

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes

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

octobre 2008

1

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes

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

2

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes

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

3

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

6

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

7

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

8

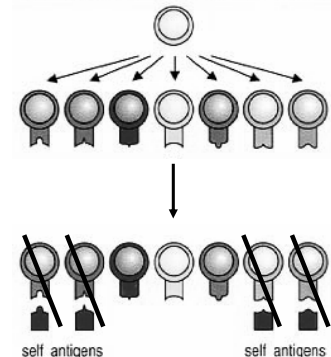
Théories de la diversité des Ac

- Théorie sélective de Erlich 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)

9

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

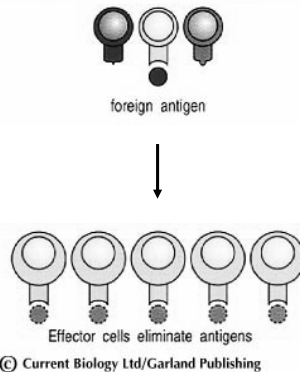
- Chaque lymphocyte exprime un type unique de récepteur spécifique d'antigène
- Les lymphocytes exprimant un récepteur dirigé contre un antigène du soi sont éliminés lors de la différenciation



10

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



11

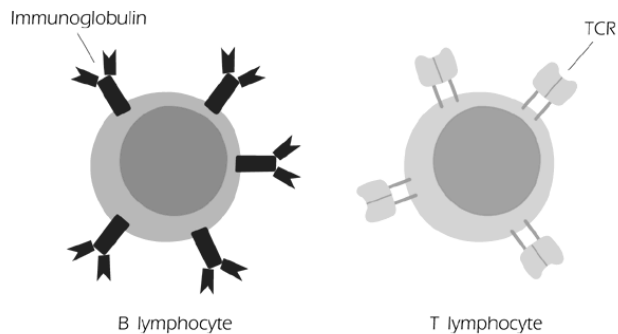
- Les cellules effectrices différenciées à partir d'un lymphocyte activé donné expriment des récepteurs de même spécificité

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes

- Généralités
- Anticorps et complexe BCR
- Recombinaison V(D)J
- Différenciation des lymphocytes B
- Différenciation des lymphocytes T
- Sélection des répertoires

