

DES de Biologie Médicale
Enseignement d'Immunologie



CM4.1

Immunoglobulines, Antigènes & Réaction Antigène-Anticorps

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

Phnom Penh
septembre 2009

DESCL12009, Phnom Penh

1

Immunoglobulines, Antigènes & Réaction Antigène-Anticorps

1. Immunogénicité & Antigénicité
2. Epitope
3. Structure des anticorps
4. Site anticorps
5. Propriétés fonctionnelles
6. Réaction antigène-anticorps
7. Conclusion

DESCL12009, Phnom Penh

2

Immunoglobulines, Antigènes & Réaction Antigène-Anticorps

1. Immunogénicité & Antigénicité
2. Epitope
3. Structure des anticorps
4. Site anticorps
5. Propriétés fonctionnelles
6. Réaction antigène-anticorps
7. Conclusion

DESCL12009, Phnom Penh

3

Définitions

- Immunogénicité:
capacité à induire une réponse immunitaire humorale ou à médiation cellulaire

Cellule B + Antigène → Cellule B effectrice + Cellule B mémoire
→ Anticorps

Cellule T + Antigène → Cellule T effectrice + Cellule T mémoire
→ cytokines
→ facteurs cytotoxiques

- Antigénicité:
capacité à se combiner "spécifiquement" avec les produits des réponses ci-dessus
→ par ex. Antigène+Anticorps

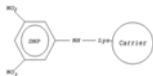
DESCL12009, Phnom Penh

4

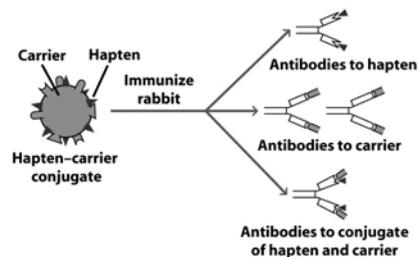
Découverte des haptènes

Haptène:

- Antigène non immunogène
- Haptène seul → pas de production d'anticorps
- Haptène couplé à un porteur → immunogène
- Porteur (*carrier*) = protéine immunogène homopolymère non immunogène
- Découverte par Landsteiner (1910)
- établit spécificité de la réponse anticorps
- démontre extraordinaire diversité des anticorps
- Permet d'étudier la réponse anticorps contre des déterminants chimiques précisément définis et modifiables



Réponse anticorps anti-haptène



Injection with:	Antibodies formed:
Haptene (DNP)	None
Protein carrier (BSA)	Anti-BSA
Haptene-carrier conjugate (DNP-BSA)	Anti-DNP (major)
	Anti-BSA (minor)
	Anti-DNP/BSA (minor)

Figure 4-1
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Spécificité de la réponse anti-haptène

TABLE 4-1 Reactivity of antisera with various haptens

Antiserum against	REACTIVITY WITH			
	 Aminobenzene (aniline)	 o-Aminobenzoic acid	 m-Aminobenzoic acid	 p-Aminobenzoic acid
Aminobenzene	+	0	0	0
o-Aminobenzoic acid	0	+	0	0
m-Aminobenzoic acid	0	0	+	0
p-Aminobenzoic acid	0	0	0	+

KEY: 0 = no reactivity; + = strong reactivity
SOURCE: Based on K. Landsteiner, 1962, *The Specificity of Serologic Reactions*, Dover Press. Modified by J. Klein, 1982, *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, Wiley.

Table 4-1
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Caractéristiques des immunogènes

L'immunogénicité est déterminée par:

- Caractère étranger de l'antigène (soi/non-soi)
→ la BSA n'est pas immunogène chez la vache
- Taille moléculaire
→ en général <10kDa = mauvais immunogène
→ ~100kDa = meilleurs immunogènes
- Composition et hétérogénéité chimique
→ complexité ↑; hétéropolymère >> homopolymère
→ influence des quatre niveaux d'organisation des protéines

Rappel sur la structure des protéines

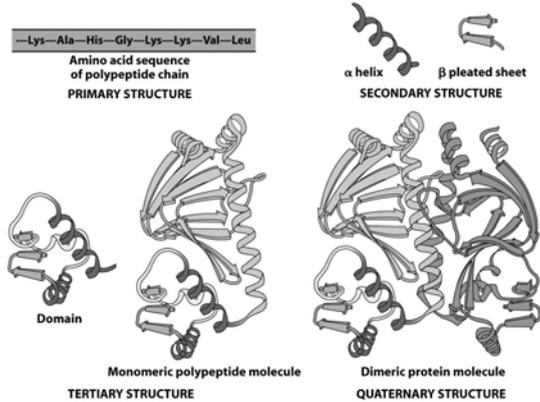


Figure 4-2
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Caractéristiques des immunogènes

