

# Réarrangement génomique au cours de la différenciation B et T

Master 1 Immunologie

2009-2010

12 novembre 2009

G. Cozon

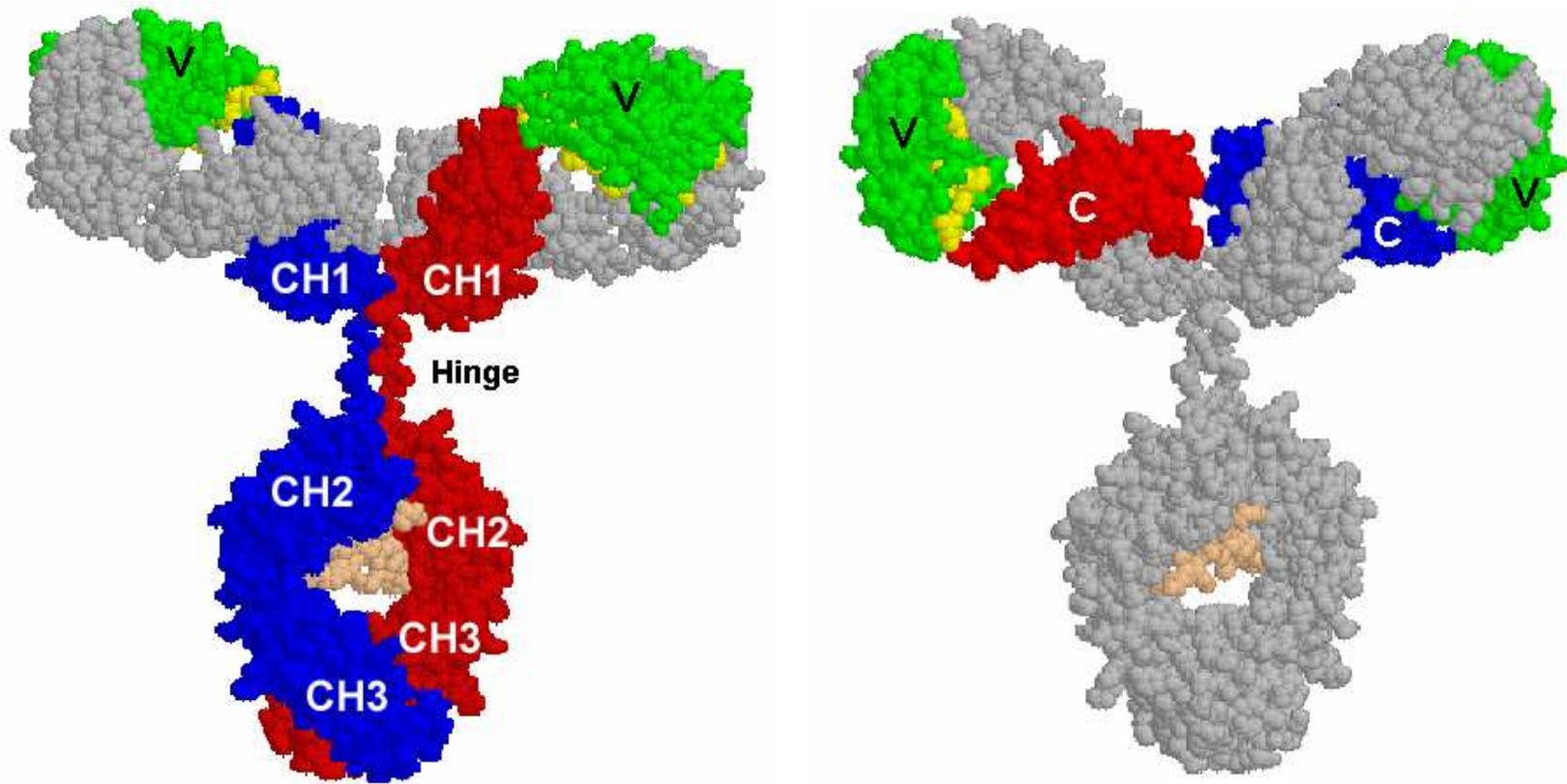
# Objectifs

- Comment est généré le répertoire des Igs, la diversité des Ac ?
- Comment le génome humain fabrique-t-il  $10^9$  Ac différents ?

# Structure de base des immunoglobulines

- 2 chaînes lourdes H identiques
  - 9 isotypes ( $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \alpha_1, \alpha_2, \mu, \epsilon, \delta$ )
  - PM 50 000    446 acides aminés (IgG) organisés en 4 ou 5 domaines.
  - 1 région variable VH, 3 ou 4 régions constantes CH (1,2,3,4)
- 2 chaînes légères L identiques
  - 2 isotypes ( $\kappa, \lambda$ )
  - PM 23 000    214 acides aminés organisés en deux domaines
- 1 région variable VL, 1 région constante CL

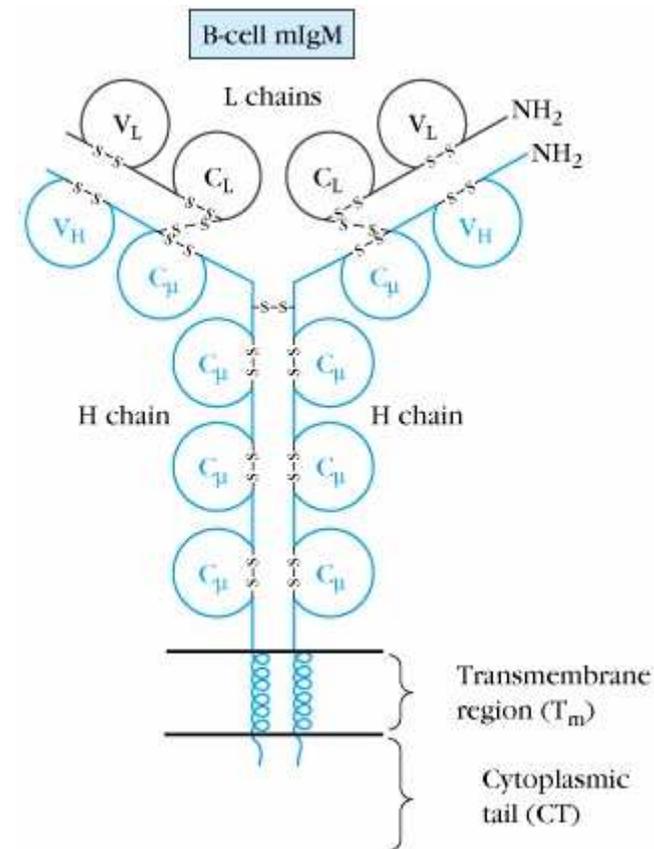
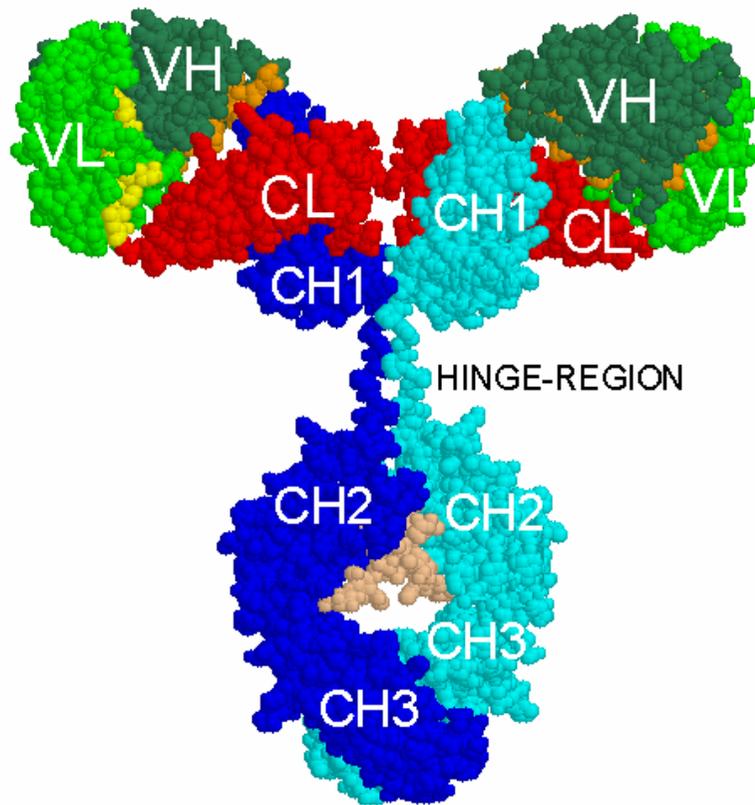
# Structure de base des immunoglobulines



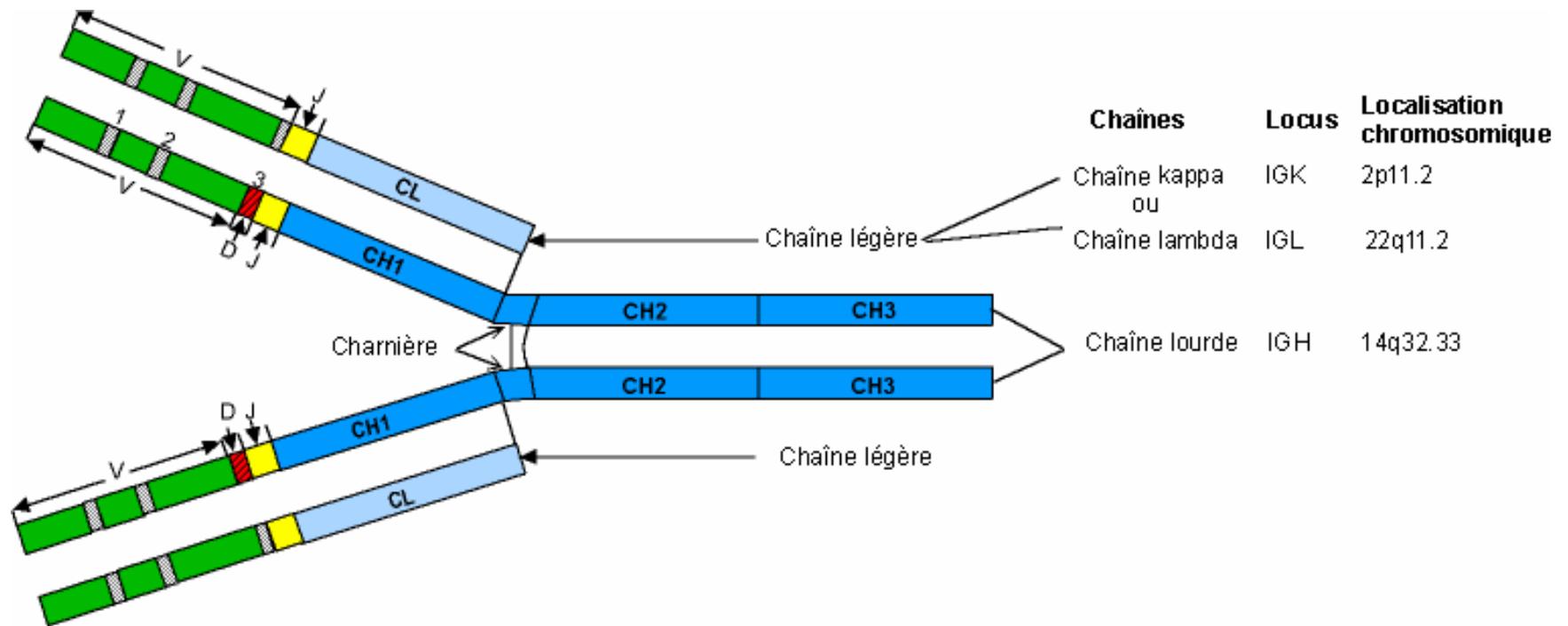
Chaîne lourde

Chaîne légère

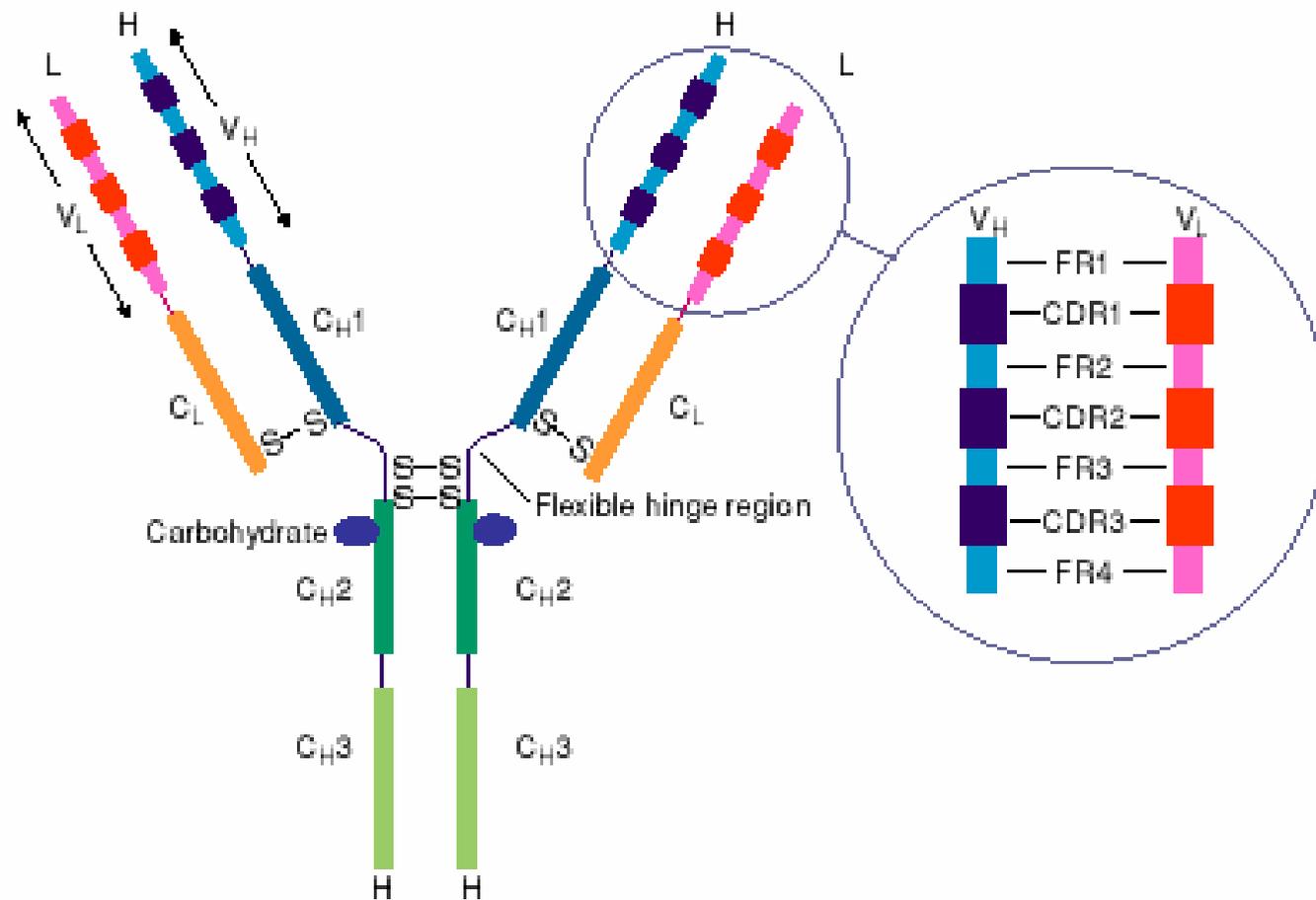
# Structure de base des immunoglobulines



