

## Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

Adrien Six

Université Pierre et Marie Curie

IF2004 BF-IVc&Vd

1<sup>er</sup> mars 2004

## Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

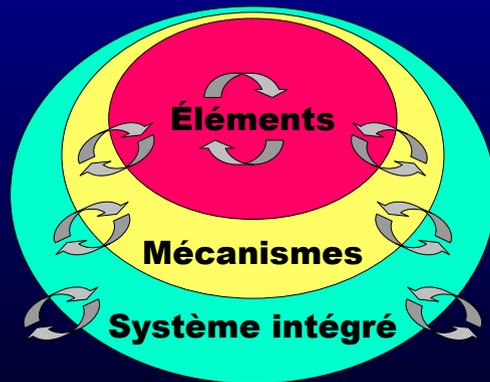
## Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

## 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<sup>ème</sup> 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. Erlich (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



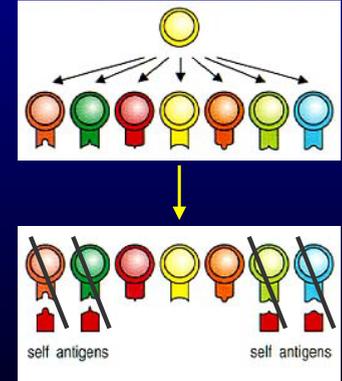
## Théories de la diversité des Ac

- **Théorie sélective** de Ehrlich 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)

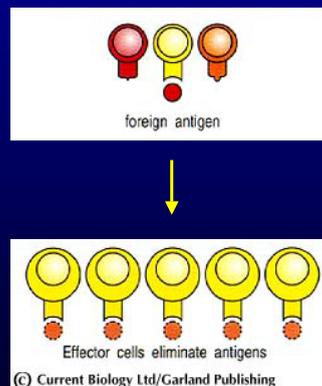
Burnet (1899–1985)

- 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 donnent expriment des récepteurs de même spécificité



## Théorie de la sélection clonale (3)

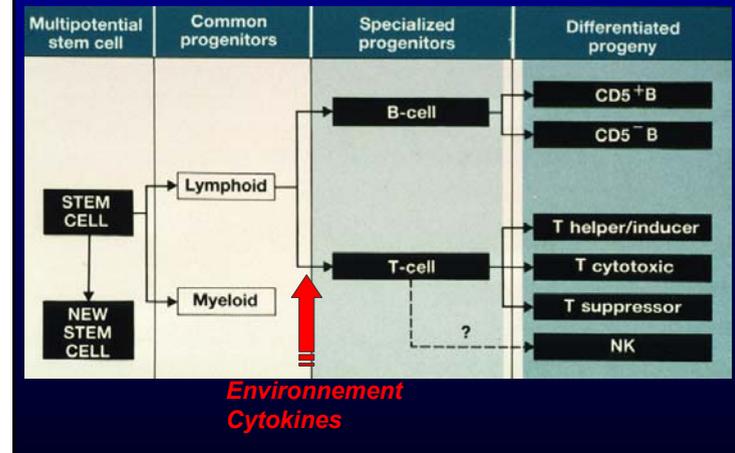
La théorie sélective pose néanmoins le problème de l'origine génétique de la diversité :

- 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 ?

## 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**

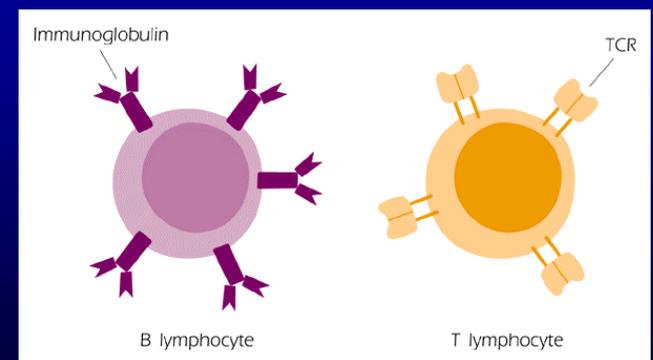
## La lignée lymphocytaire



## Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

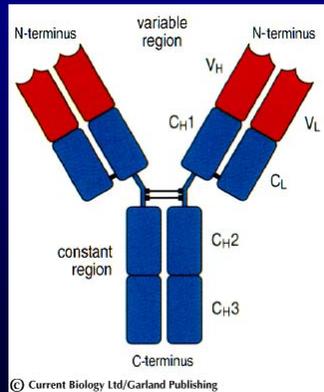
## Les lymphocytes B et T



→ caractérisés par leur récepteur spécifique d'antigène

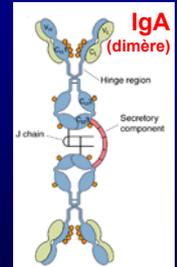
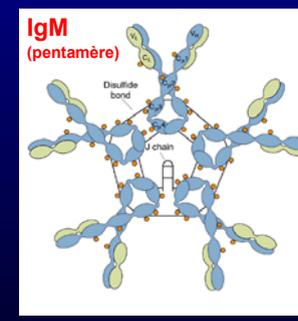
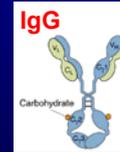
## La molécule anticorps

