

Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

Adrien Six

Université Pierre et Marie Curie

IF2005 IF-IVa&IVb

19 février 2005

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

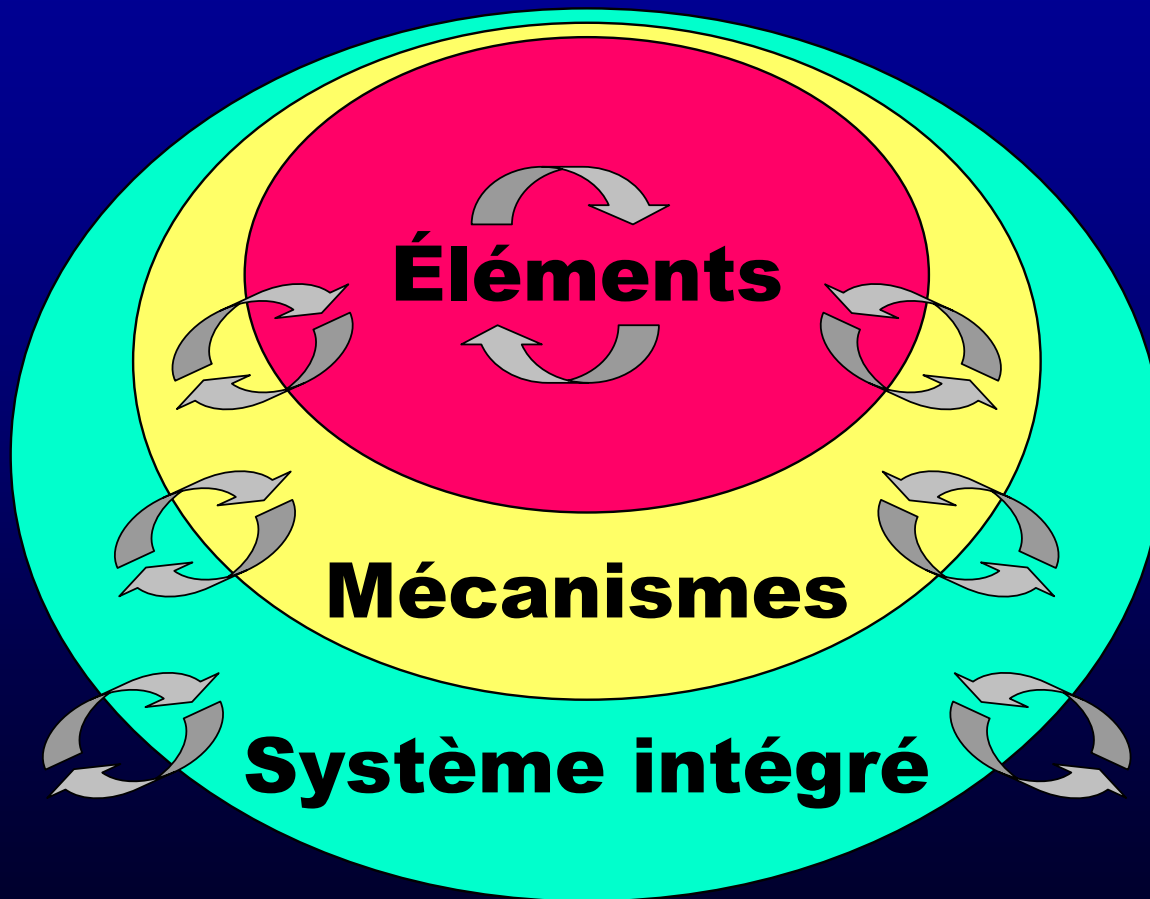
Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

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

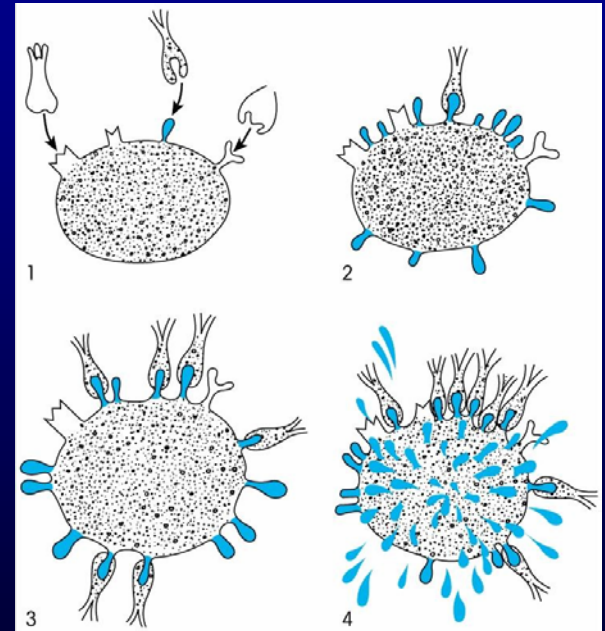
Théorie humorale de l'immunité

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

Théorie des chaînes latérales

P.Erhlich (1854–1915)

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



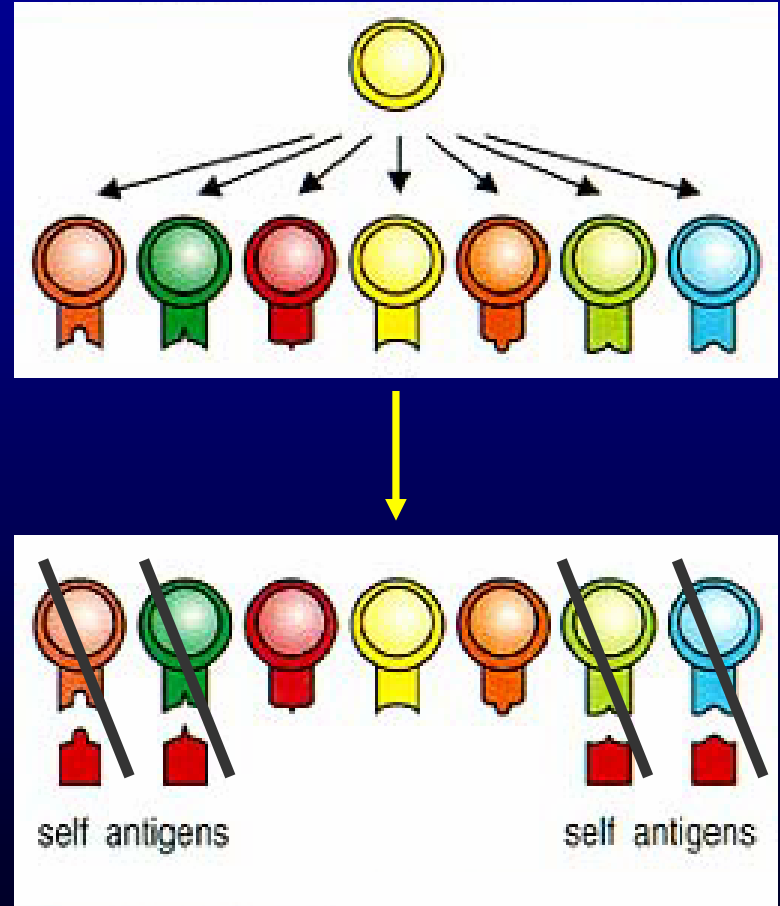
Théories de la diversité des Ac

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

Théorie de la sélection clonale (1)

Burnet (1899–1985)

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

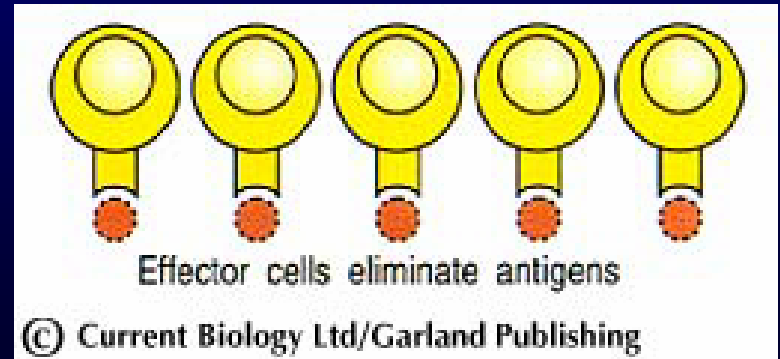


Théorie de la sélection clonale (2)

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



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



Théorie de la sélection clonale (3)