12

Les lymphocytes B et T

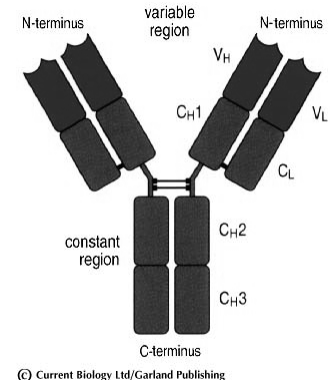


→ caractérisés par leur récepteur spécifique d'antigène

13

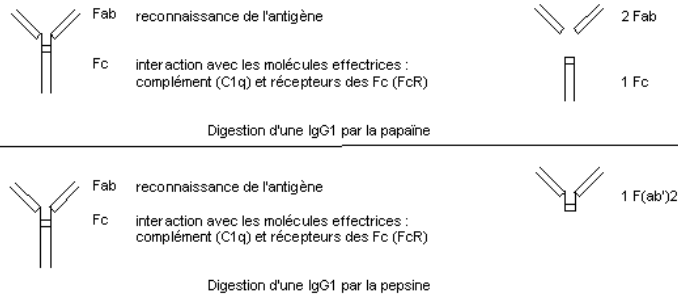
La molécule anticorps

- 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



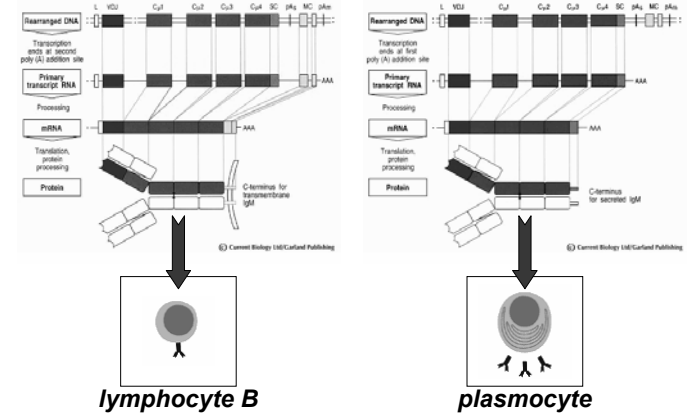
14

Fab/F(ab')₂/Fc



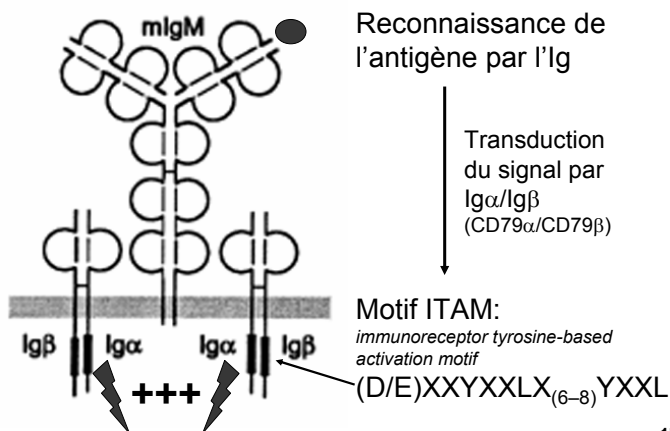
15

Ig membranaire – Ig sécrétée



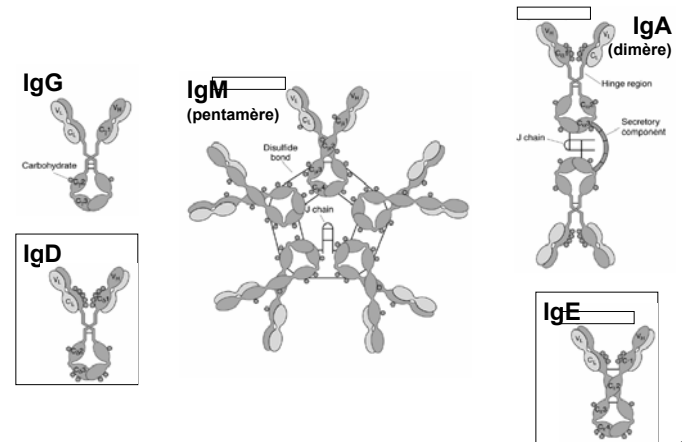
16

Transduction du signal BCR



17

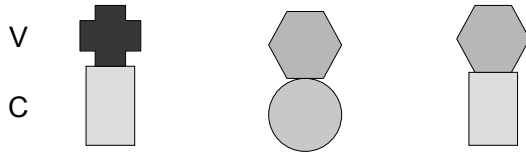
Les classes d'immunoglobulines



18

Fonctions anticorps et effectrice

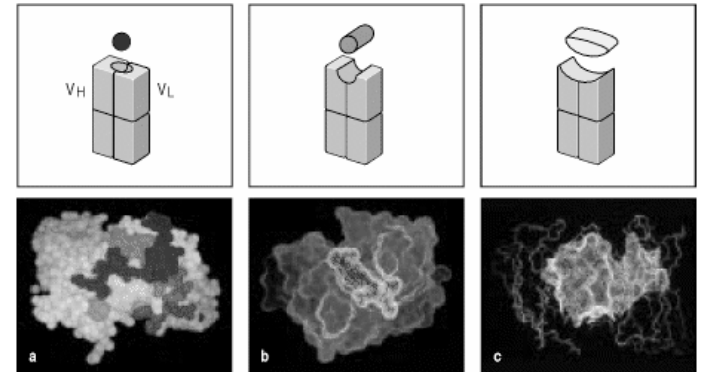
Fonction spécifique = Fonction anticorps



Fonction non spécifique = Fonction effectrice

19

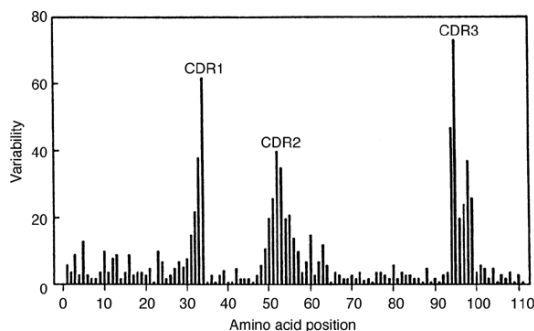
Reconnaissance d'une forme



L'anticorps reconnaît directement l'antigène

20

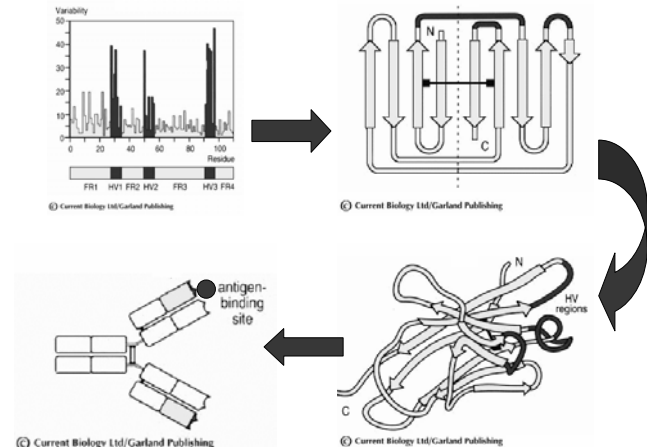
Les régions hypervariables (1)



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...

21

Les régions hypervariables (2)

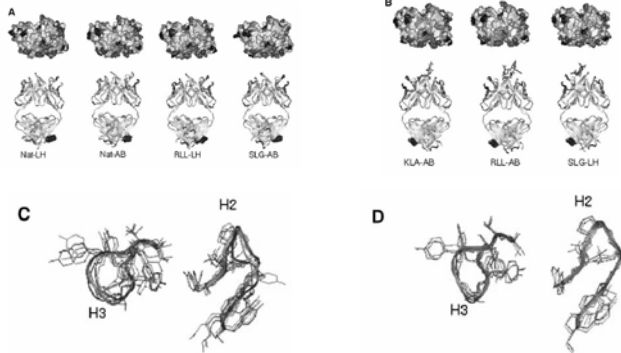


22

Reconnaissances...

4 structures différentes sans Ag

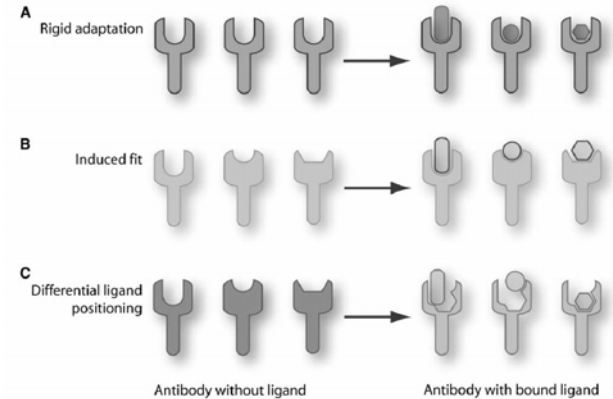
Structures avec 3 Ag différents



Superposition des régions CDRs

Sethi et al. (2006) *Immunity* 24, 429-433

Reconnaissances...



Mariuzza (2006) *Immunity* 24, 359-364

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 ?