# Schéma général d'une IgG



# Parties hypervariables et constantes

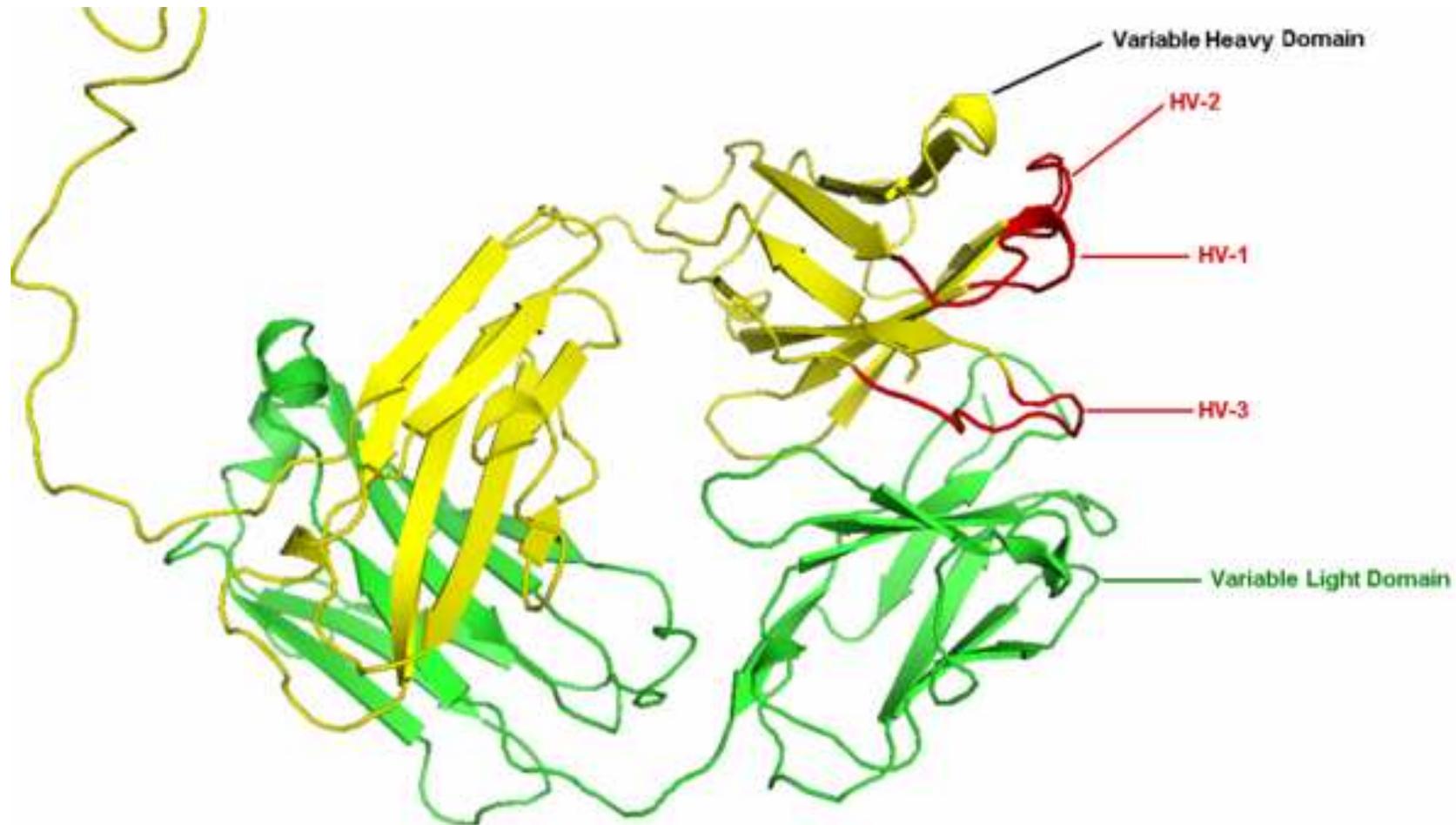


Key features of the protein structure of (human IgG<sub>1</sub>) immunoglobulin molecules

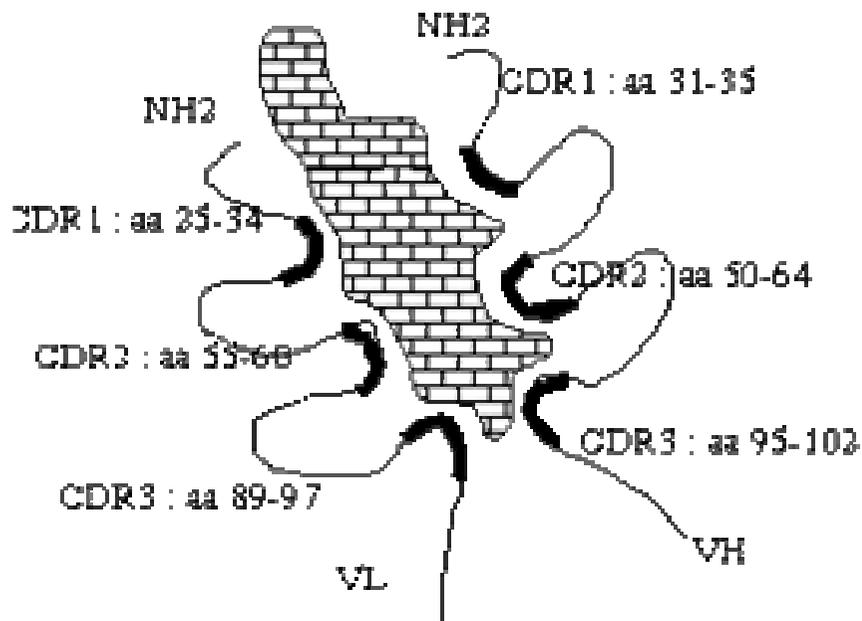
CDR = complementarity-determining regions

FR = Framework

# Site anticorps

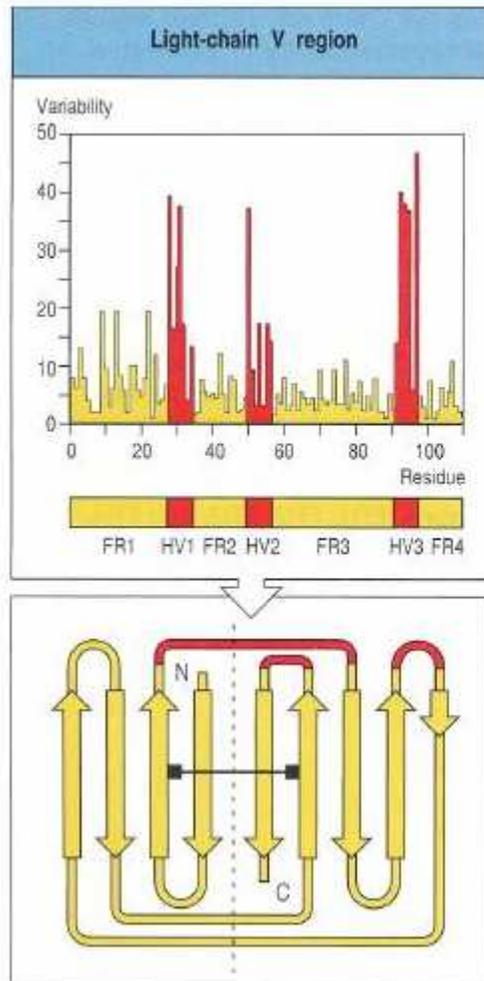


# Site Anticorps

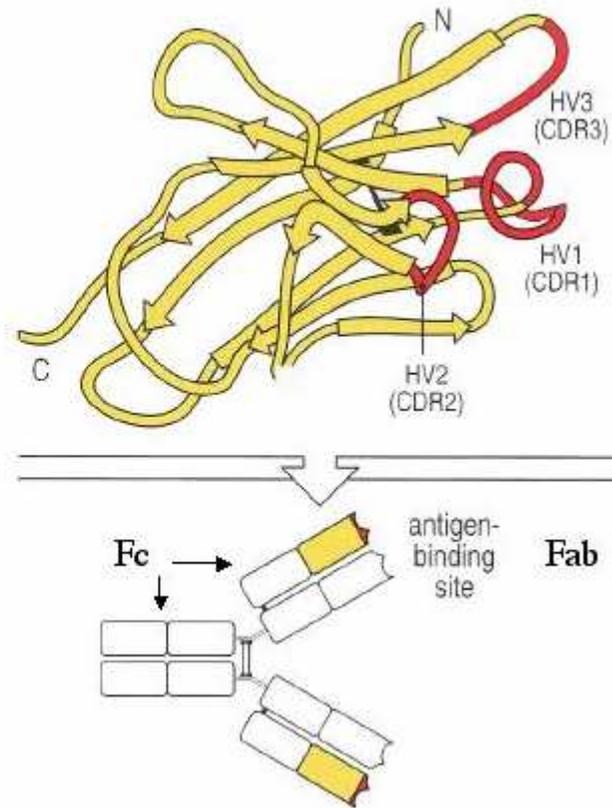


- Association des régions variables d'une chaîne lourde VH et d'une chaîne légère VL.
- Régions assez constantes (FR = charpente) et
- Régions hypervariables qui interviennent dans la constitution du site Ac : CDR1, CDR2, CDR3

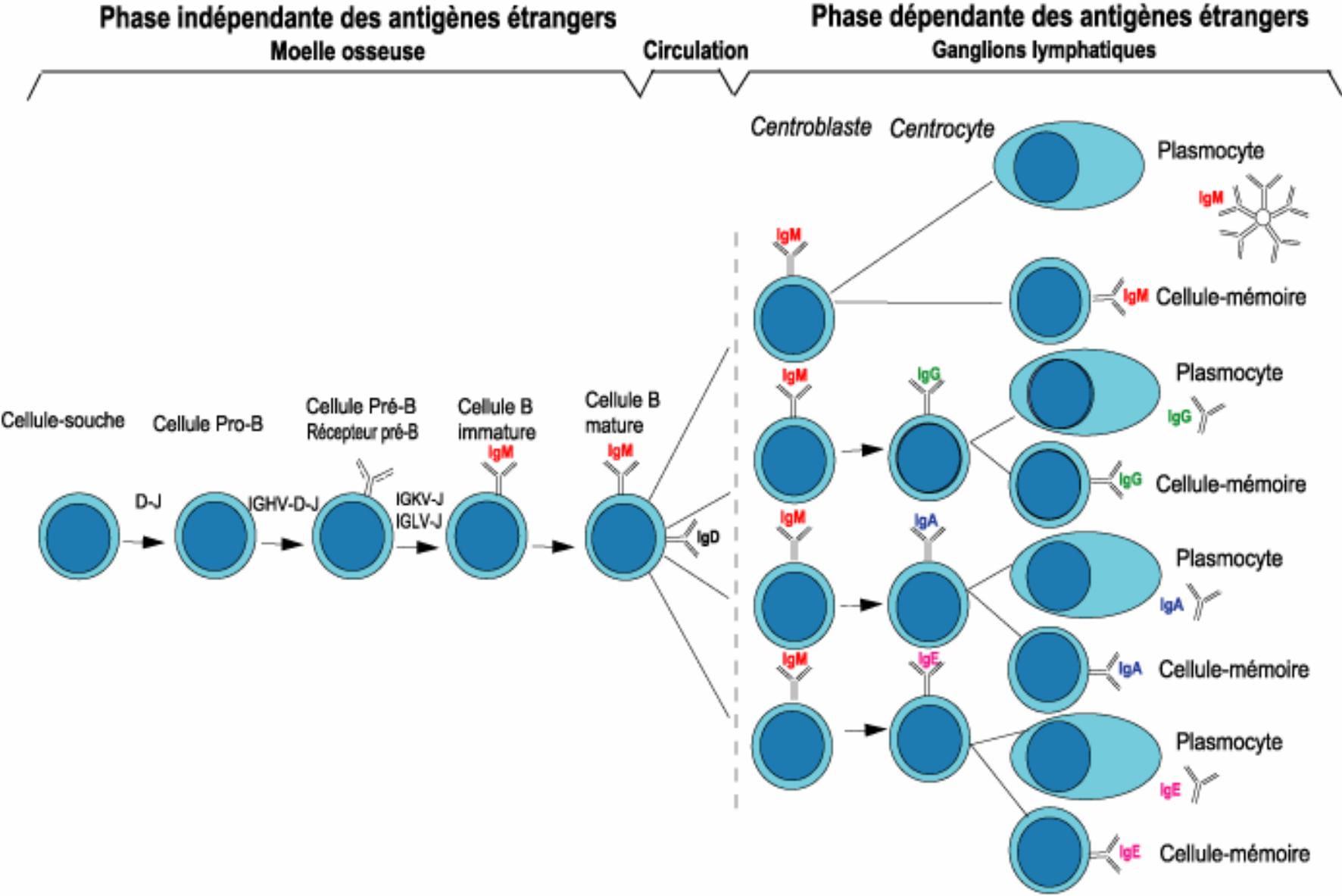
# Variations des CDR2, CDR2 et CDR3



## Organisation du domaine variable



# Différenciation B



# Génération de la diversité du répertoire

- Hypothèse germinale : un Ac = un gène
  - Pb :  $10^9$  Ac et seulement 20-30.000 gènes
- Hypothèse somatique : un gène qui mute
- Réalités : 2 x 3 segments de gènes
  - gènes de la chaîne lourde : chromosome 14 (14 q 32)
  - gènes de la chaîne légère kappa : ch 2 (2p 11.2)
  - gènes de la chaîne légère lambda : ch 22 (22q11.2)

Diversité par réarrangements géniques des segments de gène.