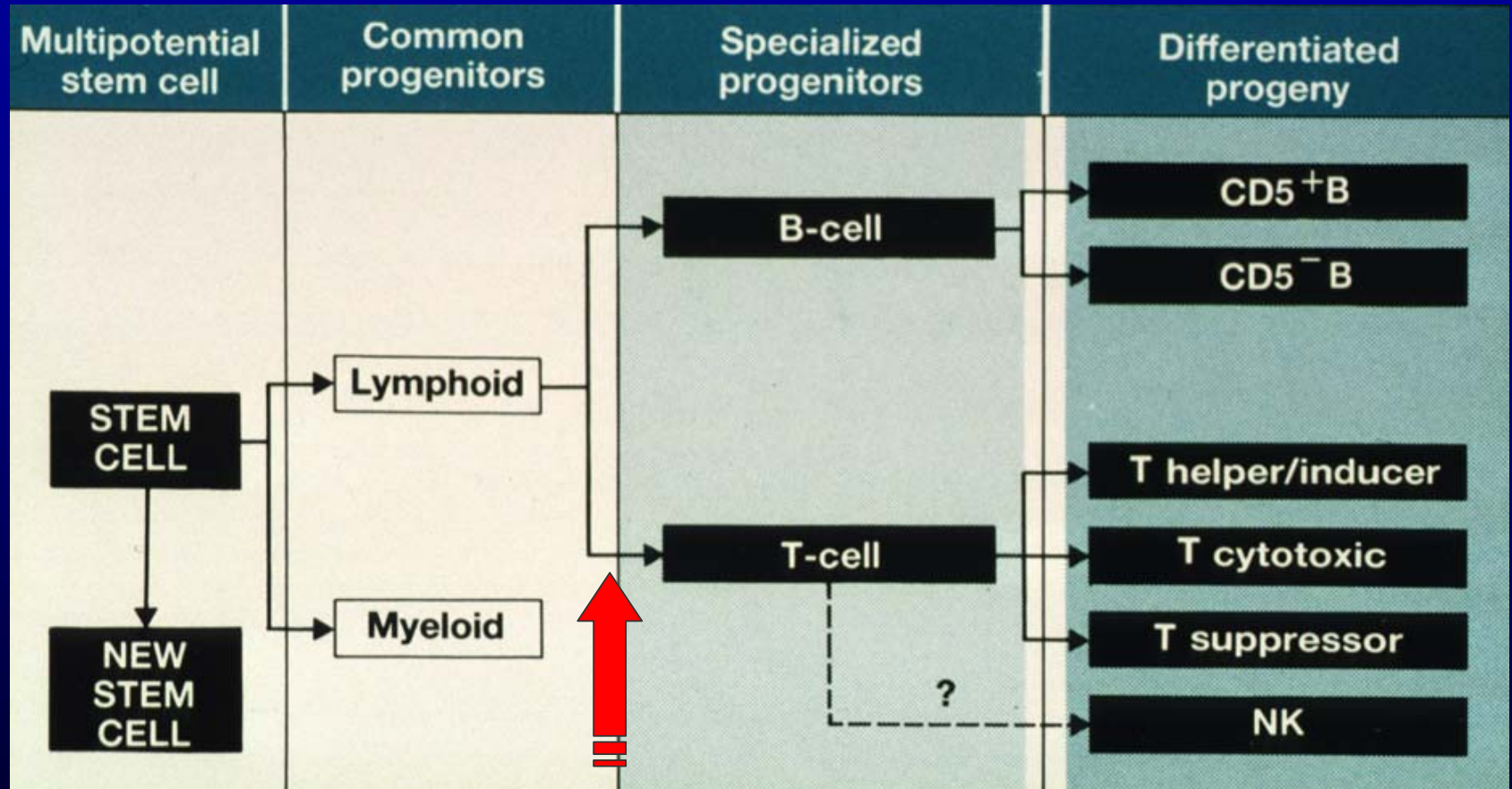
La théorie sélective pose néanmoins le problème de l'origine génétique de la diversité :

- 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

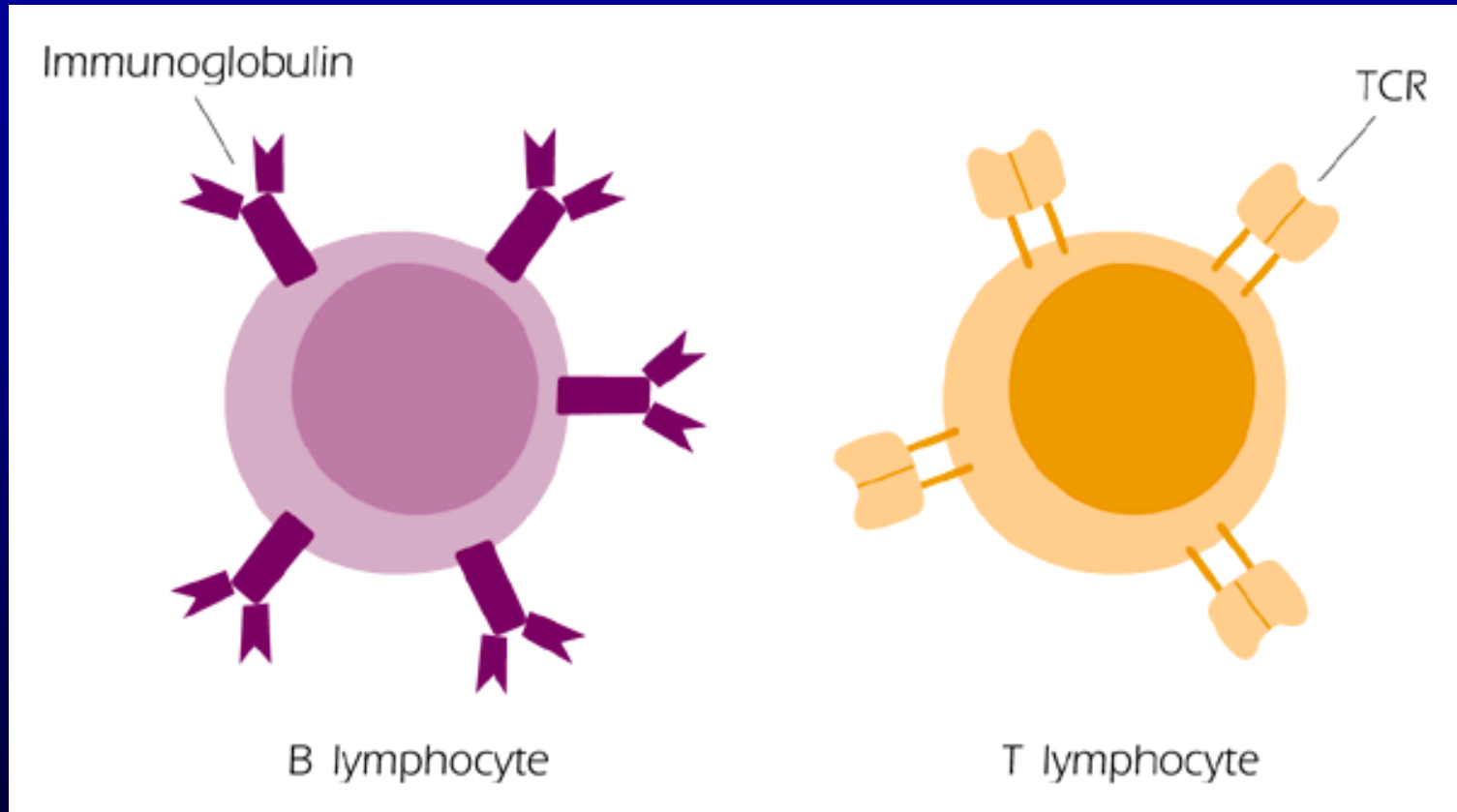


*Environnement
Cytokines*

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

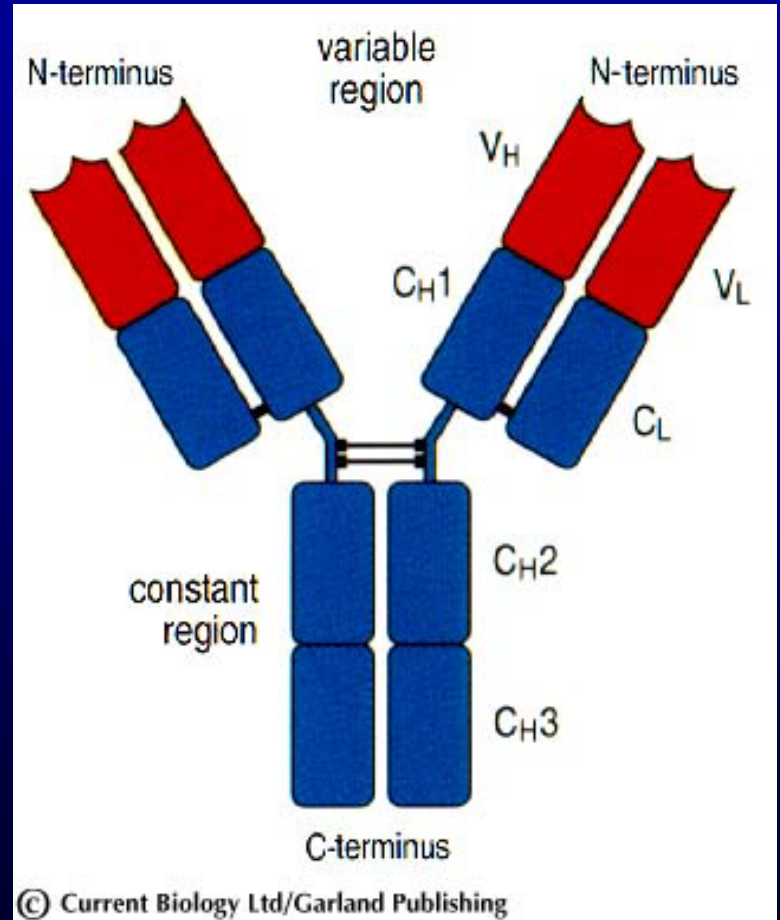
Les lymphocytes B et T



→ 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



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 gènes codant **TCR β** est cloné par hybridation soustractive d'ADNc
- Ensuite une autre chaîne est clonée, d'abord appelée TCR α , puis renommée **TCR γ**
- Le “véritable” gène **TCR α** est alors cloné
- En 1986, il est montré que TCR γ fait partie d'un autre type de TCR
- La chaîne associée est clonée → **TCR δ**