- 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

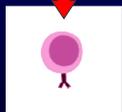
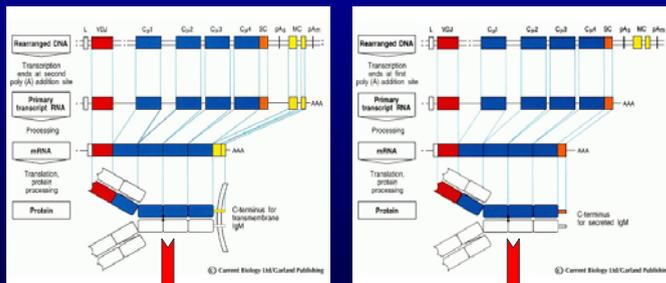


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

## Les classes d'immunoglobulines



## Ig membranaire – Ig sécrétée



lymphocyte B



plasmocyte

## Identification du récepteur T (TCR)

Supposé être un variant d'anticorps:

- Structure similaire
- Formes membranaires et solubles
- Sécrétion importante

→ Essai de purification de récepteur mais...

Anticorps monoclonaux contre le TCR montre une expression membranaire exclusive et faible (1983)

## Identification des gènes de TCR

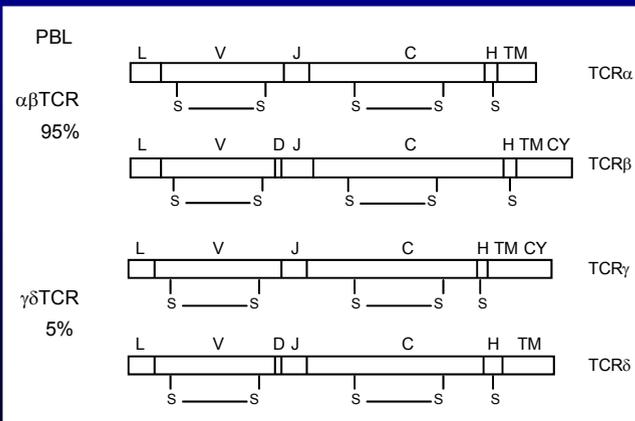
- En 1984, le gène codant **TCR $\beta$**  est cloné par hybridation soustractive d'ADNc
- Ensuite une autre chaîne est clonée, d'abord appelée TCR $\alpha$ , puis renommée **TCR $\gamma$**
- Le "véritable" gène **TCR $\alpha$**  est alors cloné
- En 1986, il est montré que TCR $\gamma$  fait partie d'un autre type de TCR
- La chaîne associée est clonée  $\rightarrow$  **TCR $\delta$**

## Lymphocytes T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$

Les lymphocytes T comprennent deux populations :

	PBL	
Lymphocytes T $\alpha\beta$	$\rightarrow$ TCR $\alpha\beta$	~95%
Lymphocytes T $\gamma\delta$	$\rightarrow$ TCR $\gamma\delta$	~5%

## Structure schématique des TCR

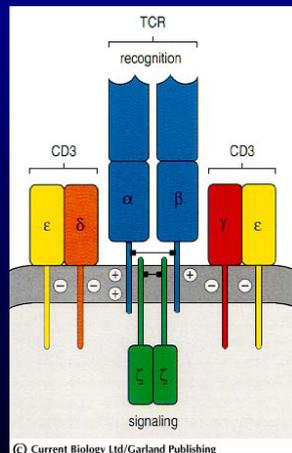


## Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

## Le complexe TCR – CD3

Les chaînes  $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$  du TCR sont associées aux molécules de transduction du signal du complexe CD3