25

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes

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

26

Un paradoxe génétique

- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
- ~20 000 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)

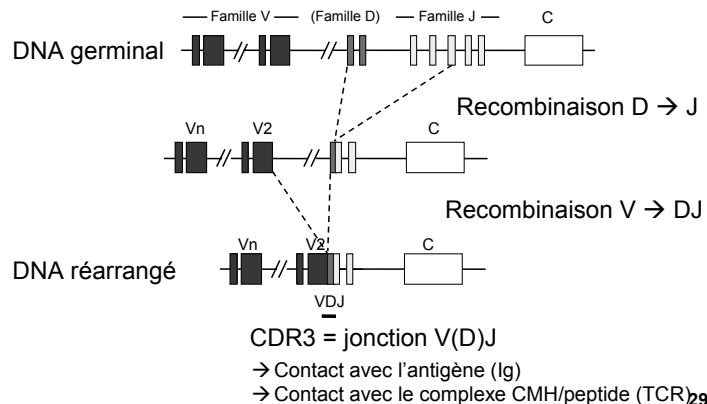
27

« 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.

28

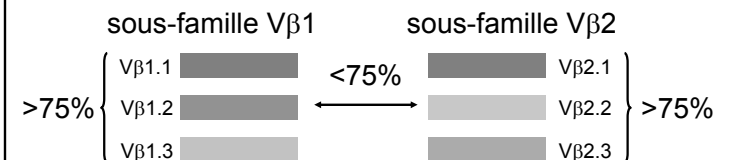
Les régions variables sont créées pendant la recombinaison V(D)J



29

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.



30

Organisation génomique du locus IgH humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

31

Organisation génomique du locus Igκ humain

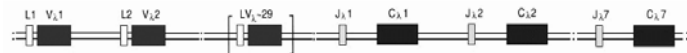


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- Chromosome 2
- Entièrement séquencé (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

32

Organisation génomique du locus Igλ humain

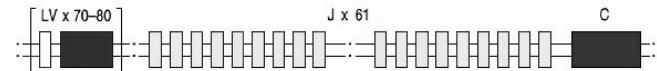


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

33

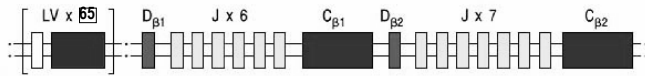
Organisation génomique du locus TCRα humain



- Chromosome 14
- Entièrement séquencé (1.1 Mb)
- 70-80 Vα groupés en 41 sous-familles
- 61 Jα, un seul Cα

34

Organisation génomique du locus TCR β humain

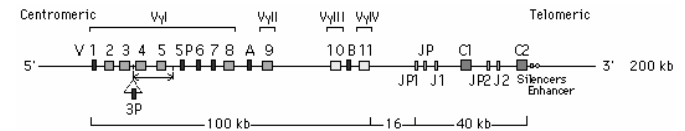


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

35

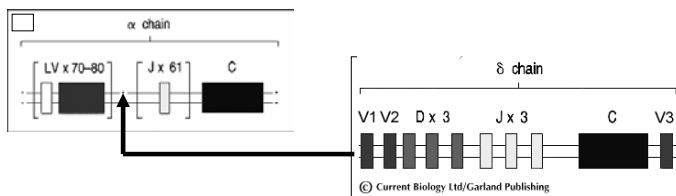
Organisation génomique du locus TCR γ humain



- 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

36

Organisation génomique du locus TCR δ humain



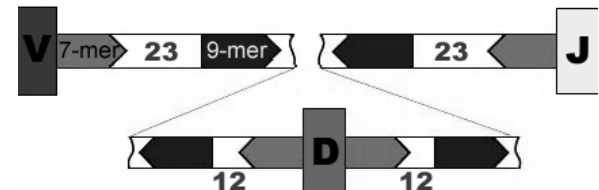
© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

37

La recombinaison V(D)J (1)

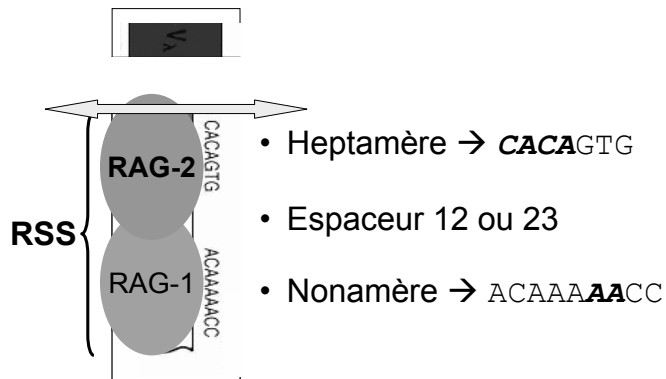
- Expression des protéines RAG-1 et RAG-2
- Accessibilité du locus → Ouverture de la chromatine pour permettre le réarrangement
- Reconnaissance de RSS → Heptamère-espaceur-nonamère suivant la règle 12/23