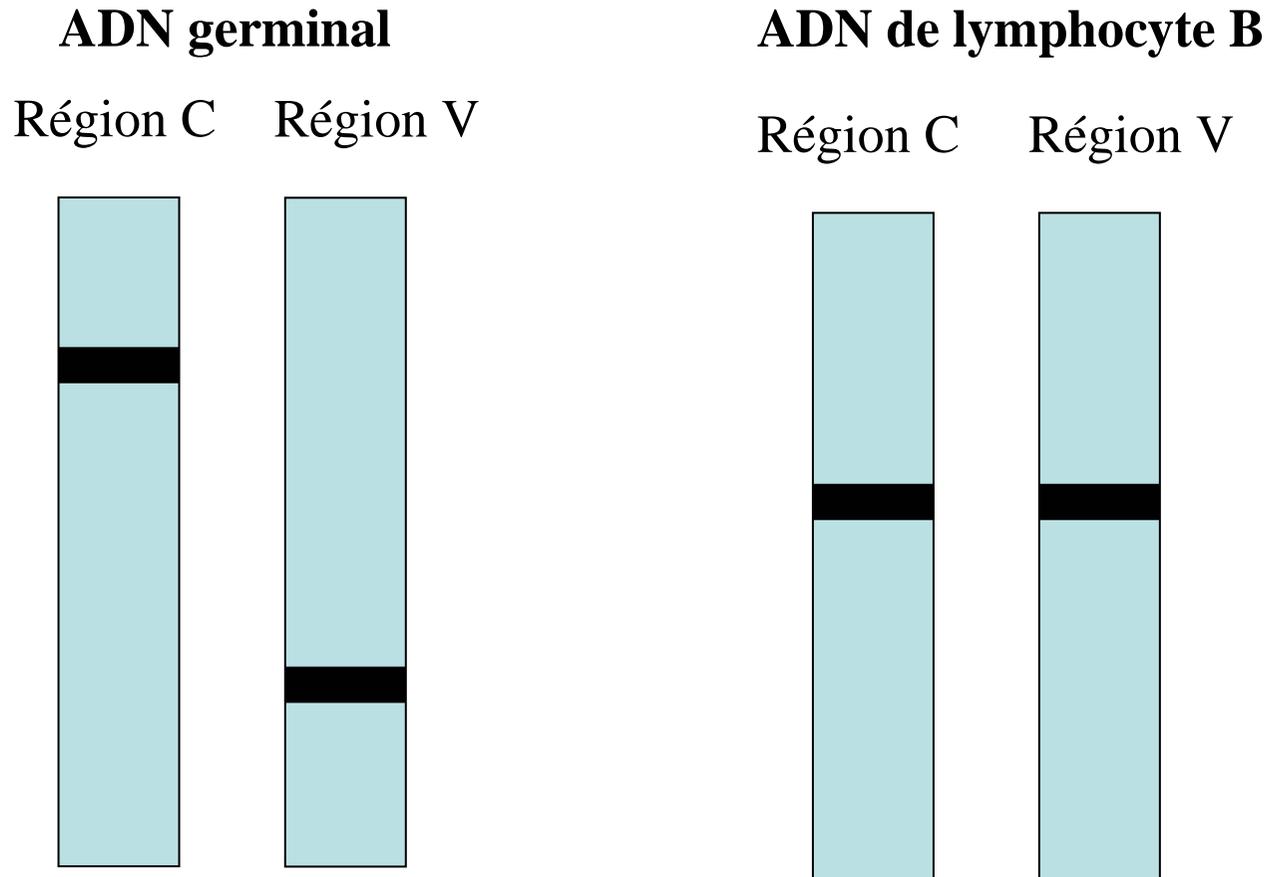
Intérêt : translocations 8-14, 8-2, 8-22 lymphome Burkitt.

# Mise en évidence du réarrangement

- Comparaison ADN de cellules germinales et ADN de lymphocytes B
- Coupure par une enzyme de restriction puis migration sur gel et révélation par une sonde marquée

# Southern blot

après digestion par une enzyme de restriction et hybridation  
avec une sonde de la région variable ou constante

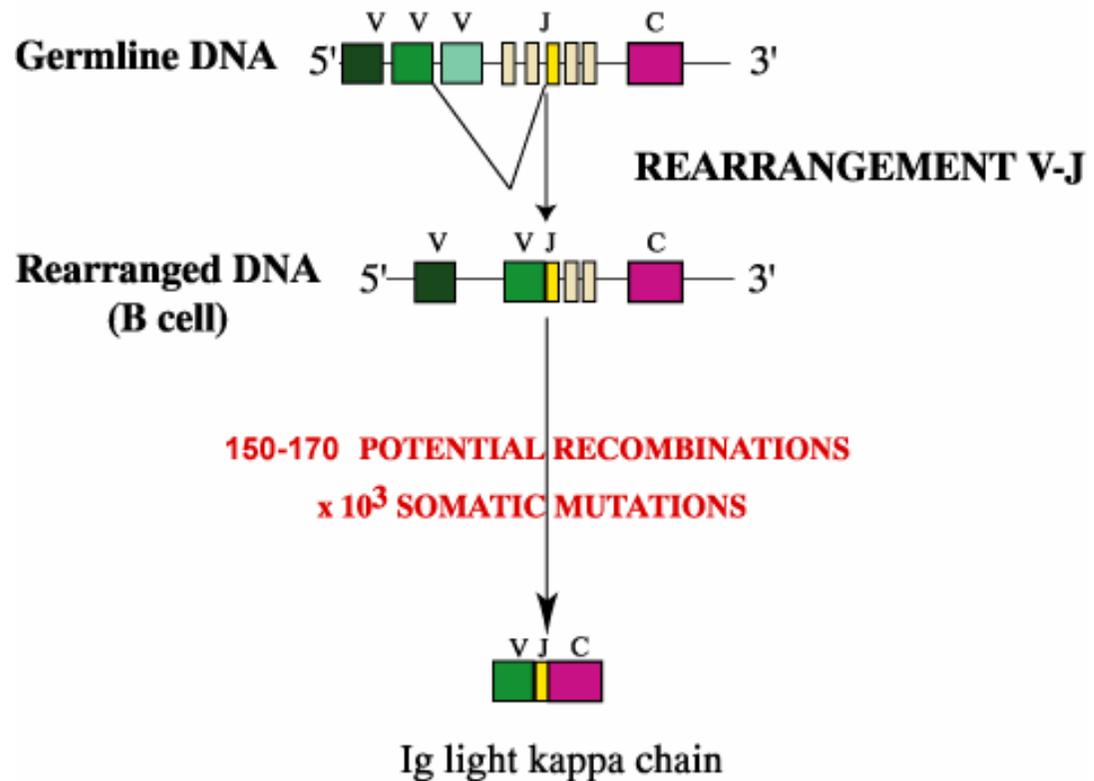


Conclusion : Dans l'ADN germinal les segments V et C sont distants avec un site de coupure de l'enzyme utilisé. Ce site n'existe plus dans l'ADN du lymphocyte B

# Réarrangement du locus IGK

## IGK locus at 2p11.2

- 76 gènes IGKV dont 34 à 37 fonctionnels appartenant à 5 sous-groupes. Codent pour 94 à 108 acides aminés + séquence L
- 5 gènes IGKJ 12 à 13 aa
- 1 gène IGKC code pour le domaine constant.



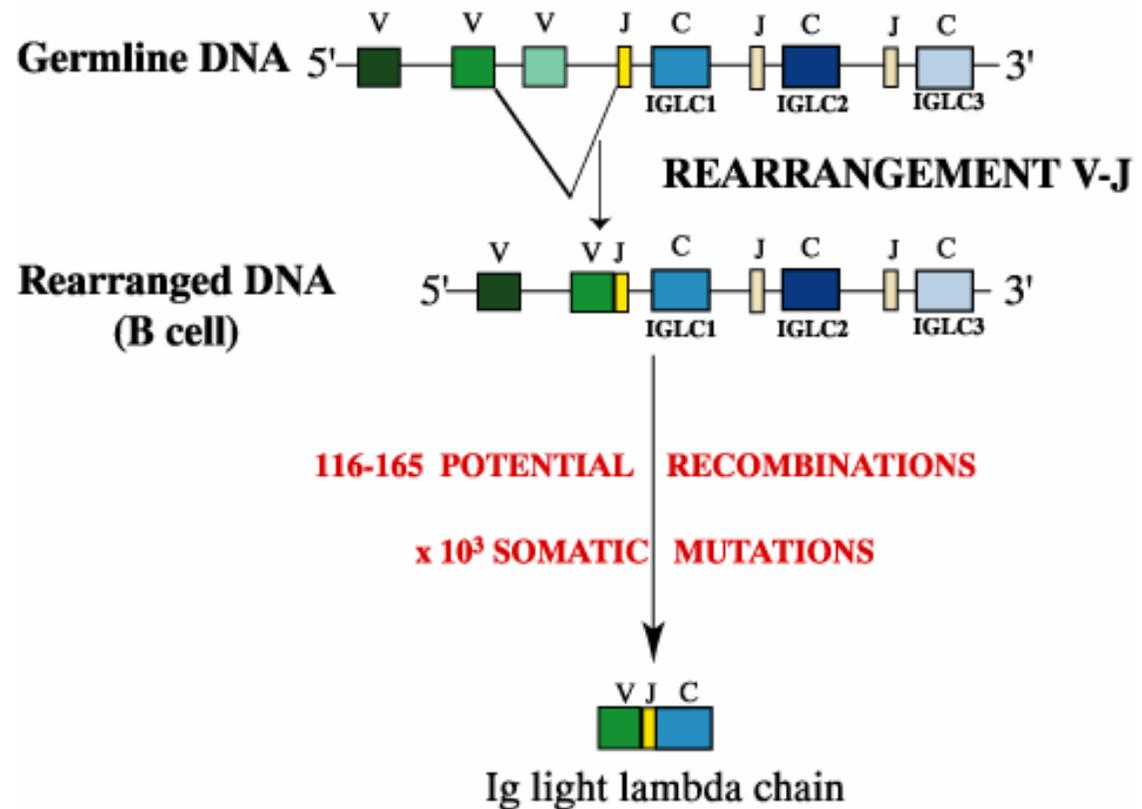
**$6.10^4$  DIFFERENT KAPPA CHAINS**

# Réarrangement du locus IGL

-70 à 74 gènes IGLV dont 29 à 35 sont fonctionnels et appartiennent à 10 sous-groupes.

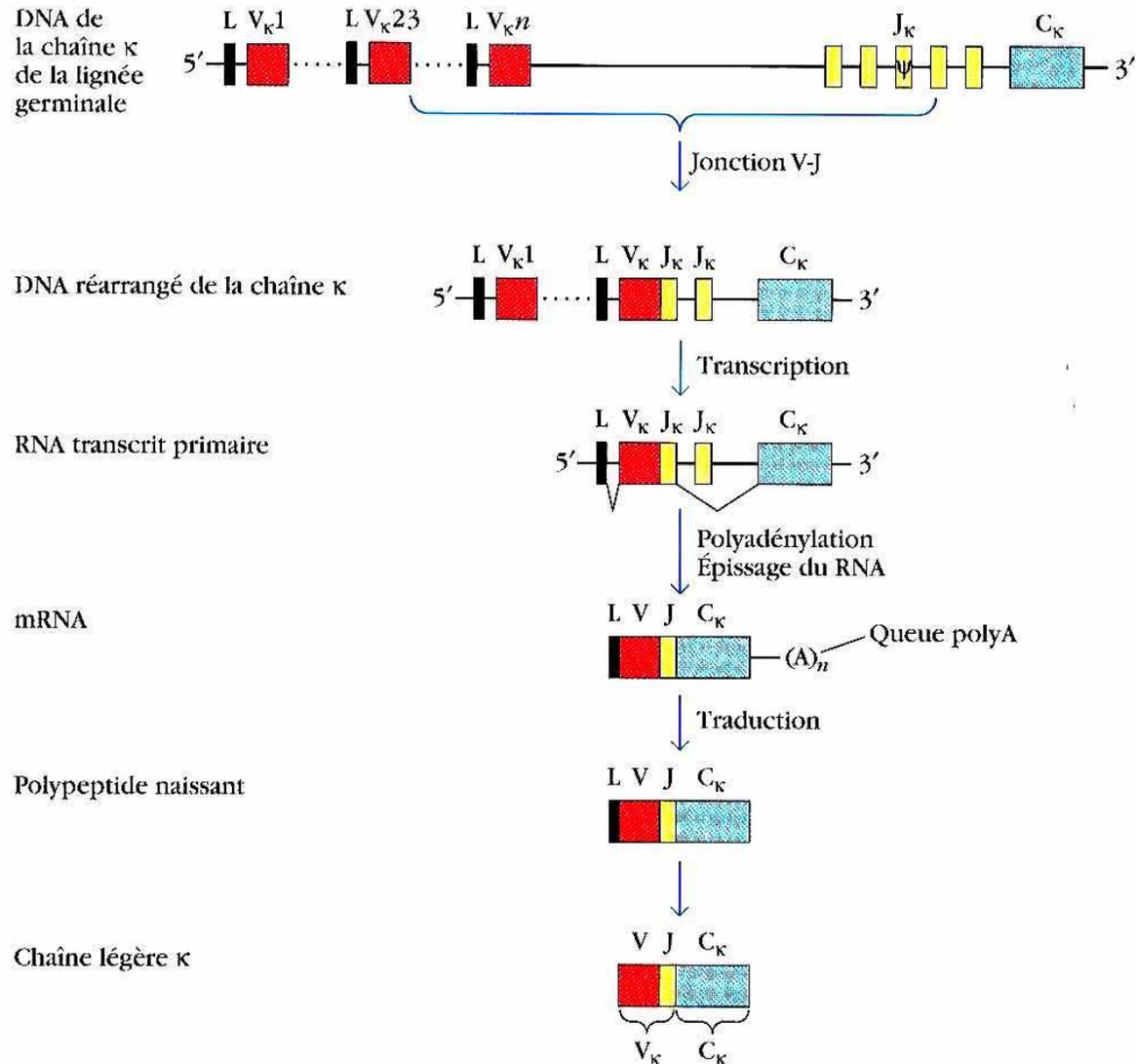
- 7 à 11 gènes IGLC précédés chacun d'un gène J, dont 4 au moins sont fonctionnels responsables de 4 isotypes de chaîne lambda