L'immunogénicité est déterminée par:

- Caractère étranger de l'antigène (soi/non-soi)
→ la BSA n'est pas immunogène chez la vache
- Taille moléculaire
→ en général <10kDa = mauvais immunogène
→ ~100kDa = meilleurs immunogènes
- Composition et hétérogénéité chimique
→ complexité ↑ ↑; hétéropolymère >> homopolymère
→ influence des quatre niveaux d'organisation des protéines
- Couplages lipides/protéines, sucres/protéines
→ obtention d'anticorps anti-acides gras (Vit. E, stéroïdes...)
- Sensibilité à l'apprêtement/présentation
→ les anticorps reconnaissent l'Ag directement
→ les TCR reconnaissent des peptides présentés par le CMH

Immunogénicité & Présentation

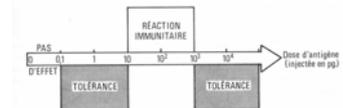
Characteristic	B cells	T cells
Interaction with antigen	Involves binary complex of membrane Ig and Ag	Involves ternary complex of T-cell receptor, Ag, and MHC molecule
Binding of soluble antigen	Yes	No
Involvement of MHC molecules	None required	Required to display processed antigen
Chemical nature of antigens	Protein, polysaccharide, lipid	Mostly proteins, but some lipids and glycolipids presented on MHC-like molecules
Epitope properties	Accessible, hydrophilic, mobile peptides containing sequential or nonsequential amino acids	Internal linear peptides produced by processing of antigen and bound to MHC molecules

Table 4-2
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Immunogénicité & Facteurs biologiques

L'immunogénicité est modifiée par:

- Génotype du receveur
→ rôle essentiel du CMH
- Taux et voie d'administration
→ dose et voie optimale dépend de l'Ag
→ plus est l'ennemi du bien



- Adjuvant
→ du latin *adjuvare*, aider
→ augmentation de l'immunogénicité: persistance Ag, signaux costimulation, inflammation locale, pouvoir mitogène

Adjuvants expérimentaux

Adjuvants that enhance immune responses		
Adjuvant name	Composition	Mechanism of action
Incomplete Freund's adjuvant	Oil-in-water emulsion	Delayed release of antigen; enhanced uptake by macrophages
Complete Freund's adjuvant	Oil-in-water emulsion with dead mycobacteria	Delayed release of antigen; enhanced uptake by macrophages; induction of co-stimulators in macrophages
Freund's adjuvant with MDP	Oil-in-water emulsion with muramyl dipeptide (MDP), a constituent of mycobacteria	Similar to complete Freund's adjuvant
Alum (aluminum hydroxide)	Aluminum hydroxide gel	Delayed release of antigen; enhanced macrophage uptake
Alum plus <i>Bordetella pertussis</i>	Aluminum hydroxide gel with killed <i>B. pertussis</i>	Delayed release of antigen; enhanced uptake by macrophages; induction of co-stimulators
Immune stimulatory complexes (ISCOMs)	Matrix of Oul A containing viral proteins	Delivers antigen to cytosol; allows induction of cytotoxic T cells

Figure A-4 Immunobiology, 6/e. © Garland Science 2005

Ag thymo-dépendant et thymo-indépendant

Property	TD antigens	TI antigens	
		Type 1	Type 2
Chemical nature	Soluble protein	Bacterial cell-wall components (e.g., LPS)	Polymeric protein antigens; capsular polysaccharides
Humoral response			
Isotype switching	Yes	No	Limited
Affinity maturation	Yes	No	No
Immunologic memory	Yes	No	No
Polyclonal activation	No	Yes (high doses)	No

Table 11-2
Auby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

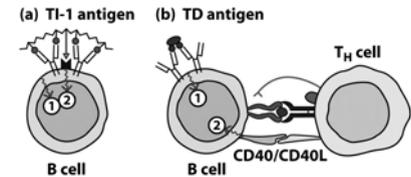


Figure 11.3
Auby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Immunoglobulines, Antigènes & Réaction Antigène-Anticorps

1. Immunogénicité & Antigénicité
2. **Epitope**
3. Structure des anticorps
4. Site anticorps
5. Propriétés fonctionnelles
6. Réaction antigène-anticorps
7. Conclusion

Epitope: définition

- L'épitope (ou déterminant antigénique) correspond à la portion discrète de l'antigène qui entre en contact avec le récepteur spécifique d'antigène (anticorps ou TCR)
- Epitopes reconnus par les anticorps
 - Accessibilité (reconnaissance directe)
 - Séquentiel ou Linéaire (ex. 6-8 aa hélice α en surface)
 - Non séquentiel ou Conformationnel
 - Chevauchants
 - Epitopes conformationnels plus sensibles à la dénaturation ménagée de l'antigène
- Un épitope peut être immunodominant

