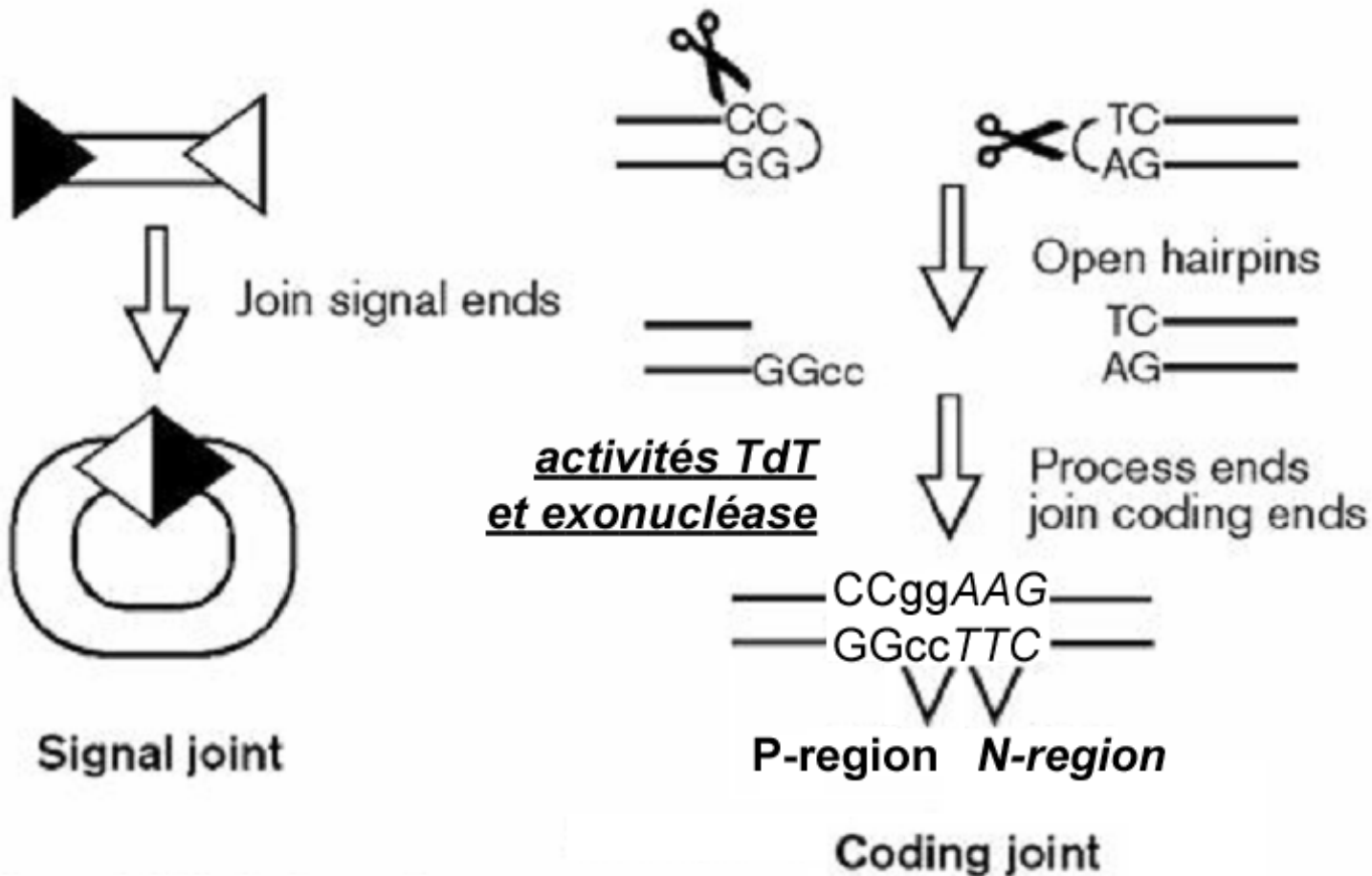


La recombinaison V(D)J (2)



La recombinaison V(D)J (3)

(b) Joining



La recombinaison V(D)J (4)

Différentes protéines sont impliquées:

- RAG-1/RAG-2
- HMG1/2, Artemis
- Ku70, Ku80, DNAPK, XRCC4, Ligase IV
- Exonucléases, TdT

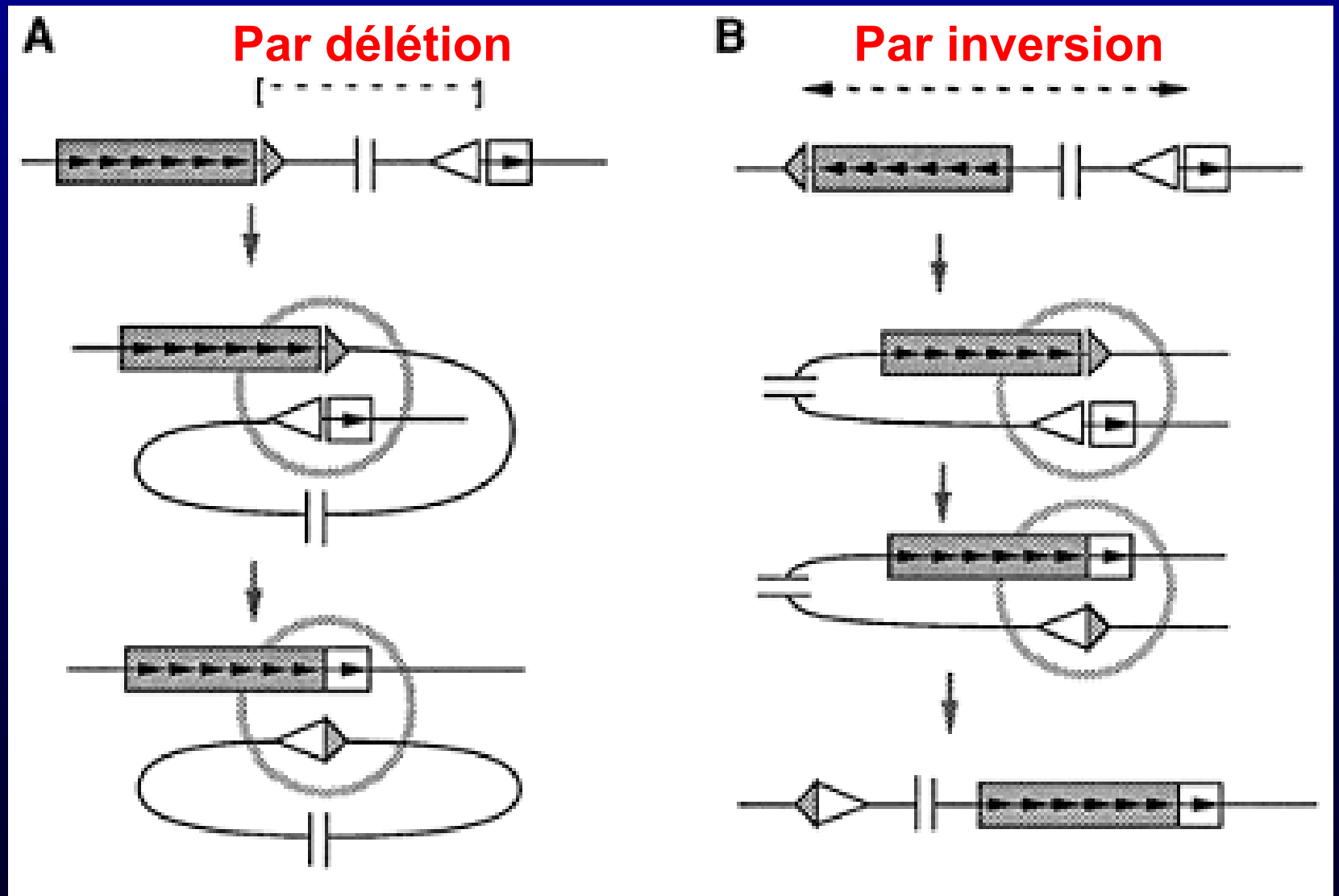
La recombinaison V(D)J (5)

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 (+).

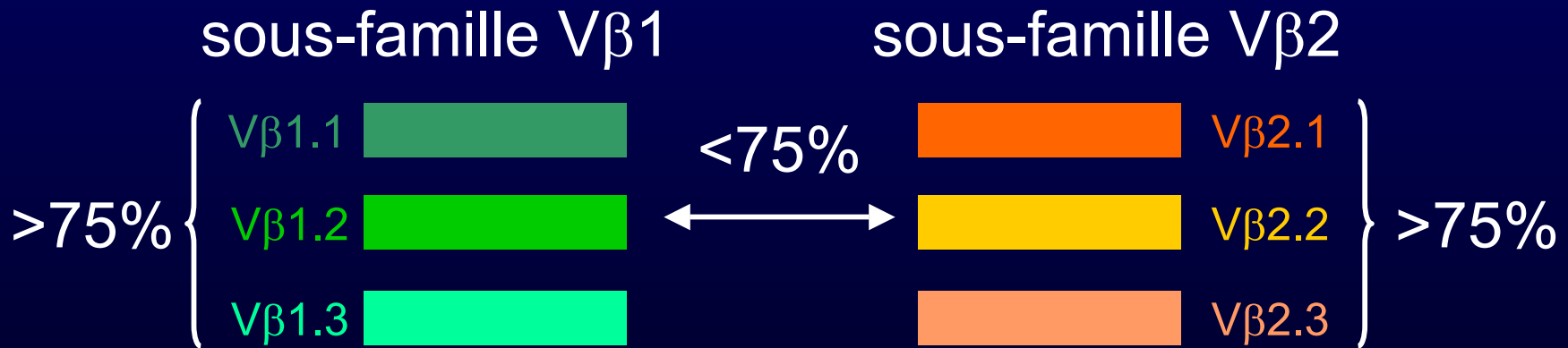
<i>Cys</i>	<i>Ala</i>	...V	>	N(D)N	<	J...	<i>Phe</i>	<i>Gly</i>	
<i>TGT</i>	<i>CGA</i>	<i>CC</i>				<i>TCGC</i>	<i>TTT</i>	<i>GGT</i>	
<i>TGT</i>	<i>CGA</i>	<i>CC</i>		g aa		G	<i>CTT</i>	<i>TGGT</i>	-
<i>TGT</i>	<i>CGA</i>	<i>CC</i>		g gaa		GCT	<i>TTG</i>	<i>GT</i>	-
<i>TGT</i>	<i>CGA</i>	<i>CC</i>	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

Différents types de réarrangements

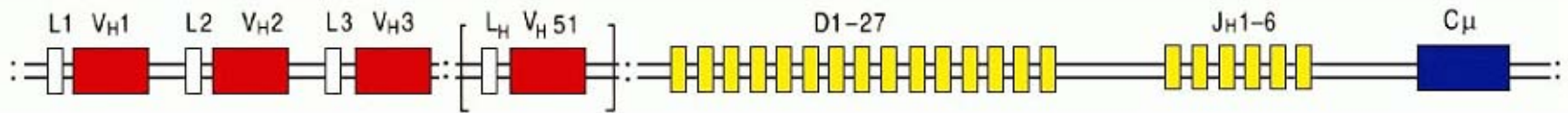


Sous-familles de gènes variables

- 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.



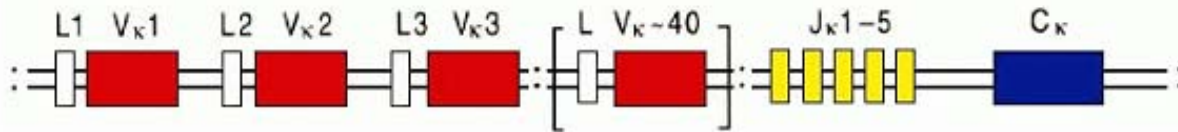
Organisation génomique du locus IgH humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

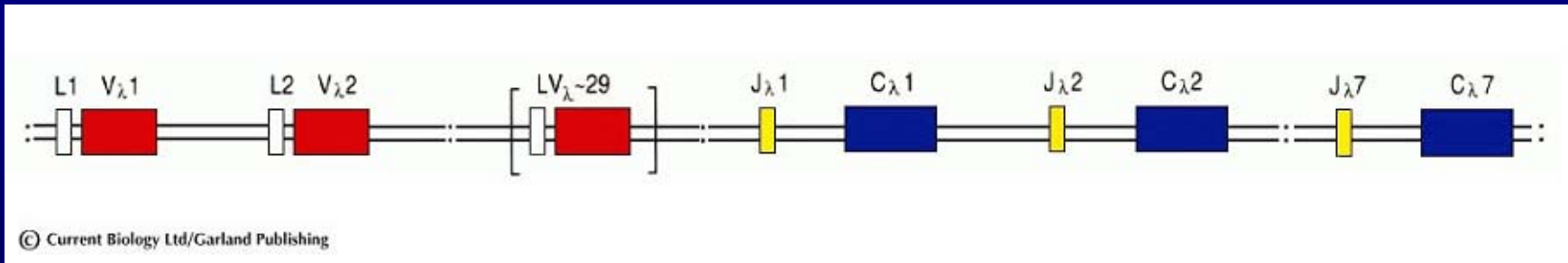
Organisation génomique du locus Ig κ humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

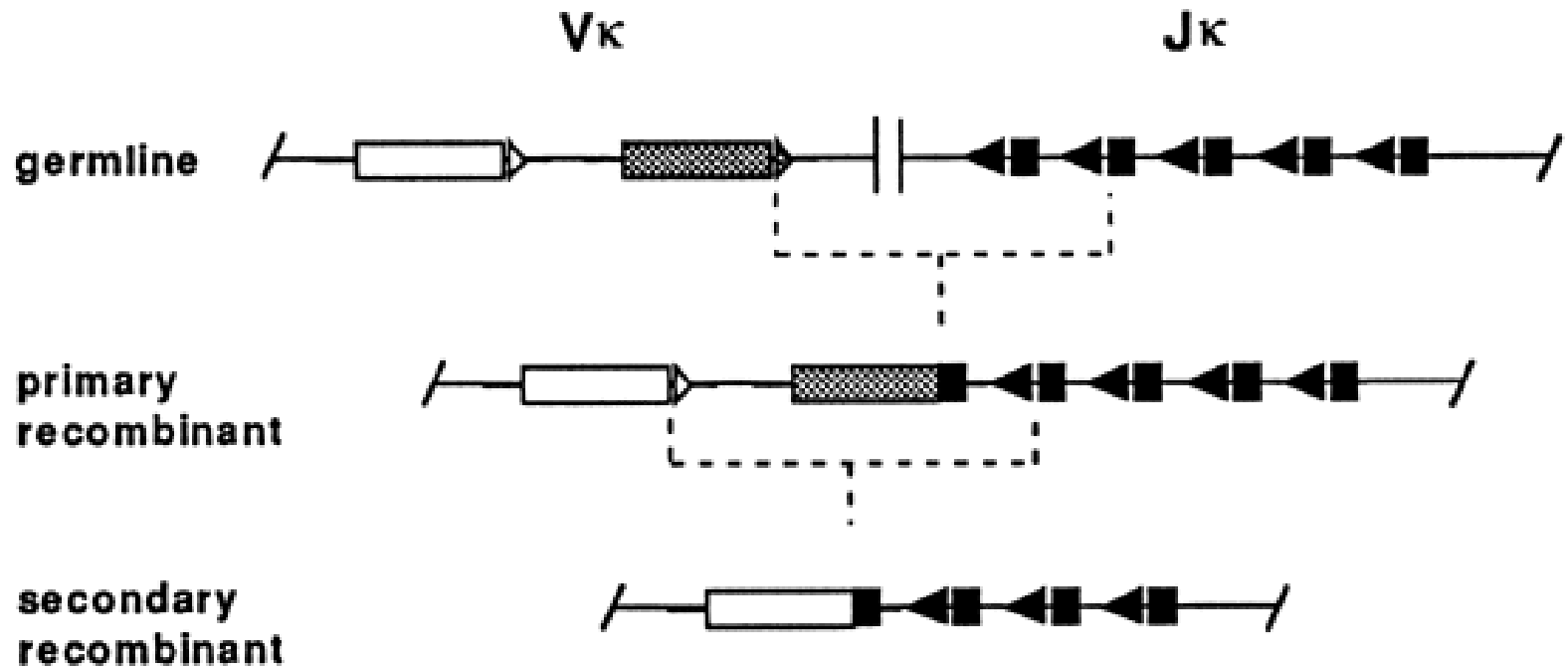
- Chromosome 2
- Entièrement séquencé (1,8 Mb)
- ~80 V κ (dont ~40 fonctionnels) groupés en 7 sous-familles
- V κ organisés en deux répétitions en miroir
- 5 J κ , un seul C κ