## IGL locus at 22q11.2



**4.10<sup>4</sup> DIFFERENT LAMBDA CHAINS**

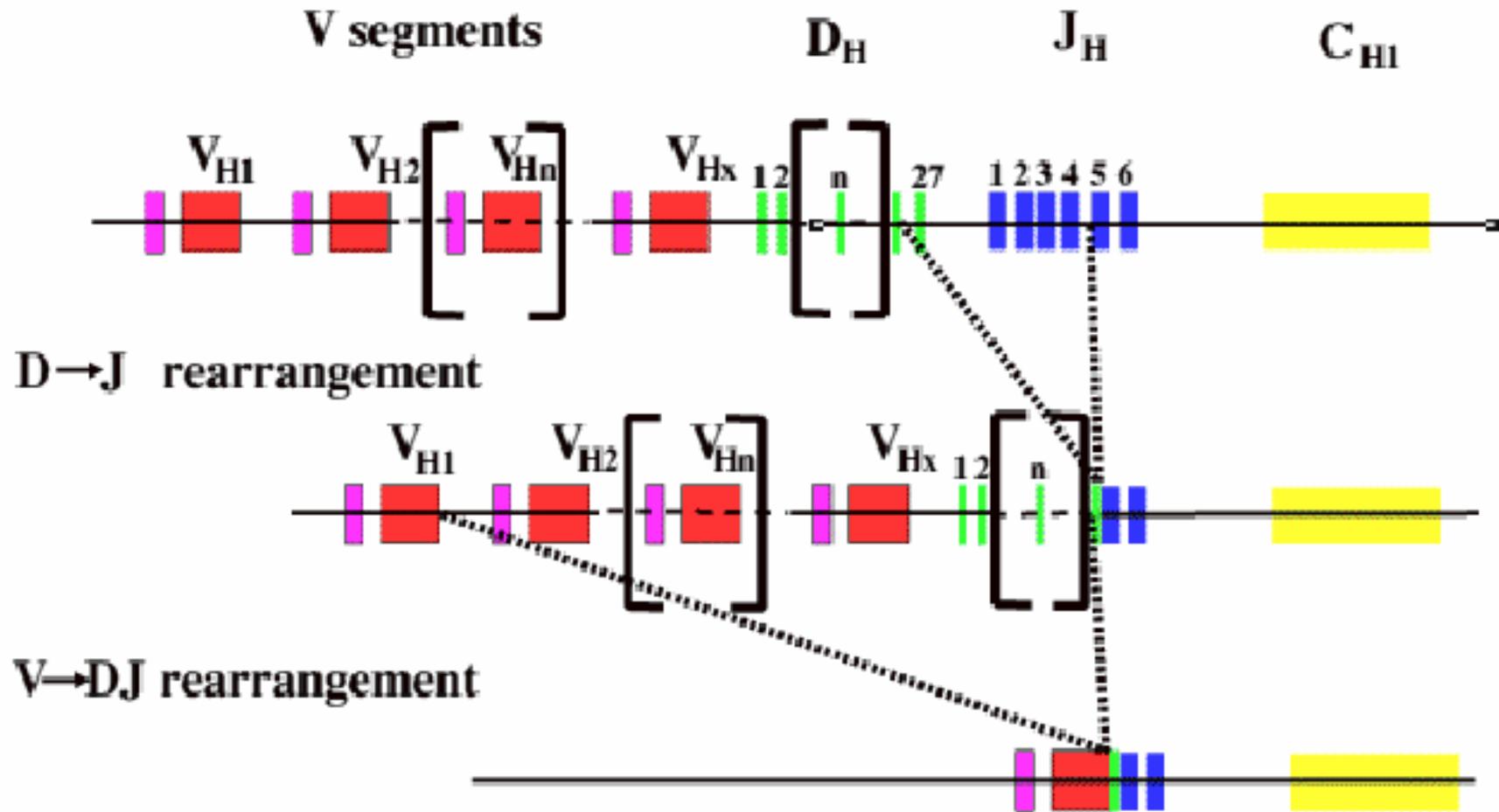
# Synthèse chaîne légère IGK et IGL



# Réarrangement et synthèse de la chaîne lourde

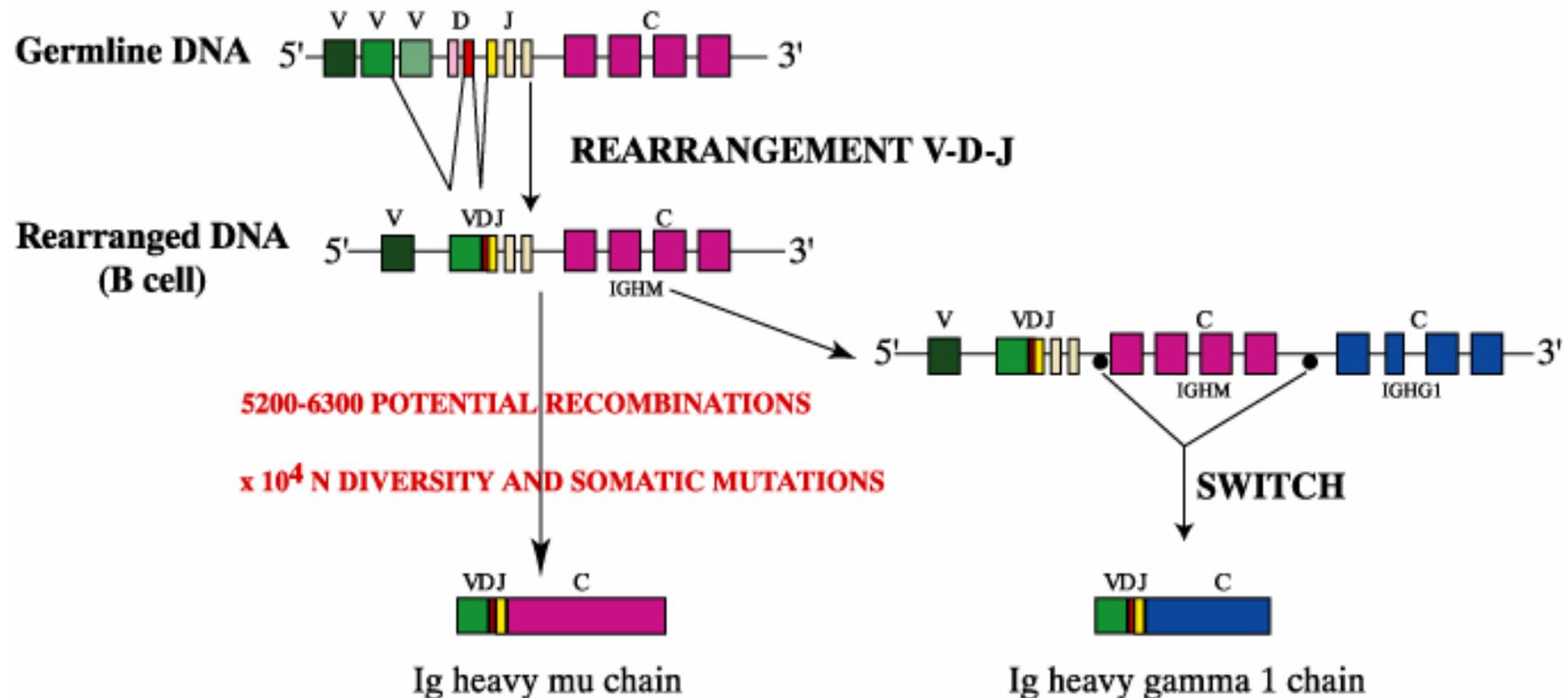
- Le locus est en 14q32.3
- Domaine variable codé par un assemblage VDJ de 3 segments de gènes V D et J
- Domaines constantes organisés en 9 séquences géniques fonctionnelles codant pour les 9 isotypes.

# Réarrangements D-J puis V-D-J du locus IGH



# Production de la chaîne lourde

IGH locus at 14q32.33

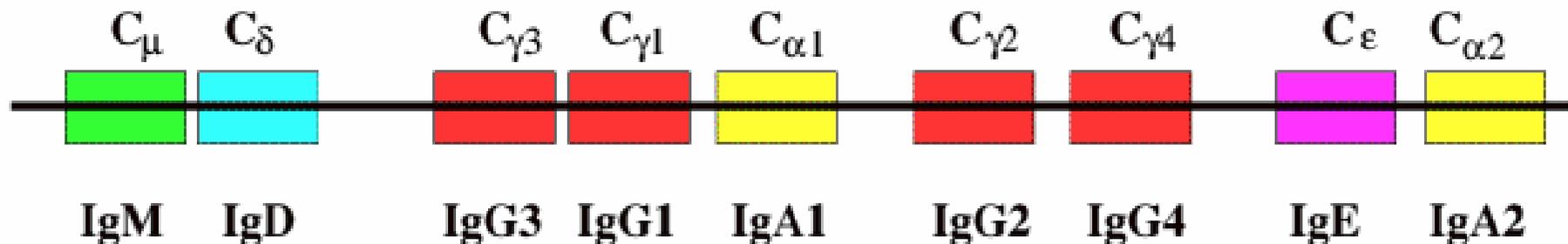


**$10^7$  DIFFERENT HEAVY CHAINS**

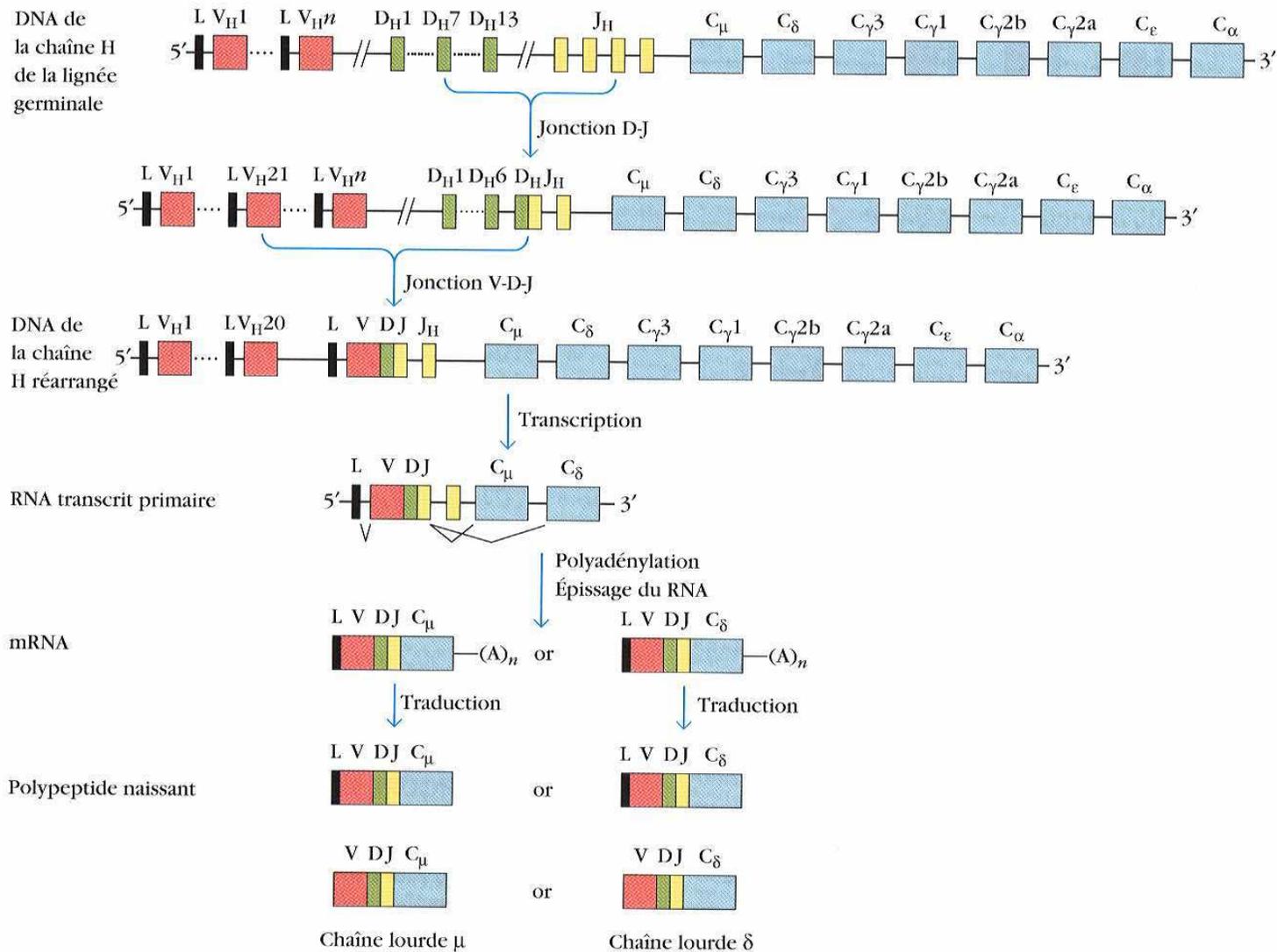
# Réarrangement de la chaîne lourde

organisation des gènes codant pour la partie constante

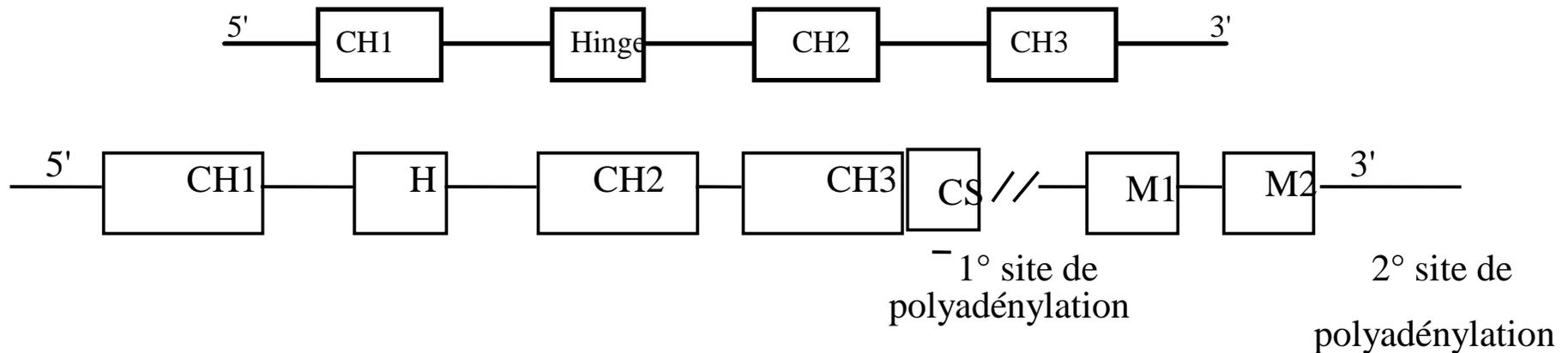
- Le segment VDJ réarrangé va s'associer à différentes régions constantes donnant différents isotopes de chaîne lourde avec un même site anticorps.