Exemple d'épitopes

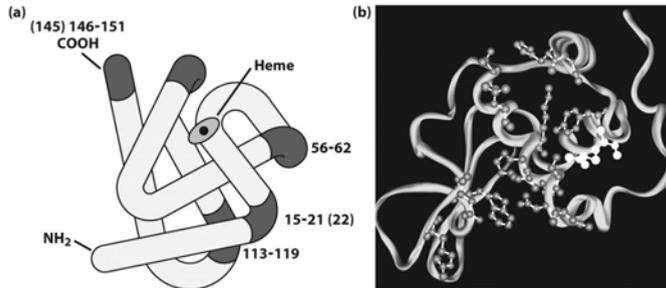


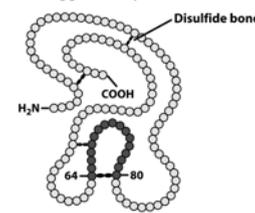
Figure 4-3
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Myoglobine de cachalot

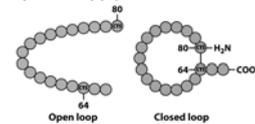
Lysozyme d'œuf de poule

Liaison d'un épitope conformationnel

Hen egg-white lysozyme



Synthetic loop peptides



Inhibition of reaction between HEL loop and anti-loop antiserum

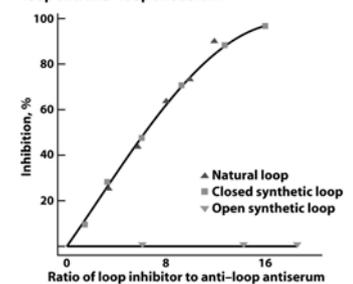


Figure 4-4c
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Immunoglobulines, Antigènes & Réaction Antigène-Anticorps

1. Immunogénicité & Antigénicité
2. Epitope
3. **Structure des anticorps**
4. Site anticorps
5. Propriétés fonctionnelles
6. Réaction antigène-anticorps
7. Conclusion

La molécule anticorps

- La molécule anticorps ou immunoglobuline est un hétérodimère composé de 2 chaînes lourdes (IgH) et 2 chaînes légères (IgL κ ou λ)

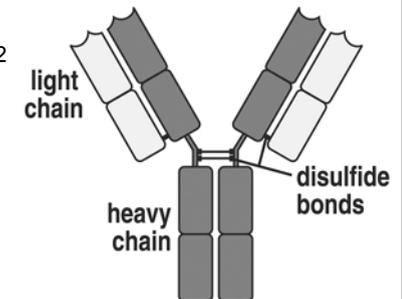


Figure 3-2 Immunobiology, 6/e (© Garland Science 2005)

La molécule anticorps

- La molécule anticorps ou immunoglobuline est un hétérodimère composé de 2 chaînes lourdes (IgH) et 2 chaînes légères (IgL κ ou λ)
- Chaque chaîne comprend une région constante et une région variable

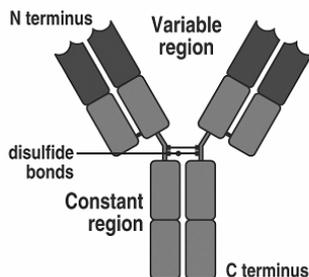


Figure 3-1 part 3 of 3 Immunobiology, 6/e. © Garland Science 2005

La molécule anticorps

- La molécule anticorps ou immunoglobuline est un hétérodimère composé de 2 chaînes lourdes (IgH) et 2 chaînes légères (IgL κ ou λ)
- Chaque chaîne comprend une région constante et une région variable
- Les chaînes IgH et IgL sont organisées en domaines
- La région variable porte le site de liaison à l'antigène ou site anticorps (Ac)