Organisation génomique du locus $Ig\lambda$ humain

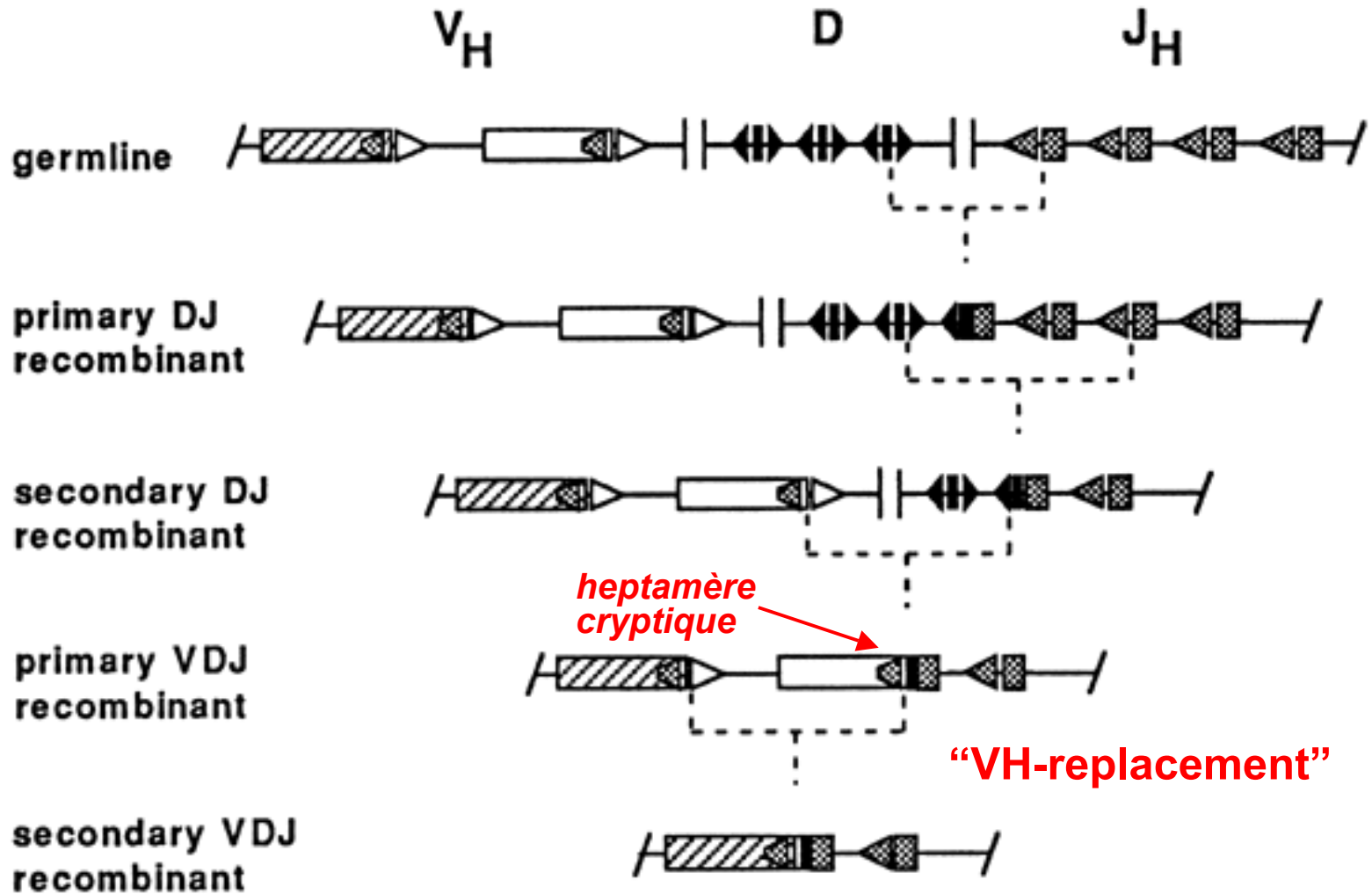


- Chromosome 22
- Entièrement séquencé (1 Mb)
- ~70 V λ (dont ~30 fonctionnels) groupés en 11 sous-familles
- 7-11 clusters J–C λ (4-5 fonctionnels)

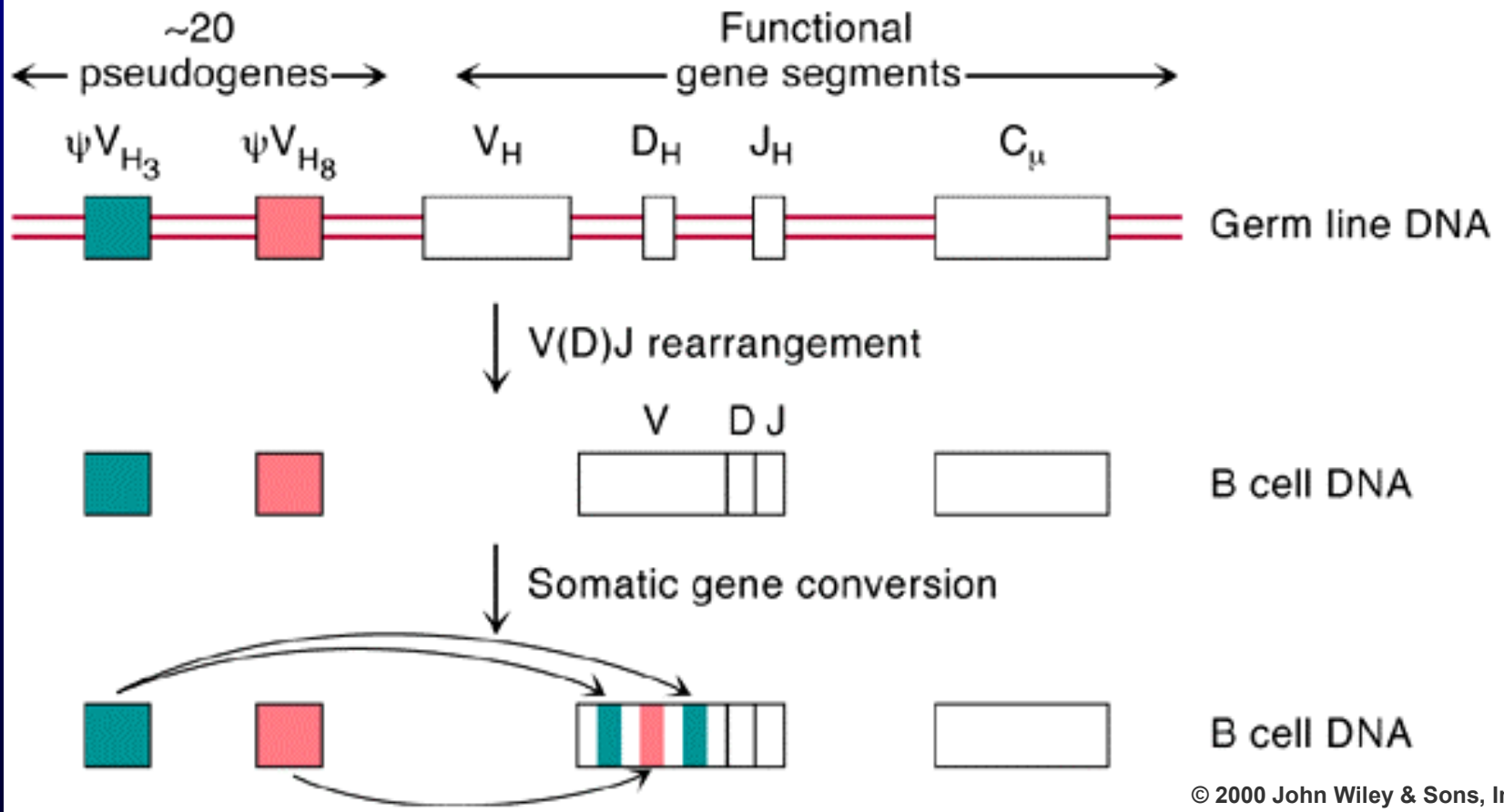
Réarrangements secondaires (1)



Réarrangements secondaires (2)

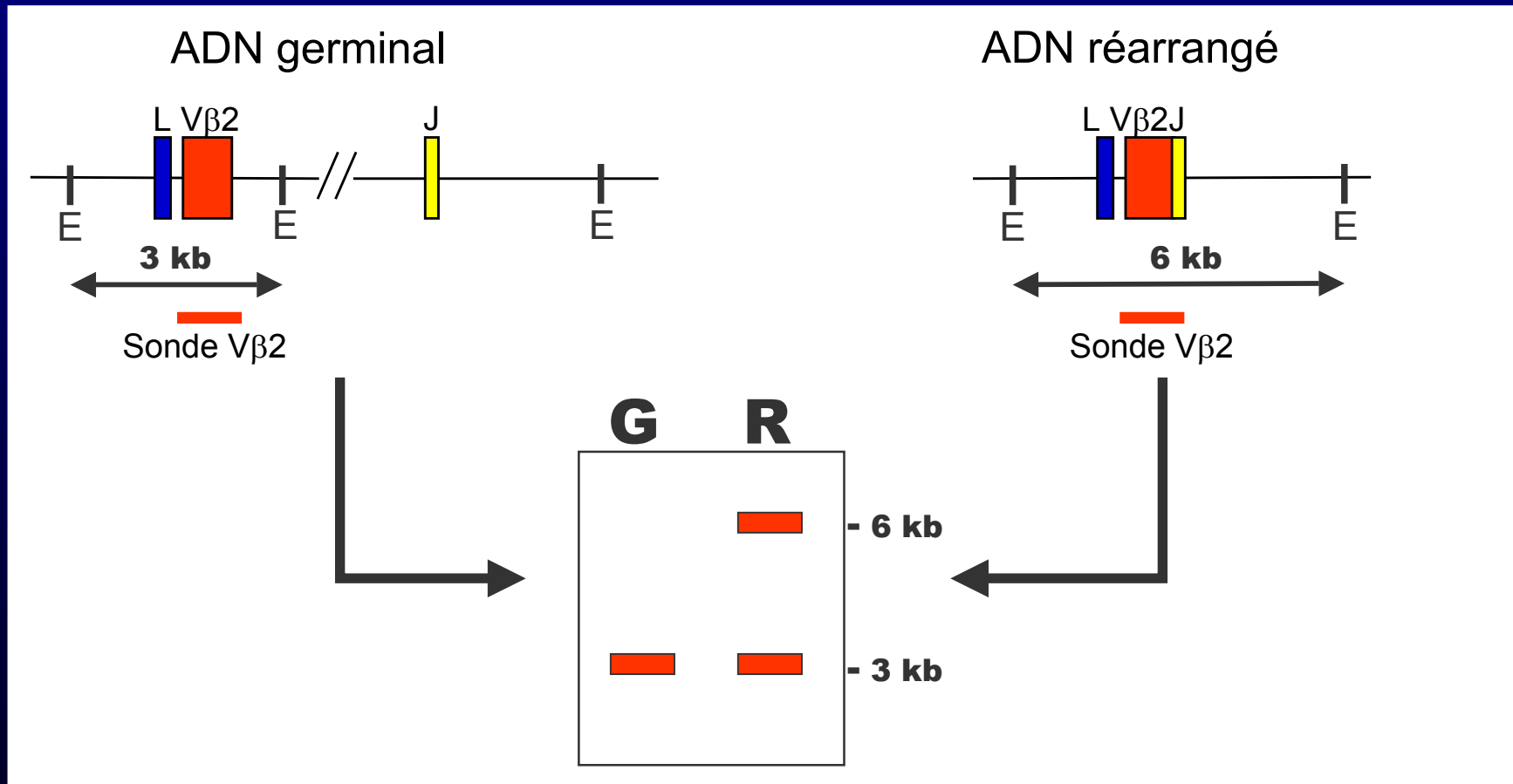


Conversion génique



Détection des réarrangements (1)

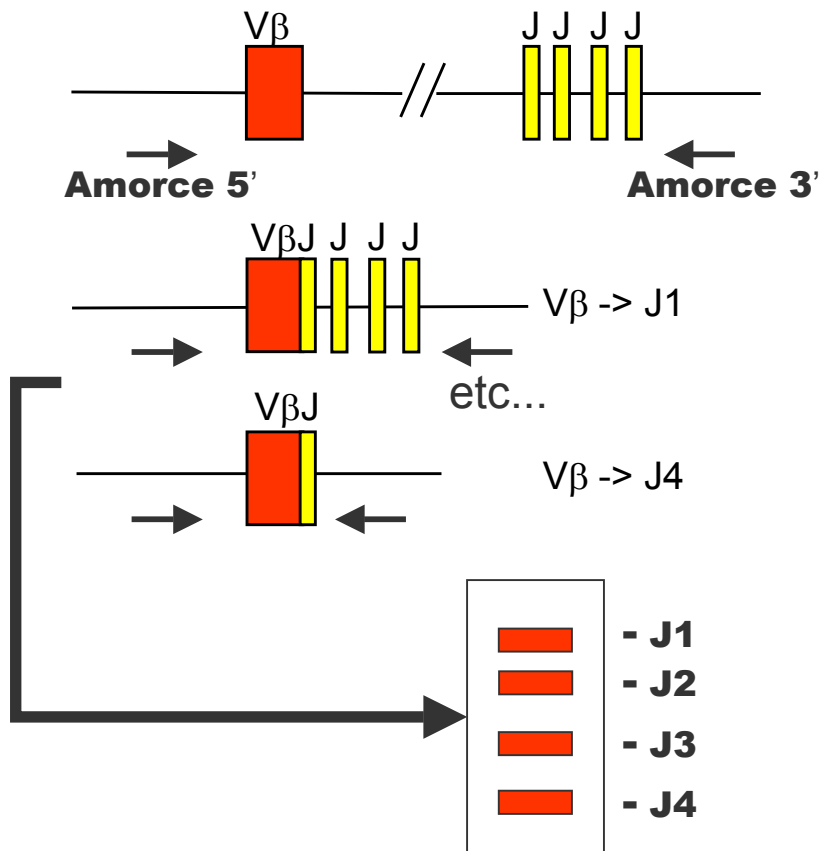
- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par la technique de Southern blot.



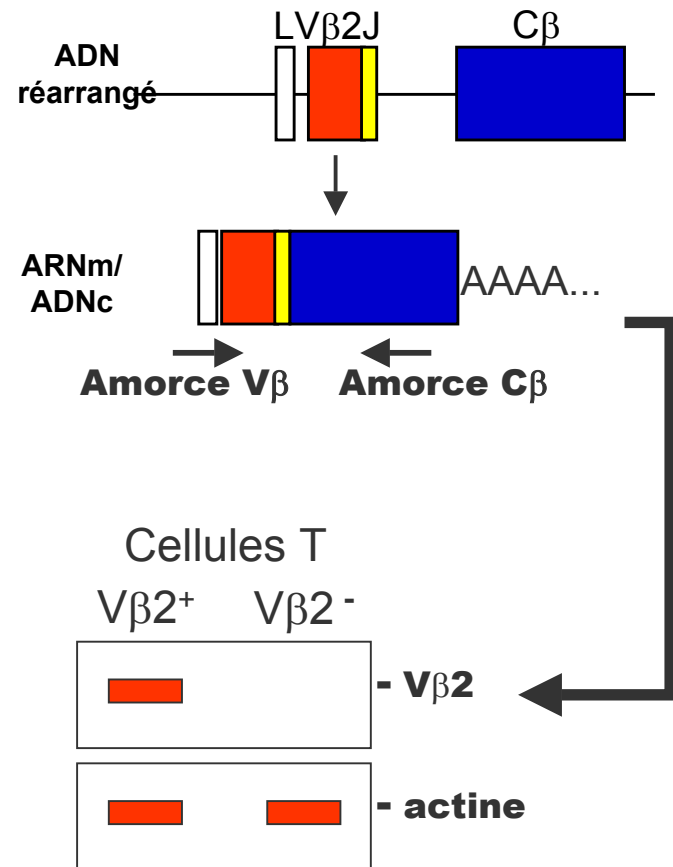
Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR aux niveaux ADN et ARN.