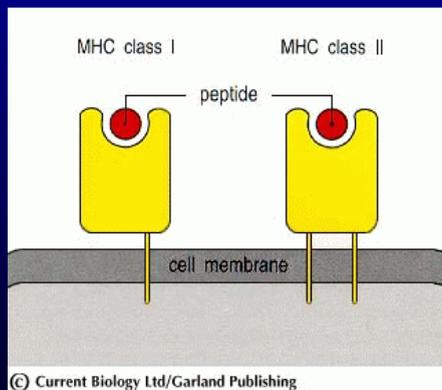


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

## 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**

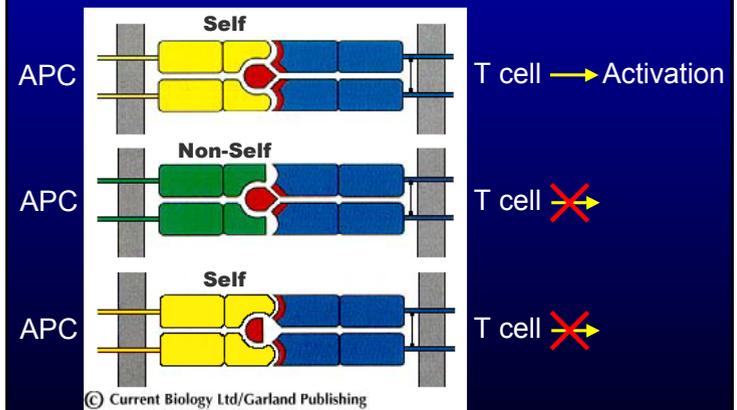
## La présentation antigénique



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

## Restriction par le CMH

**CMH TCR**

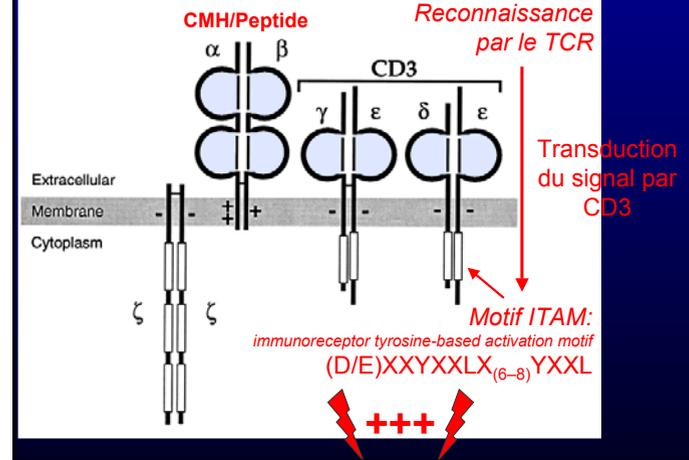


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

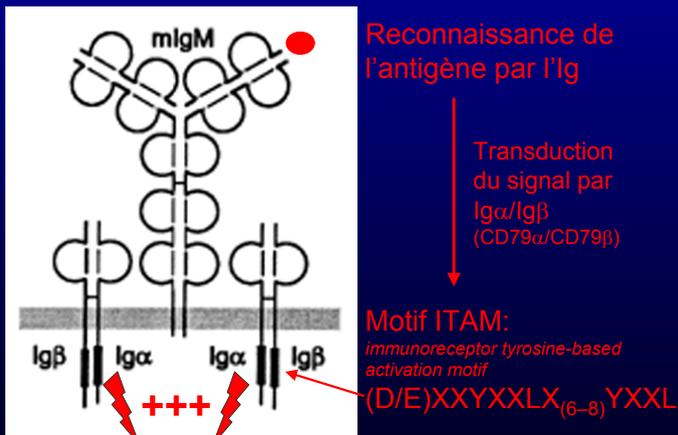
## Reconnaissance par le TCR $\gamma\delta$

- Intermédiaire entre anticorps et TCR $\alpha\beta$  en structure et fonction
- Reconnaît l'antigène de différentes manières:
  - reconnaissance restreinte par le CMH
  - présentation par des molécules du CMH non classiques (class Ib, CD1)
  - reconnaissance directe de l'antigène
  - reconnaissance d'antigènes non-peptidiques (lipides, glycolipides, phospholipides)

## Transduction du signal TCR/CD3



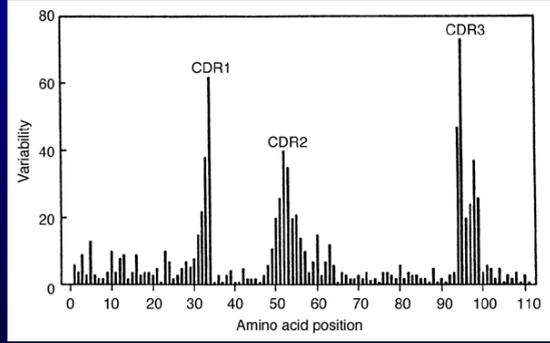
## Transduction du signal BCR



## Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

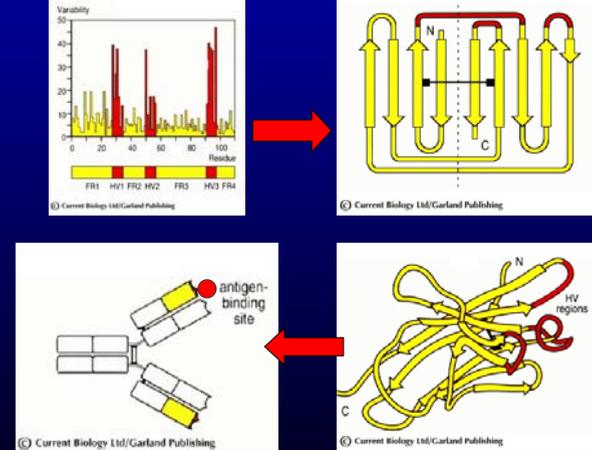
1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