# Réarrangement des chaînes lourdes

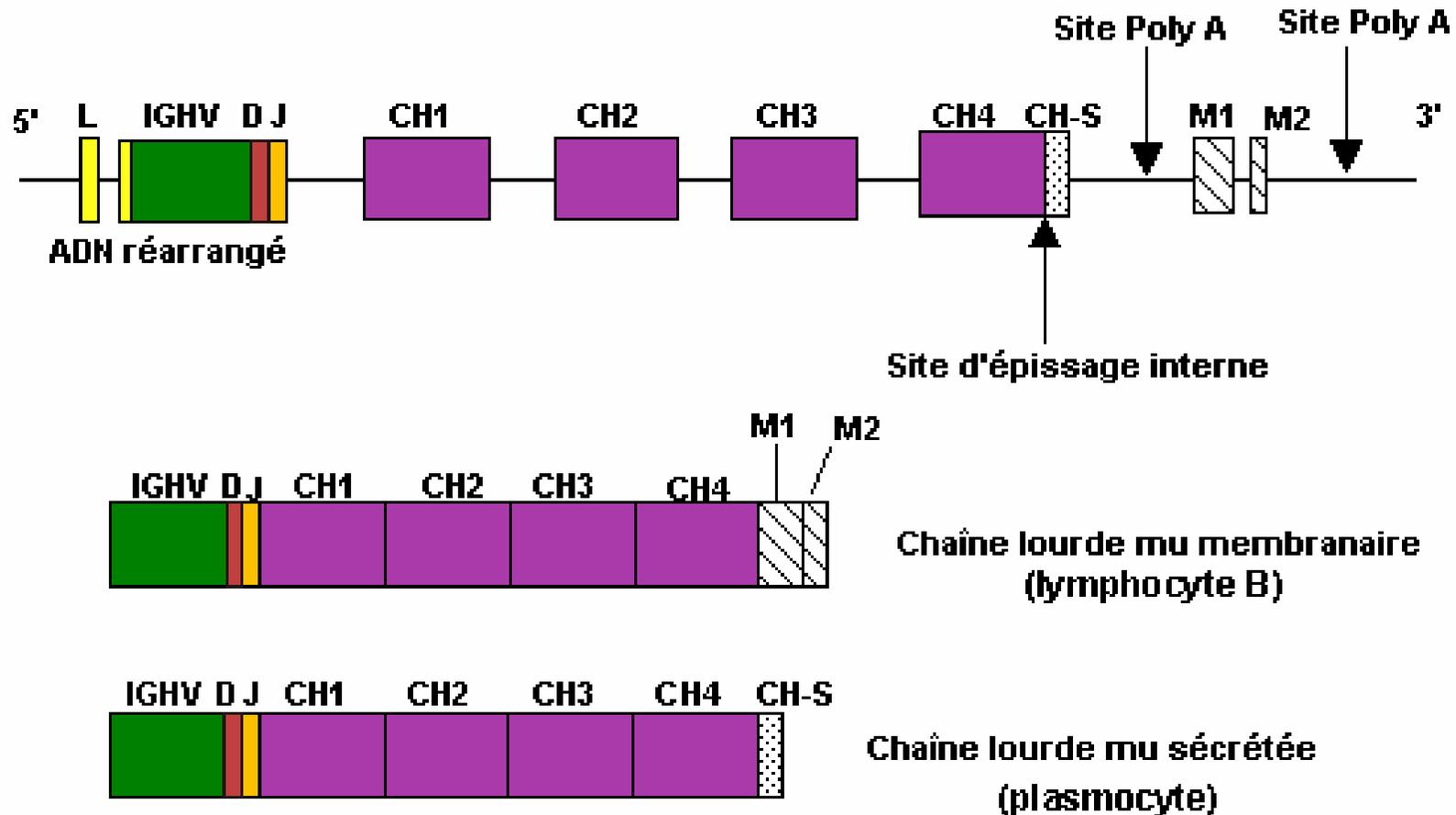


# Organisation des gènes de parties constantes



- 4 segments codant pour les 4 domaines CH1-CH4 ou CH1-CH3 + charnière
- 2 sites de polyadénylation permettant soit la production d'une forme membranaire soit une forme sécrétée.
- Un exon Cs pour la sécrétion, 2 exons M1 et M2 pour la forme membranaire.

# Forme membranaire et sécrétée d'IgM



# Mise en jeu de la recombinaison somatique.

- Au cours de la différenciation B
- Réarrangement chaîne lourde DJ puis VDJ
- Chaîne  $\mu$  intracytoplasmique puis membranaire  $\rightarrow$  preBCR ( $\mu$ - $\lambda$ 5VpreB)
- Réarrangement chaîne légère
- Expression d'un BCR
- Mutation somatique dans les centres germinatifs.

# PreBCR et BCR

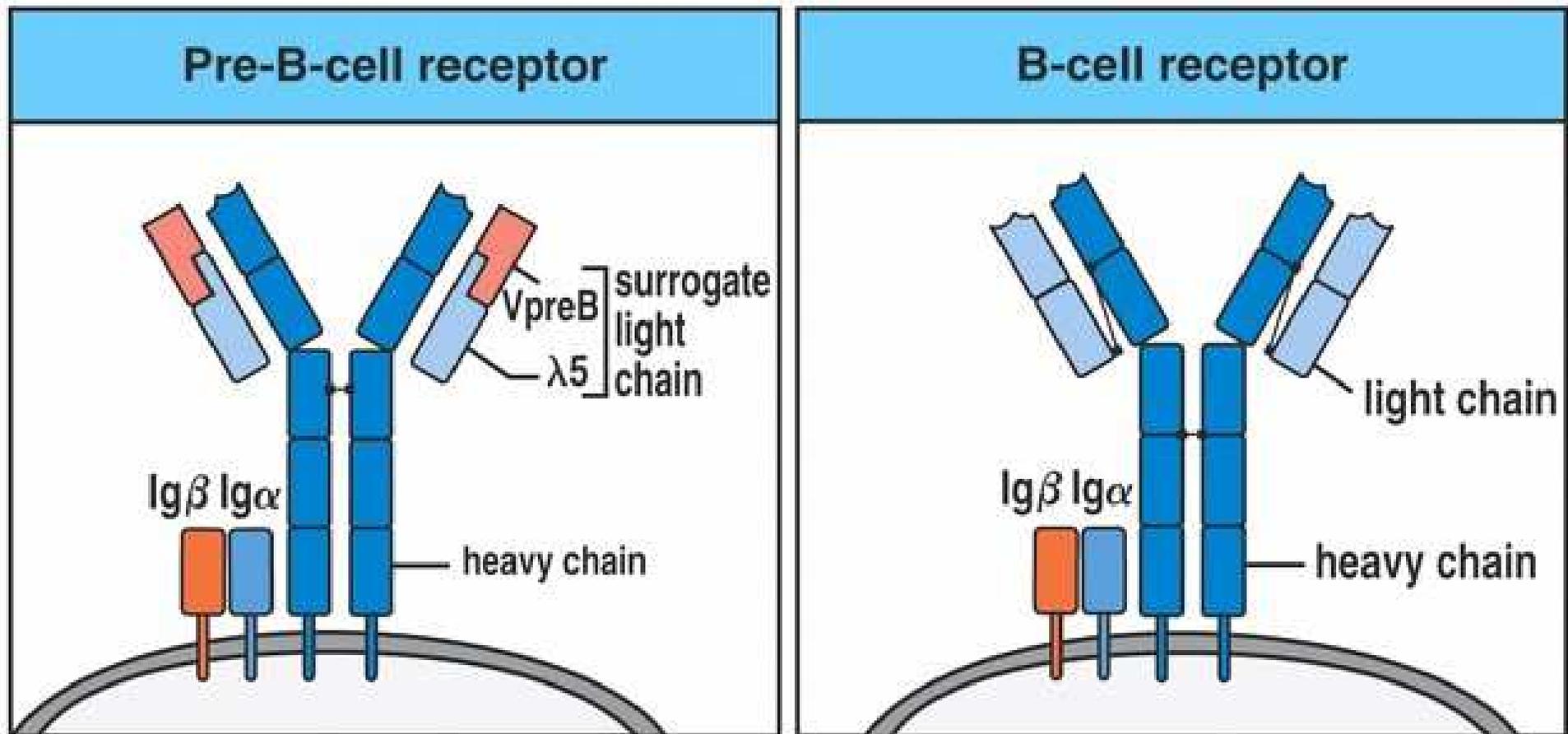
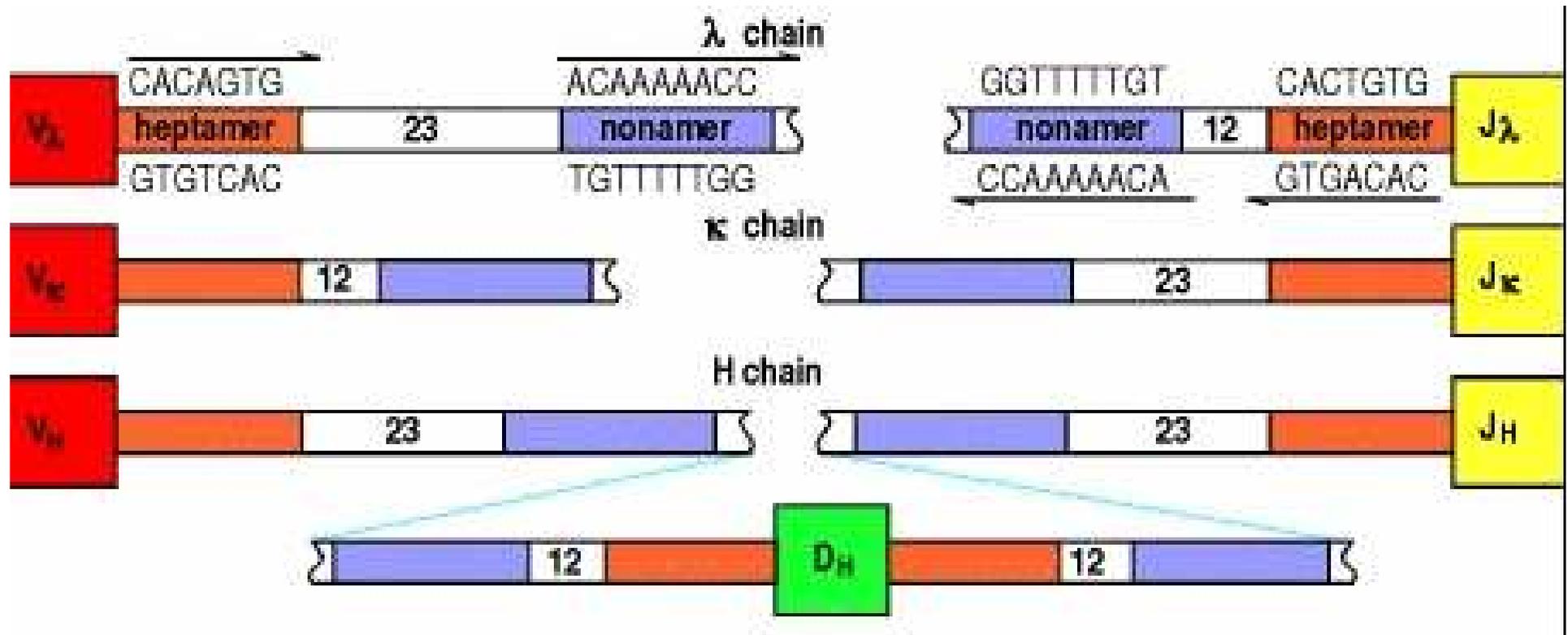


Figure 4-4 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

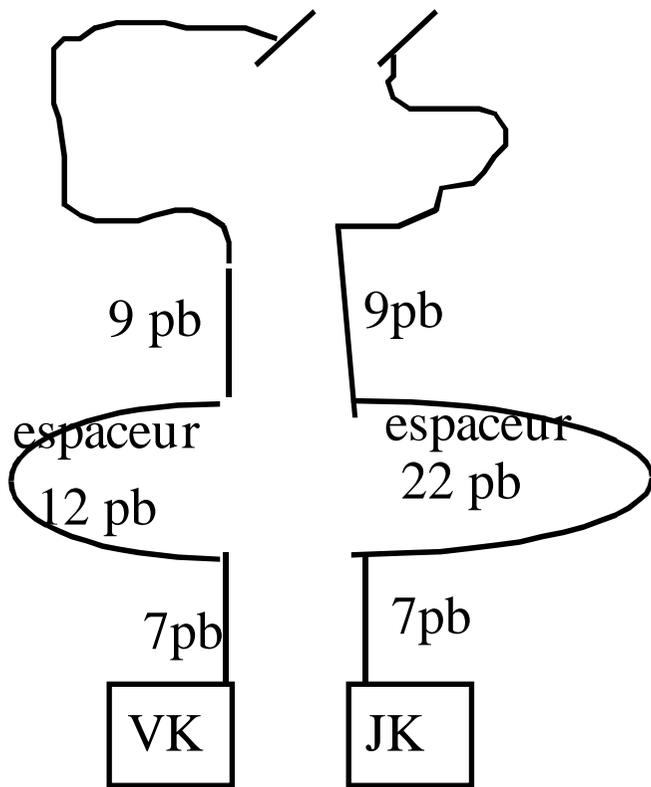
# Mécanismes de la recombinaison

- Présence de séquence signal de recombinaison (RSS) en aval des segments V et en amont des segments J des chaînes légères
- RSS = heptamère-espaceur de 12 ou 23 nucléotides-nonamère.
- Les séquences heptamère nonamère en aval des segments V sont complémentaires des séquences heptamère nonamère en amont des séquences J.
- Rapprochement grâce à des protéines (RAG 1 et RAG2)