ADN

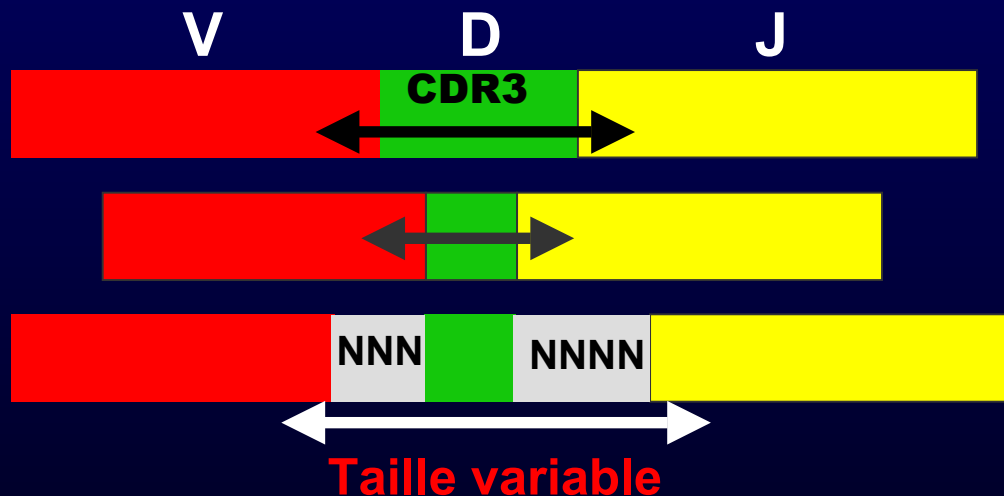


ARN



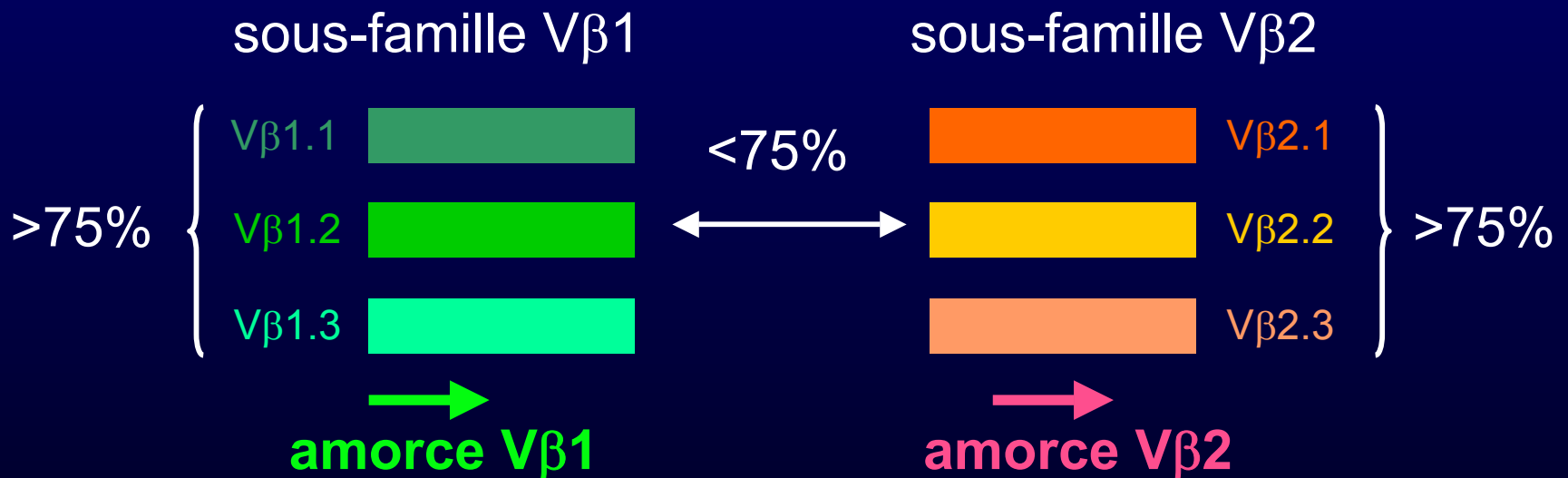
La région CDR3 concentre l'essentiel de la diversité

- La recombinaison V(D)J est imprécise
- Activité exonucléase → délétions aléatoires
- Activité TdT → additions N aléatoires
- La région CDR3 est de taille variable; c'est la *signature du réarrangement*

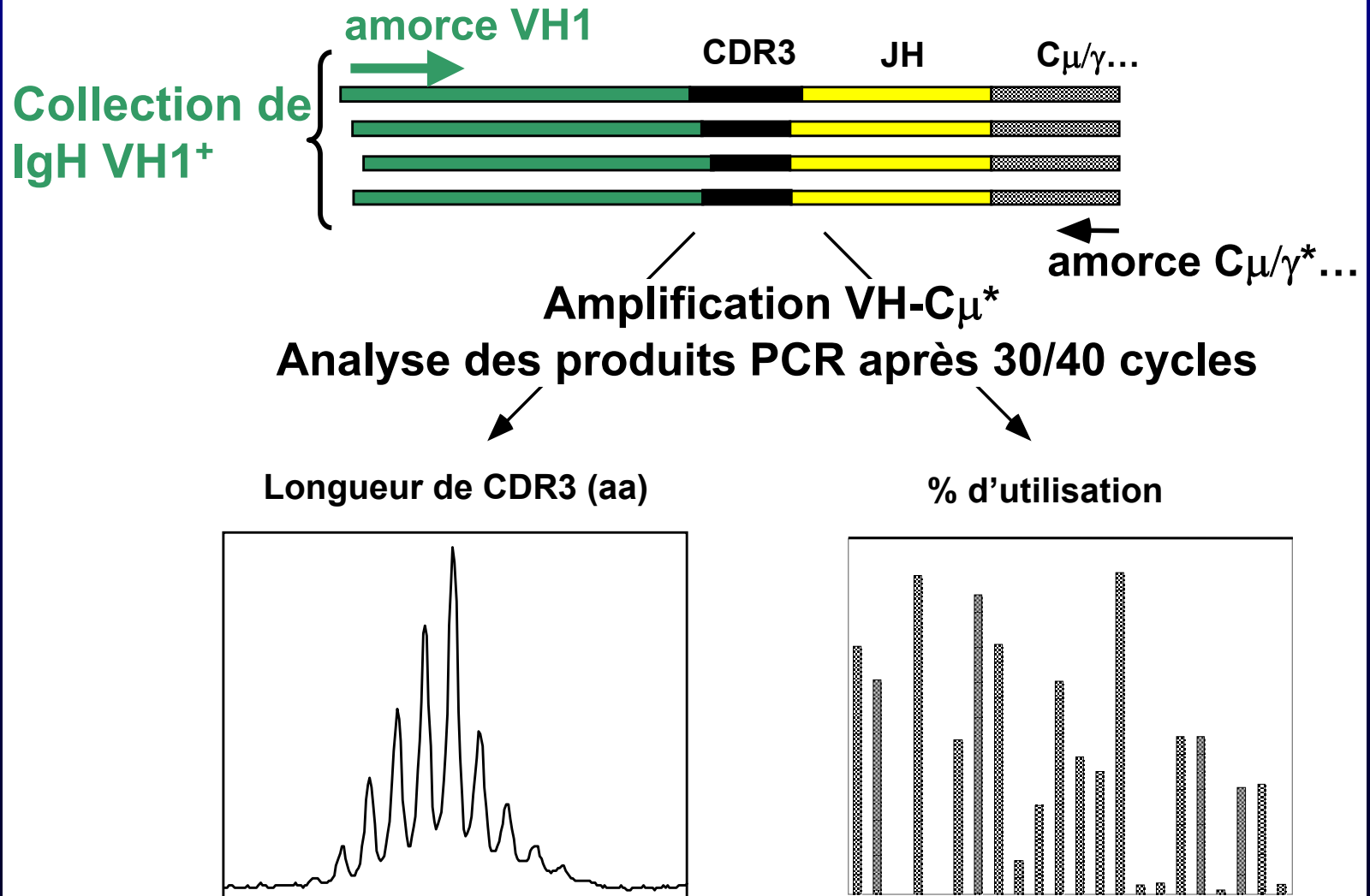


Amorces de sous-familles

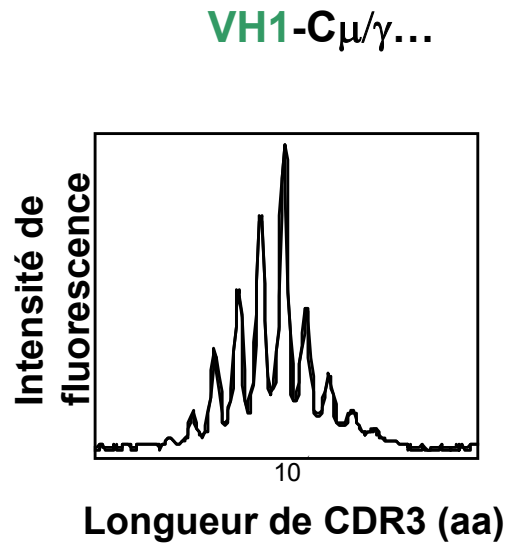
- Étant donné l'identité entre les membres d'une sous-famille Ig/TCR, il est généralement possible de dessiner des amorces spécifiques de sous-familles.



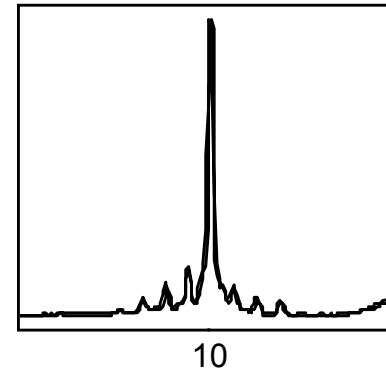
La technique Immunoscope (1)



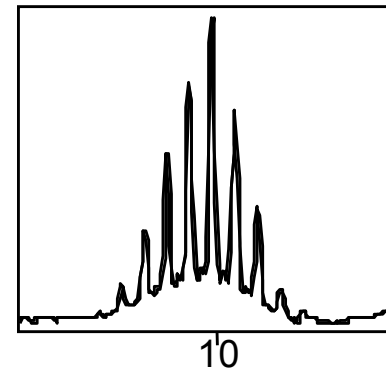
La technique Immunoscope (2)



2 dimensions: VxCDR3



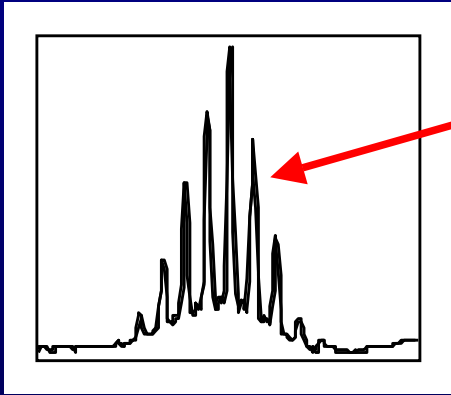
VH1-JH1



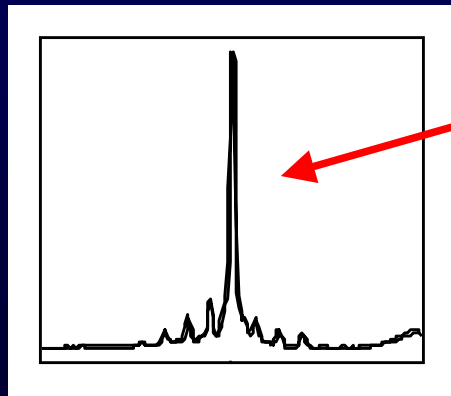
VH1-JH2

3 dimensions: VxJxCDR3

La technique Immunoscope (3)



Courbe en cloche régulière:
indicatif d'une
population polyclonale



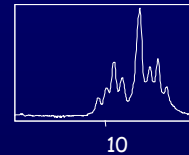
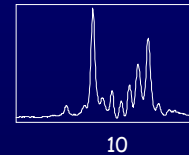
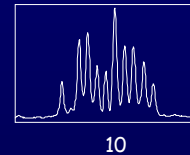
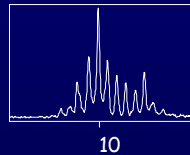
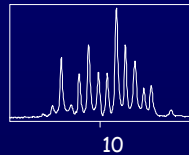
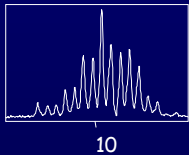
Pic proéminent:
indicatif d'une *population oligoclonale* ou *clonale*
→ *expansion clonale*

Réponse IgG oligoclonale chez les souris B6. $\kappa^{-}\lambda^{SEG}$

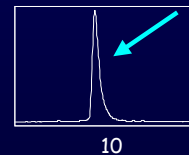
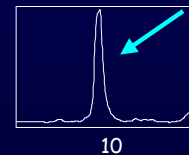
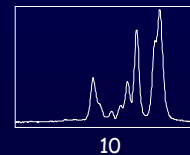
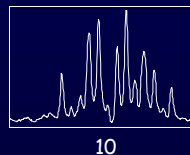
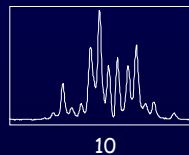
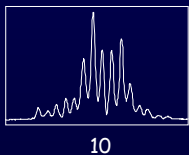
VH J558

VH 36-60

Témoins



Immunisés



B6

B6. $\kappa^{-}\lambda^{SEG}$ Igh^a

B6. $\kappa^{-}\lambda^{SEG}$

B6

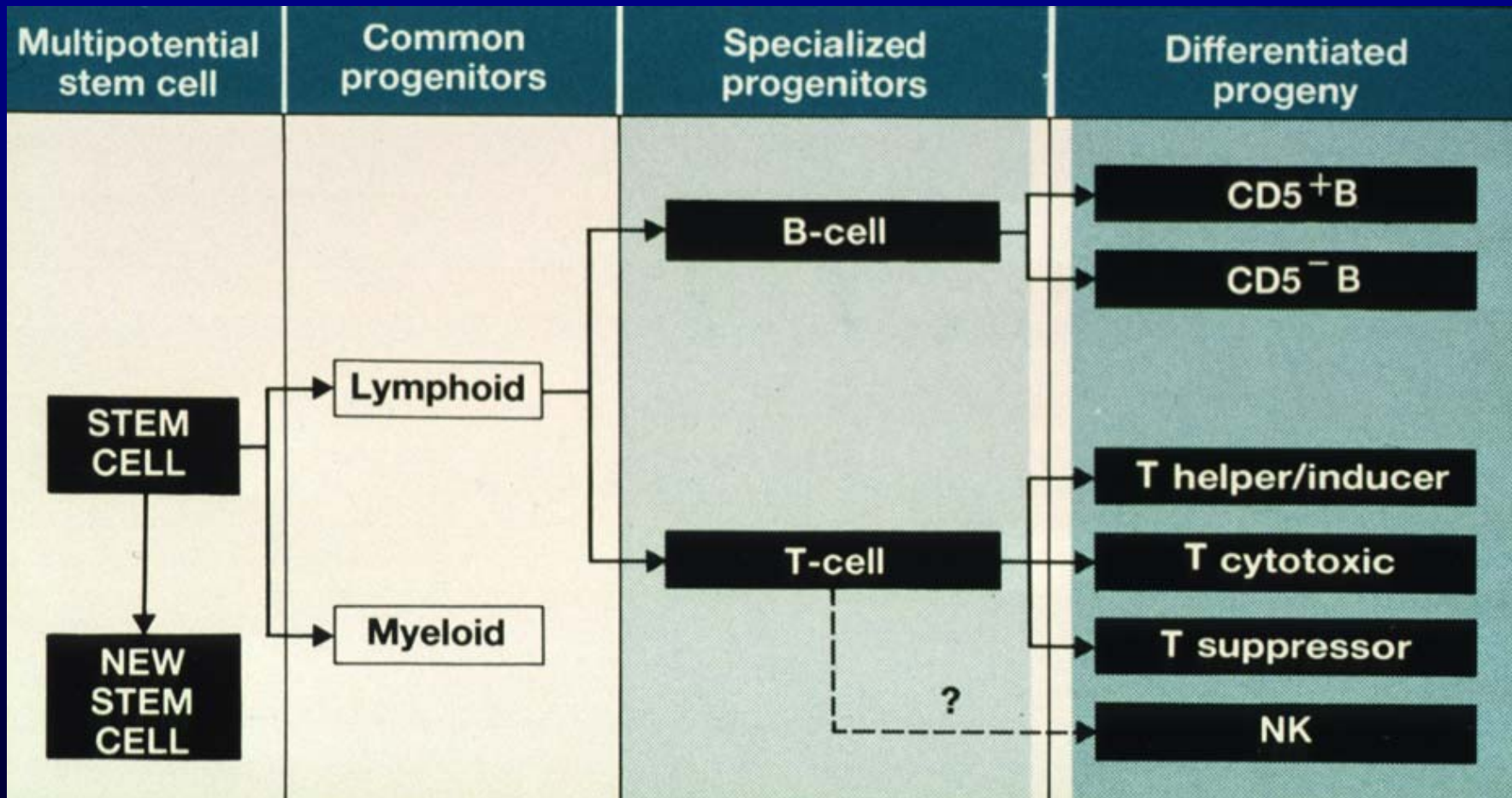
B6. $\kappa^{-}\lambda^{SEG}$ Igh^a

B6. $\kappa^{-}\lambda^{SEG}$

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes B

1. Généralités
2. Anticorps et complexe BCR
3. Recombinaison V(D)J
4. Différenciation des lymphocytes B
5. Sélection des répertoires