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

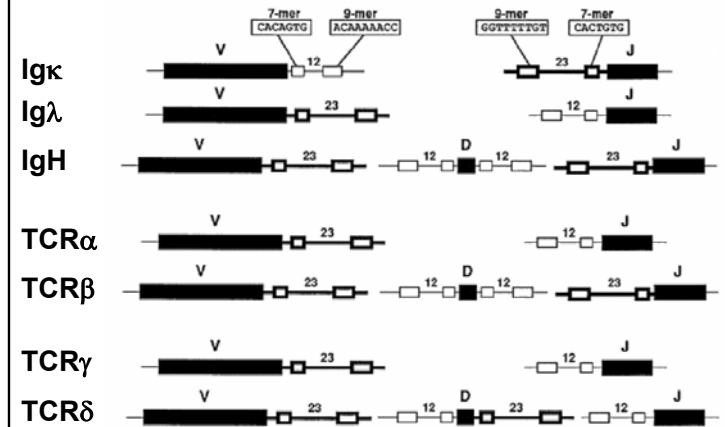
38

Séquences signal de recombinaison



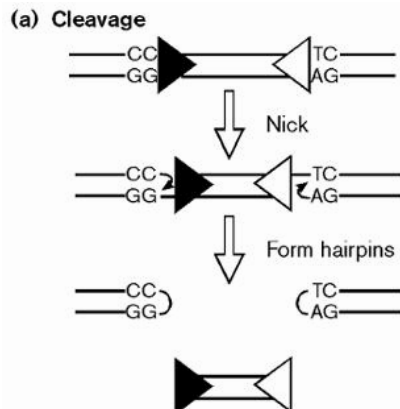
39

La règle 12/23 pour les Ig et TCR



40

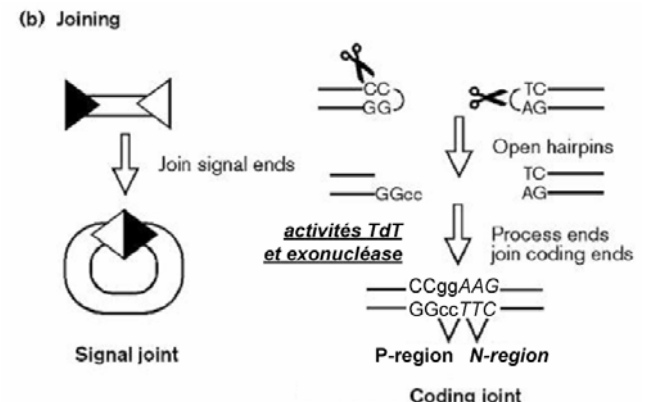
La recombinaison V(D)J (2)



© 1996 Current Opinion in Immunology

41

La recombinaison V(D)J (3)



© 1996 Current Opinion in Immunology

42

La recombinaison V(D)J (4)

Différentes protéines sont impliquées:

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

43

La recombinaison V(D)J (5)

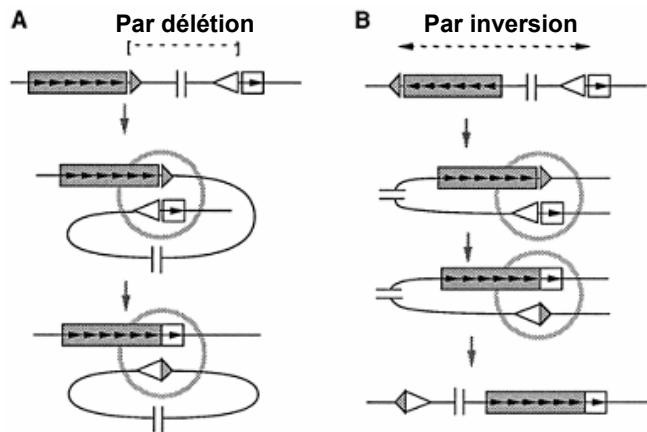
Réarrangements en phase vs. hors phase :

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

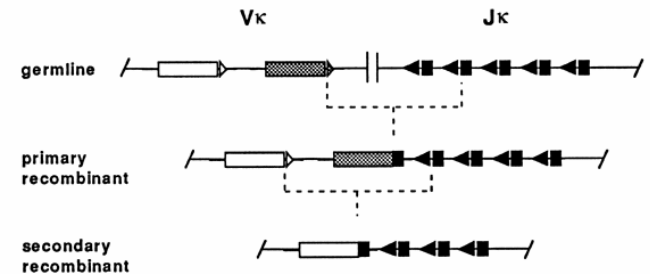
44

Différents types de réarrangements



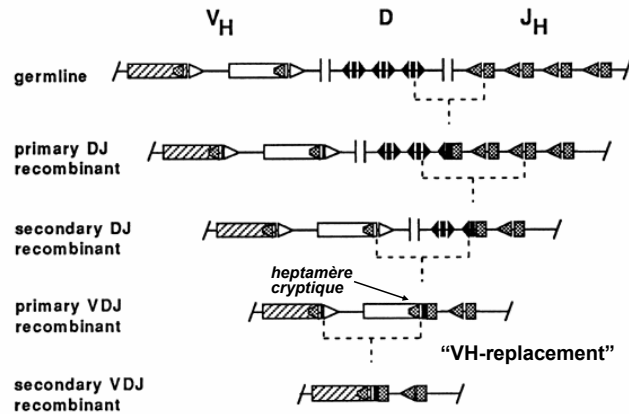
45

Réarrangements secondaires (1)



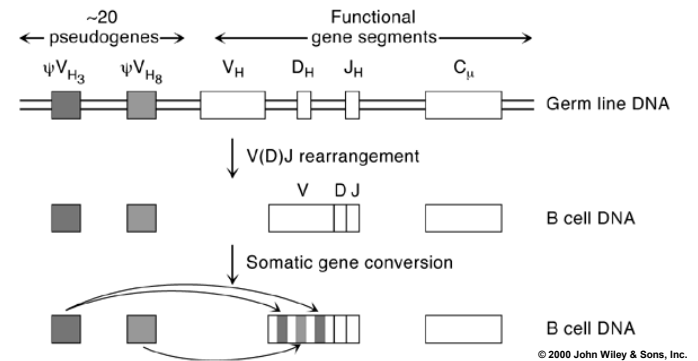
46

Réarrangements secondaires (2)



47

Conversion génique

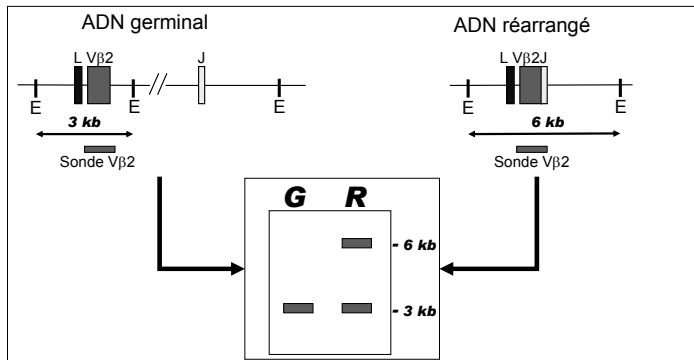


© 2000 John Wiley & Sons, Inc.