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

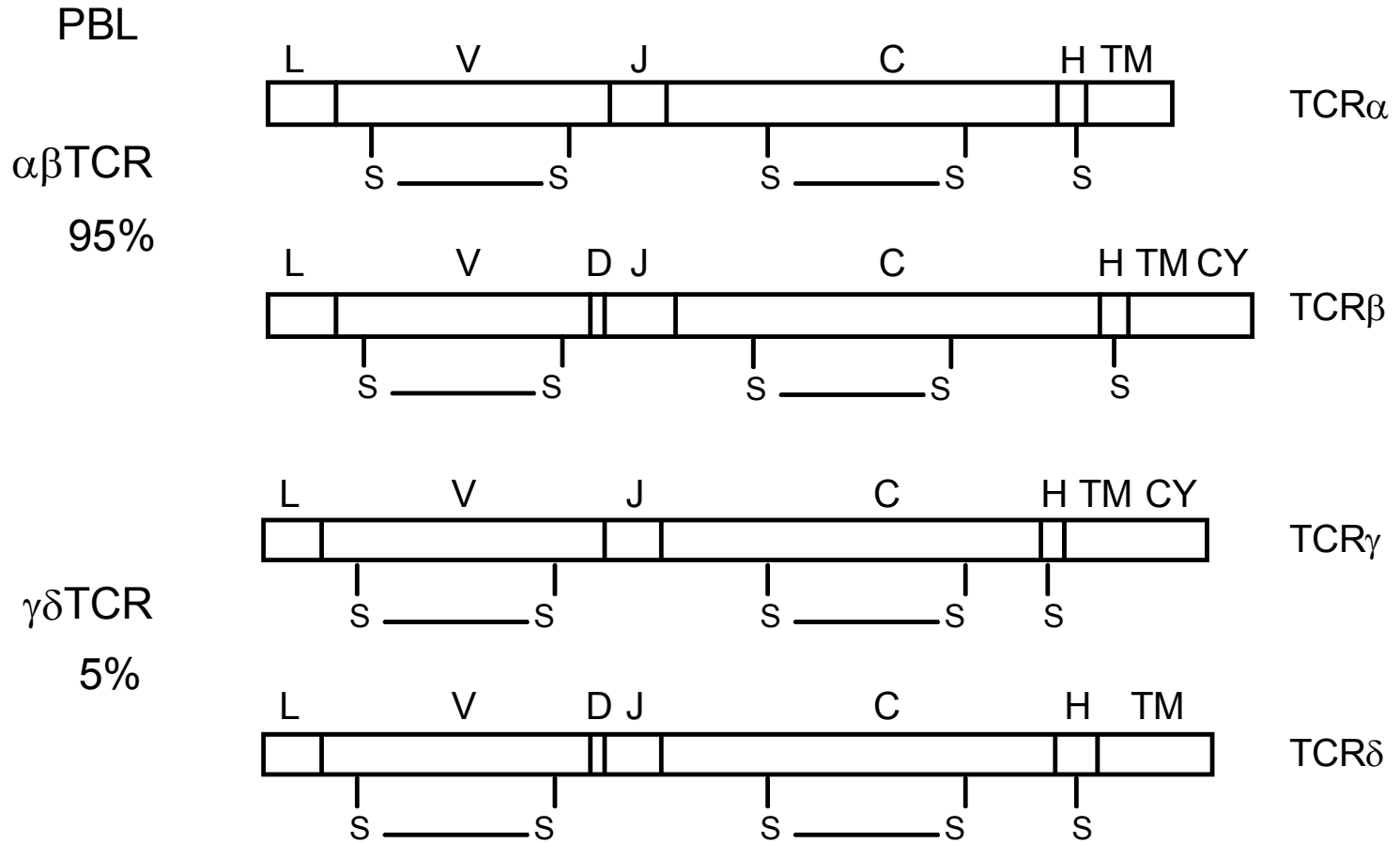
Les lymphocytes T comprennent deux populations :

PBL

Lymphocytes T $\alpha\beta$ $\rightarrow$ TCR $\alpha\beta$ ~95%

Lymphocytes T $\gamma\delta$ $\rightarrow$ TCR $\gamma\delta$ ~5%

Structure schématique des TCR

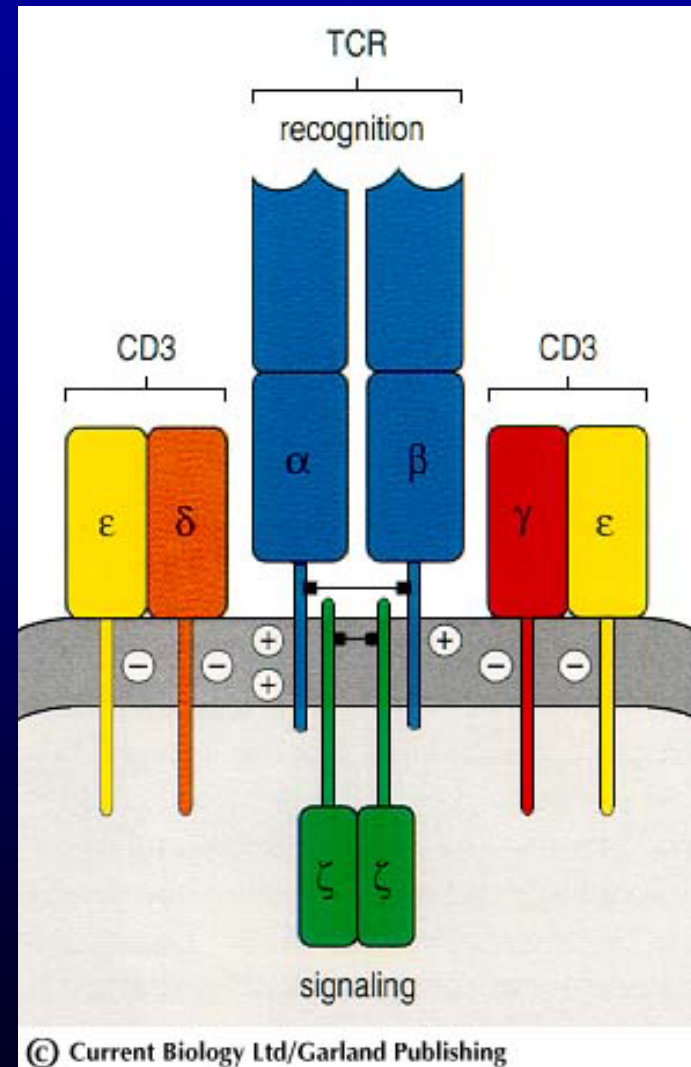


Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

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

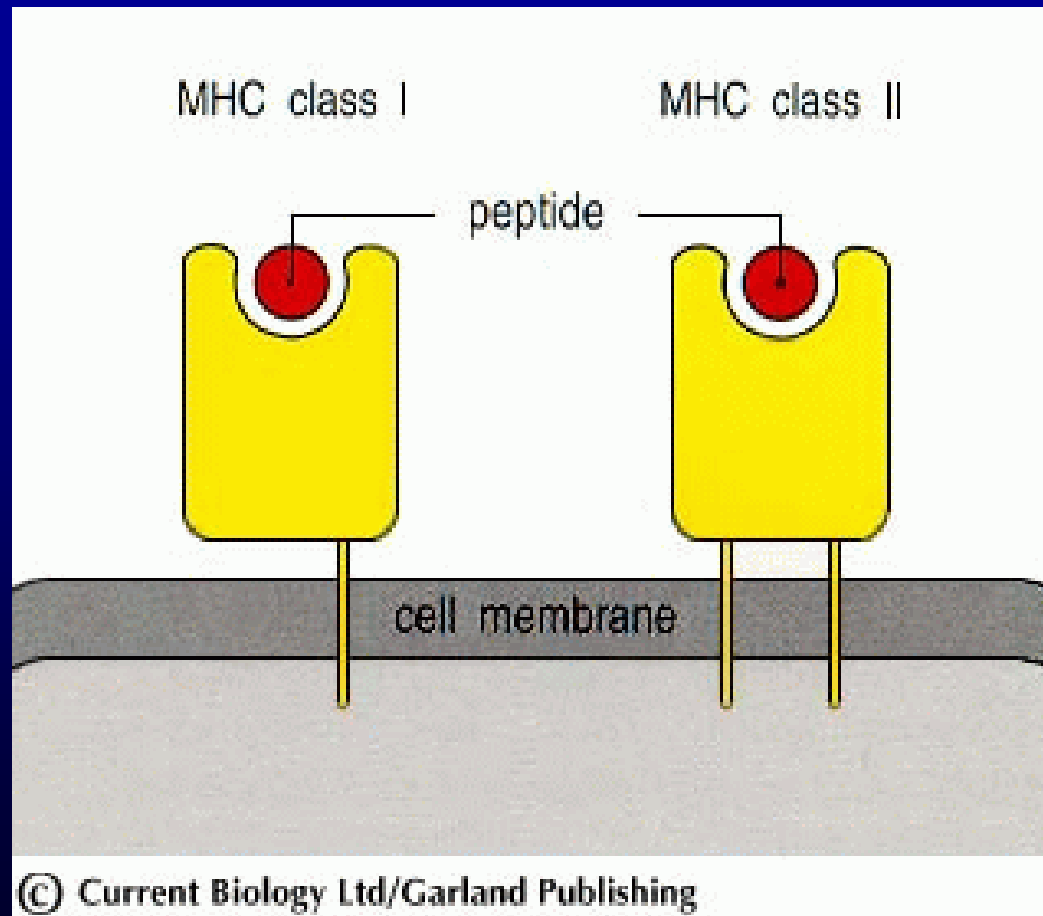
Les chaînes α/β ou γ/δ du TCR sont associées aux molécules de transduction du signal du complexe CD3