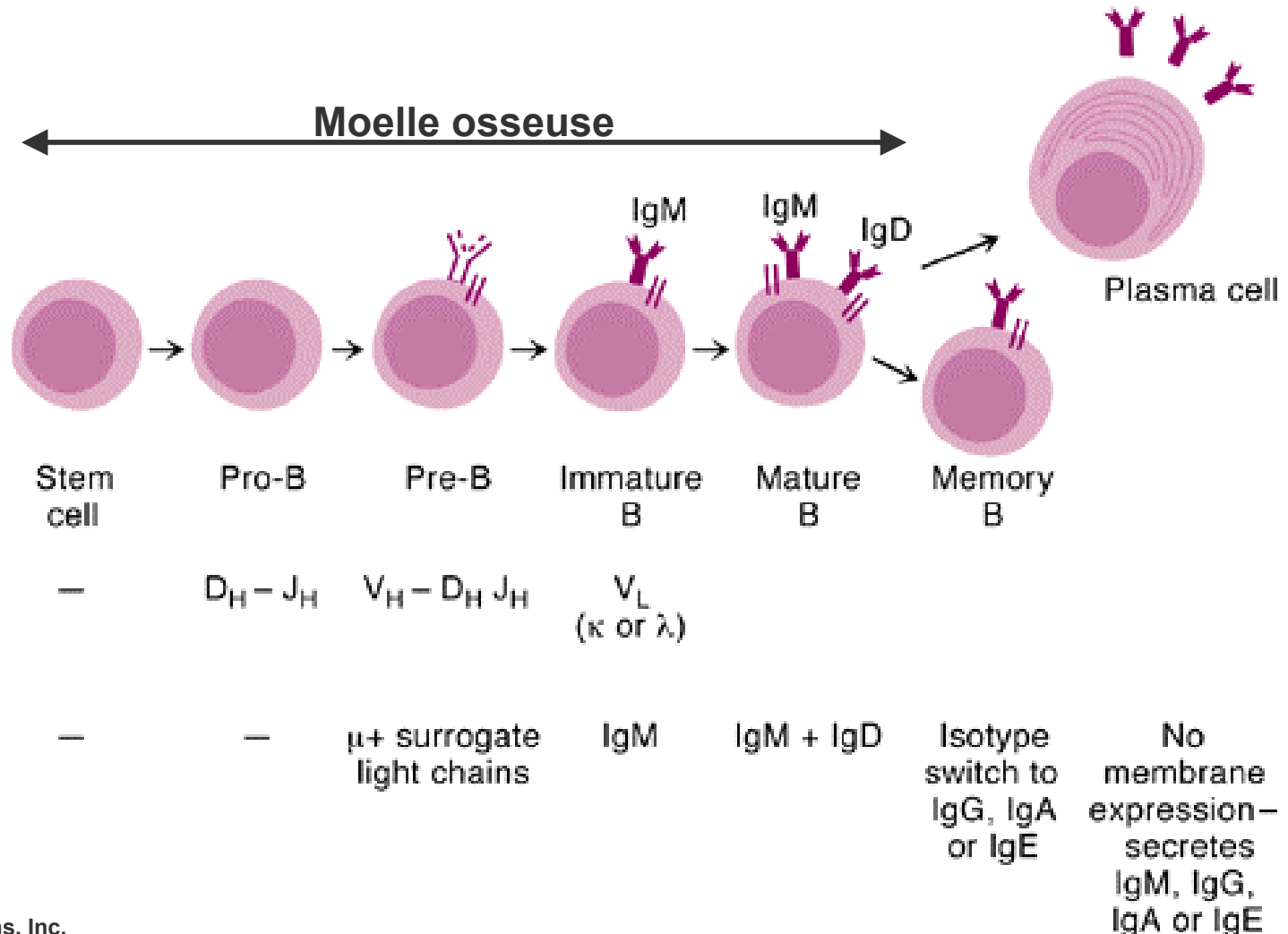
La lignée lymphocytaire



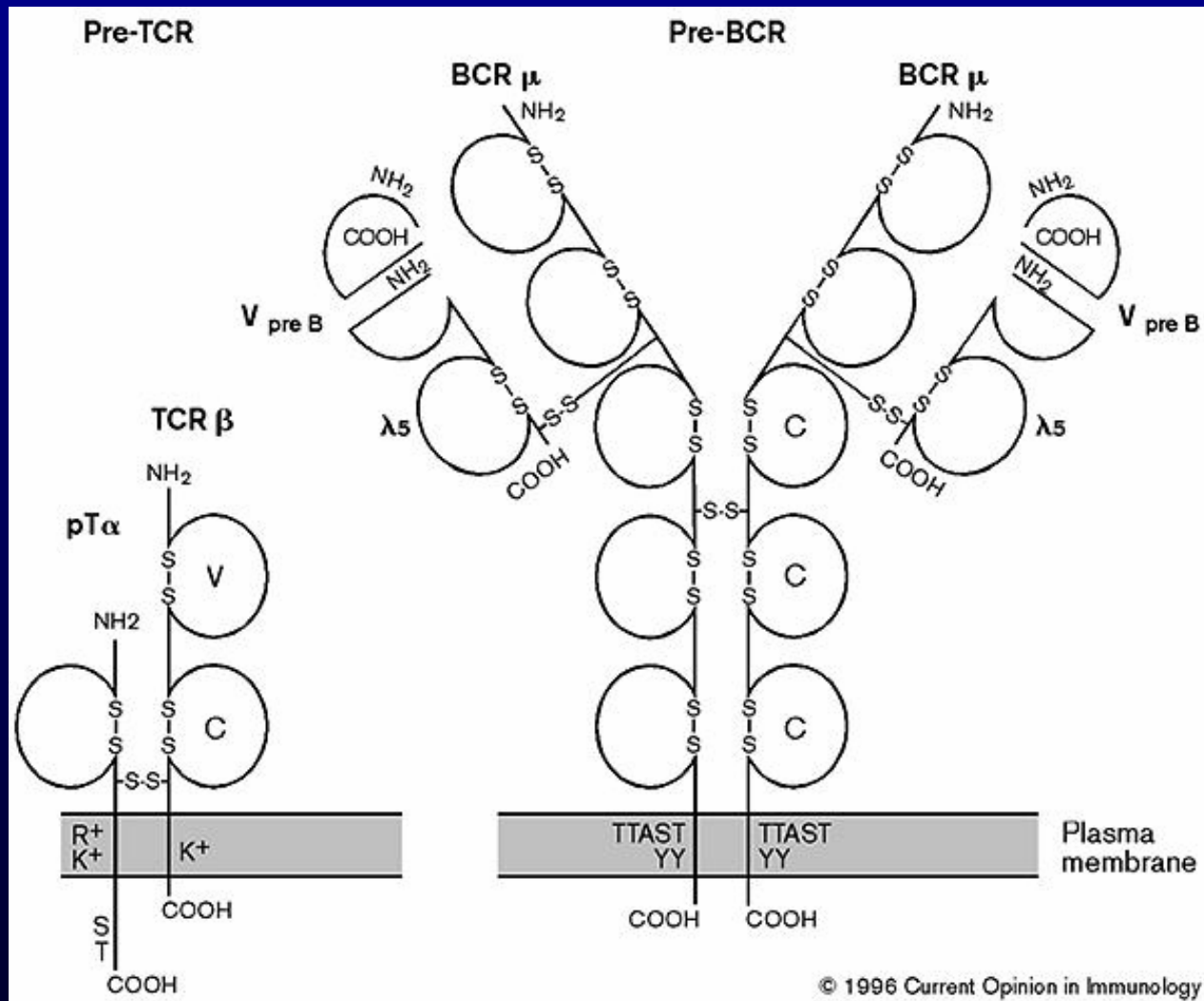
Questions

- 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

Différenciation des lymphocytes B



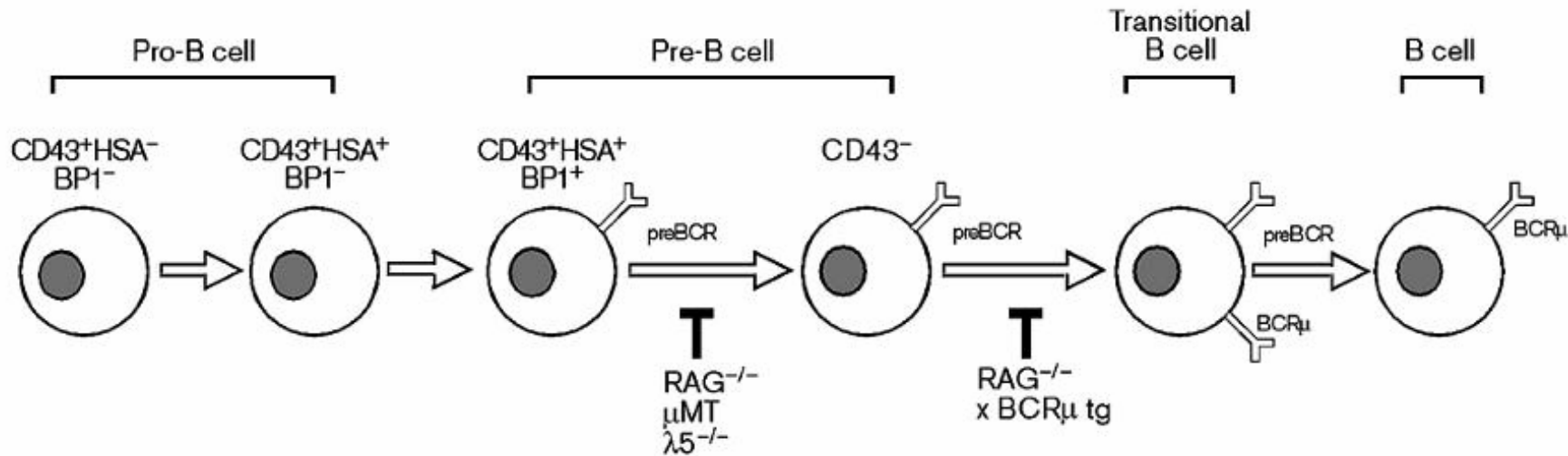
Caractérisation du pré-BCR



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

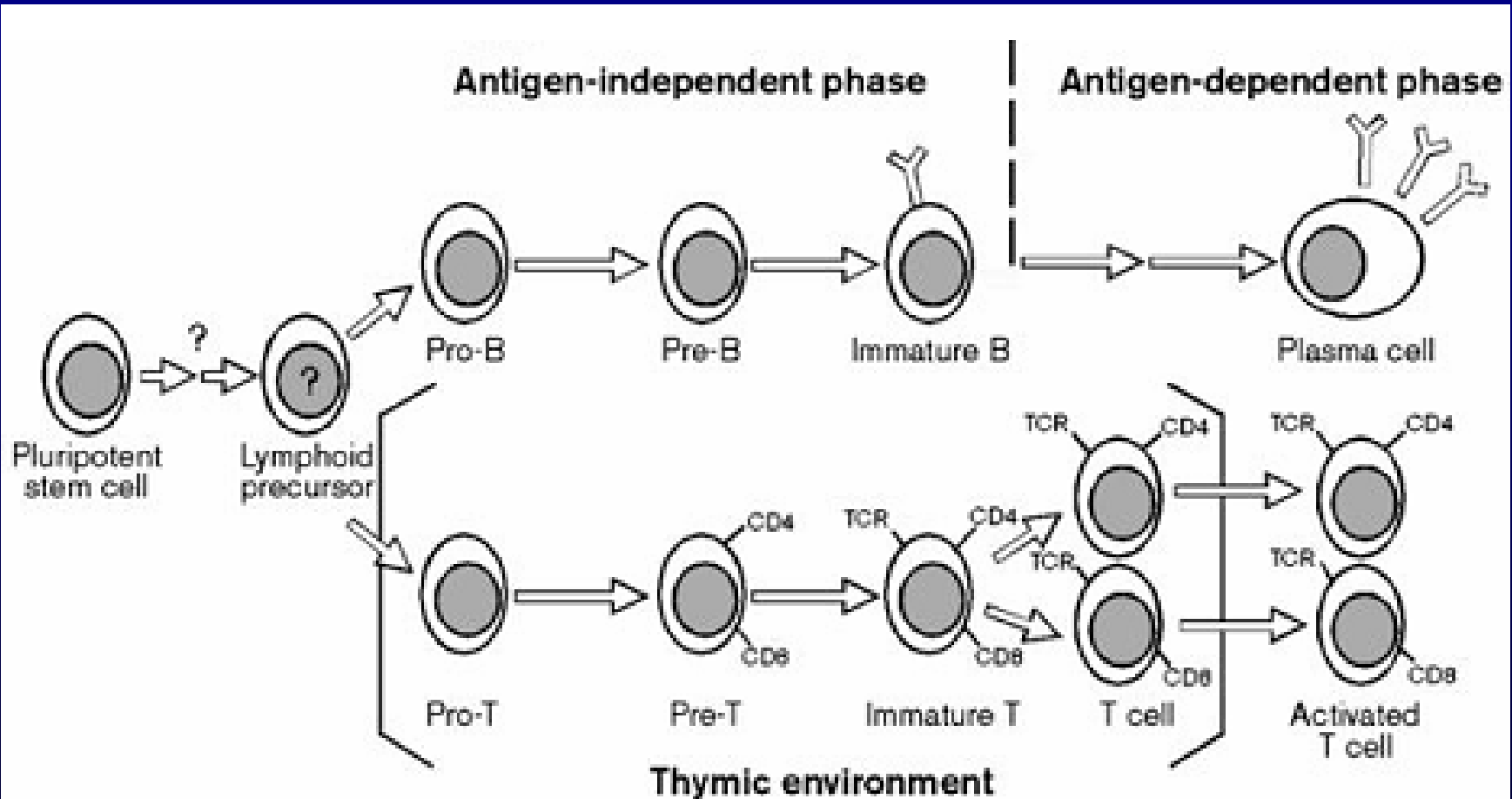
Différenciation des lymphocytes B



BCR _μ	-	D-J	V-D-J	V-D-J	V-D-J	V-D-J
BCR	-	-	-N-J	-N-J	V-J	V-J
light chain	-	-/+	+	+	±	-
ψL	-	-/+	+	+	±	-