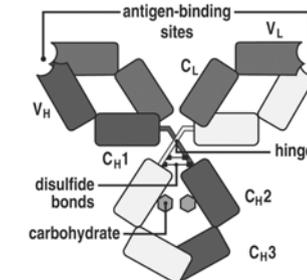


Figure 3-1 part 3 of 3 Immunobiology, 6/e. © Garland Science 2005

Immunoglobulines sériques

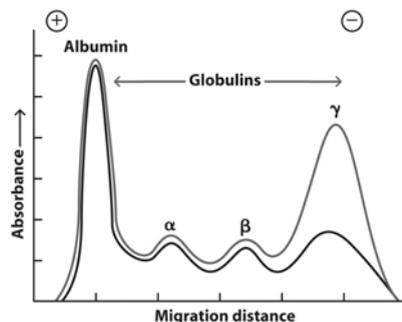
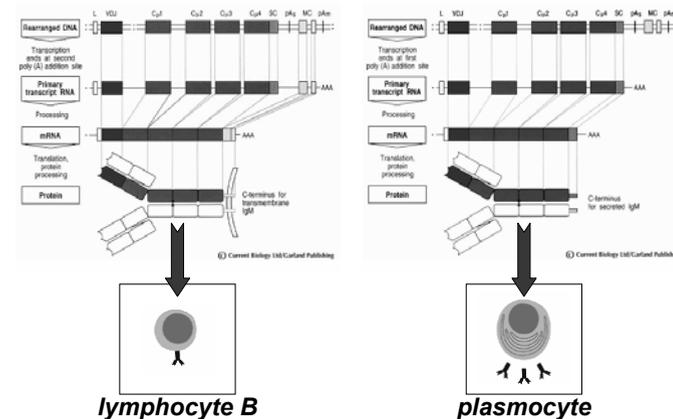


Figure 4-5
Avery IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2005 W. H. Freeman and Company

Les immunoglobulines produites par les cellules B sont principalement retrouvées dans la fraction sérique des γ -globulines (expériences de Tiselius et Kabat, 1929)

Ig membranaire – Ig sécrétée



Structure 3D de l'anticorps

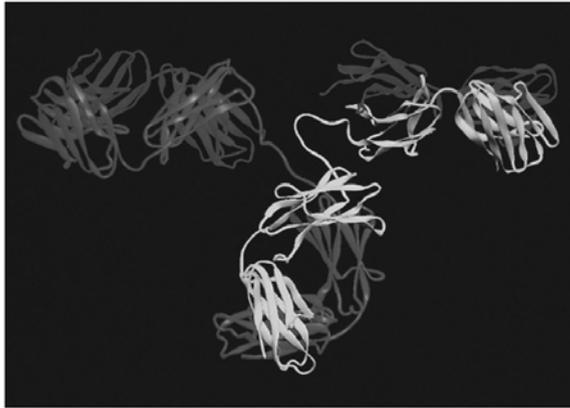


Figure 3-1 part 1 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Propriétés structurales

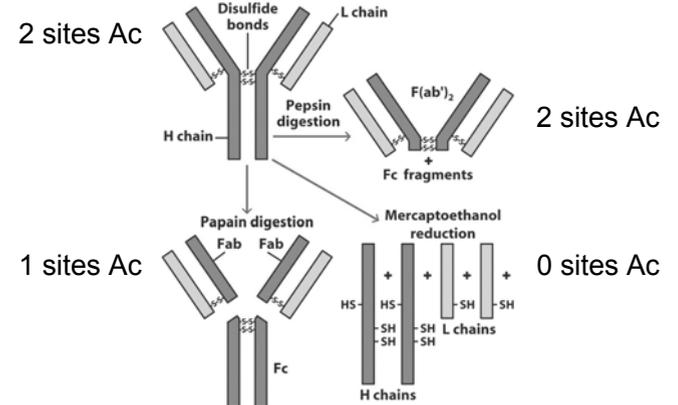


Figure 4-7 Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition © 2007 W. H. Freeman and Company

5 classes d'immunoglobulines

	Immunoglobulin								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Heavy chain	γ ₁	γ ₂	γ ₃	γ ₄	μ	α ₁	α ₂	δ	ε
Molecular weight (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Serum level (mean adult mg ml ⁻¹)	9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.03	5 × 10 ⁻⁵
Half-life in serum (days)	21	20	7	21	10	6	6	3	2

Figure 4-17 part 1 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

5 classes d'immunoglobulines

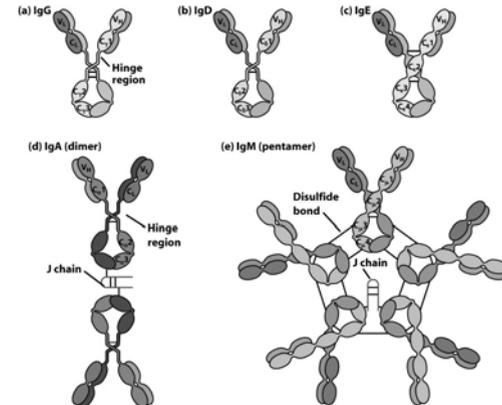


Figure 4-17 Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition © 2007 W. H. Freeman and Company