48

Détection des réarrangements (1)

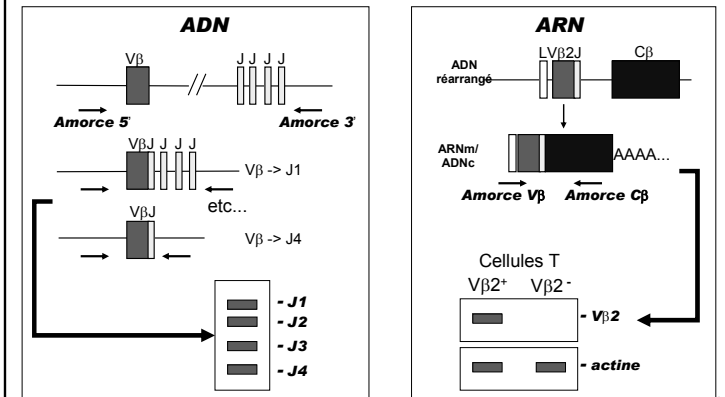
- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par la technique de Southern blot.



49

Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR aux niveaux ADN et ARN.



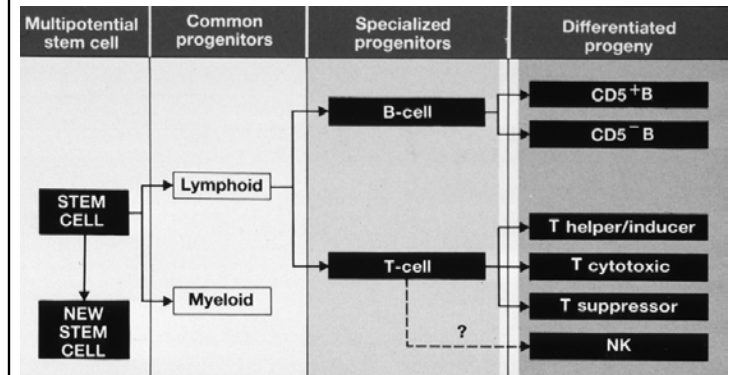
50

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes

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

57

La lignée lymphocytaire



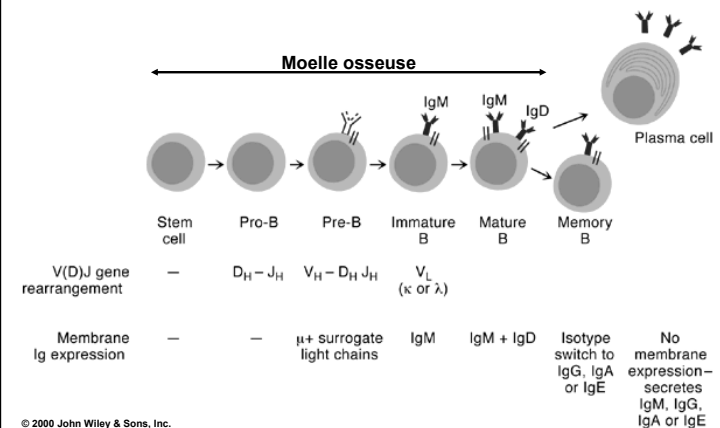
58

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

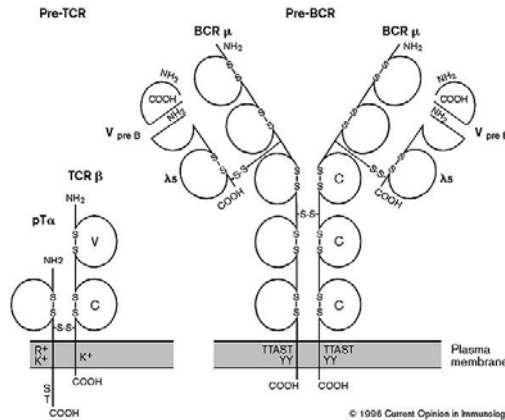
59

Différenciation des lymphocytes B



60

Caractérisation du pré-BCR



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

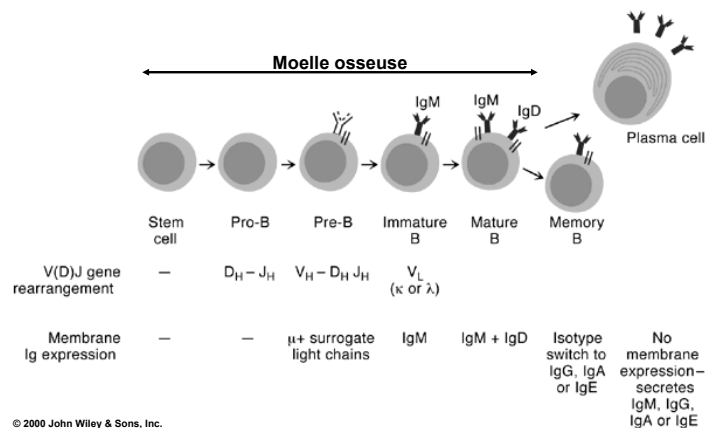
61

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

62

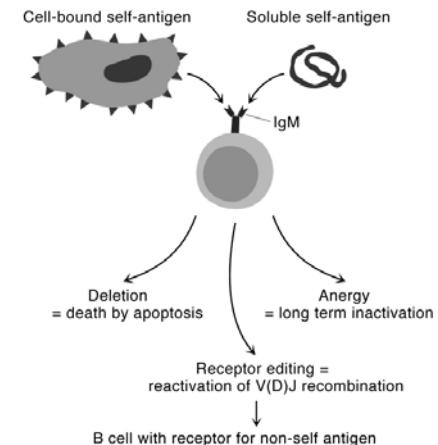
Différenciation des lymphocytes B



© 2000 John Wiley & Sons, Inc.