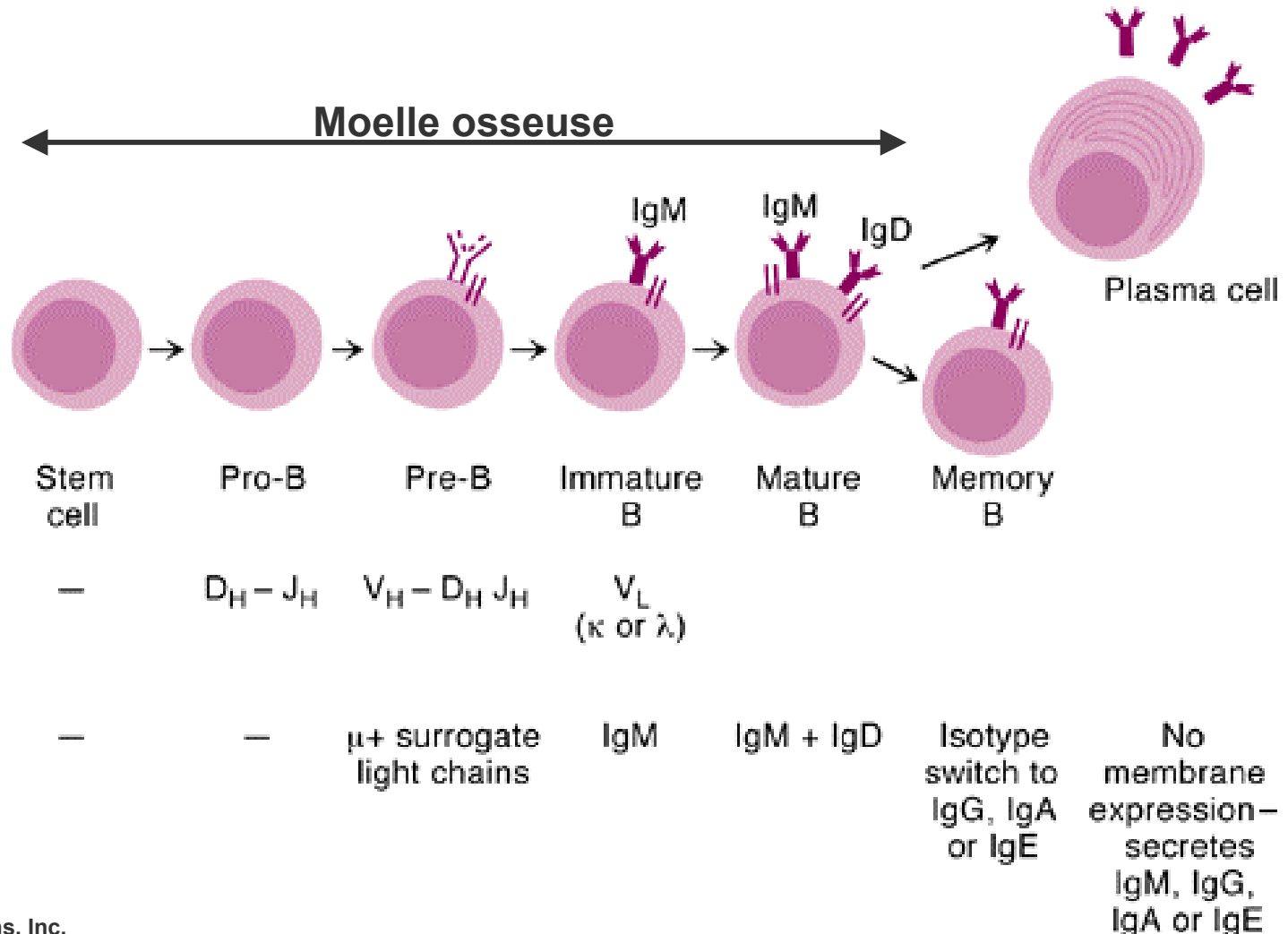
© 1996 Current Opinion in Immunology

Parallèle différenciations B et T



© 1998 Current Opinion in Immunology

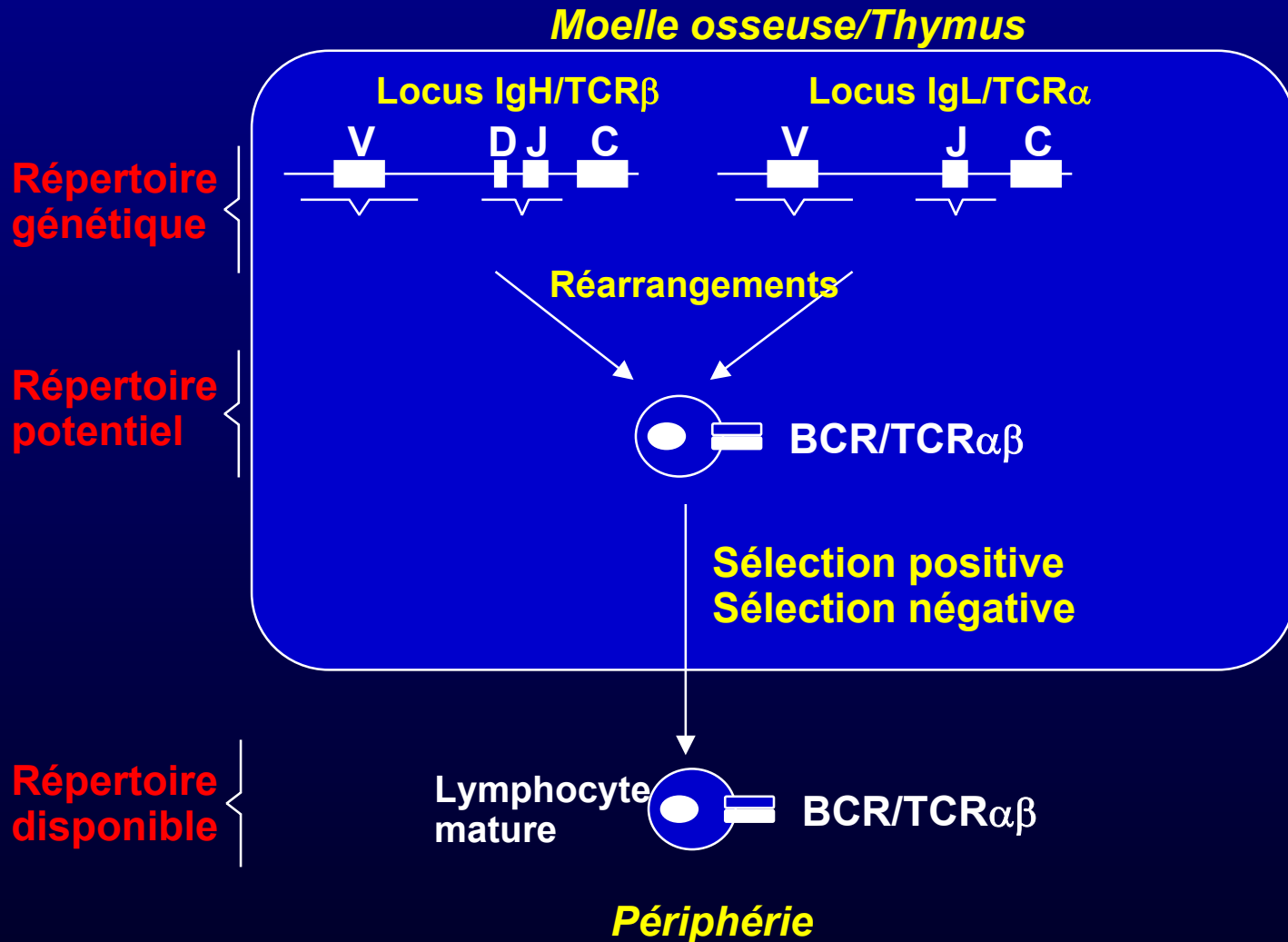
Différenciation des lymphocytes B



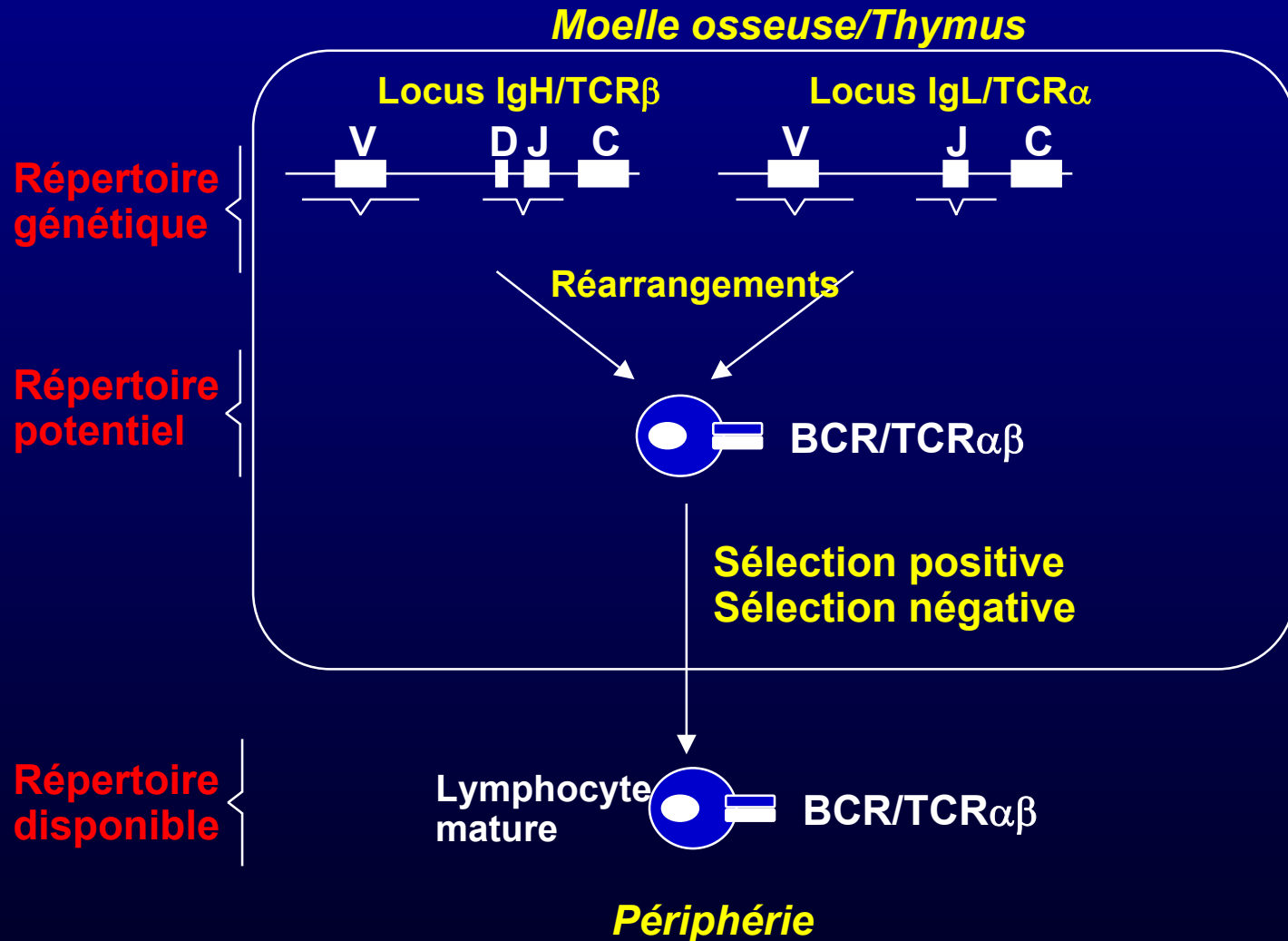
Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes B

1. Généralités
2. Anticorps et complexe BCR
3. Recombinaison V(D)J
4. Différenciation des lymphocytes B
5. Sélection des répertoires

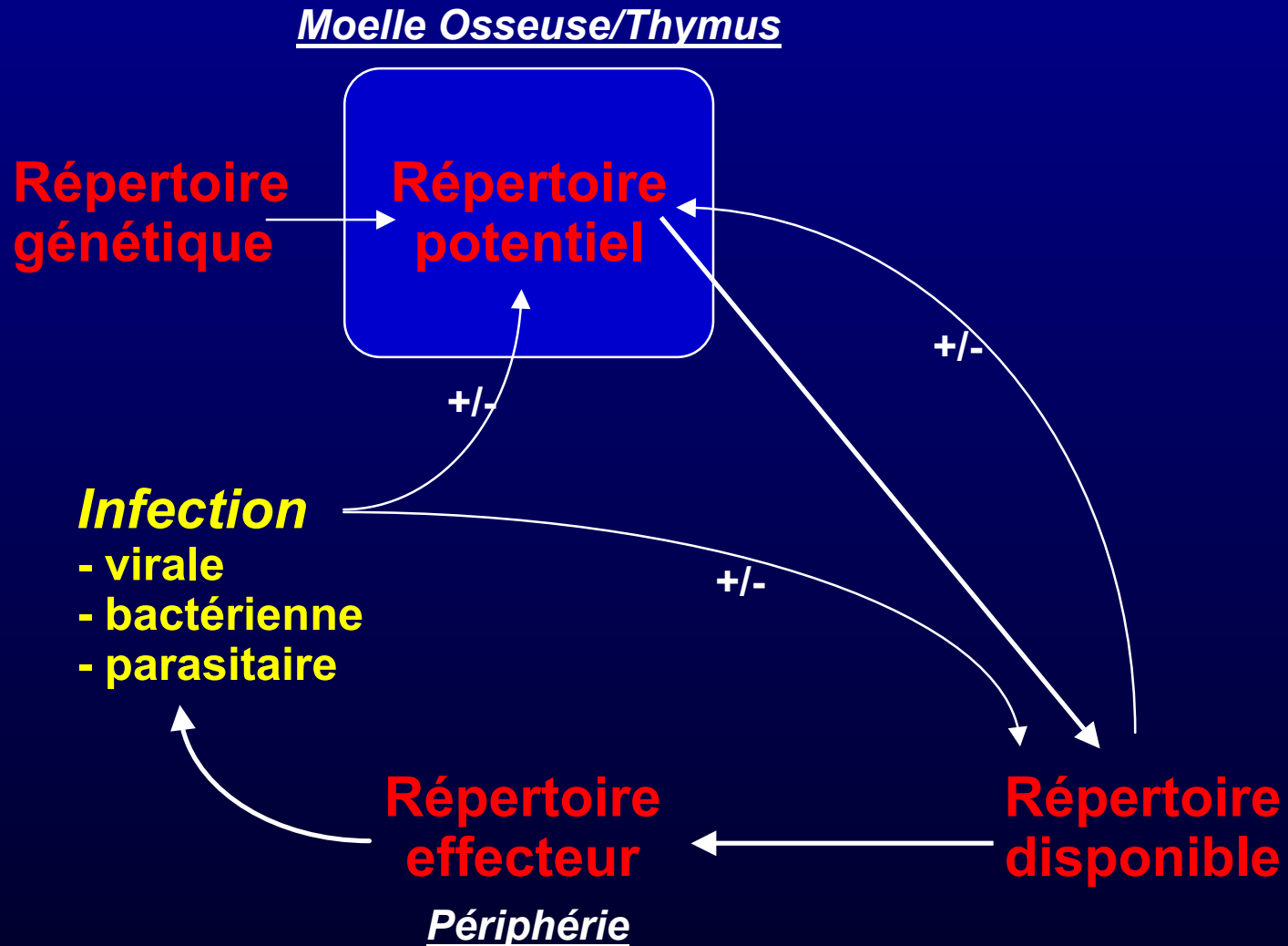
Notions de répertoires (1)



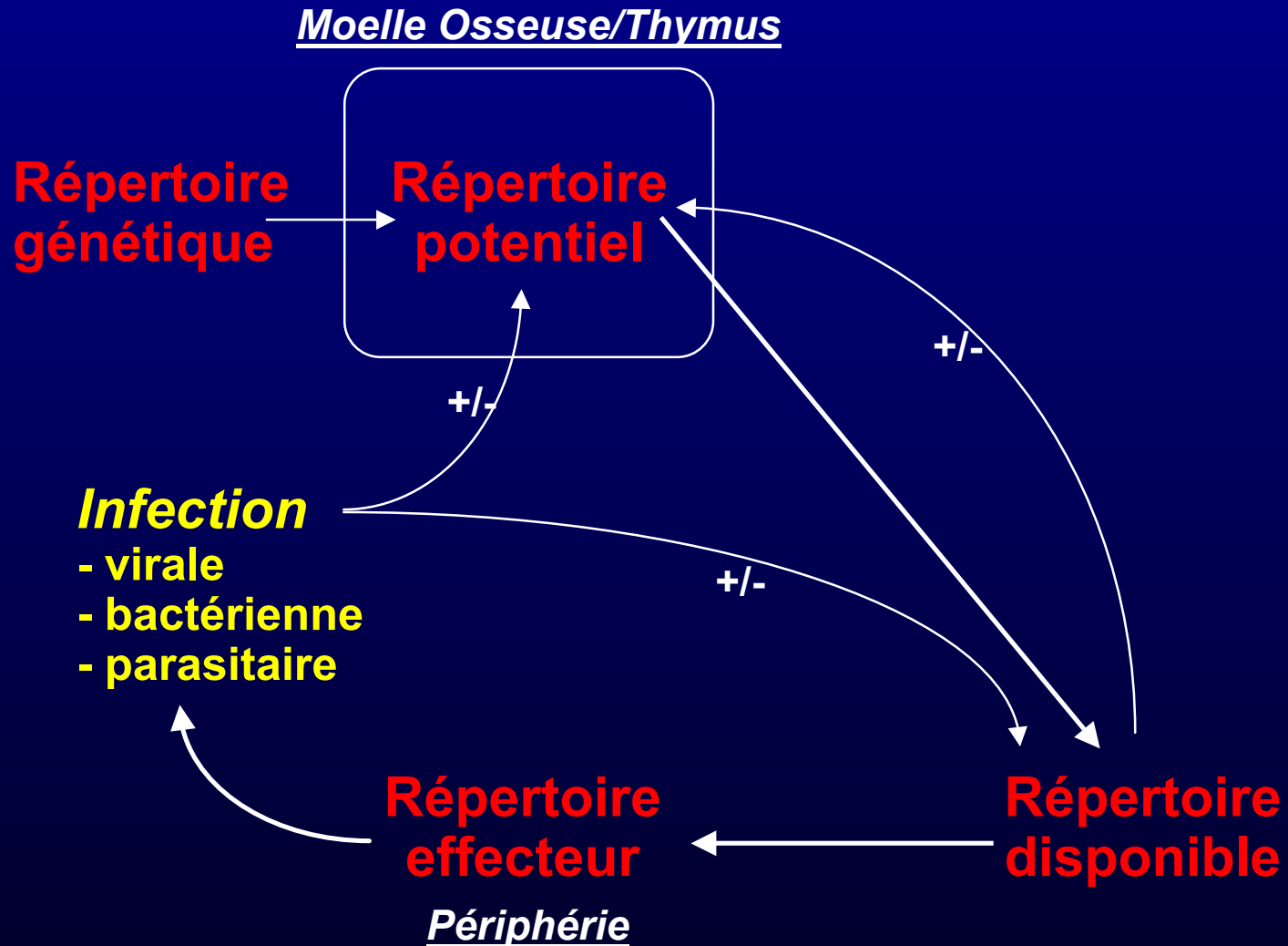
Notions de répertoires (1)