## 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)



## Un paradoxe génétique

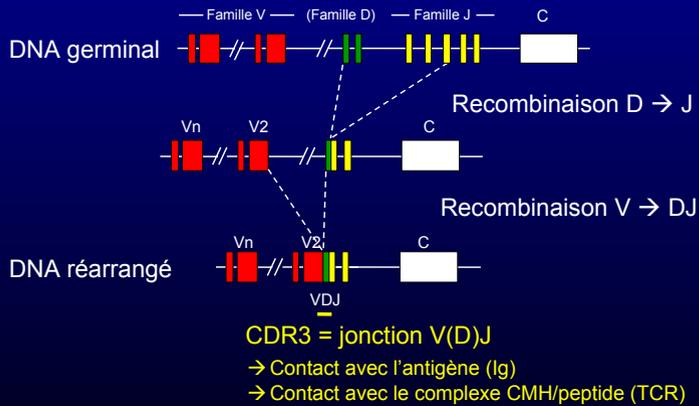
- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
  - ~50 000 gènes dans le génome humain
- Mais...
- Capacité de production d'une variété « infinie » d'Ig et de TCR (cf. Landsteiner)
  - Constance des domaines constants vs. Diversité dans les domaines variables (cf. Edelman, 1969)
  - Combien de gènes doit-on considérer ?

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

« 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. »

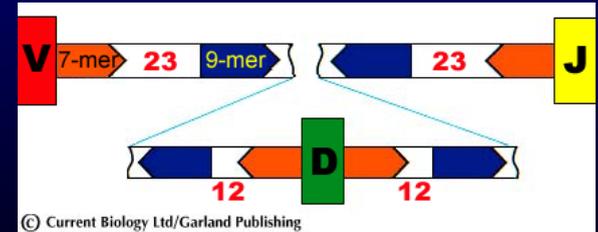
*La sagesse des gènes, Christopher Wills.*

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

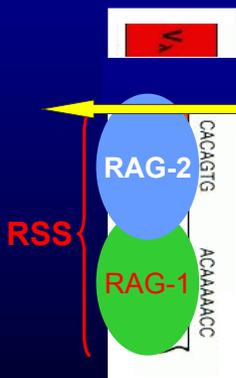


## La recombinaison V(D)J (1)

- Nécessite l'expression des protéines RAG-1 et RAG-2
- Nécessité de l'ouverture/accessibilité de la chromatine pour la recombinaison
- Reconnaissance de RSS : heptamère-espaceur-nonamère suivant la règle 12/23