63

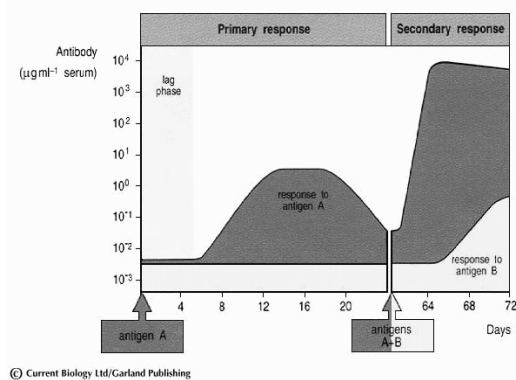
Sélection des lymphocytes B



© 2000 John Wiley & Sons, Inc.

64

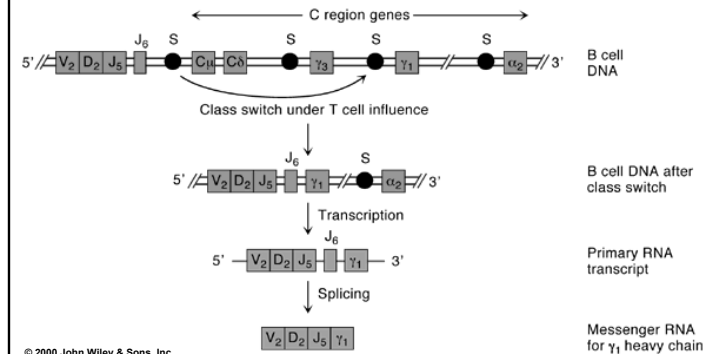
Mémoire immunologique



▲ *Principe de la vaccination*

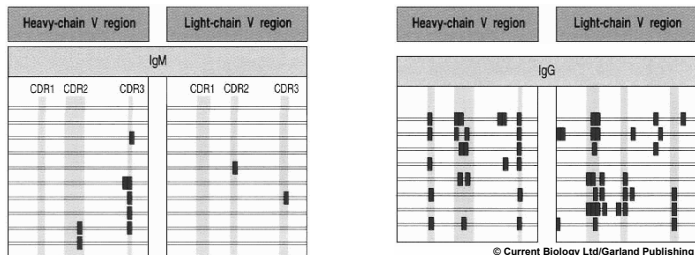
65

La commutation isotypique



66

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*

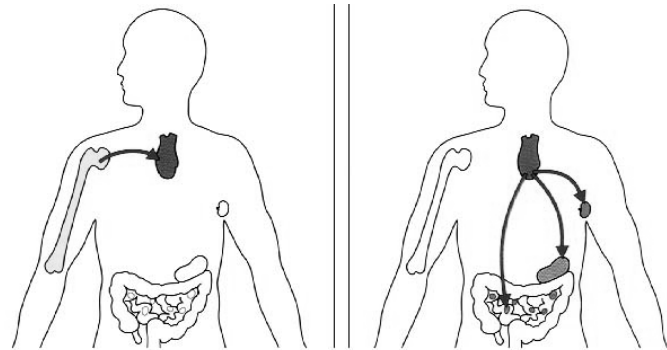
67

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes

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

68

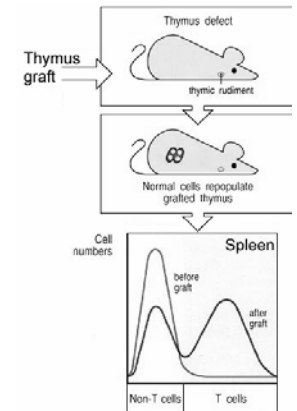
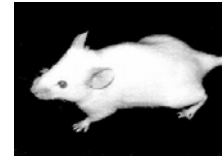
Les lymphocytes T se différencient dans le thymus



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

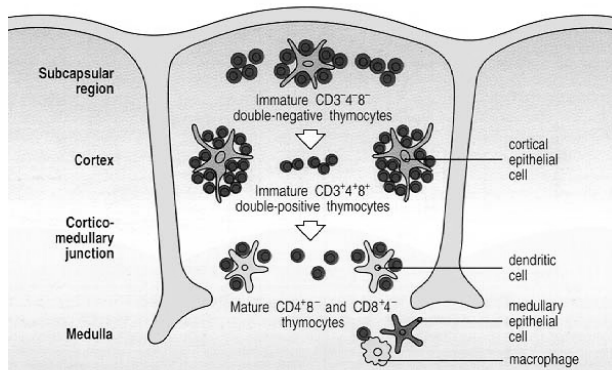
69

Pas de lymphocytes T chez les enfants athymiques (DiGeorge) ou les souris *nude*



70

Architecture cellulaire du thymus



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

71

Stades de différenciation des thymocytes

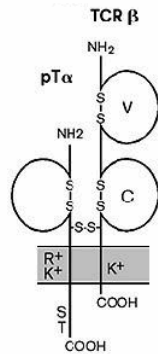
- Les différentes populations identifiées correspondent à des stades de différenciation des thymocytes
 - Chaque stade peut-être critique pour :
 - les réarrangements du TCR
 - la restriction par le CMH
 - la sélection positive ou négative
- notion de *points de contrôle (checkpoint)*