Reconnaissance par le TCR $\alpha\beta$

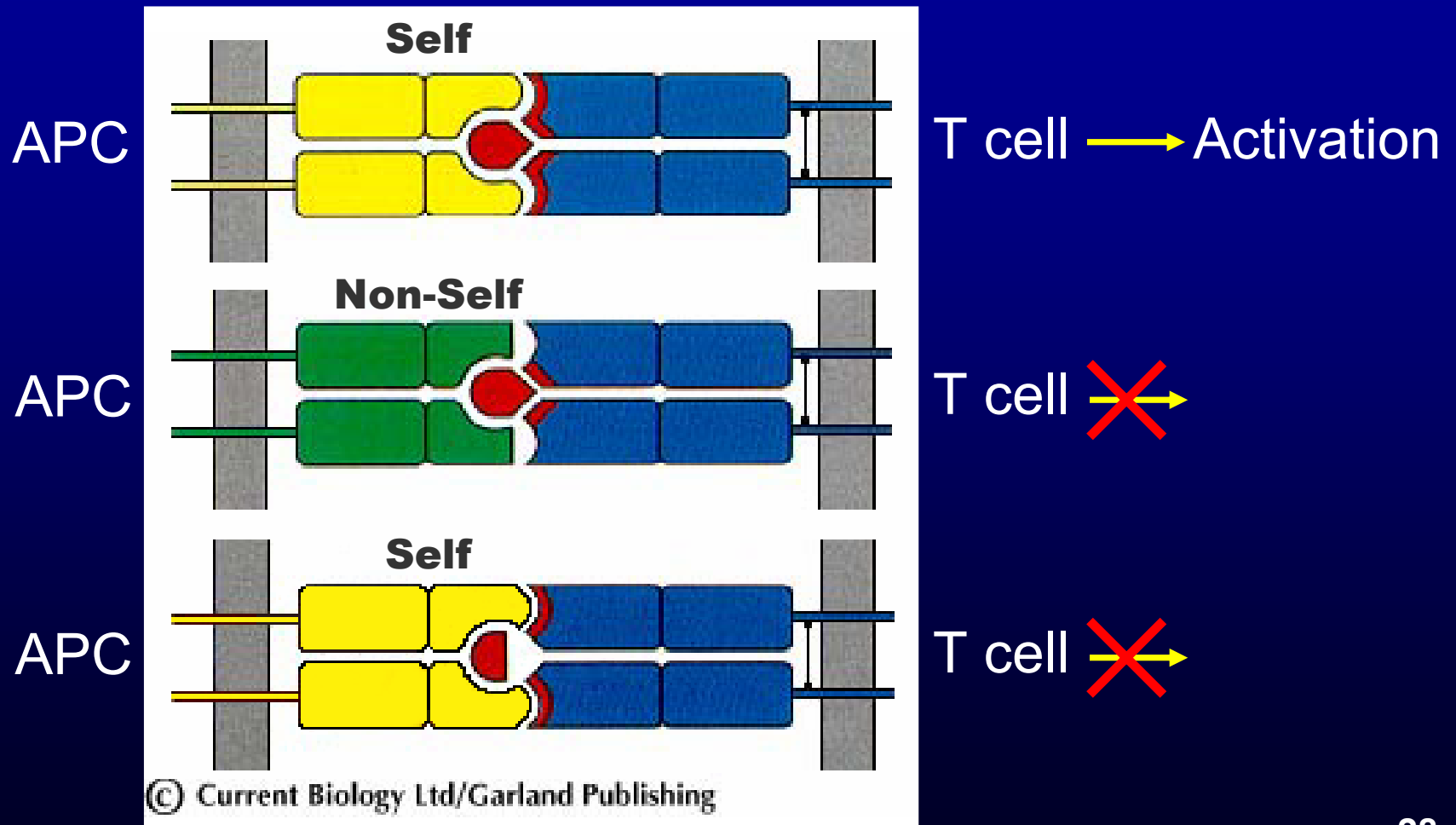
- A l'inverse des anticorps qui reconnaissent les protéines natives, le TCR reconnaît des petits *peptides*
 - produits de dégradation des protéines
 - présentés les molécules du MHC
- Pendant leur différenciation dans le thymus, les lymphocytes T sont “*éduqués*” pour reconnaître les molécules du CMH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

La présentation antigénique



Restriction par le CMH

CMH TCR



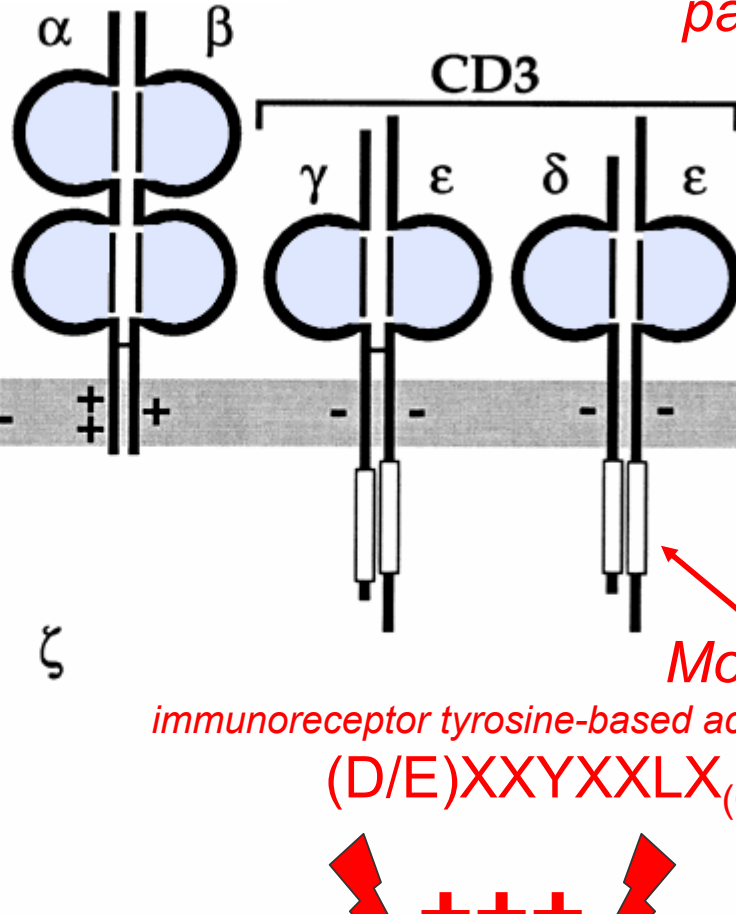
Reconnaissance par le TCR $\gamma\delta$

- 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

CMH/Peptide

Reconnaissance
par le TCR

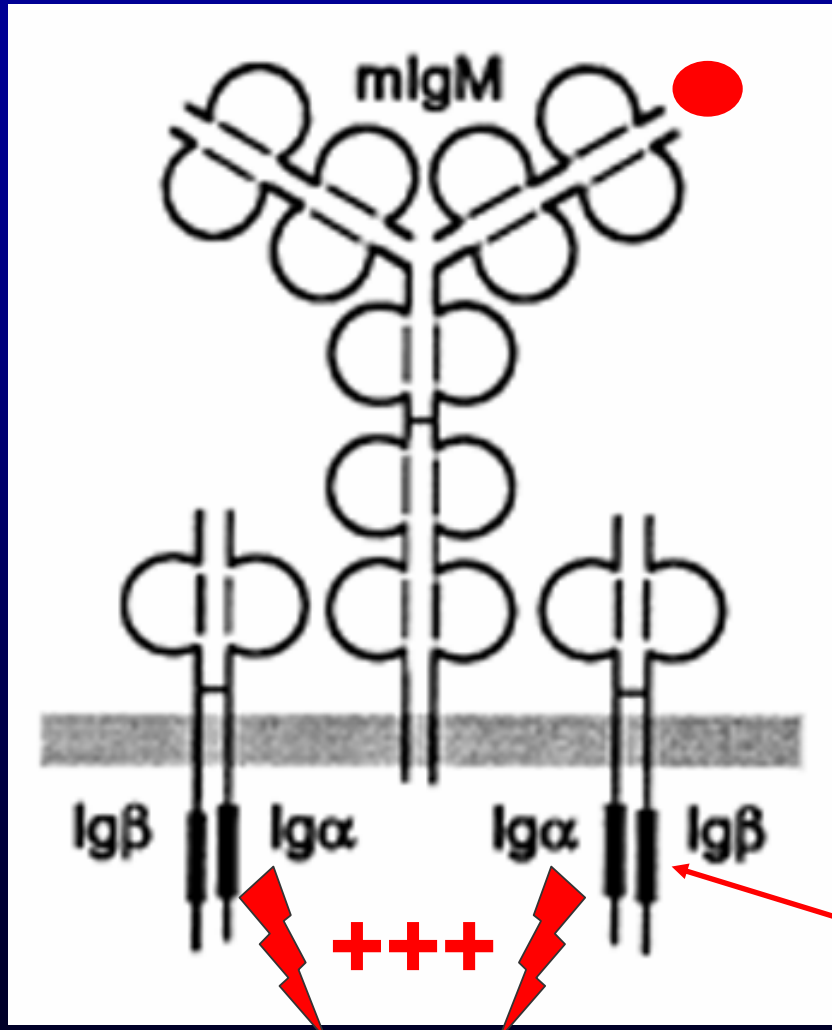


Transduction
du signal par
CD3

Motif ITAM:

immunoreceptor tyrosine-based activation motif
(D/E)XXYXXLX₍₆₋₈₎YXXL

Transduction du signal BCR



Reconnaissance de l'antigène par l'Ig

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

Motif ITAM:

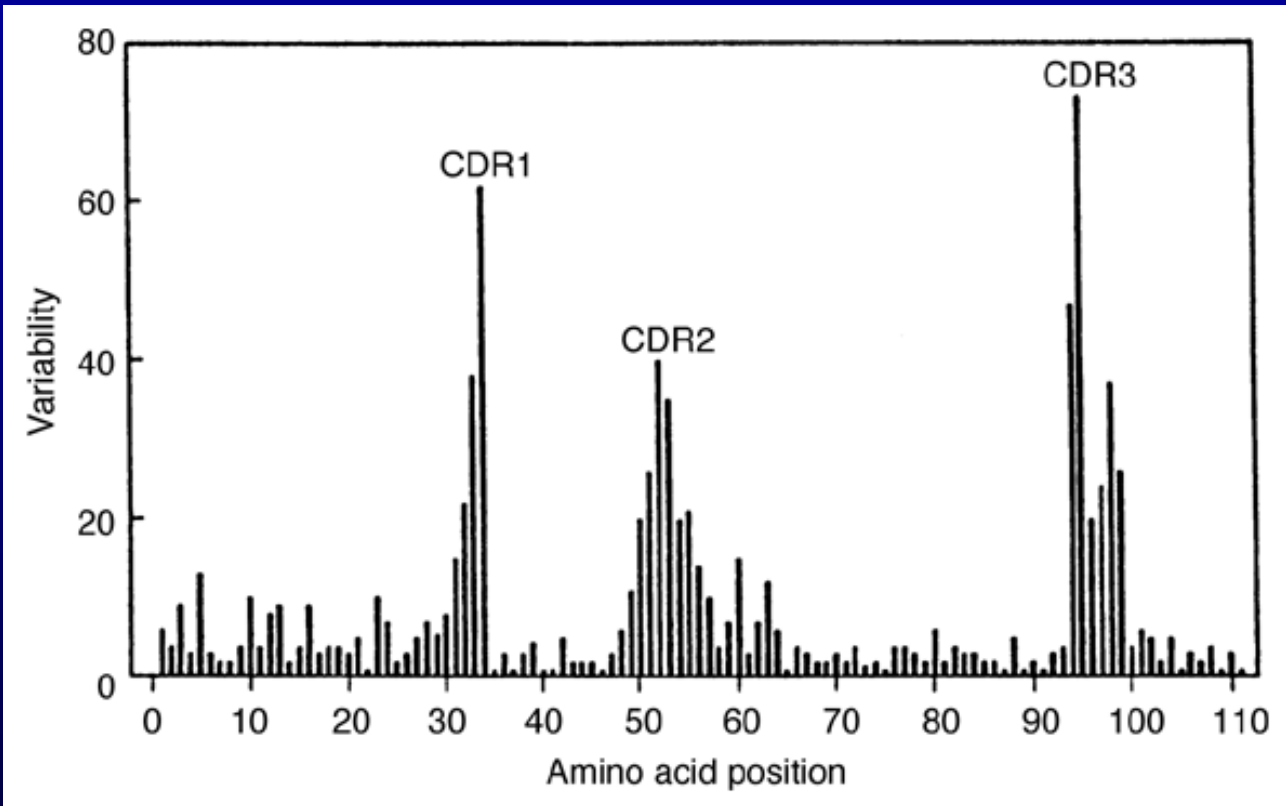
immunoreceptor tyrosine-based activation motif

(D/E)XXYXXLX₍₆₋₈₎YXXL

Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

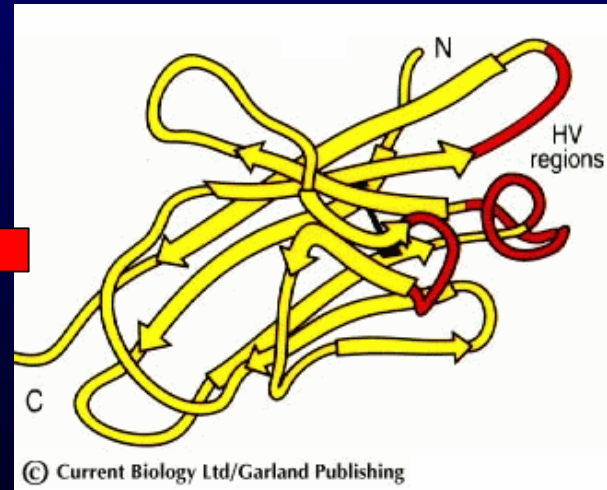
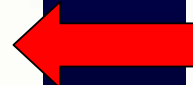
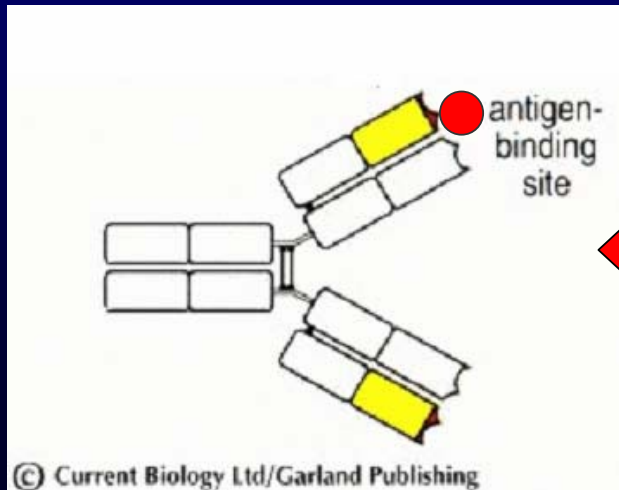
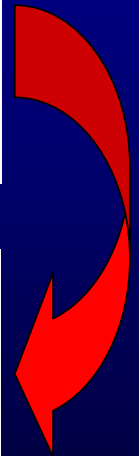
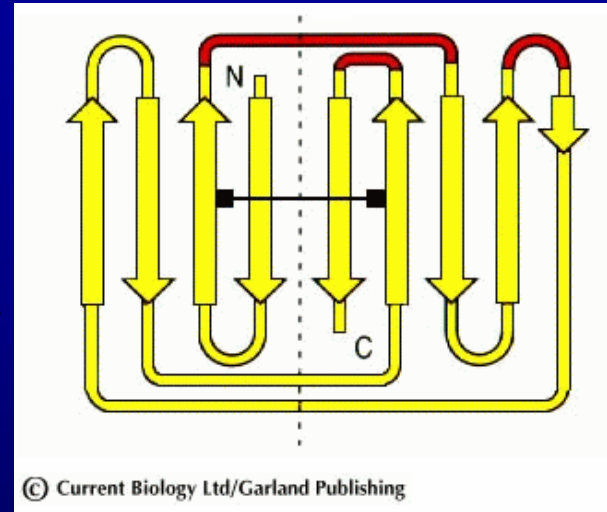
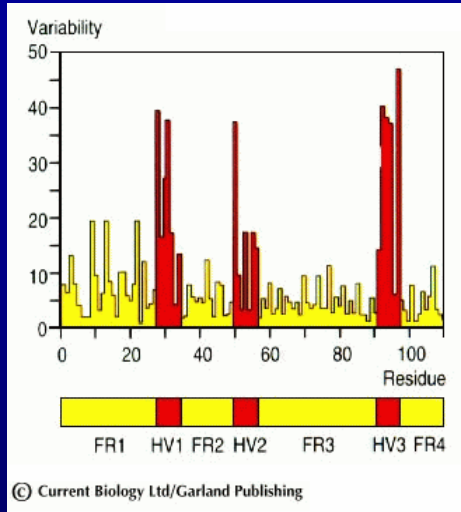
1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

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...