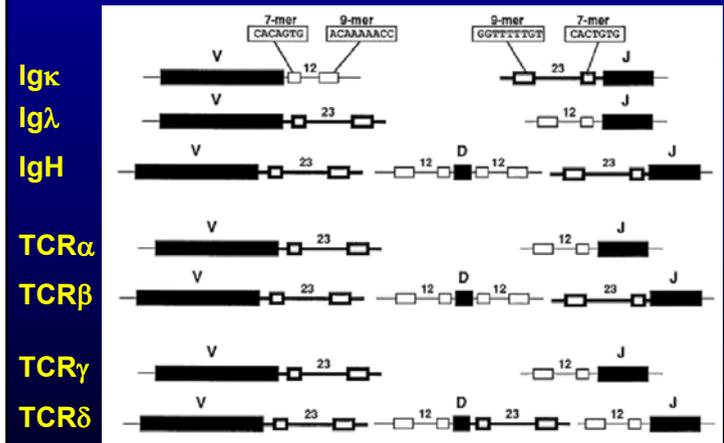


## Séquences signal de recombinaison

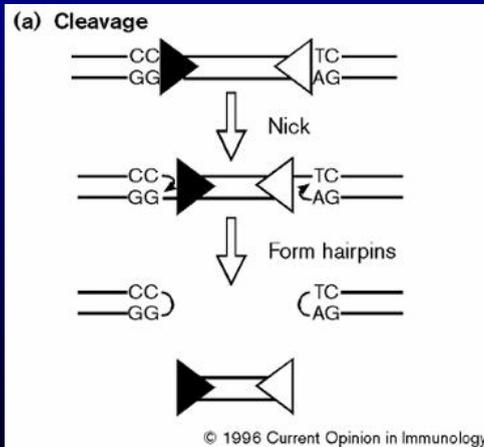


- Heptamère → CACAGTG
- Espaceur 12 ou 23
- Nonamère → ACAAAAACC

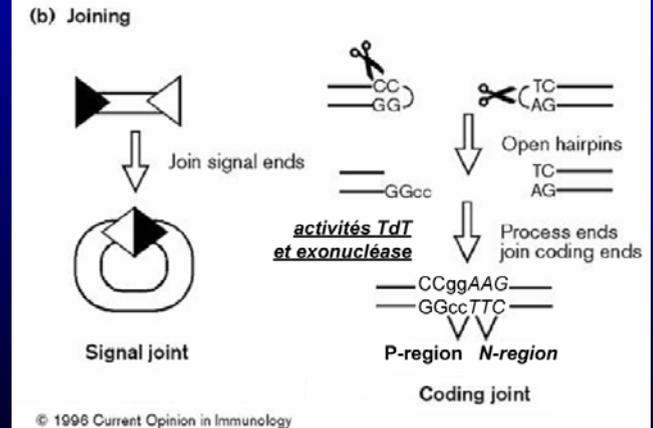
## La règle 12/23 pour les Ig et TCR



## La recombinaison V(D)J (2)



## La recombinaison V(D)J (3)



## La recombinaison V(D)J (4)

Différentes protéines sont impliquées :

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

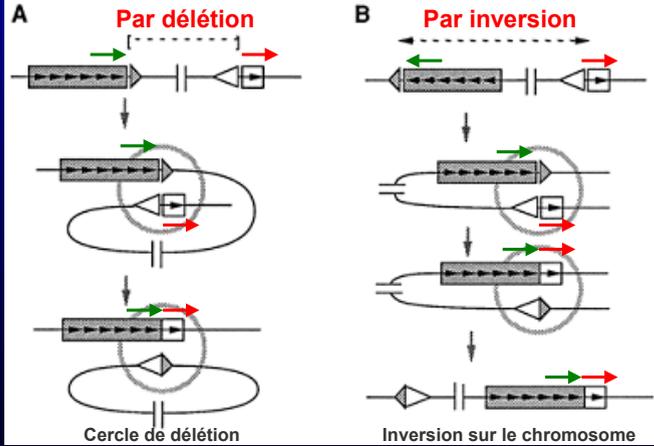
## La recombinaison V(D)J (5)

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 (+).

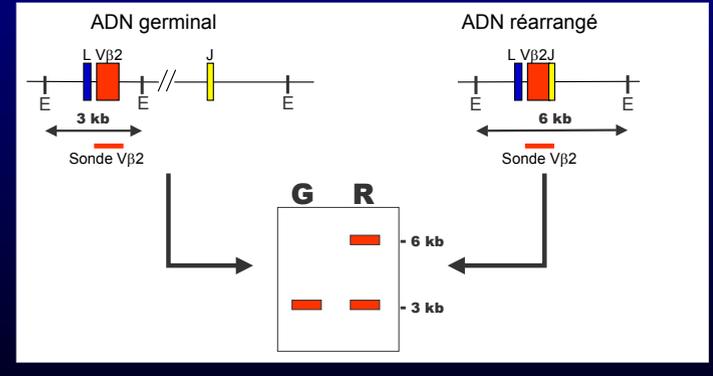
<i>Cys Ala ...V</i>	>	N(D)N	<	J... <i>Phe Gly</i>	
<i>TGT CGA CC</i>				<i>TCGC TTT GGT</i>	
<i>TGT CGA CC</i>		g aa		G <i>CTT TGGT</i>	-
<i>TGT CGA CC</i>		g gaa		GC <i>T TTG GT</i>	-
<i>TGT CGA CC</i>		g gaa g		GC <i>TTT GGT</i>	+
<i>TGT CGA CC</i>		g gaa gt		G <i>CTT TGGT</i>	-
<i>TGT CGA CC</i>	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

## Différents types de réarrangements



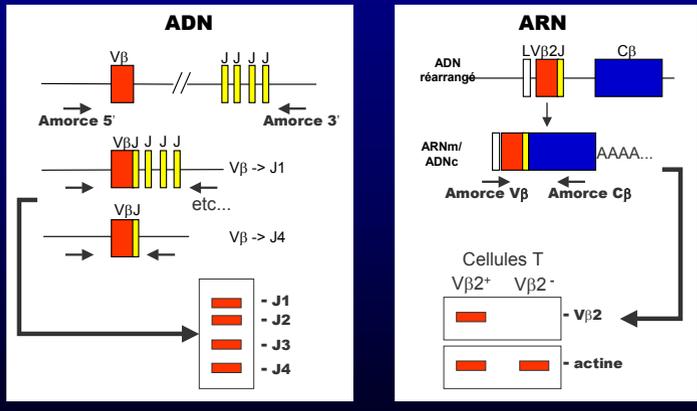
## Détection des réarrangements (1)

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



## Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR aux niveaux ADN et ARN.



## Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

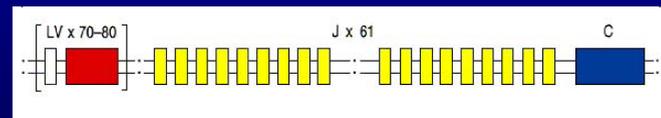
- Introduction
- Anticorps et TCR
- Complexes TCR/CD3 et BCR
- Recombinaison V(D)J
- Organisation des locus TCR et Ig
- La technique Immunoscope

## Sous-familles de gènes variables

- Deux segments de gène variables de chaîne de TCR ou d'immunoglobuline sont groupés dans une même sous-famille s'ils partagent au moins 75 % d'identité au niveau nucléique.

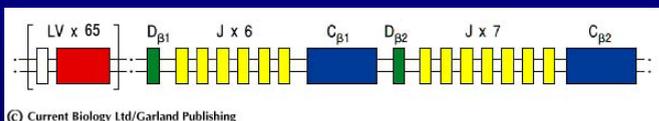


## Organisation génomique du locus TCR $\alpha$ humain



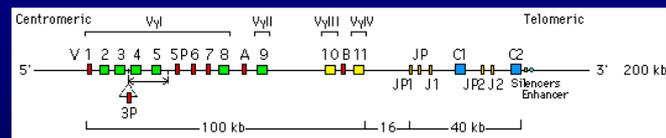
- Chromosome 14
- Entièrement séquencé (1.1 Mb)
- 70-80 V $\alpha$  groupés en 41 sous-familles
- 61 J $\alpha$ , un seul C $\alpha$

## Organisation génomique du locus TCR $\beta$ humain



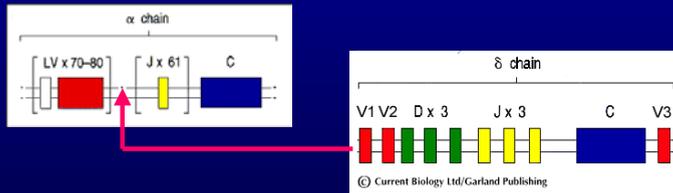
- Chromosome 7
- Entièrement séquencé (685 kb)
- 65 segments V $\beta$
- 30 sous-familles (1-9 membres)
- 2 D $\beta$ , 13 J $\beta$ , 2 C $\beta$ , en deux répétitions

## Organisation génomique du locus TCR $\gamma$ humain



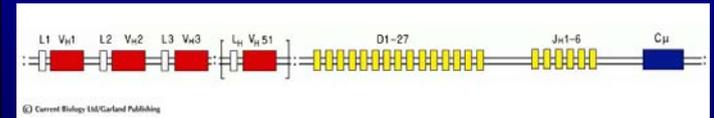
- Chromosome 7
- 14 V $\gamma$  groupés en 4 sous-familles
- 5 J $\gamma$ , 2 C $\gamma$ , en deux répétitions
- Deux formes C $\gamma$ 2 sans cystéine dans le peptide charnière → pas de pont disulfure avec la chaîne TCR $\delta$

## Organisation génomique du locus TCR $\delta$ humain



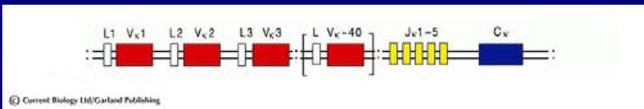
- Chromosome 14, inséré dans le locus TCR $\alpha$
- 3 V $\delta$  principaux, 3 D $\delta$ , 3 J $\delta$ , un seul C $\delta$
- Des V $\alpha$  sont utilisés par les chaînes TCR $\delta$ : V $\alpha$ / $\delta$ 14.1, V $\alpha$ / $\delta$ 23.1, V $\alpha$ / $\delta$ 29.1, V $\alpha$ / $\delta$ 36.1,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

## Organisation génomique du locus IgH humain



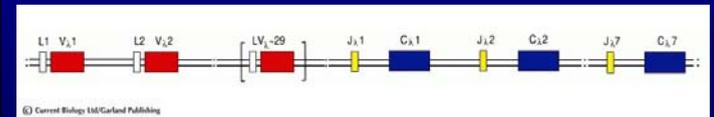
- Chromosome 14
- Entièrement séquencé (1,2 Mb)
- ~80 V $H$  (dont ~50 fonctionnels) groupés en 7 sous-familles
- 27 D $H$ , 6 J $H$ , 9 C $H$