72

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

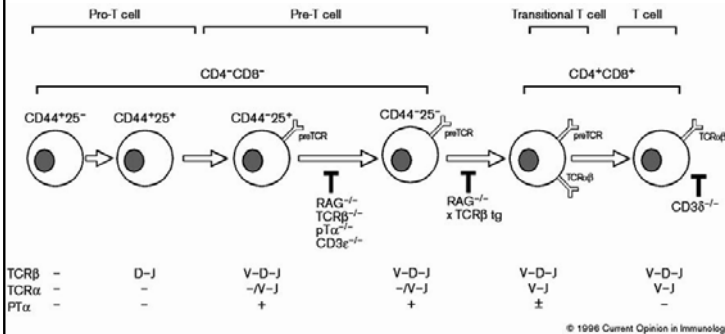


D'après Borst et al. (1996) Curr. Op. Immunol. 8:181-193

Rôle critique du pré-TCR

- $pT\alpha$ exprimée tôt dans l'ontogénie et associée à CD3/TCR β
- L'expression de ce 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

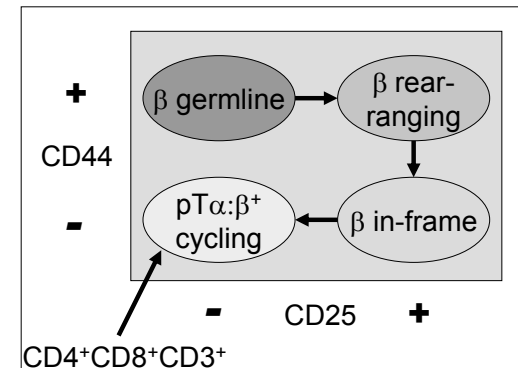
Différenciation thymique: souris



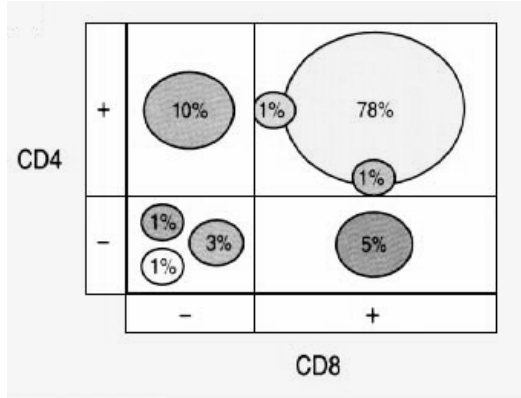
© 1996 Current Opinion in Immunology

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

Différenciation des thymocytes (1)



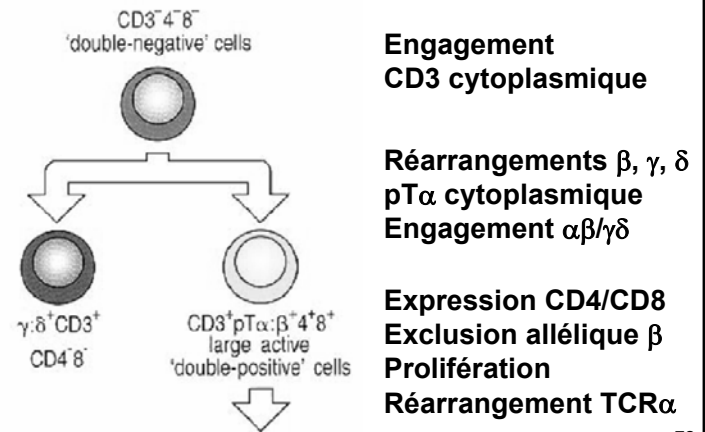
Différenciation des thymocytes (2)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

77

Différenciation des thymocytes (3)



78

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

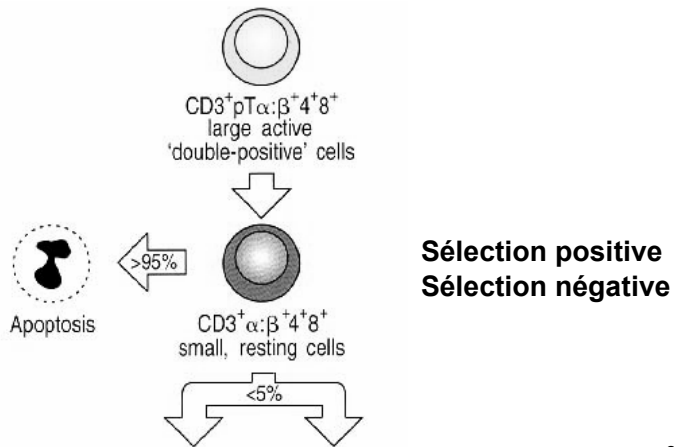
79

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

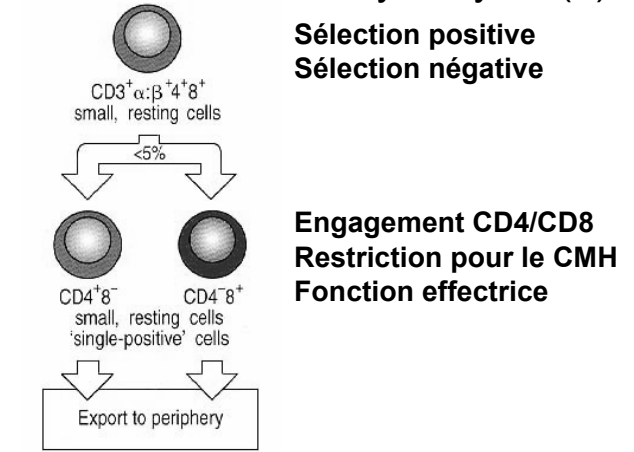
80

Différenciation des thymocytes (4)



81

Différenciation des thymocytes (5)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