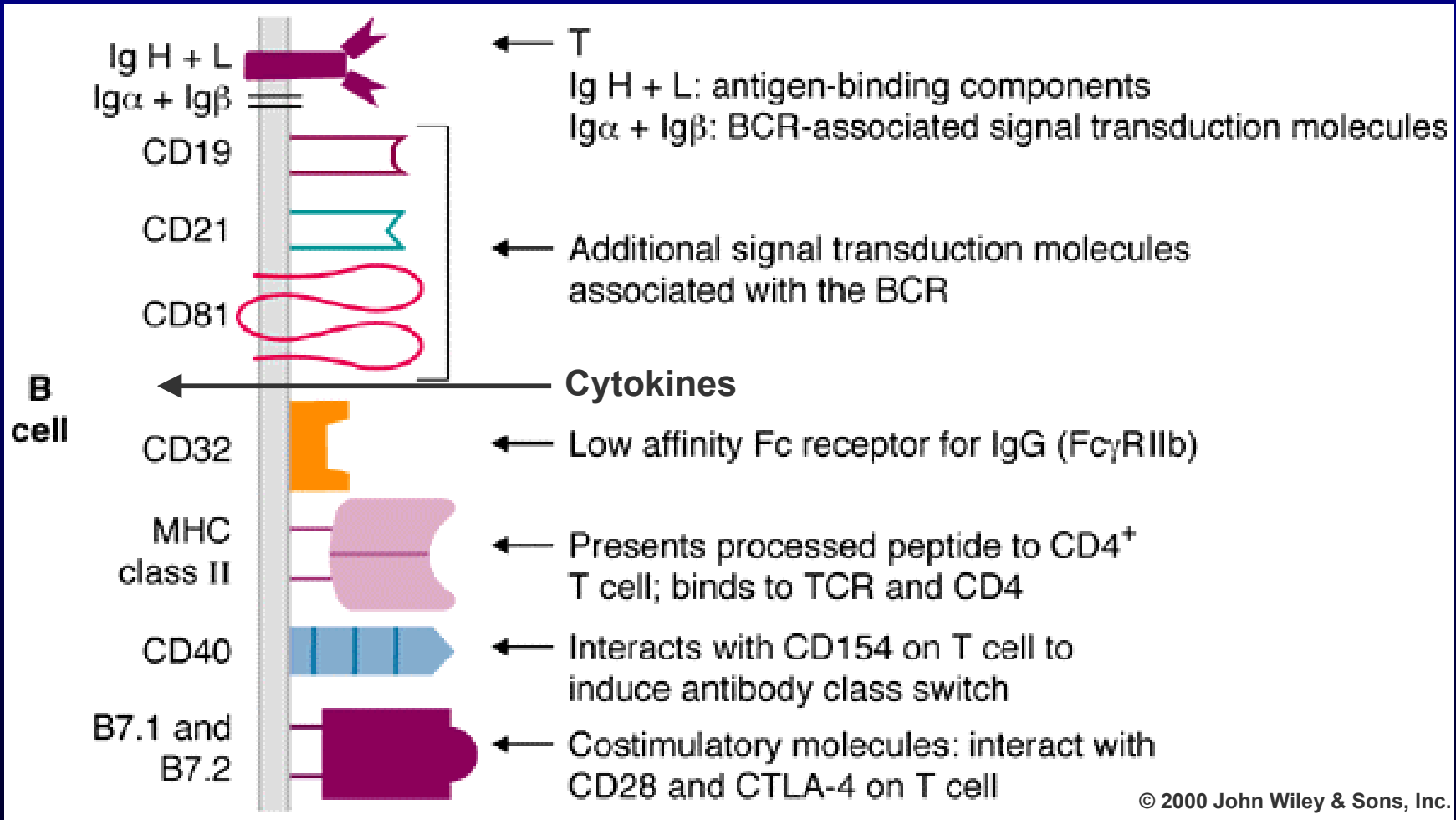
Notions de répertoires (2)



Notions de répertoires (2)

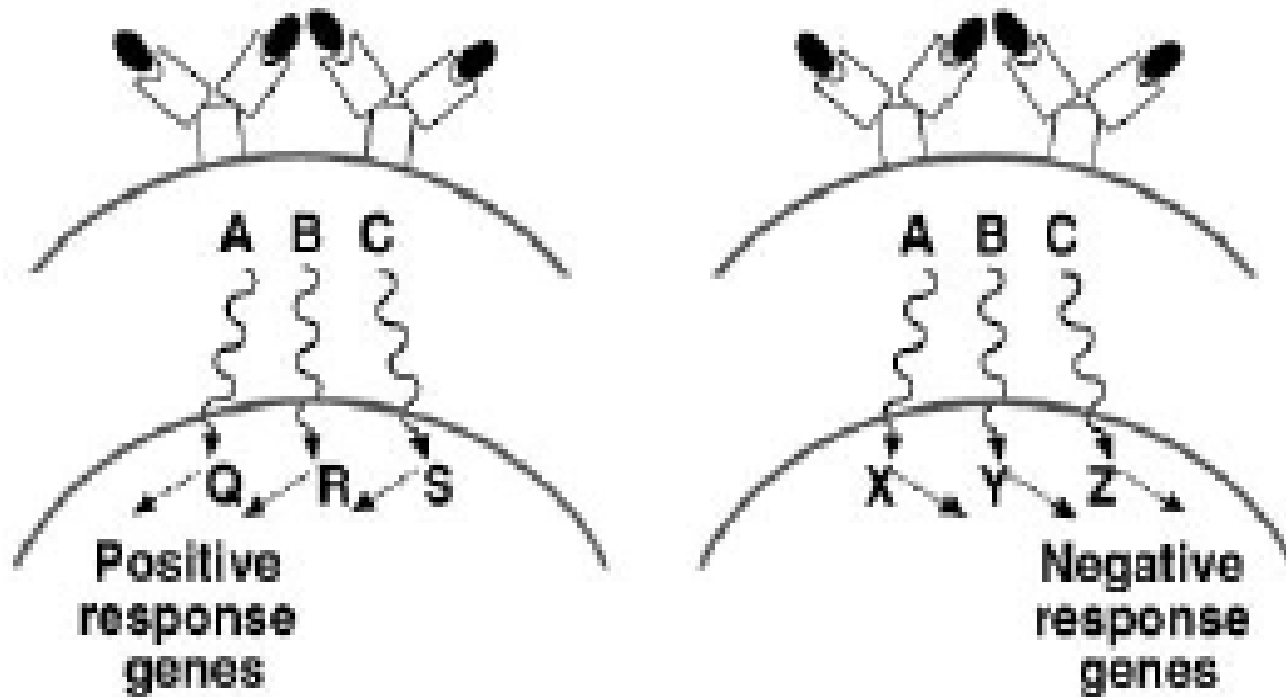


Activation du lymphocyte B



Quantité versus qualité

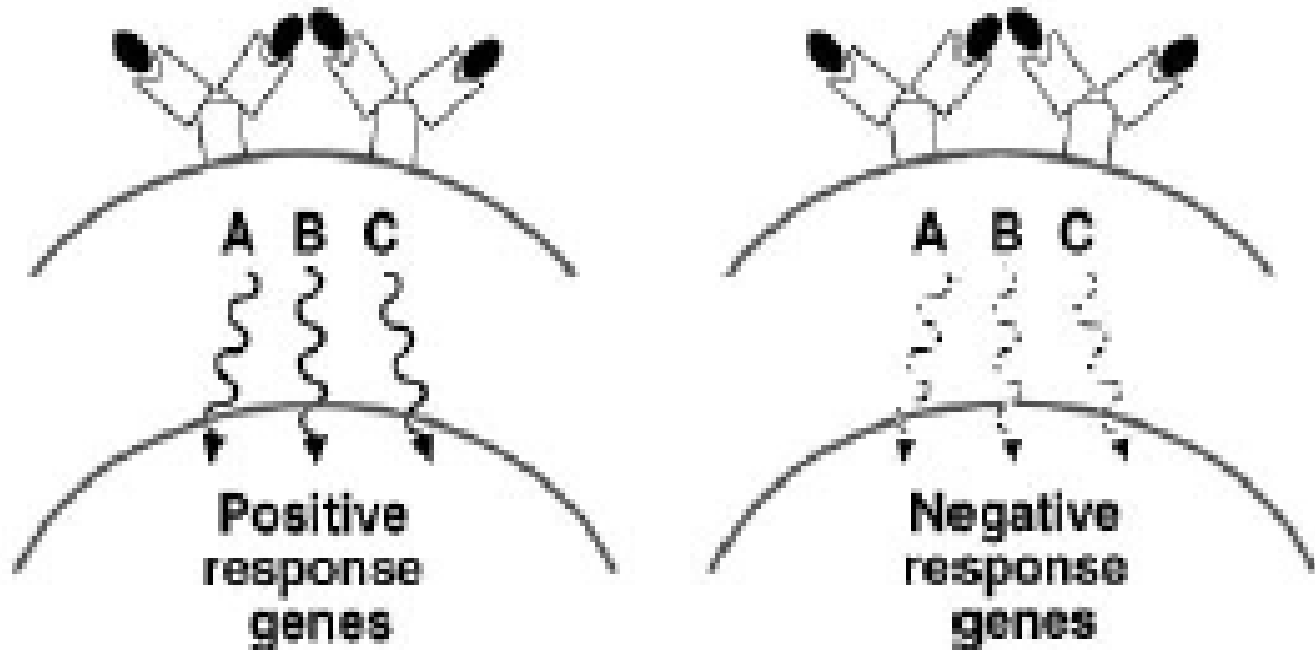
A. Difference in nuclear quality:



Affinité, cytokines, molécules d'adhésion et costimulation

Quantité versus qualité

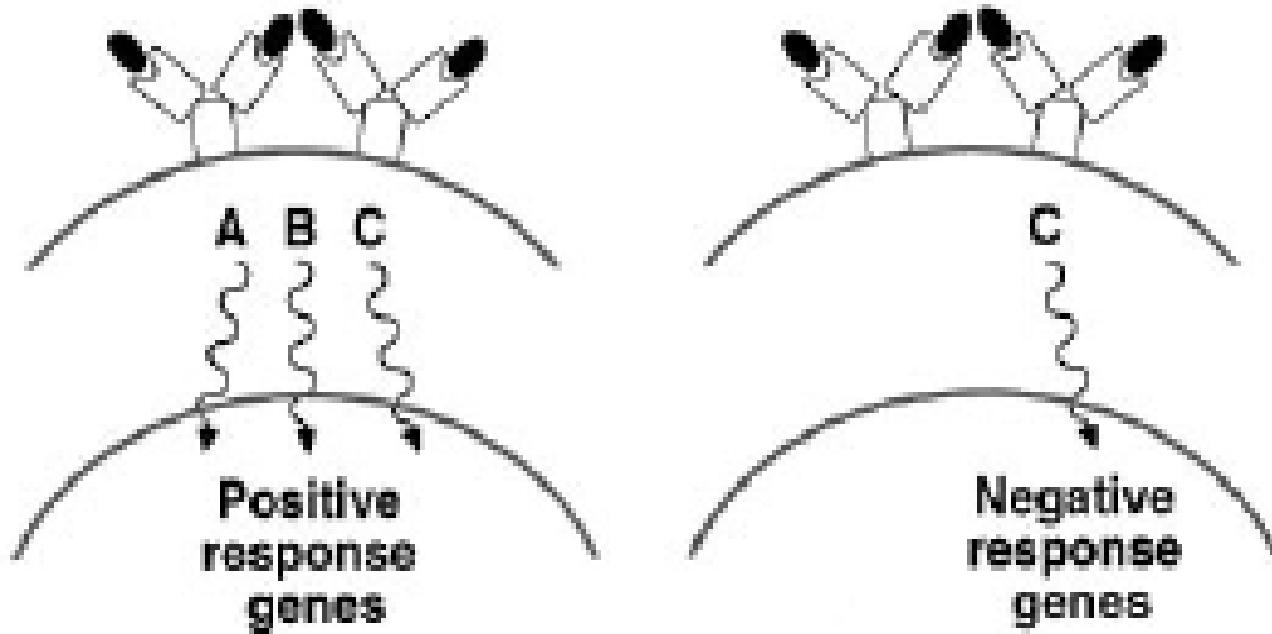
B. Difference in signal quantity:



Affinité, cytokines, molécules d'adhésion et costimulation

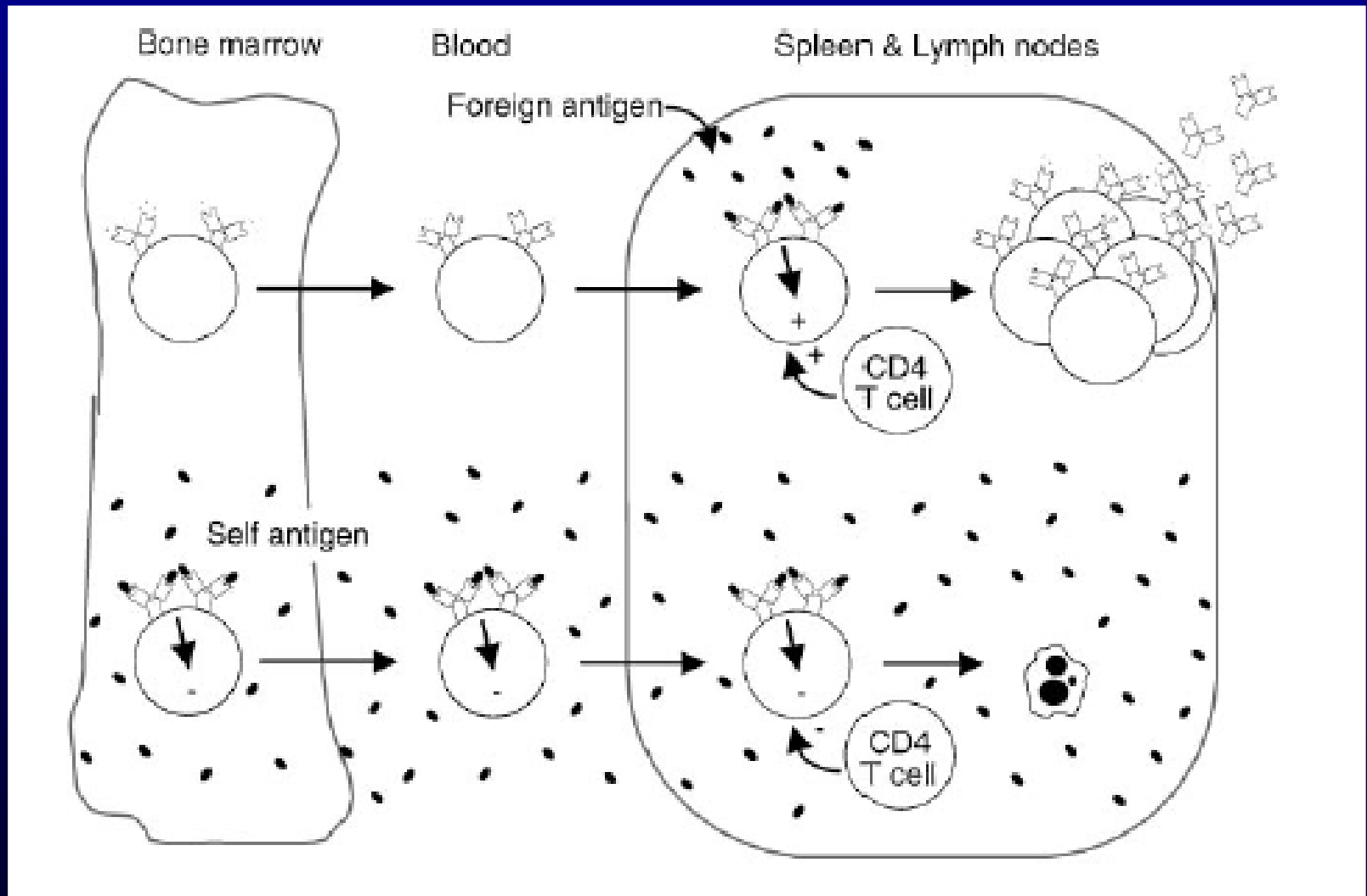
Quantité versus qualité

C. Difference in signal quality:



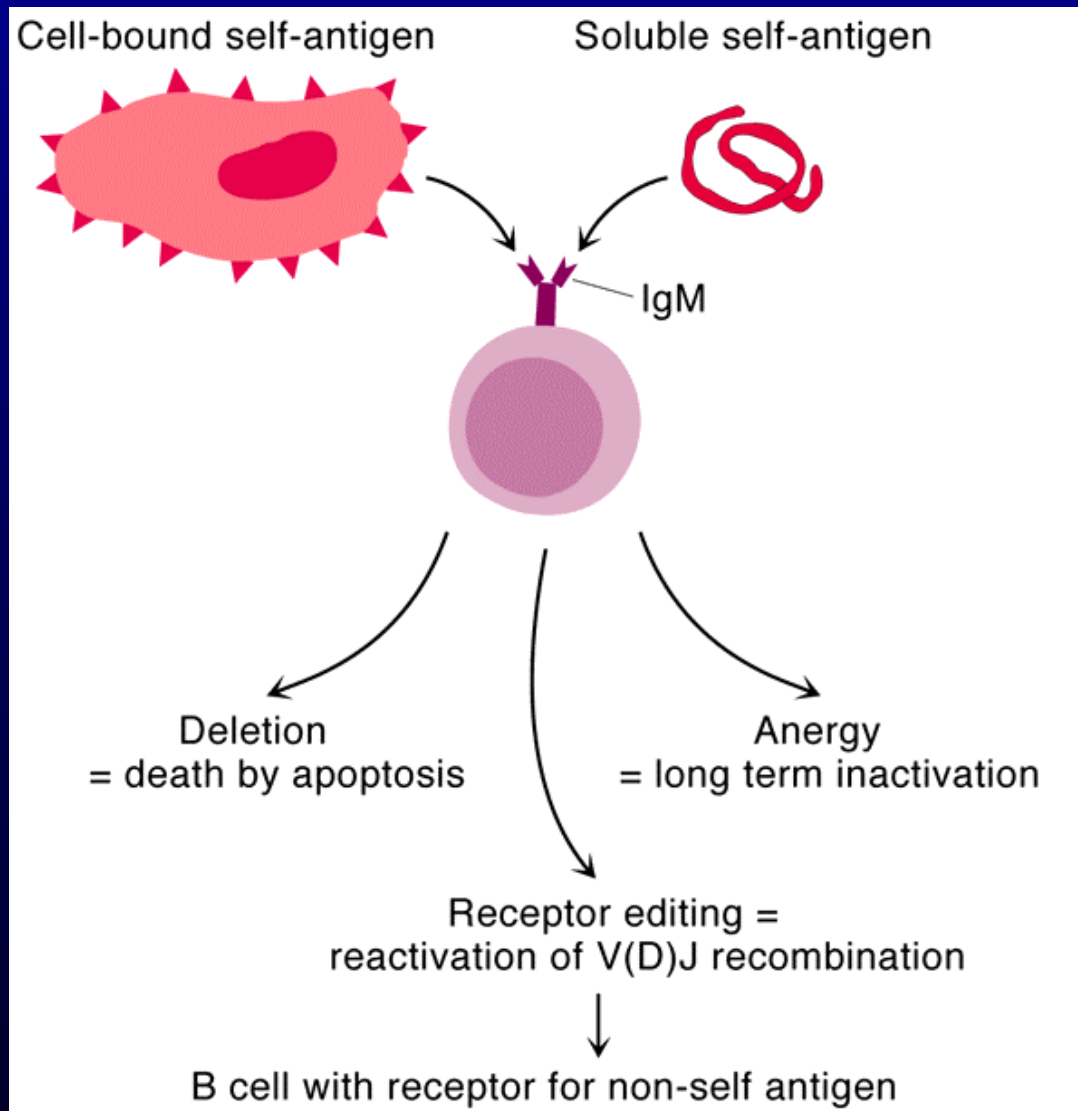
Affinité, cytokines, molécules d'adhésion et costimulation

Immunité versus tolérance

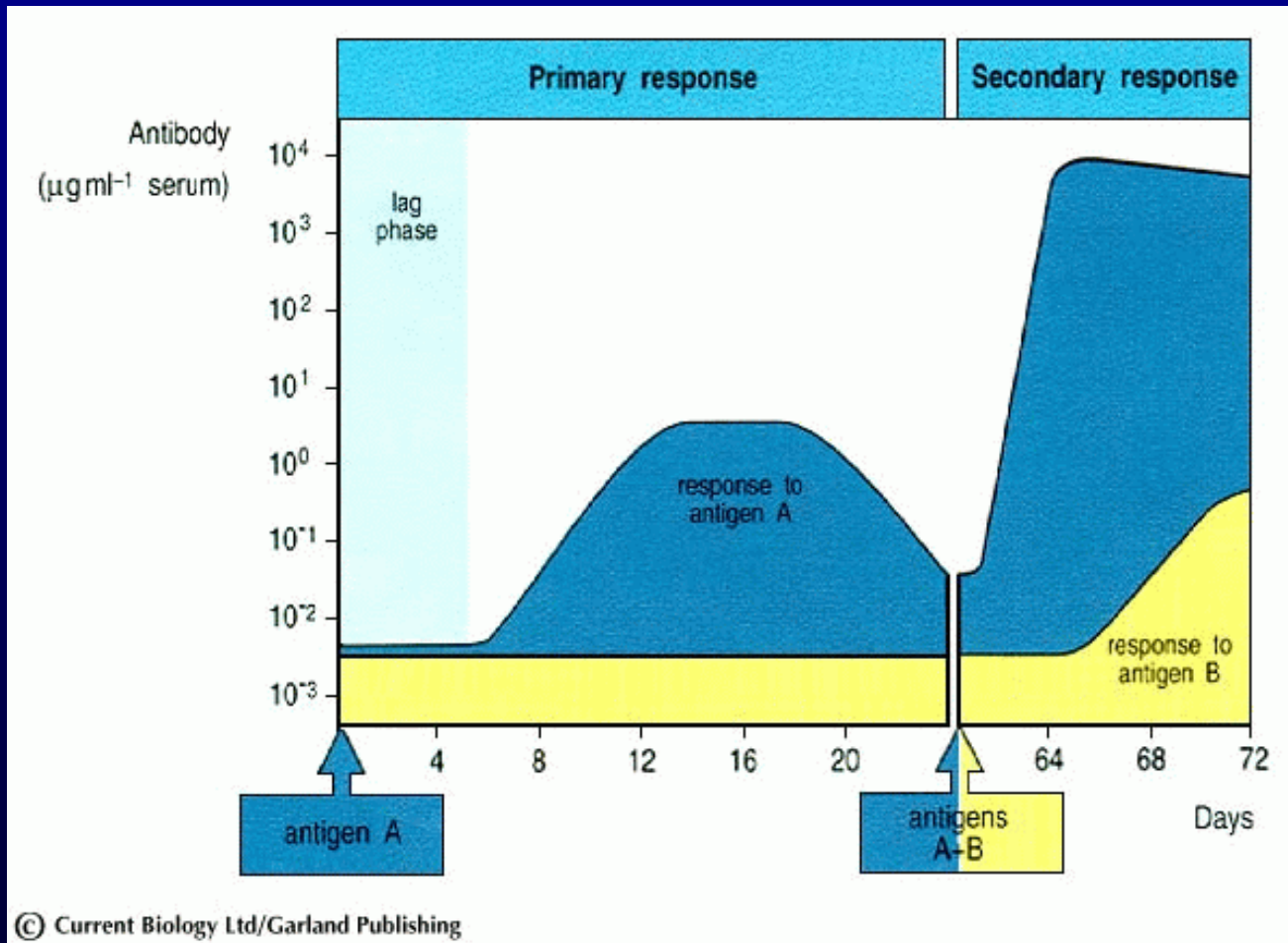


D'après Healy et Goodnow (1998) Annu. Rev. Immunol. 16: 645-670.

Sélection des lymphocytes B

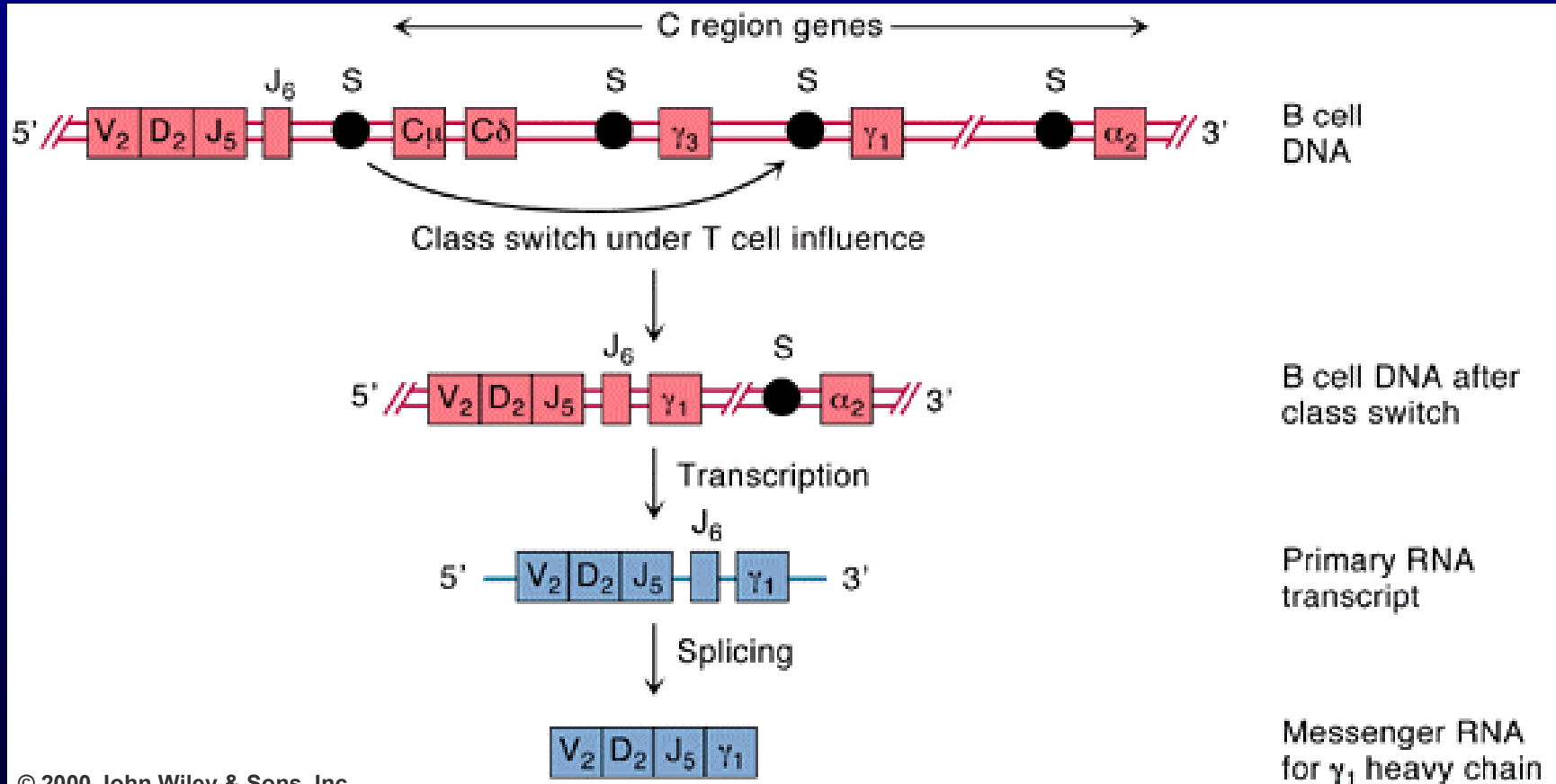


Mémoire immunologique

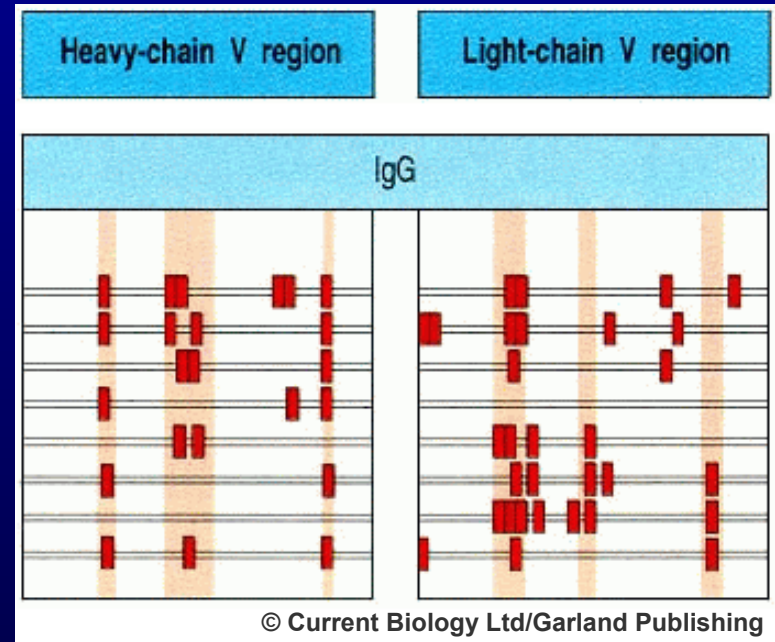
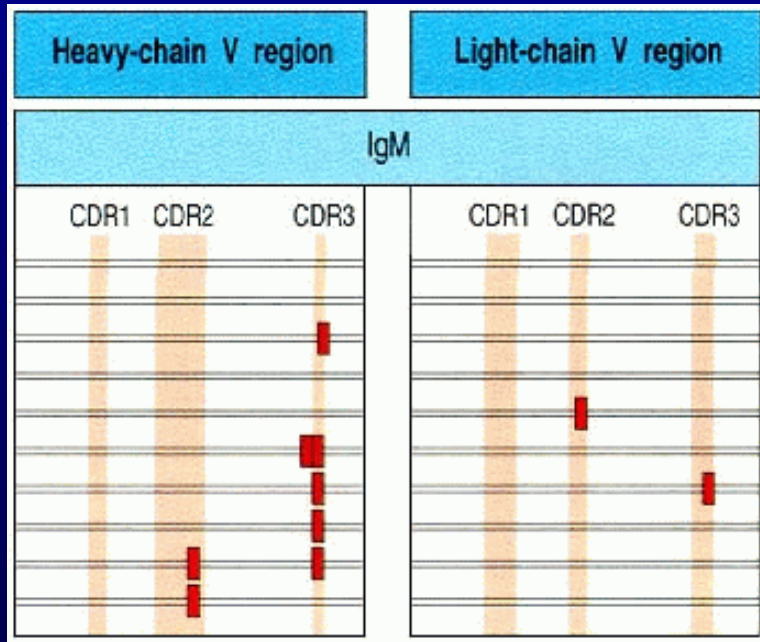