Organisation des gènes C du locus IgH

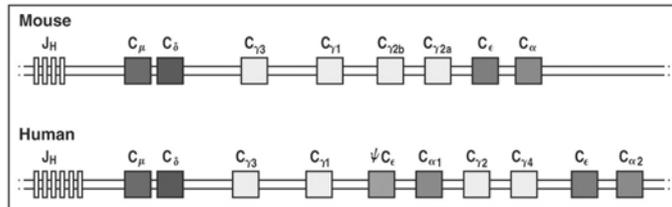


Figure 4-19 Immunobiology, 6/e. © Garland Science 2005

Organisation des domaines Ig (1)

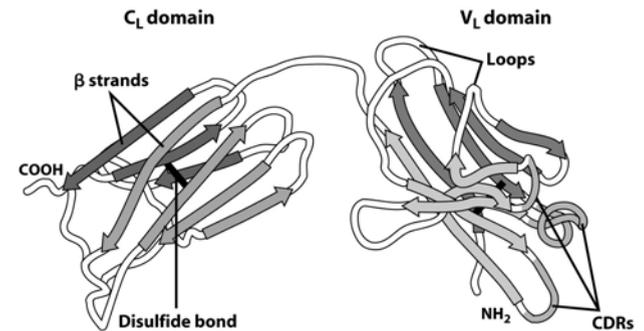


Figure 4-11a
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Organisation des domaines Ig (2)

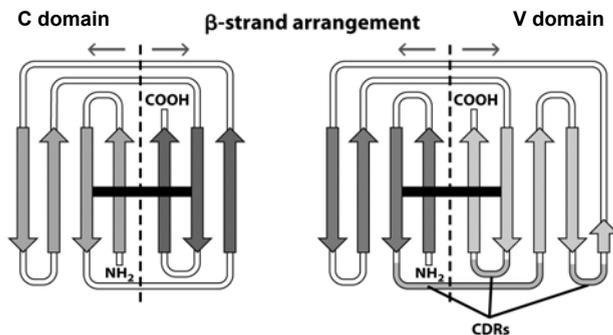


Figure 4-11b
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Immunoglobulines, Antigènes & Réaction Antigène-Anticorps

1. Immunogénicité & Antigénicité
2. Epitope
3. Structure des anticorps
4. **Site anticorps**
5. Propriétés fonctionnelles
6. Réaction antigène-anticorps
7. Conclusion

Régions hypervariables → Site Ac (1)

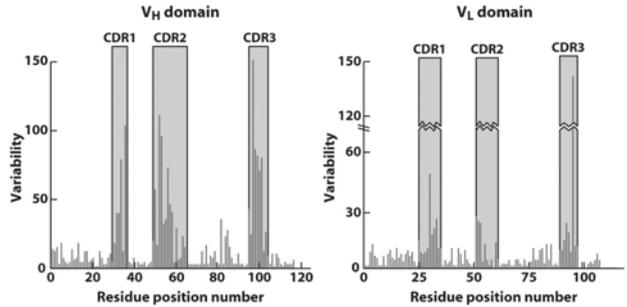


Figure 4-12
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Régions hypervariables → Site Ac (2)

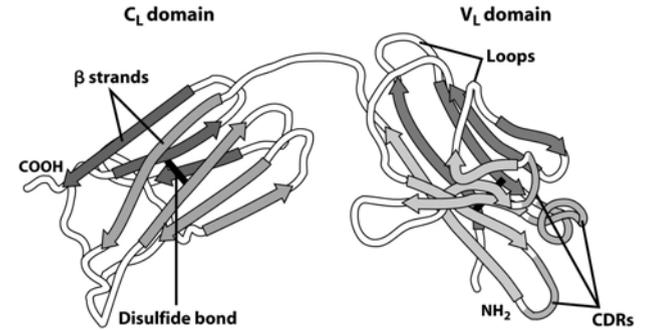


Figure 4-11a
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Le site anticorps est donc formé par les 6 régions CDR:
CDR1/CDR2/CDR3 IgH + CDR1/CDR2/CDR3 IgL

Site anticorps = forme

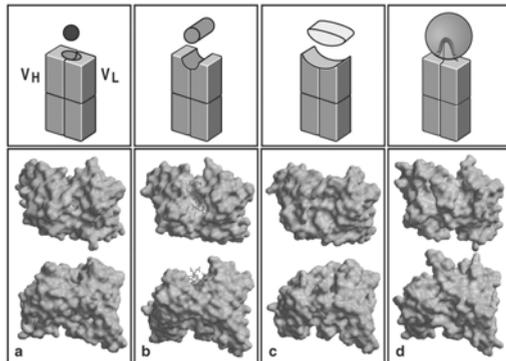


Figure 3-8 Immunobiologie, 4/e, © Garland Science 2005

Le site anticorps adopte une forme (structure stéréochimique) qui va interagir avec l'antigène.