## Organisation génomique du locus Ig $\kappa$ humain



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

## Organisation génomique du locus Ig $\lambda$ humain



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

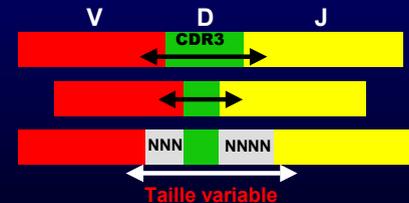


## Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

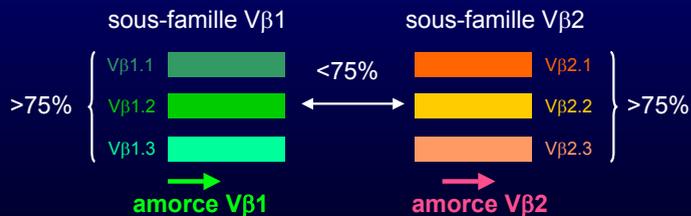
## La région CDR3 concentre l'essentiel de la diversité

- 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*

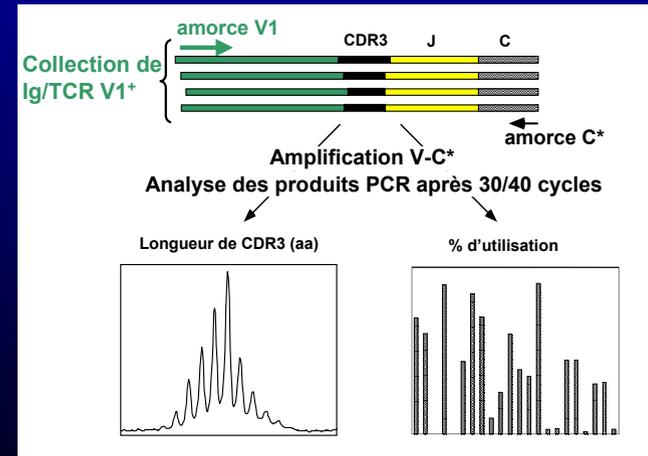


## Amorces de sous-familles

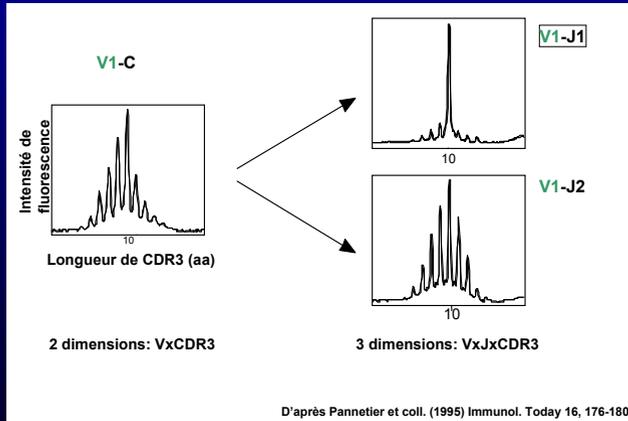
- Étant donné l'identité entre les membres d'une sous-famille Ig/TCR, il est généralement possible de dessiner des amorces spécifiques de sous-familles.



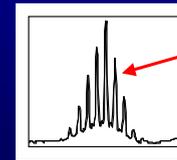
## La technique Immunoscope (1)



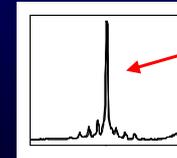
## La technique Immunoscope (2)