# Séquence signal de recombinaison RSS

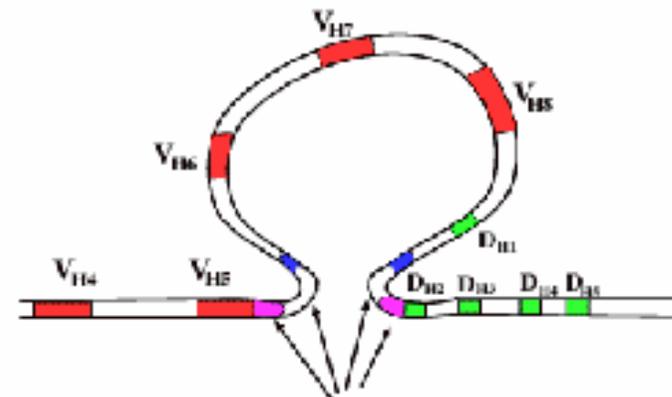


# Mécanismes de la recombinaison des chaînes légères

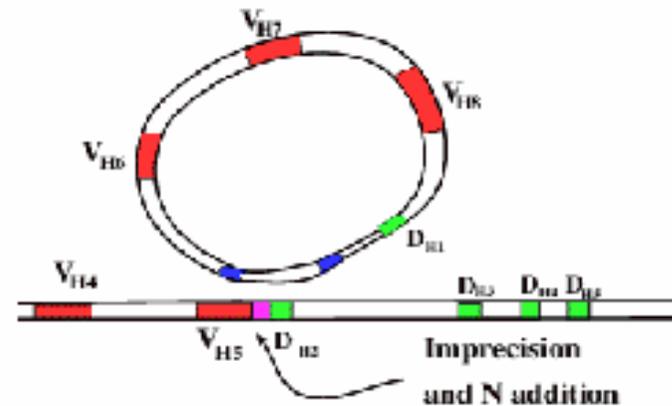


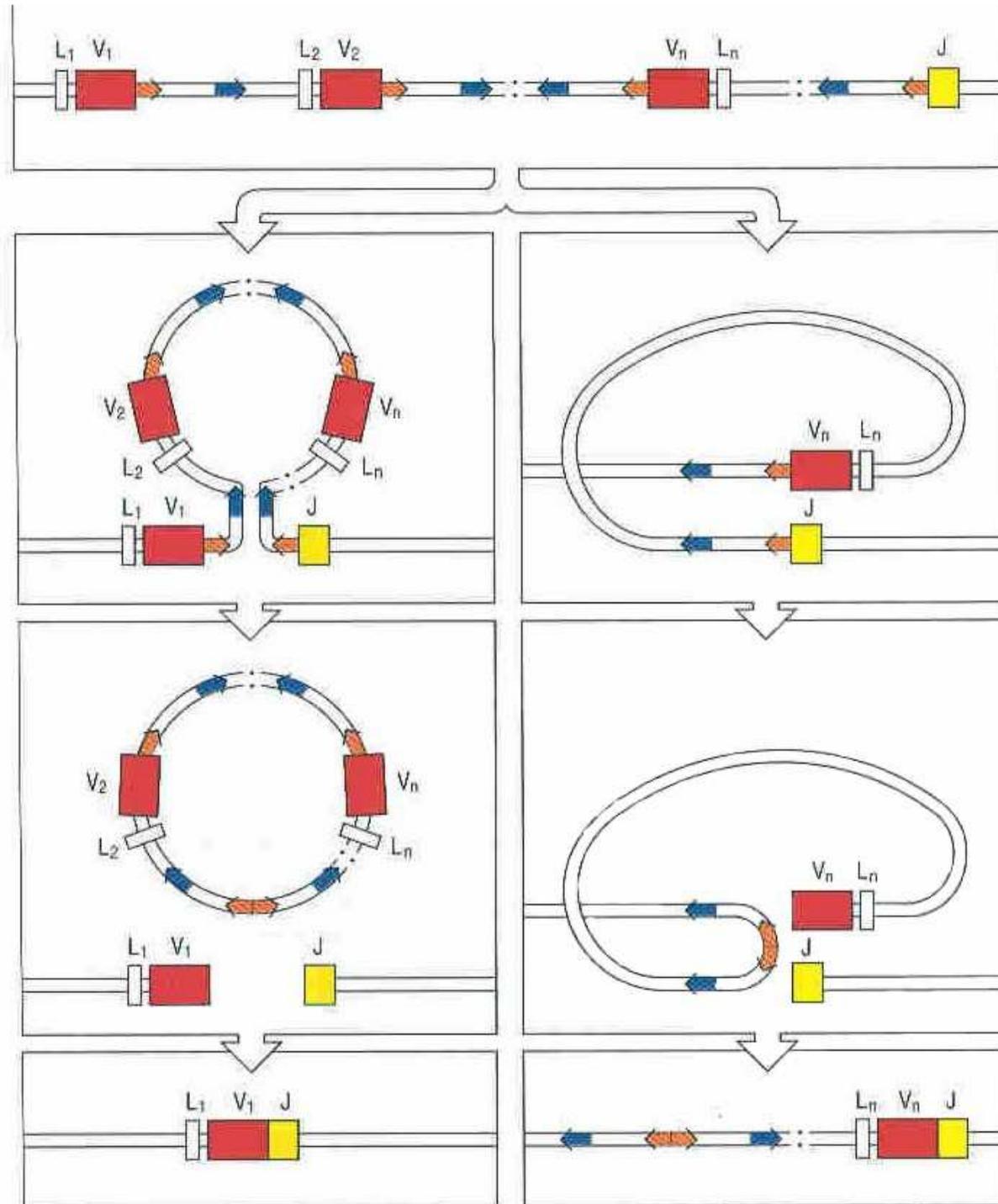
Recombinase

VDJ joining occurs by DNA recombination

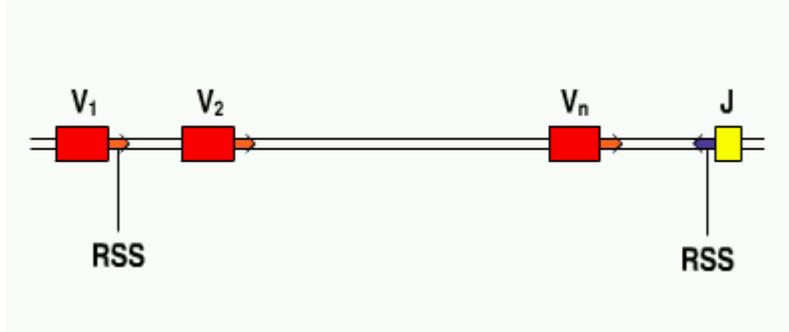


Heptamer and nonamer signal sequences





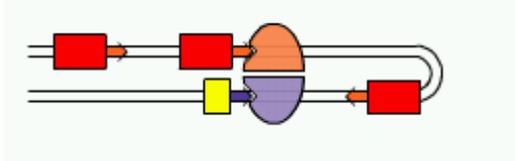
# Mécanismes de la recombinaison (1)



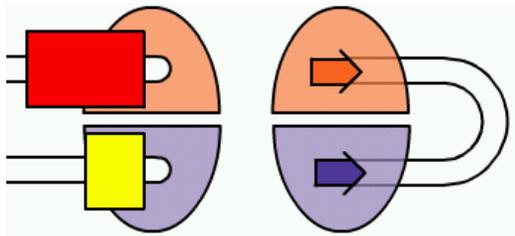
Rag1 et RAG2 se fixent sur les RSS



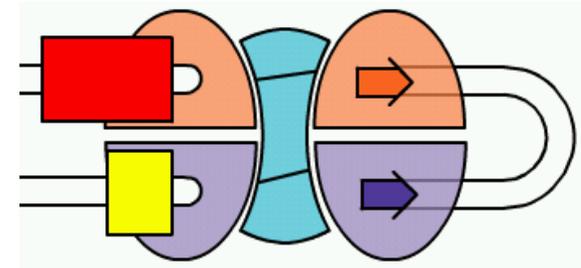
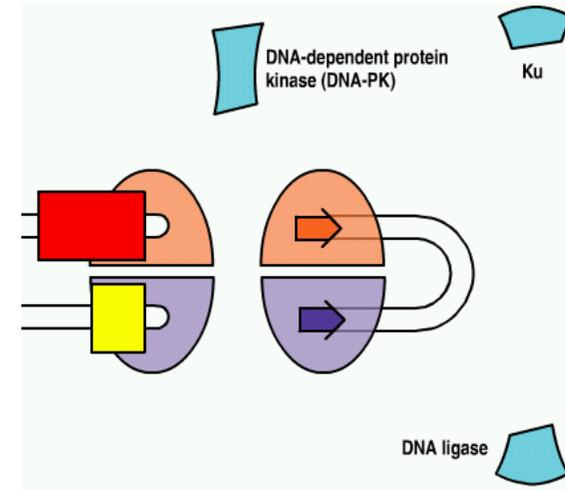
Rag1 et RAG 2 se rapprochent



L'ADN est clivé pour formé une structure en épingle à cheveux

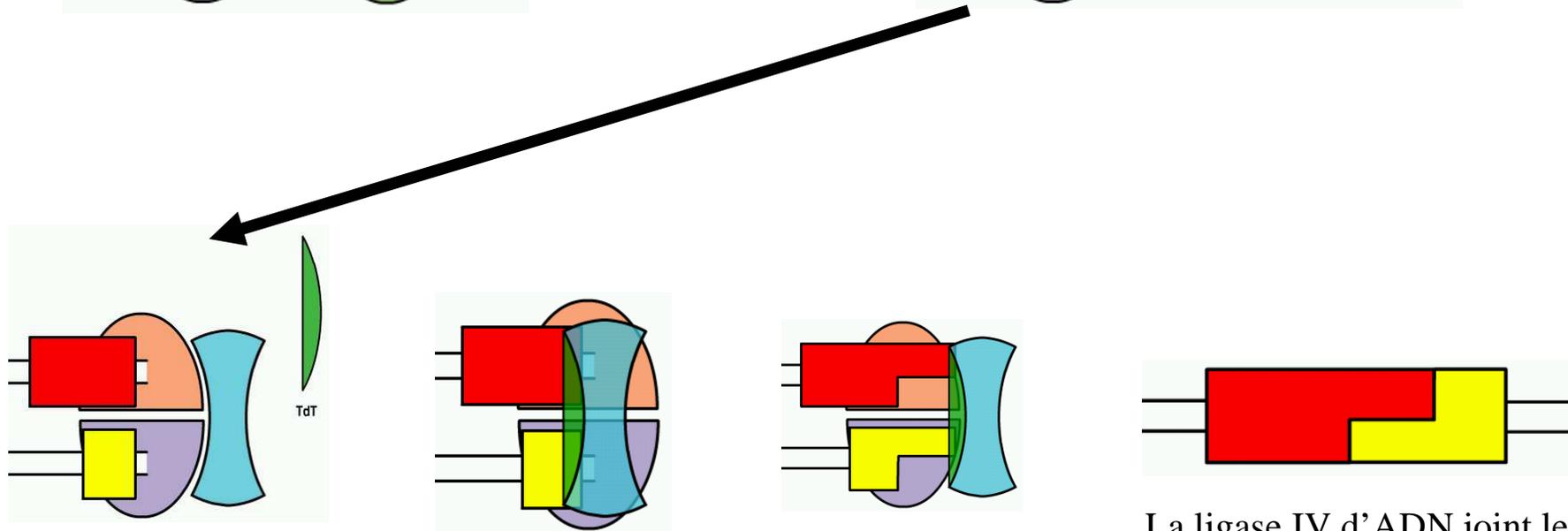
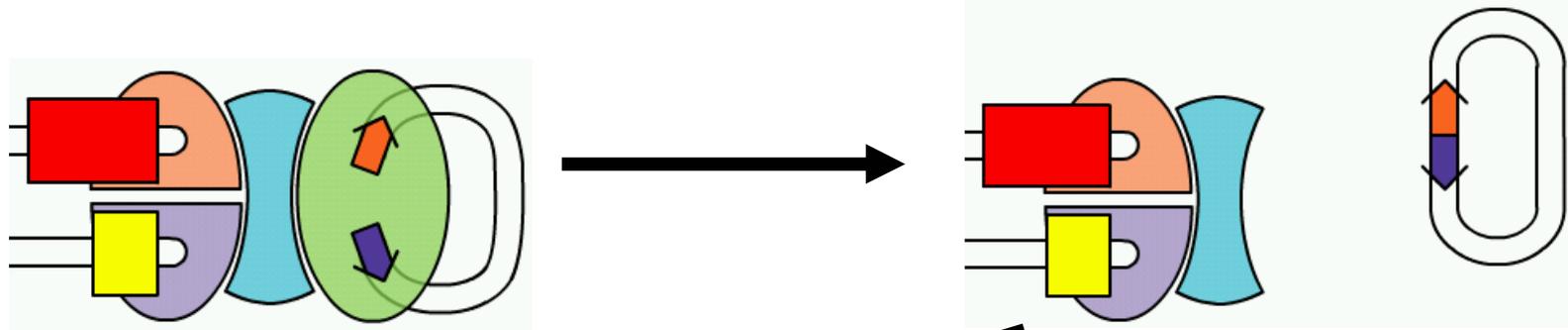


Puis une recombinase (complexe Ku80/DNA Pkcs) se lie à l'épingle à cheveux



# Mécanismes de la recombinaison (2)

Les segments RSS sont joints pour former le « signal joint »



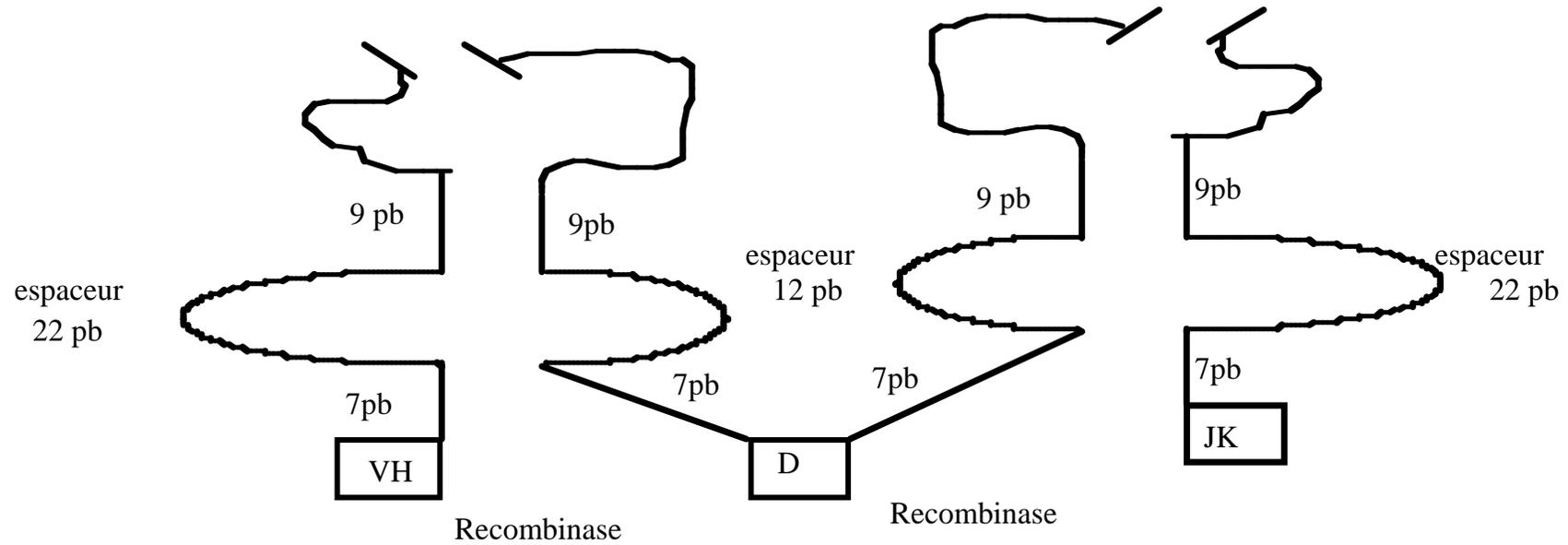
Des nucléotides sont enlevés ou ajoutés (exonucléase et TdT)

La ligase IV d'ADN joint les extrémités pour former le « joint codant »