Epitope & Paratope

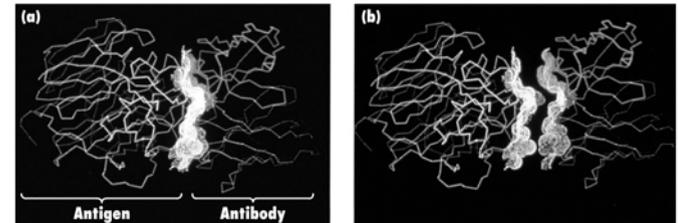


Figure 4-13
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

L'épitope (sur l'Ag) interagit directement avec le paratope (dans le site Ac).

Immunoglobulines, Antigènes & Réaction Antigène-Anticorps

1. Immunogénicité & Antigénicité
2. Epitope
3. Structure des anticorps
4. Site anticorps
- 5. Propriétés fonctionnelles**
6. Réaction antigène-anticorps
7. Conclusion

DESCL2009, Phnom Penh

37

Région charnière et flexibilité

- La région charnière entre les domaines CH1 et CH2 des Ig γ , Ig δ et Ig α assure la flexibilité de l'Ac.
- Le domaine CH2 des Ig μ et Ig ϵ assure la même fonction.

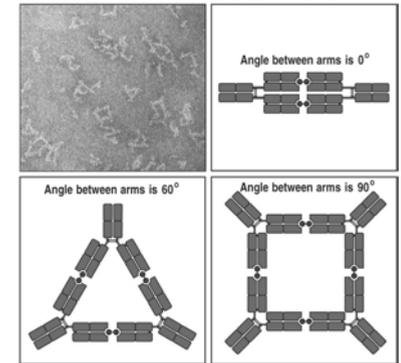


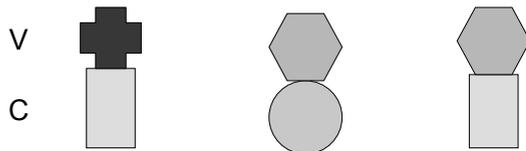
Figure 3-4 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

DESCL2009, Phnom Penh

38

Fonctions anticorps et effectrice

Fonction spécifique = Fonction anticorps



Fonction non spécifique = Fonction effectrice

DESCL2009, Phnom Penh

39

Propriétés fonctionnelles des anticorps

	Immunoglobulin								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Classical pathway of complement activation	++	+	+++	-	+++	-	-	-	-
Alternative pathway of complement activation	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Placental transfer	+++	+	++	+	-	-	-	-	-
Binding to macrophage and phagocyte Fc receptors	+	-	+	+	-	+	+	-	+
High-affinity binding to mast cells and basophils	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Reactivity with staphylococcal Protein A	+	+	-	+	-	-	-	-	-

Figure 4-17 part 2 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

DESCL2009, Phnom Penh

40

Immunoglobulines, Antigènes & Réaction Antigène-Anticorps

1. Immunogénicité & Antigénicité
2. Epitope
3. Structure des anticorps
4. Site anticorps
5. Propriétés fonctionnelles
- 6. Réaction antigène-anticorps**
7. Conclusion

DESCL2009, Phnom Penh

41

La réaction antigène - anticorps

- La réaction antigène-anticorps est une association bimoléculaire semblable à une réaction enzyme-substrat.
- C'est une association non-covalente et réversible.
- Elle met en jeu plusieurs forces d'interaction:
 - Liaisons hydrogènes
 - Liaisons ioniques
 - Interactions hydrophobes
 - Forces de van der Waals

DESCL2009, Phnom Penh

42

Forces des interactions Ag-Ac

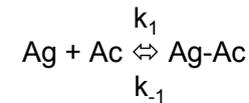
Noncovalent forces	Origin	
Electrostatic forces	Attraction between opposite charges	$-\text{NH}_3^+ \quad \text{OOC}^-$
Hydrogen bonds	Hydrogen shared between electronegative atoms (N,O)	$\text{>N}(\delta^-) - \text{H}(\delta^+) - \text{O}(\delta^-) = \text{C}(\delta^-)$
Van der Waals forces	Fluctuations in electron clouds around molecules oppositely polarize neighboring atoms	$\delta^+ \leftrightarrow \delta^-$ $\delta^- \leftrightarrow \delta^+$
Hydrophobic forces	Hydrophobic groups interact unfavorably with water and tend to pack together to exclude water molecules. The attraction also involves van der Waals forces	$\text{H}_2\text{O} \quad \text{H}_2\text{O} \quad \text{O} < \text{H}$ $\delta^+ \quad \delta^- \quad \delta^- \quad \delta^+$ $\text{H} \text{---} \text{H}$

Figure 3-9 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

DESCL2009, Phnom Penh

43

Réaction Ag-Ac & Affinité



- k_1 (L/mol/s) constante de vitesse aller (association)
- k_{-1} (s⁻¹) constante de vitesse retour (dissociation)
- $K_a = k_1 / k_{-1}$ constante d'association = affinité

$$K_a = [\text{Ag-Ac}] / [\text{Ag}] [\text{Ac}]$$

Rem: le modèle concerne la liaison d'un site de liaison anticorps (Ac) avec un antigène (Ag) monovalent.