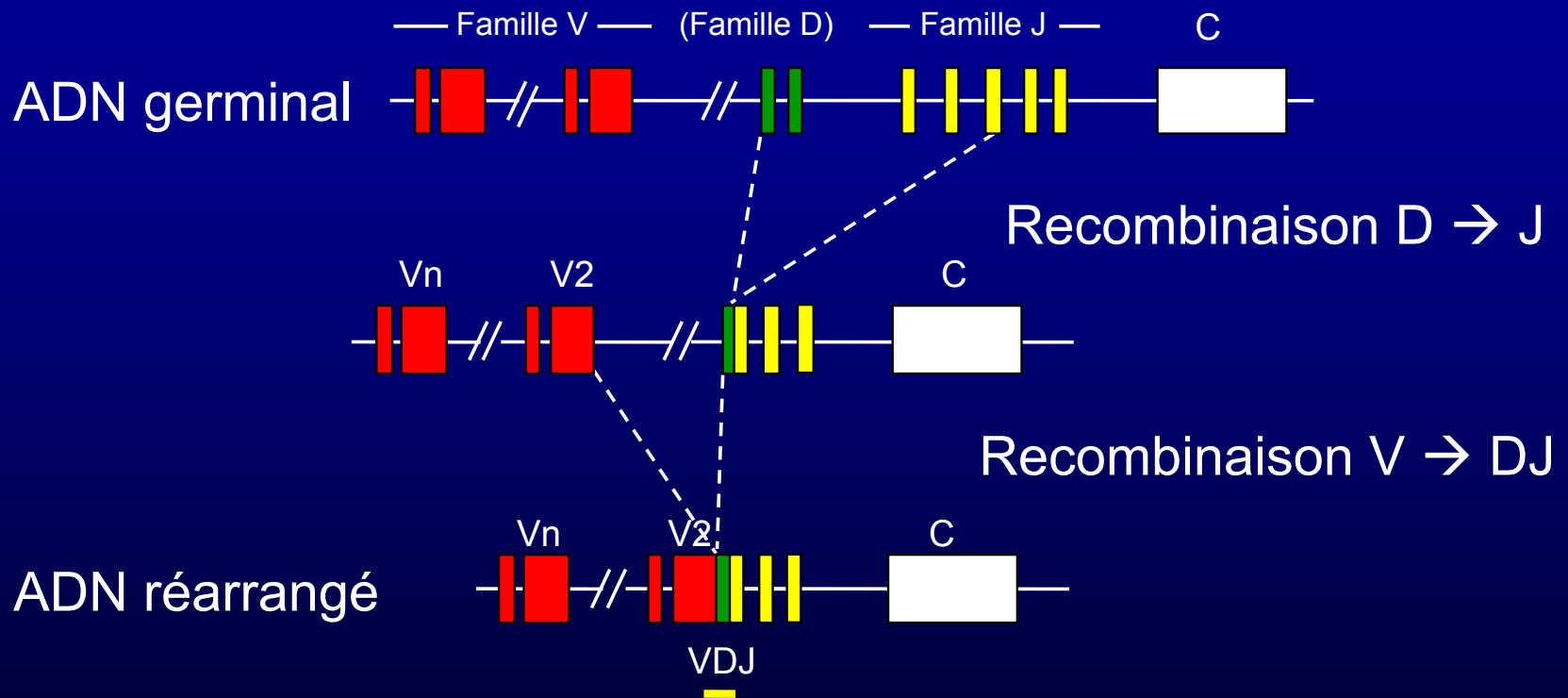
- Capacité de production d'une variété « infinie » d'Ig et de TCR (cf. Landsteiner)
- Constance des domaines constants vs. Diversité dans les domaines variables (cf. Edelman, 1969)
- Combien de gènes doit-on considérer ?

=> 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



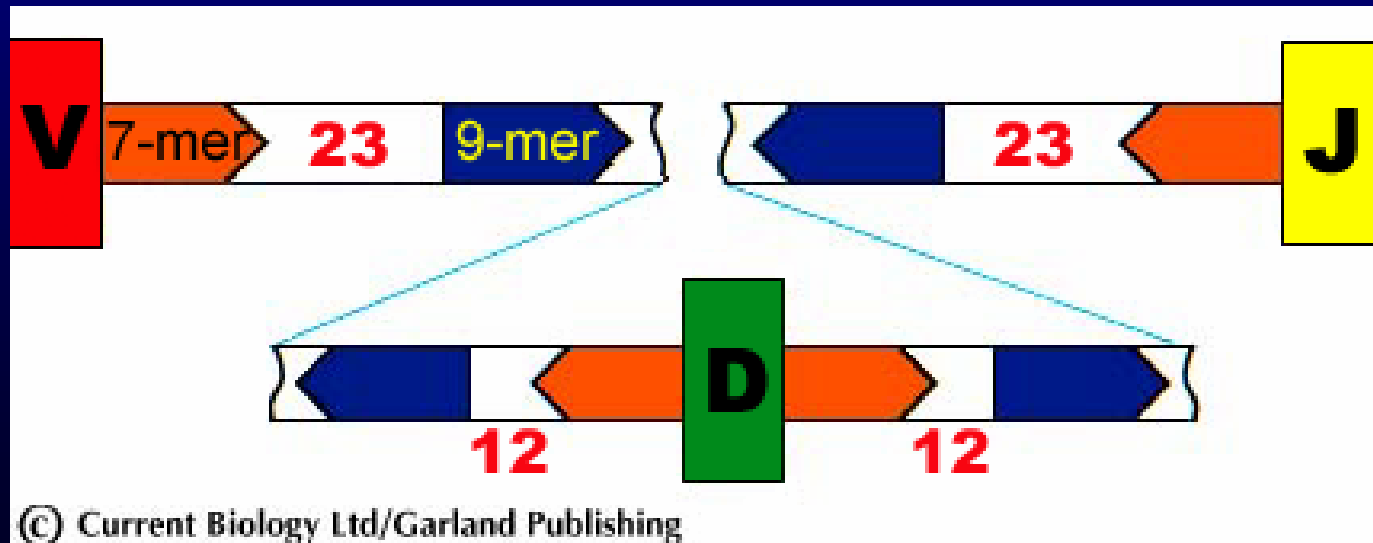
CDR3 = jonction V(D)J

→ Contact avec l'antigène (Ig)

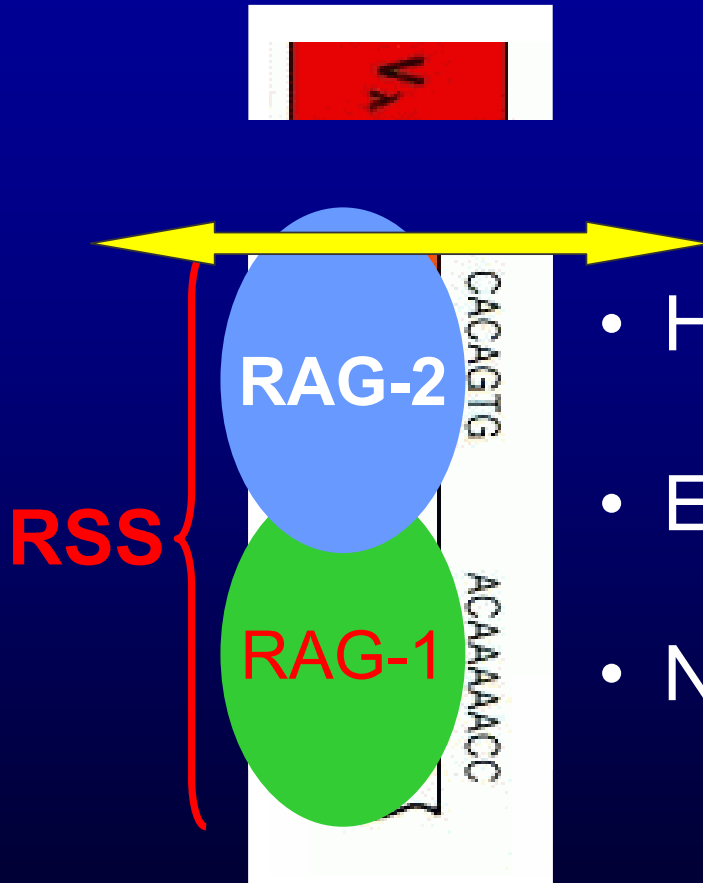
→ Contact avec le complexe CMH/peptide (TCR)

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 → **CACA**GTG
- Espaceur 12 ou 23
- Nonamère → ACAA**AA**ACC