# Exclusion isotypique et exclusion allélique

- Un seul allèle de chaîne lourde
- un seul isotype de chaîne légère est exprimé au niveau d'un lymphocyte B et cet isotype n'est codé que par l'un des deux allèles
- recombinaison séquentielle des allèles des gènes des chaînes légères kappa puis lambda

# Recombinaison des chaînes lourdes

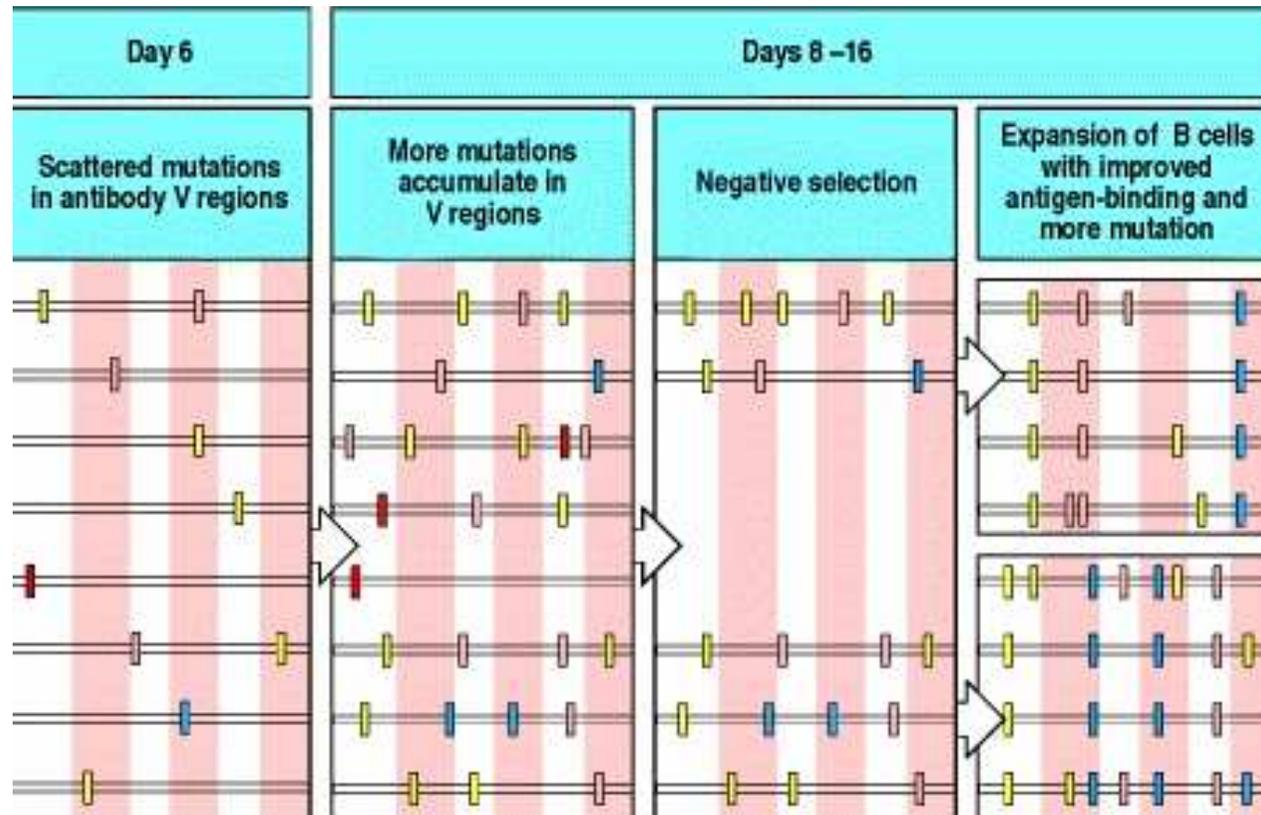


# Diversité du répertoire

- Diversité combinatoire
- Diversité jonctionnelle (P) par imprécision de la recombinaison aux zones de jonction V-D-J ou V-J
- Diversité N par insertion ou délétion d'un nucléotide lors de la recombinaison sous l'action de la terminal transférase (Tdt) jusqu'à 20 nucléotides.
- Recombinaison entre gènes VH par substitution d'un ou d'une partie d'un deuxième gène VH à un segment VH-D-JH déjà recombiné.



# Hypermutations somatiques

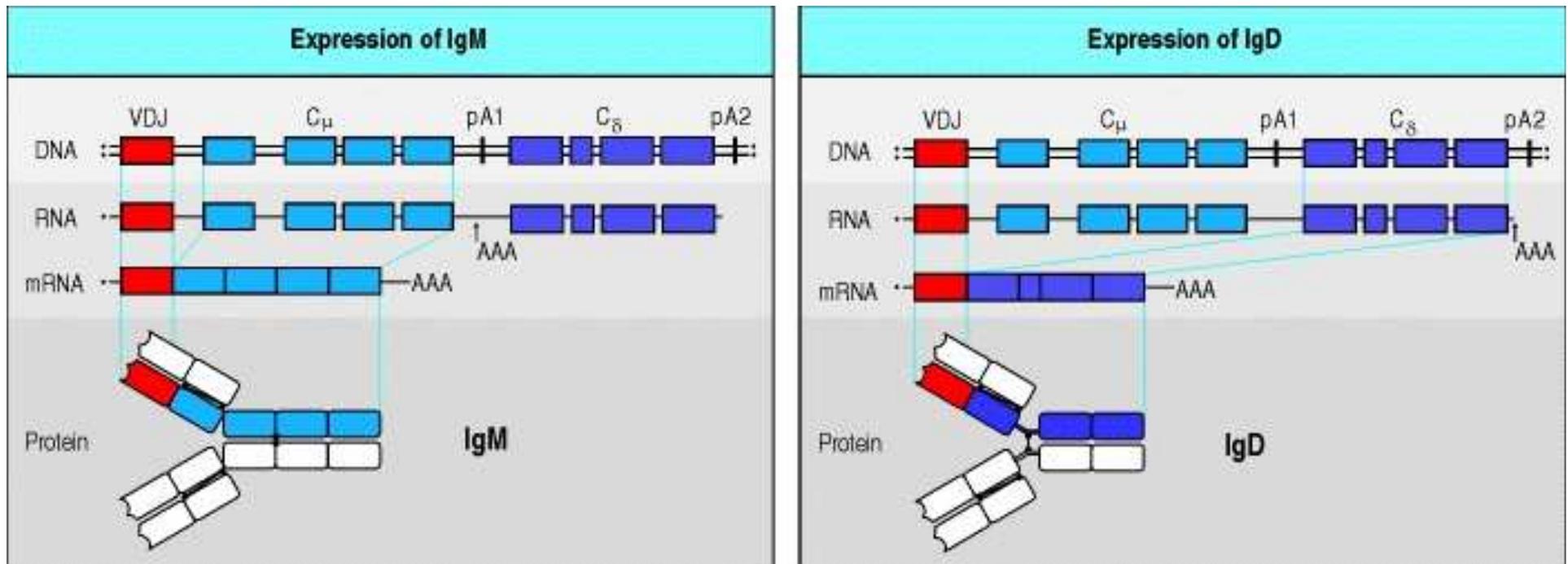


Analyse des mutations de la région V d'un clone après immunisation

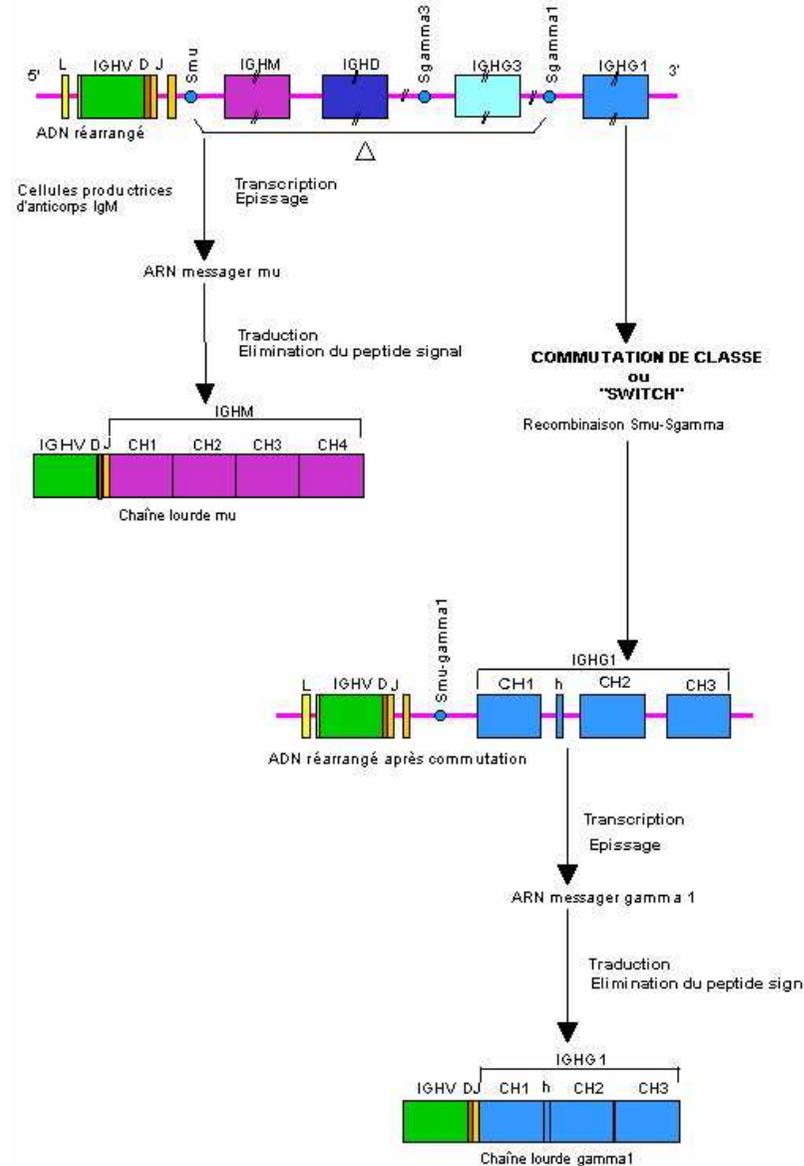
# Commutation de classes d'Ig

- Définition
- Présence de séquence S (Switch)
- Recombinase spécifique de classes
- Rôle de CD40-CD40ligand (CD154) pour activer avec l'IL-4 l'AID
- Rôle de cytokines pour induire une commutation

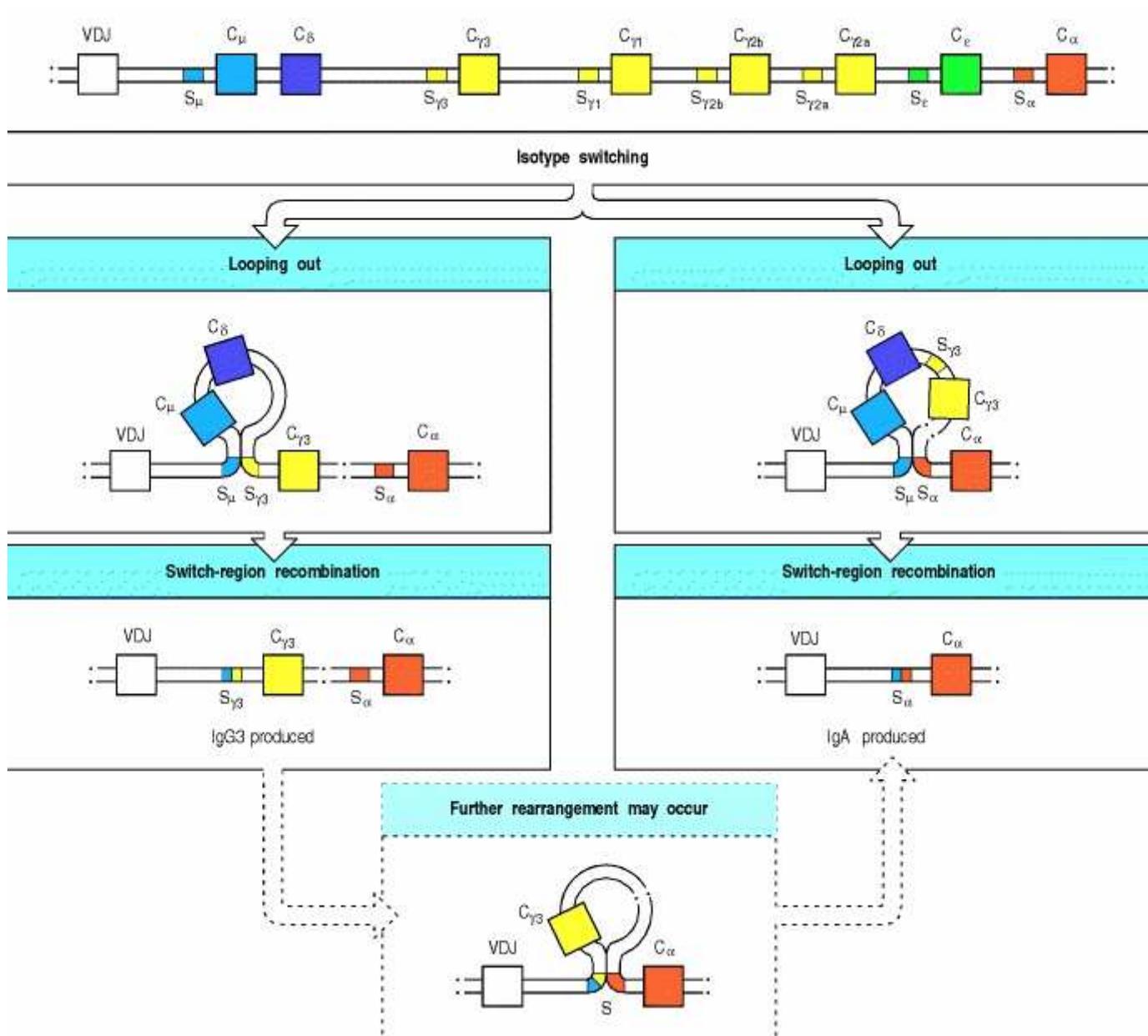
# Co-expression d'IgM et IgD sur le lymphocyte B mature