DESCL2009, Phnom Penh

44

Exemples d'affinité de liaison Ag-Ac

Antibody	Ligand	k_1	k_{-1}	K_a	K_d
Anti-DNP	ϵ -DNP-L-lysine	8×10^7	1	1×10^8	1×10^{-8}
Anti-fluorescein	Fluorescein	4×10^8	5×10^{-3}	1×10^{11}	1×10^{-11}
Anti-bovine serum albumin (BSA)	Dansyl-BSA	3×10^5	2×10^{-3}	1.7×10^8	5.9×10^{-9}

SOURCE: Adapted from H. N. Eisen, 1990, *Immunology*, 3rd ed., Harper & Row, Publishers.

Table 6-1
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

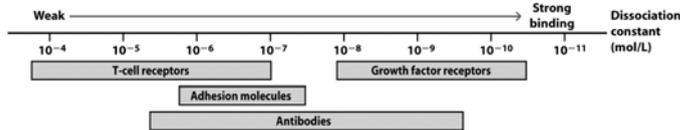


Figure 9-12a
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Mesure de la liaison Ag-Ac

Technique de dialyse à l'équilibre:

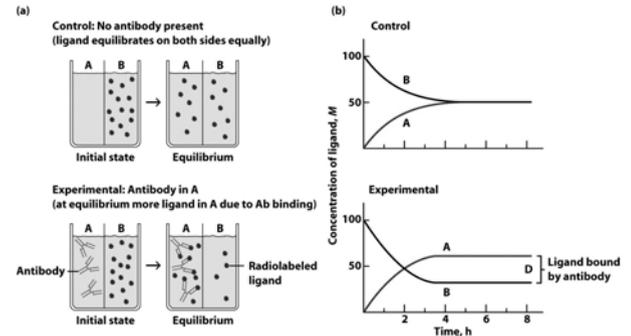


Figure 6-2
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Courbe de Scatchard

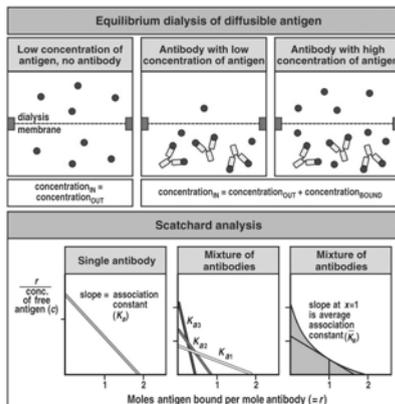


Figure A-11 Immunobiology, 6/e. © Garland Science 2005

Eq. de Scatchard:

$$r / c = K_a n - K_a r$$

$n = nb$ sites Ac = valence

IgG: $n = 2$

IgA: $n = 4$

IgM: $n = 10$

$c = [Ag]$

$$r = \frac{[Ag-Ac]}{[Ag-Ac] + [Ac]}$$

$$([Ac \text{ lié}] / [Ac \text{ total}])$$

Affinité & Avidité

- L'avidité est la résultante des affinités des multiples sites de liaison.
- L'avidité est une meilleure mesure de la capacité de liaison au sein d'un système biologique.
- Pour une IgG, avidité théorique maximale:
 $K_a \times K_a = K_{eq} = [Ag-Ac] / [Ag] [Ac]$
- En réalité, $K_{eq} < K_a^2$, en raison des contraintes géométriques. Néanmoins, $K_{eq} \gg K_a$.
- $K_{eq} \text{ IgM} > K_{eq} \text{ IgG}$ du fait de la valence IgM malgré $K_a \text{ IgM} < K_a \text{ IgG}$.