La règle 12/23 pour les Ig et TCR

Ig κ

Ig λ

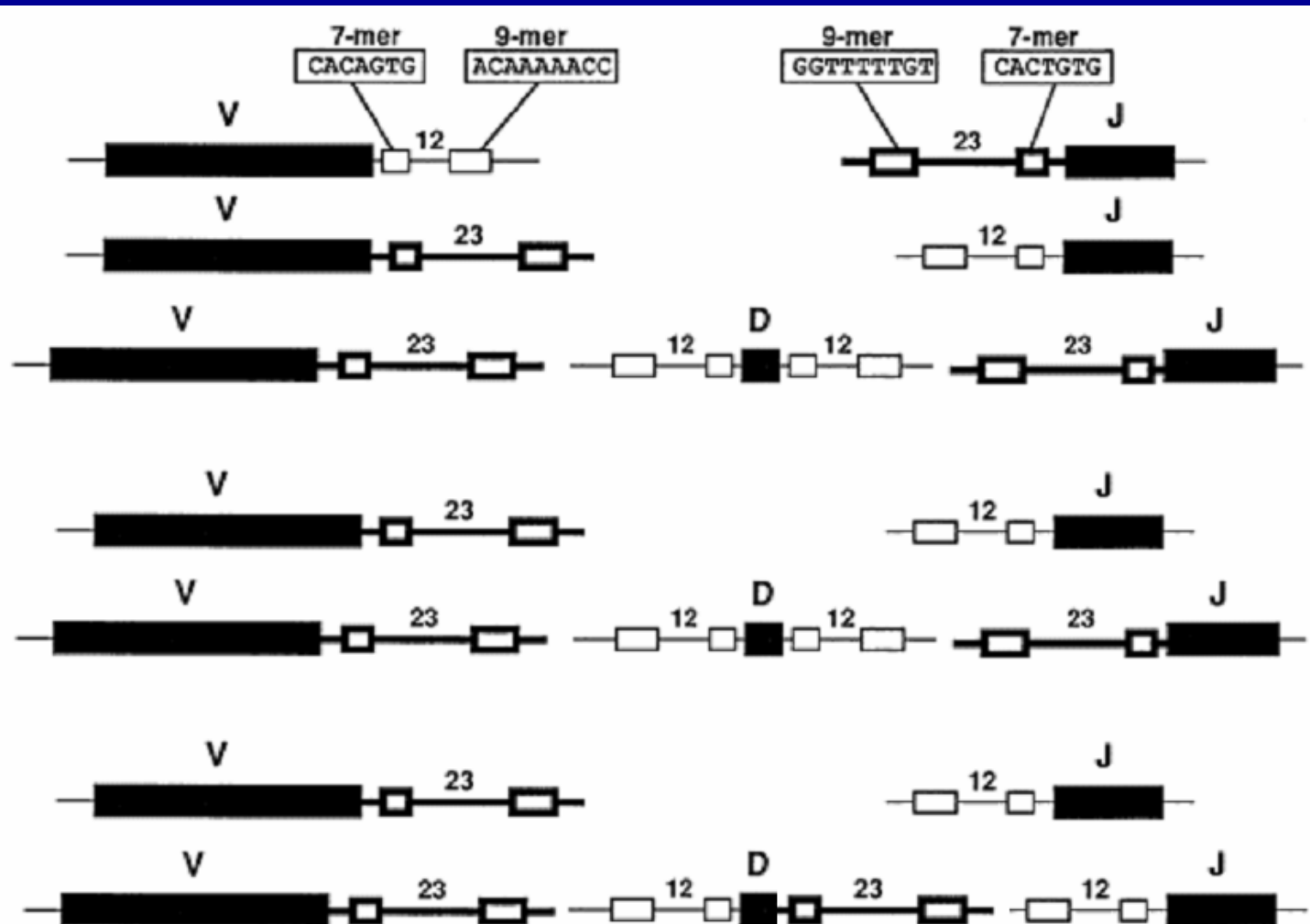
IgH

TCR α

TCR β

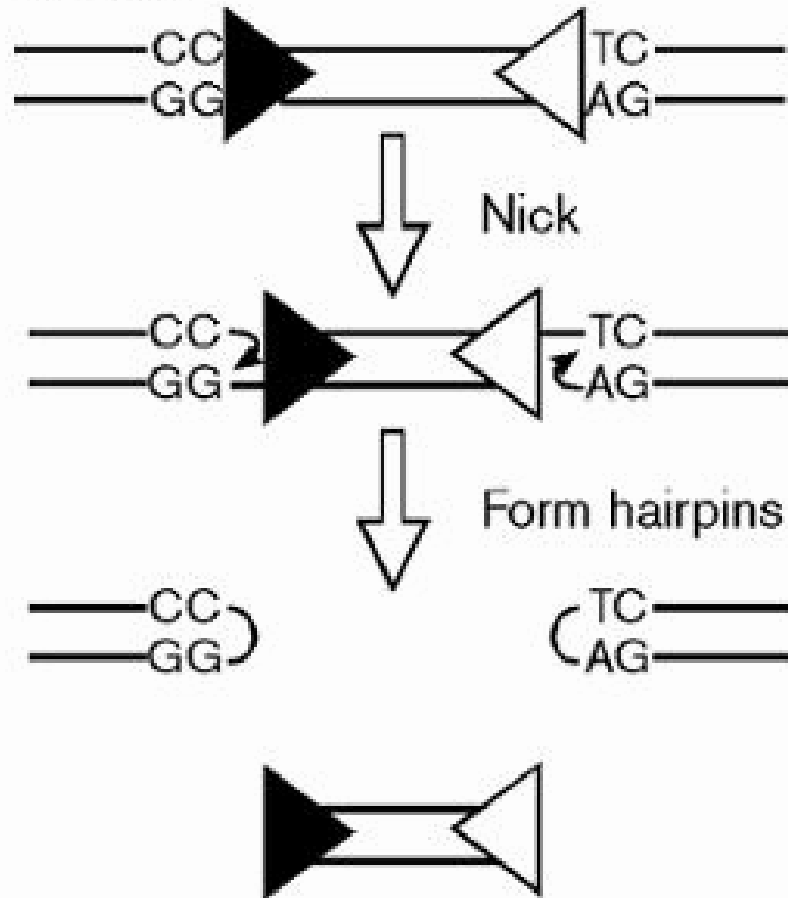
TCR γ

TCR δ



La recombinaison V(D)J (2)

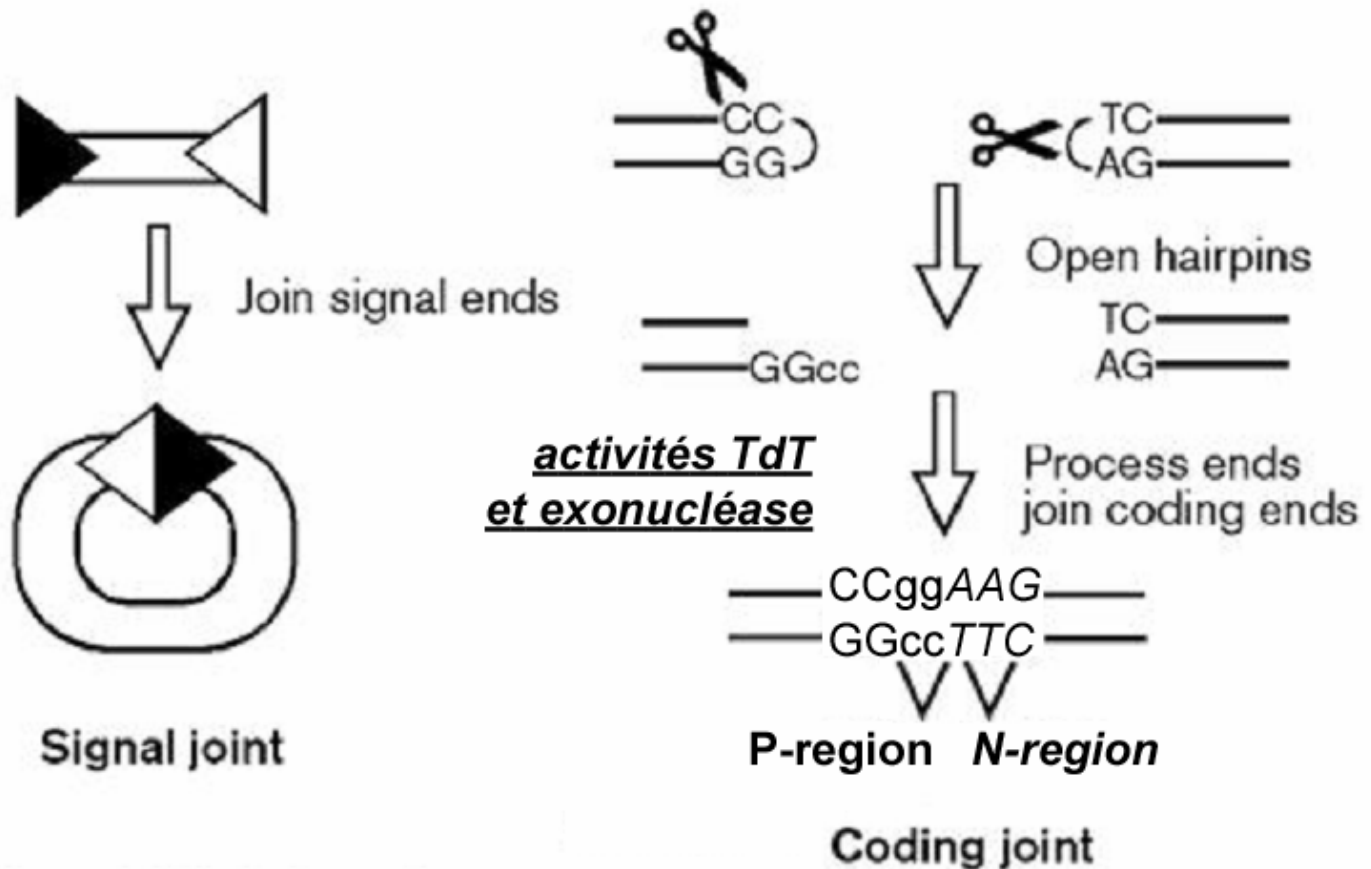
(a) Cleavage



© 1996 Current Opinion in Immunology

La recombinaison V(D)J (3)

(b) Joining



La recombinaison V(D)J (4)

Différentes protéines sont impliquées :