## La technique Immunoscope (3)

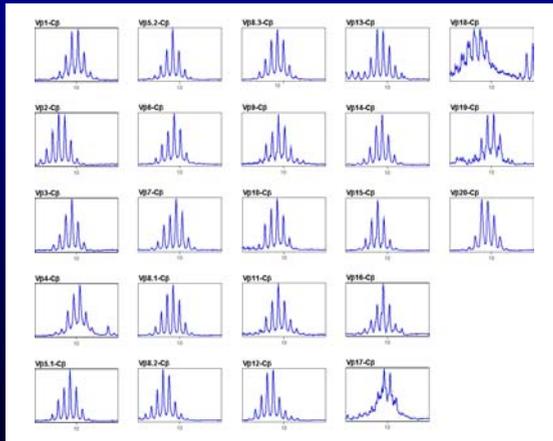


**Courbe en cloche régulière:**  
indicatif d'une *population polyclonale*

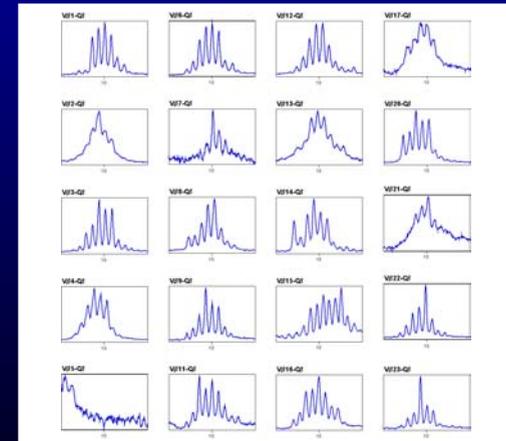


**Pic proéminent:**  
indicatif d'une *population oligoclonale* ou *clonale*  
→ *expansion clonale*

## Répertoire TCR $\beta$ naïf de la souris



## Répertoire TCR $\beta$ chez l'homme sain



## Réponse IgG anti-DNP oligoclonale chez les souris B6.κ-λ<sup>SEG</sup>

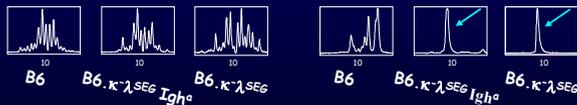
VH J558

VH 36-60

Témoins



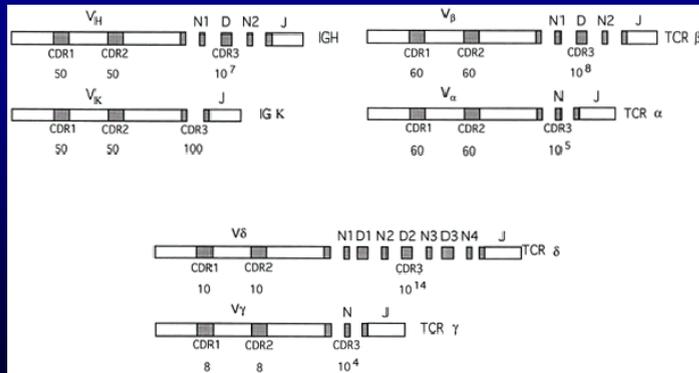
Immunisés



## Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

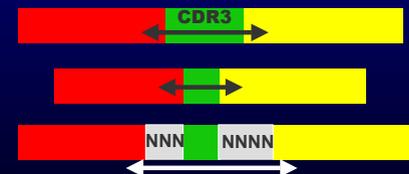
Conclusion

## Diversité jonctionnelle CDR3 : une stratégie générale

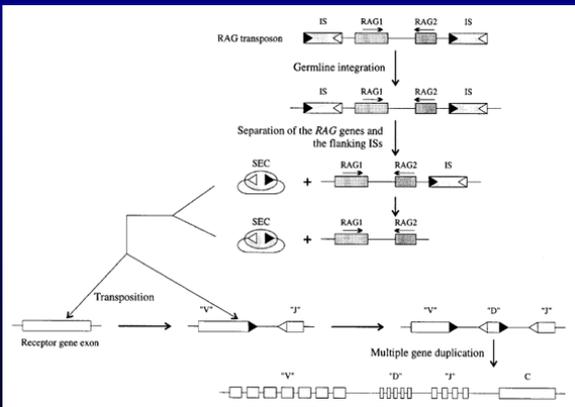


## Diversité des chaînes Ig et TCR

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

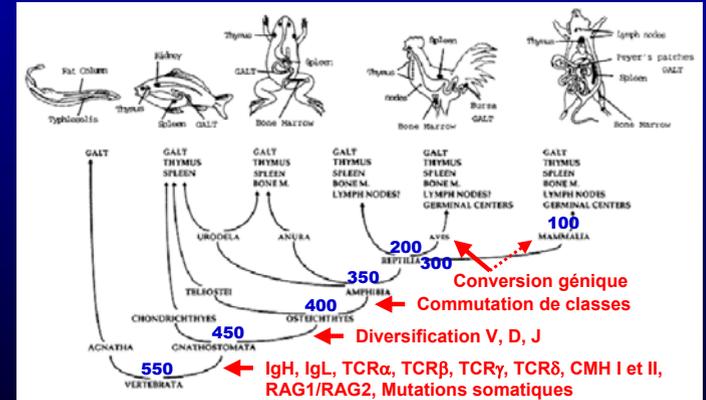


## Origine de la recombinaison V(D)J



D'après Fugmann et al. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18:495-527.

## Éléments d'immunologie comparée



D'après Du Pasquier et Flajnik, in *Fundamental Immunology*, 4<sup>th</sup> edition, W.E.Paul ed.

Questions/Discussion...