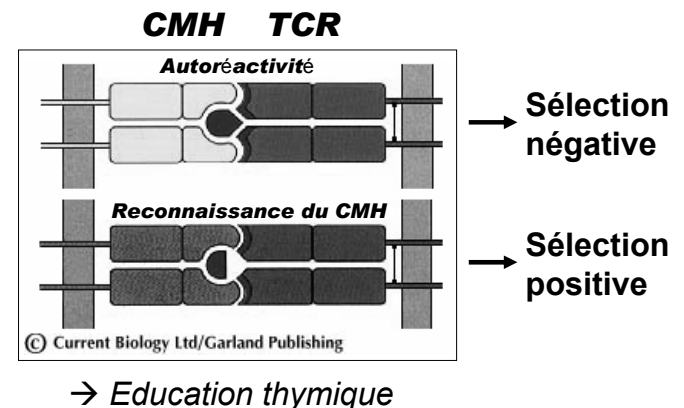
82

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

83

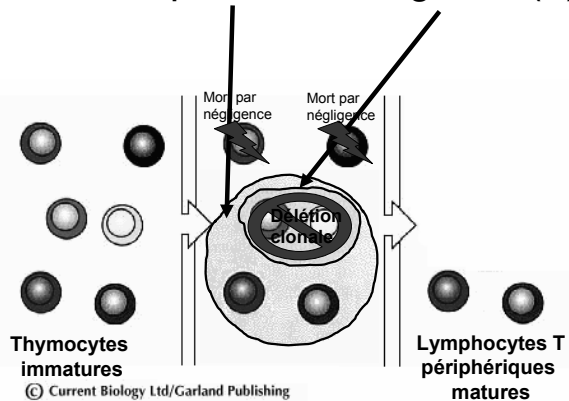
Sélections positive et négative (2)



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

84

Sélections positive et négative (3)



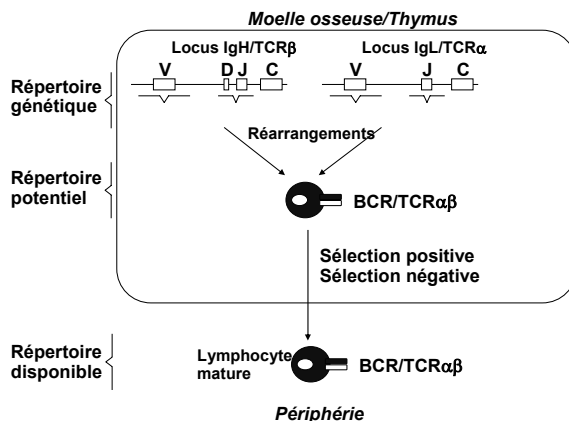
85

Génération de la diversité et différenciation des lymphocytes

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

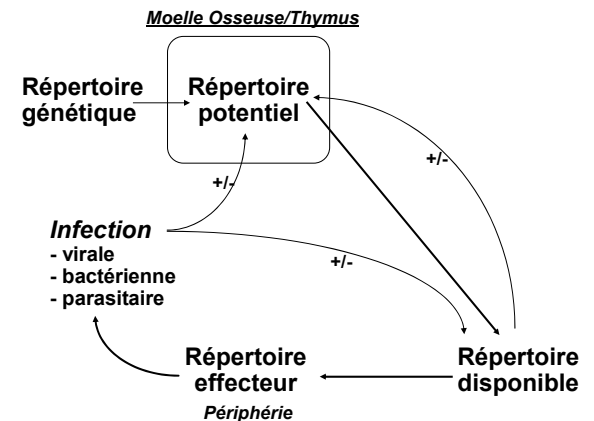
86

Notions de répertoires (1)



87

Notions de répertoires (2)

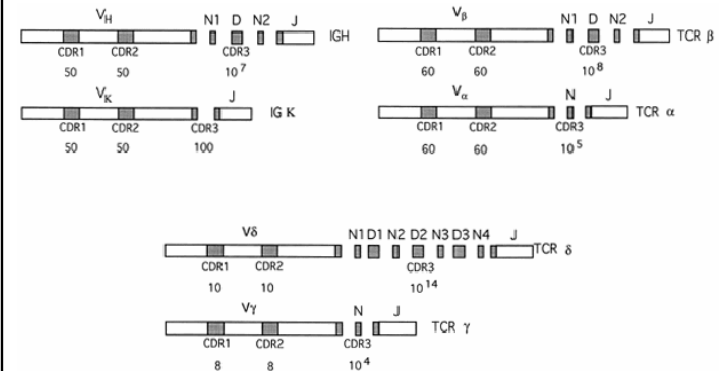


88

Conclusion

89

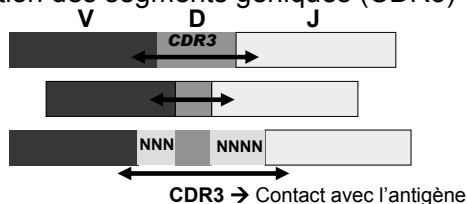
Diversité jonctionnelle CDR3: une stratégie générale



90

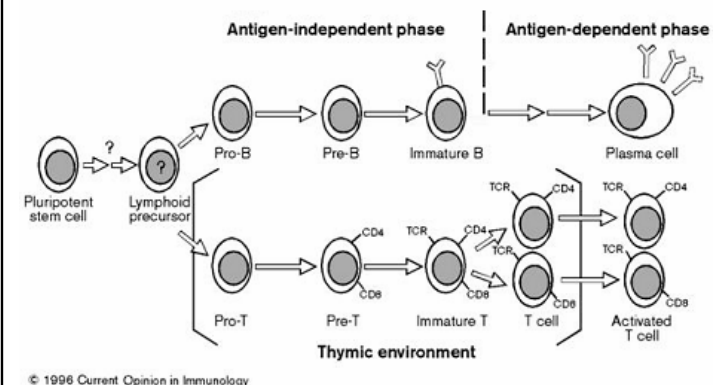
Diversité des chaînes Ig et TCR

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



91

Parallèle différenciations B et T



© 1996 Current Opinion in Immunology

D'après Fitzsimmons et Hagman (1996) Curr. Op. Immunol. 8:166-192