➤ *Principe de la vaccination*

La commutation isotypique



La maturation d'affinité



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

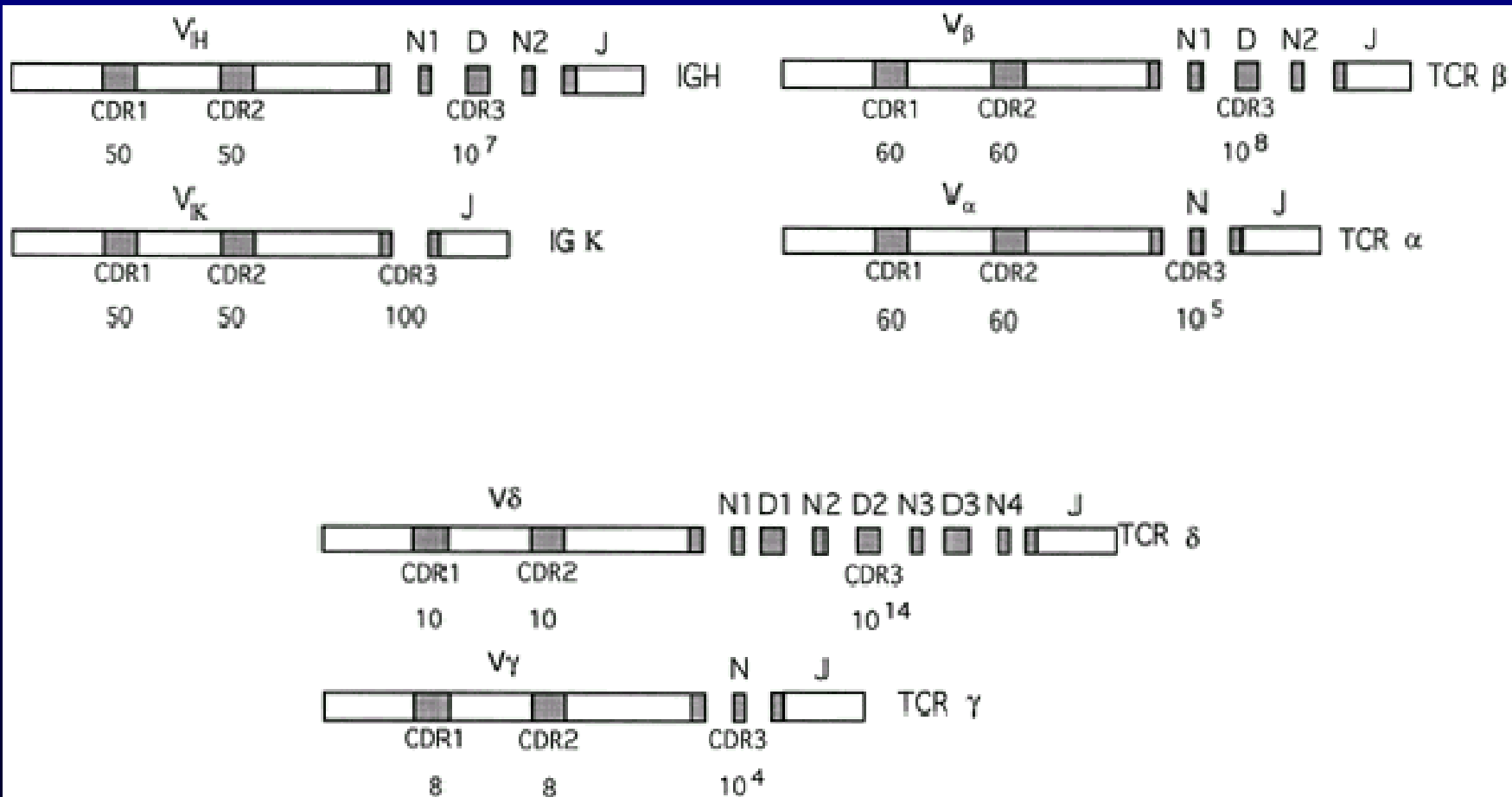


« Réponse secondaire »
7 jours après la 2^{ème}
immunisation au jour 14

→ *Hypermutation somatique dans les centres germinatifs*

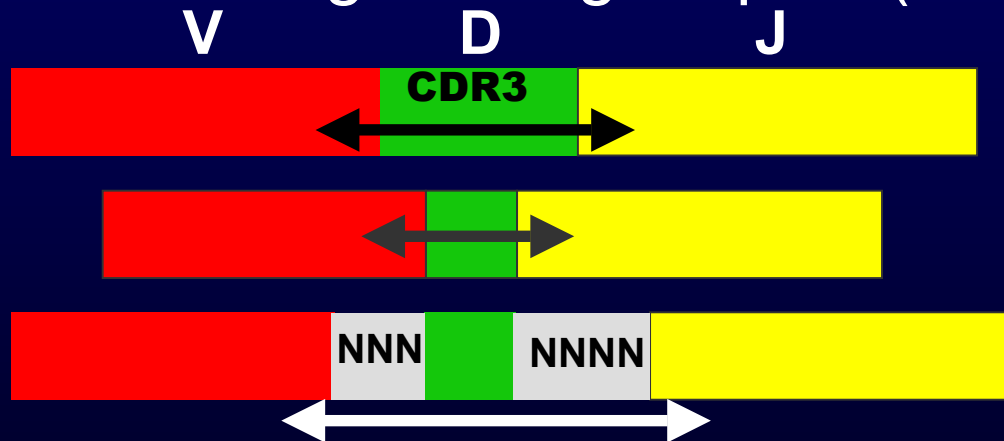
Conclusion

Diversité jonctionnelle CDR3: une stratégie générale



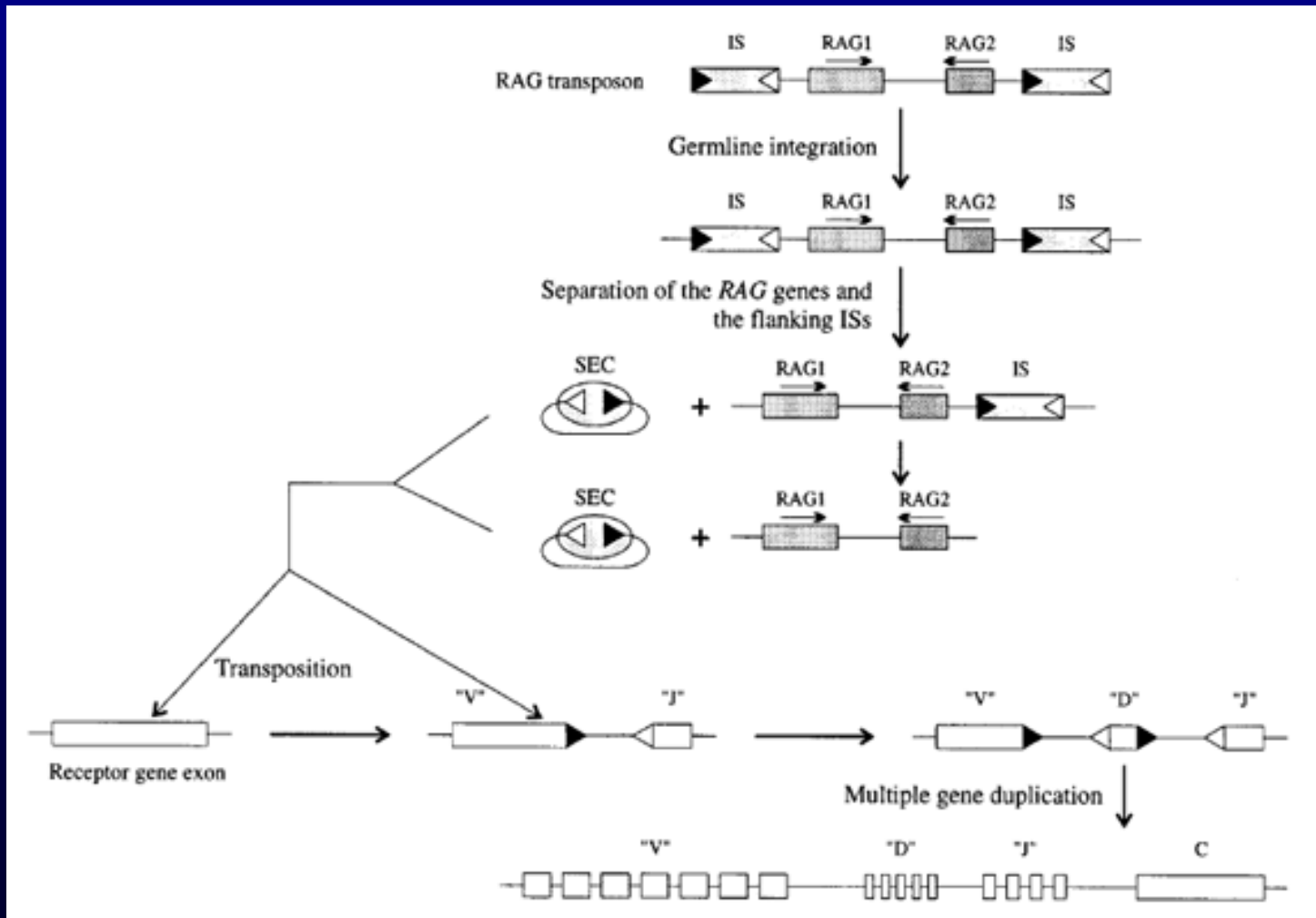
Diversité des chaînes Ig et TCR

- 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)

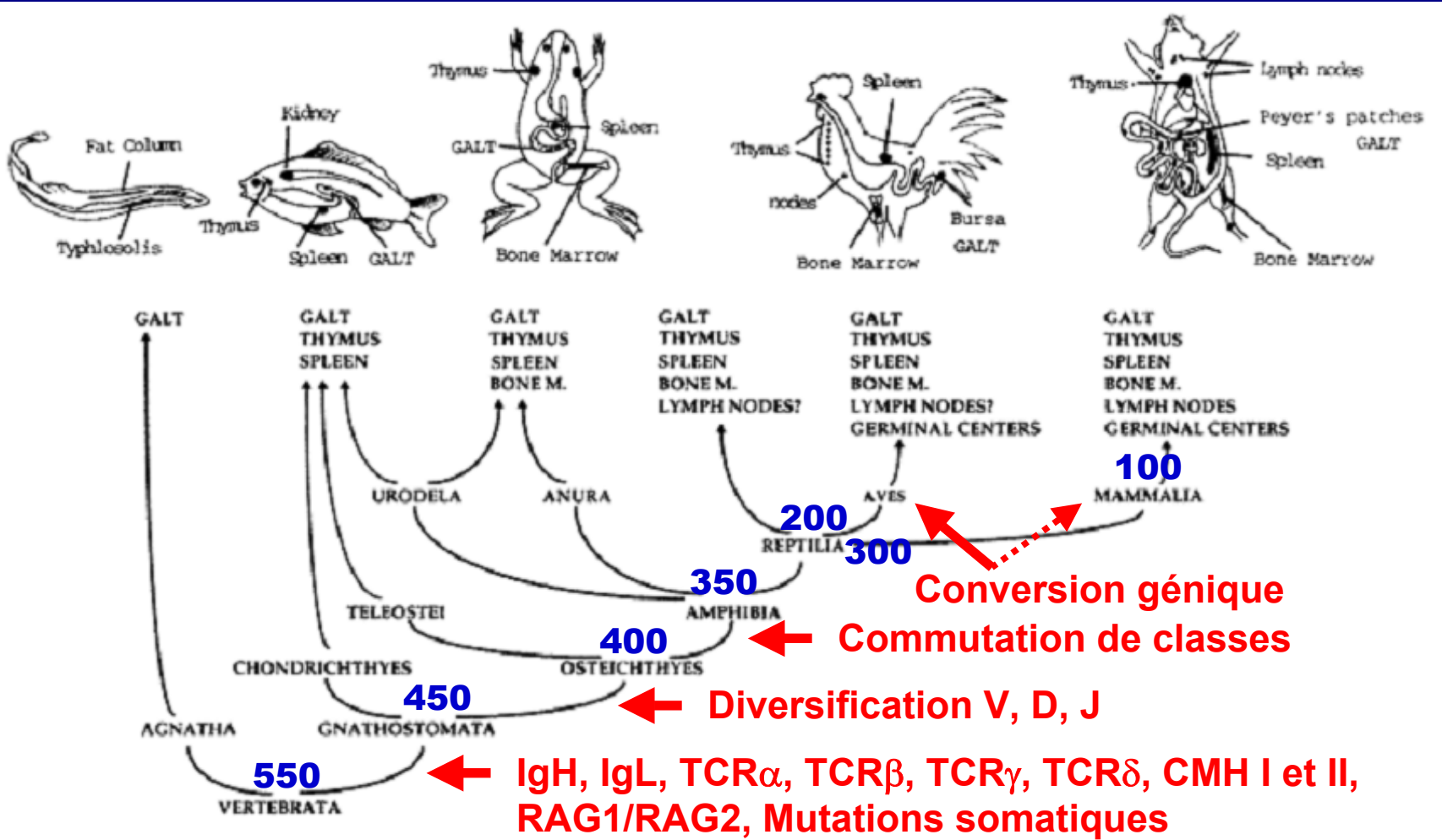


CDR3 → Contact avec l'antigène

Origine de la recombinaison V(D)J



Éléments d'immunologie comparée



Questions/Discussion...

- Notions de répertoires
- Expansion clonale
- Réponse immunitaire/Tolérance
- Peptide analogue
- Vaccination/Rappel
- Variation antigénique
- Persistance, chronicité

Reconnaissance par le TCR $\alpha\beta$

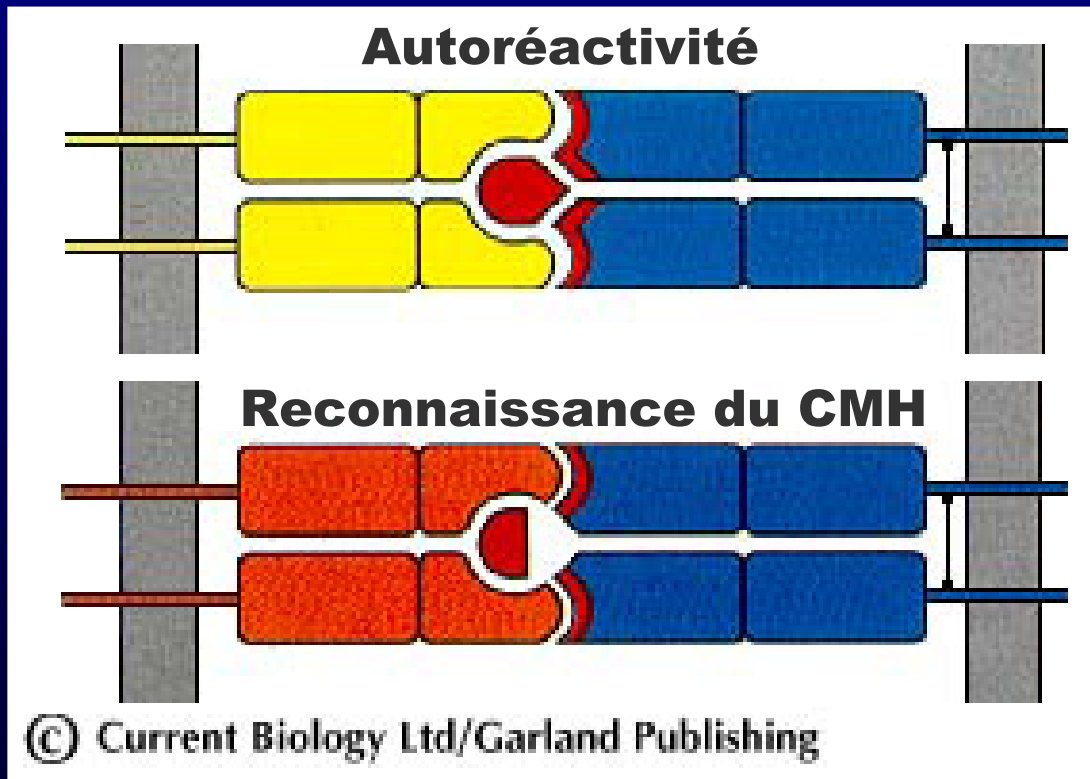
- A l'inverse des anticorps qui reconnaissent les protéines natives, le TCR reconnaît des petits *peptides*
 - produits de dégradation des protéines
 - présentés les molécules du MHC
- Pendant leur différenciation dans le thymus, les lymphocytes T sont “*éduqués*” pour reconnaître les molécules du CMH de l'organisme → *restriction par le CMH*

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)

Thymocytes
immature