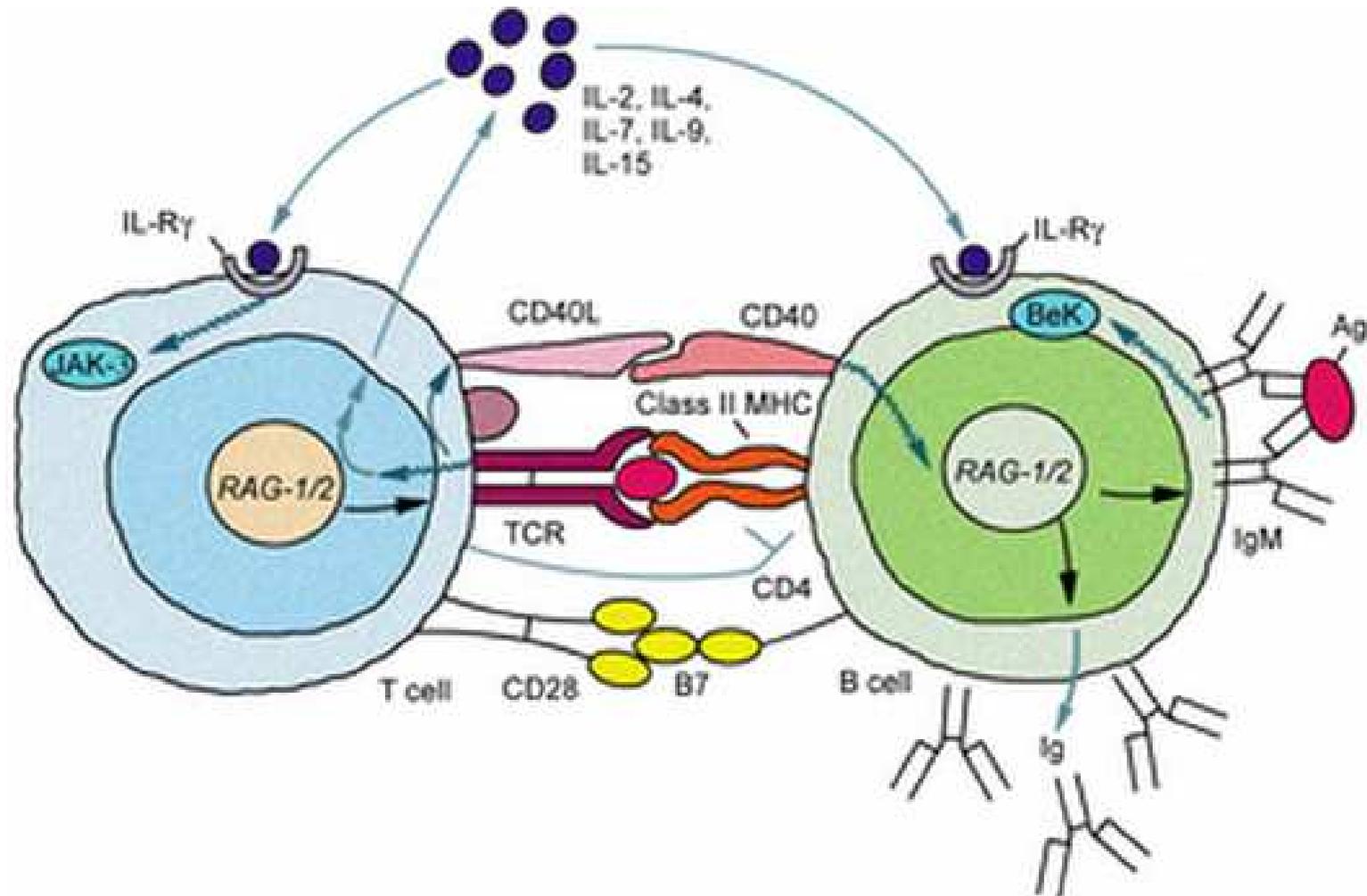
# Commutation d'Isotypes d'Ig



# Commutation de classes



# Mécanisme de la commutation



# Rôles de différentes enzymes dans la commutation

- Activation-Induced (Cytidine) Deaminase (AID) qui convertit des cytosines en Uracils au niveau des séquences S
- Uracil DNA glycosylase (UNG) qui enlève les bases dU
- Apyrimidic/apurinic-endonuclease (APE) qui répare les sites sans bases.

# Régulation de la commutation

- Interaction CD40 / CD40 ligand
- Rôles des cytokines sur les promoteurs des parties constantes
  - IL-4 ( $\rightarrow$ STAT6), IL-13  $\rightarrow$  IgE
  - TGF $\beta$  ( $\rightarrow$ Smad et Runx),  $\rightarrow$  IgA
  - IFN- $\gamma$
  - IL-10
  - IL-21  $\rightarrow$  IgG1, IgG3 (Eur Cytokine Netw. 2008 ;19:30-6. )

# Paradoxe des Ig

- Le site anticorps formé par l'assemblage des domaines variables est « relativement » constant (codé par VDJ et VJ) à partir du stade B immature (exception des mutations ponctuelles dans le centre germinatif)
- La partie constante de l'Ig va varier grâce aux mécanismes de commutation isotypique

# Bilan de la diversité des chaînes d'Ig

Locus	Immunoglobulines		
	IGH	IGK	IGL
Chaînes polypeptidiques	H	$\kappa$	$\lambda$
Localisation chromosomique	14q323.3	2p12	22q11.2
nbre de gènes V	39-46	34-37	30-33
nbre de sous-groupes	6-7	5	11
nbre de segments D	23	0	0
nbre de segments J	6	5	4-5
nbre de gènes C	9	1	4-5
Nbre de réarrangements	2	1	1
Type de réarrangements	V-D-J	V-J	V-J
Diversité combinatoire	+++	++	++
Diversité N (jonctionnelle)	+++	-	-
Mutations somatiques	++	++	++

# Bilan des recombinaisons

Chaîne	Kappa	Lambda	Lourde
Gène V	80-200	100	100
Gène D			50
Gène J	5	7 dont 3 $\phi$	6+3 $\phi$
Gène C	1	7 dont 3 $\phi$	9
Possibilités	400-1000	400	30 000
Diversité	$4 \times 10^3 - 10^4$	$4 \times 10^3$	$3 \times 10^6$

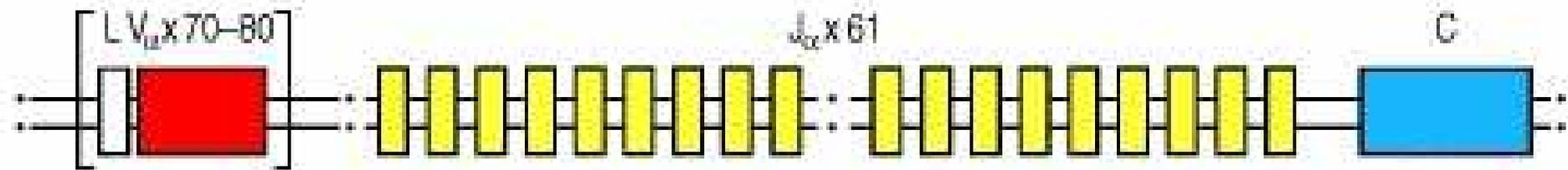
"Possibilités théoriques" =  $((4000-10000) \times 3000000) + (4000 \times 3000000) = [24-42] \times 10^9$  possibilités

# Génétique du TCR $\alpha\beta$

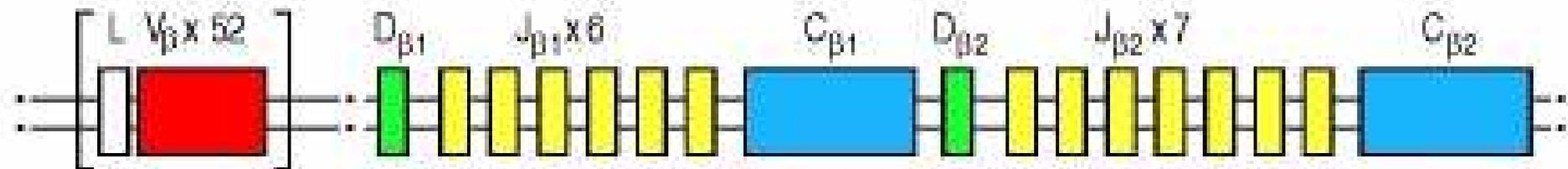
Ch 14q11.2

$10^4$  possibilités

$\alpha$ -chain locus



$\beta$ -chain locus



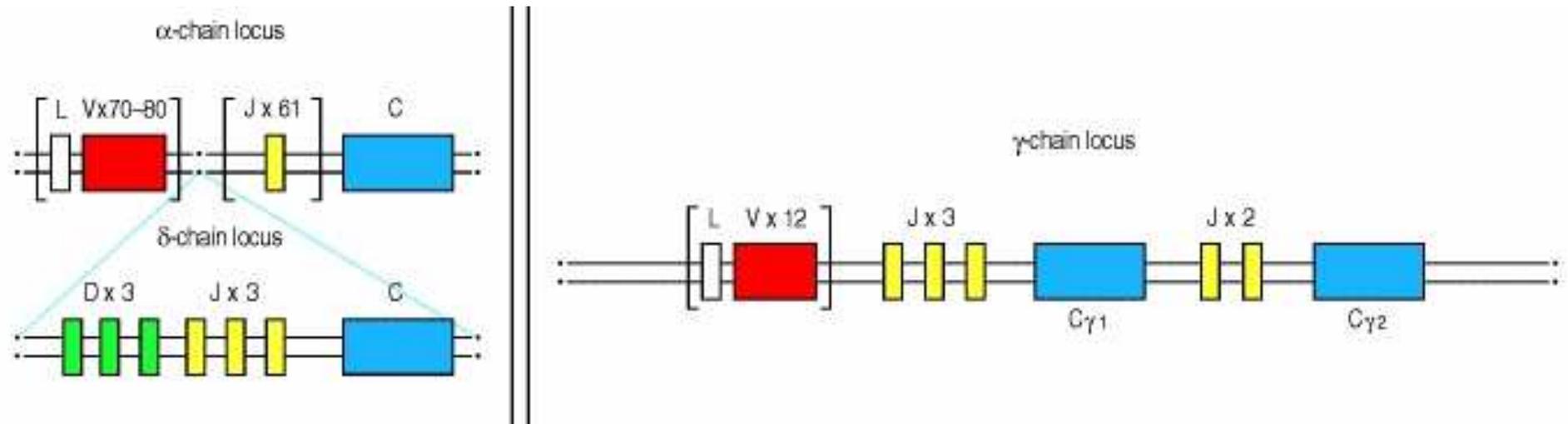
Ch 7q34

$10^8$  possibilités

# Génétique du TCR $\gamma\delta$

Ch 14q11.2

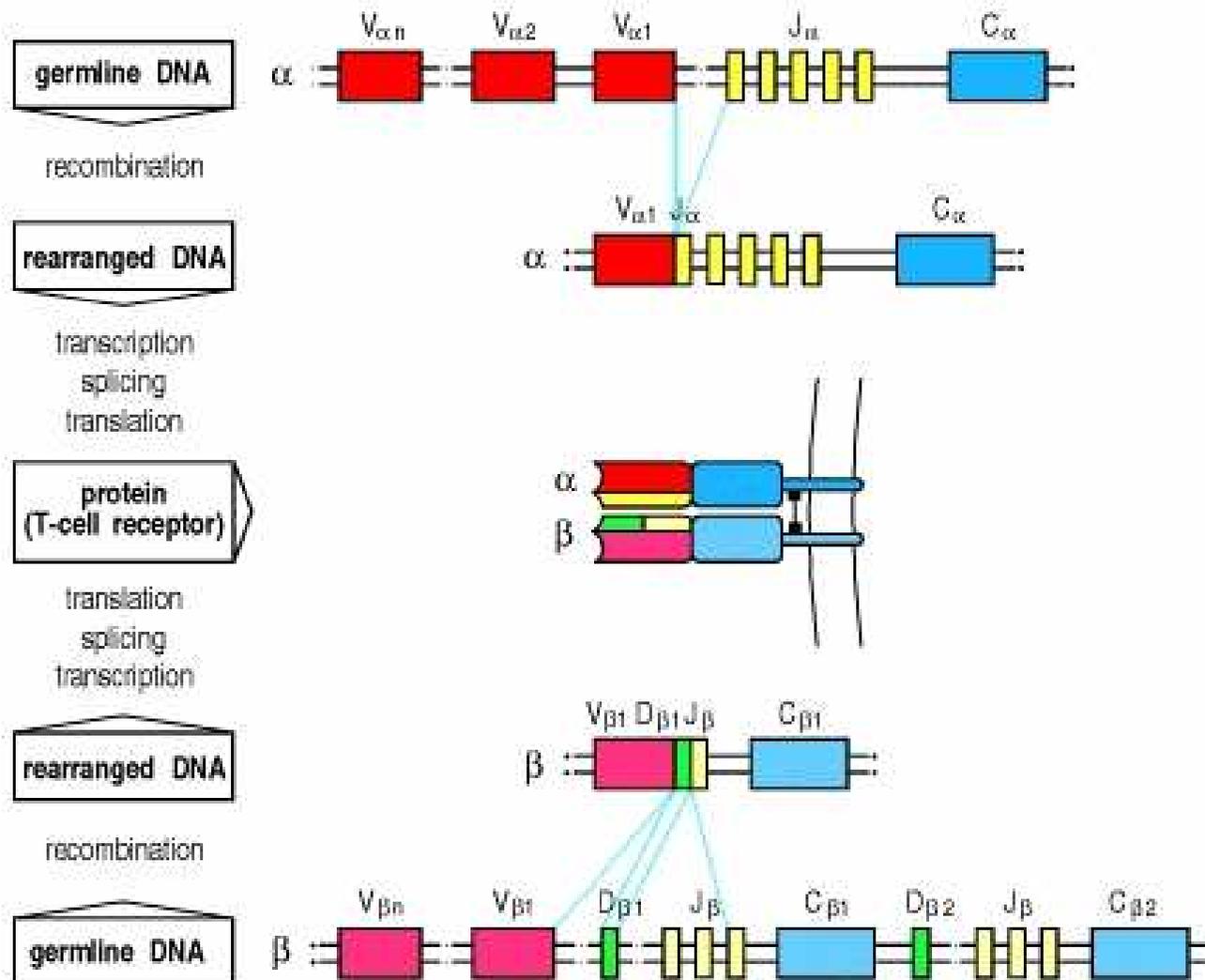
Ch 7p14



$10^8$  possibilités

$10^4$  possibilités

# Réarrangement du TCR



# Bilan global de la diversité

Element	Immunoglobulin		$\alpha:\beta$ receptors	
	H	$\kappa+\lambda$	$\beta$	$\alpha$
Variable segments (V)	65	70	52	~70
Diversity segments (D)	27	0	2	0
D segments read in 3 frames	rarely	—	often	—
Joining segments (J)	6	5( $\kappa$ ) 4( $\lambda$ )	13	61
Joints with N- and P-nucleotides	2	50% of joints	2	1
Number of V gene pairs	$3.4 \times 10^6$		$5.8 \times 10^6$	
Junctional diversity	$\sim 3 \times 10^7$		$\sim 2 \times 10^{11}$	
Total diversity	$\sim 10^{14}$		$\sim 10^{18}$	