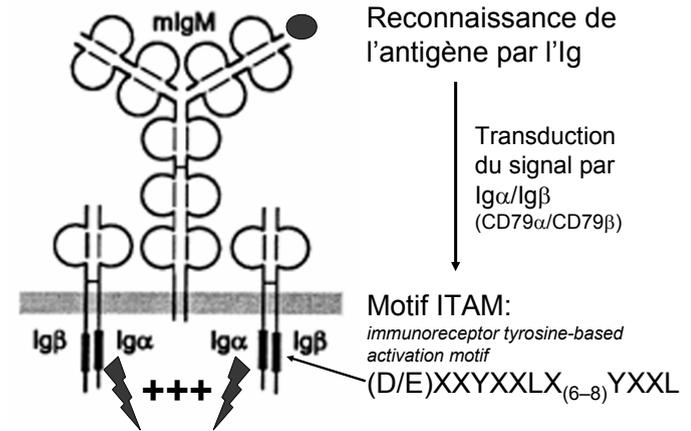
Immunoglobulines, Antigènes & Réaction Antigène-Anticorps

1. Immunogénicité & Antigénicité
2. Epitope
3. Structure des anticorps
4. Site anticorps
5. Propriétés fonctionnelles
6. Réaction antigène-anticorps
7. **Conclusion**

DESCL2009, Phnom Penh

49

Transduction du signal BCR

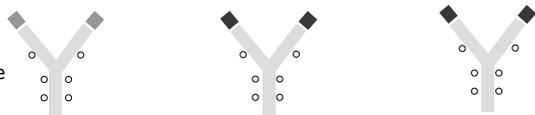


DESCL2009, Phnom Penh

50

Isotypie, Allotypie, Idiotypie

Isotypie
→ Variabilité fonctionnelle



Allotypie
→ Variabilité individuelle



Idiotypie
→ Variabilité particulière



← Individu A →

← Individu B →

DESCL2009, Phnom Penh

51

Anticorps polyréactifs

Table III. Polyreactivity of anti-DNA mAbs with or without N-addition in H-CDR3^a

mAb	N-region(s) in H-CDR3	Actin	Myosin	Thyroglobulin	IgG
64.9D	N ⁺	-	-	-	-
64.22.2	N ⁺	+++	+++	+++	+
70.1.4	N ⁺	+	+	+	-
70.3.1	N ⁺	+	+	-	-
64.3All	N ⁺	+	+	+	+++
A.24.7	N ⁰	-	-	-	-
3.4.1	N ⁰	++	+	++	-
A.18.13	N ⁰	-	-	-	-
64.18A1	N ⁰	-	-	-	-
8.46.2	N ⁰	-	-	-	-
8.3.6	N ⁰	+	+++	-	-
A.1.11	N ⁰	-	-	-	-
64.8DI	N ⁰	-	-	-	-
27.3E1a	N ⁰	++	+++	+++	+++

^a Binding of supernatant mAbs (1 μg/ml) to immobilized Ags was tested by ELISA. The results are expressed as the OD at 492 nm: (-) represents OD < 0.1; +, 0.1 < OD < 0.3; ++, 0.3 < OD < 0.5; +++, OD > 0.5. In both N⁺ and N⁰ groups, mAbs were classified in decreasing order of their relative avidity for ssDNA (cf Fig. 1).

Comment?

- Epitope redondant
- Epitopes dégénéré
- Epitopes distincts
- ...

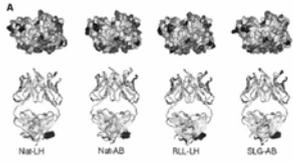
Weller, S. et al. (1997) *J.Immunol.* 159:3890-3898.

DESCL2009, Phnom Penh

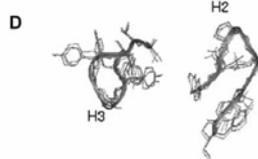
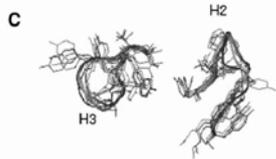
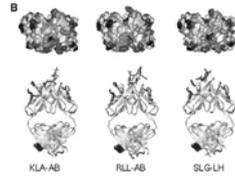
52

Reconnaissances...

4 structures différentes sans Ag



Structures avec 3 Ag différents

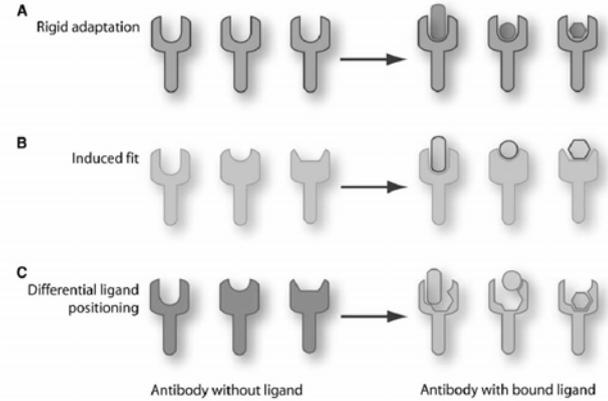


Superposition des régions CDRs

DESCL2009, Phnom Penh

Sethi et al. (2006) *Immunity* 24, 429-438

Reconnaissances...



DESCL2009, Phnom Penh

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