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

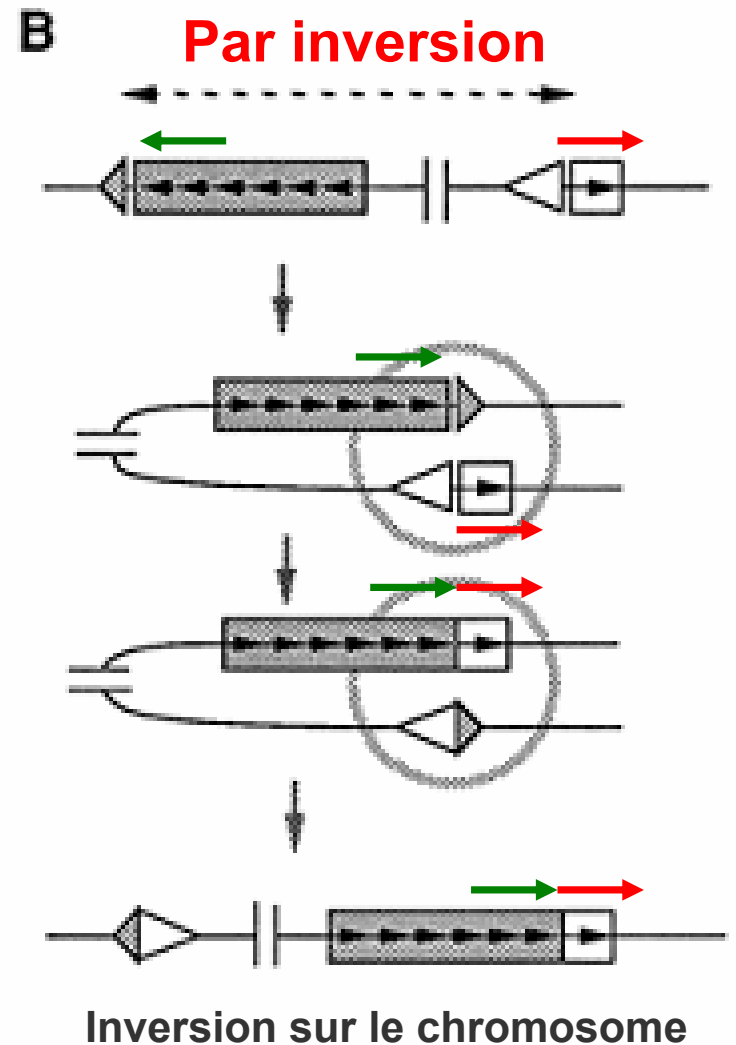
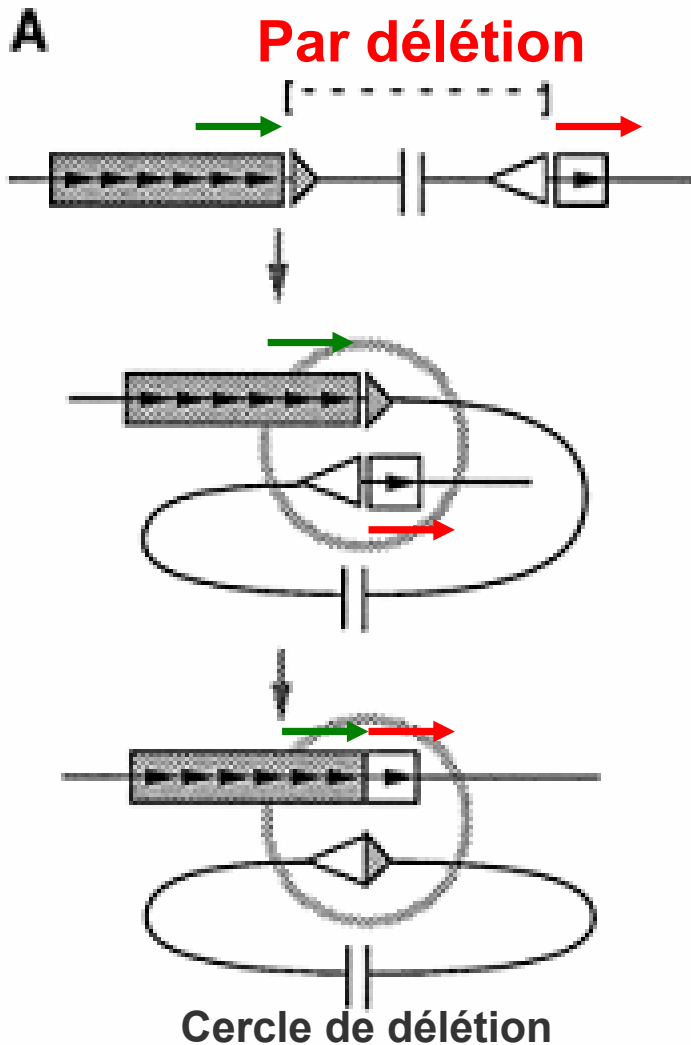
La recombinaison V(D)J (5)

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 (+).

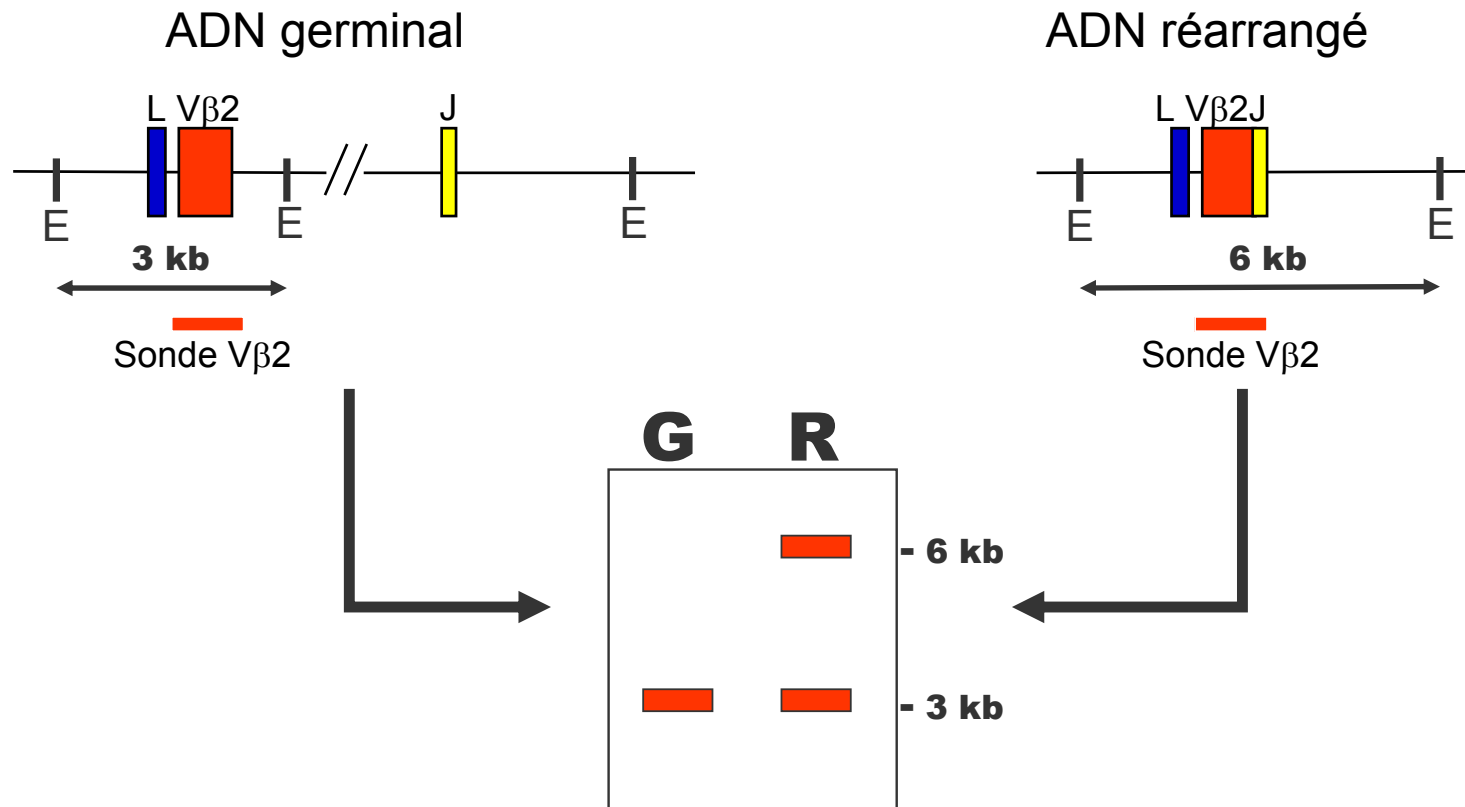
<i>Cys</i>	<i>Ala</i>	...V	>	N(D)N	<	J...	<i>Phe</i>	<i>Gly</i>	
<i>TGT</i>	<i>CGA</i>	CC				<i>TCGC</i>	<i>TTT</i>	<i>GGT</i>	
<i>TGT</i>	<i>CGA</i>	CC		g aa		G	<i>CTT</i>	<i>TGGT</i>	-
<i>TGT</i>	<i>CGA</i>	CC		g gaa		GCT	<i>TTG</i>	<i>GT</i>	-
<i>TGT</i>	<i>CGA</i>	CC		g gaa g		GC	<i>TTT</i>	<i>GGT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

Différents types de réarrangements



Détection des réarrangements (1)

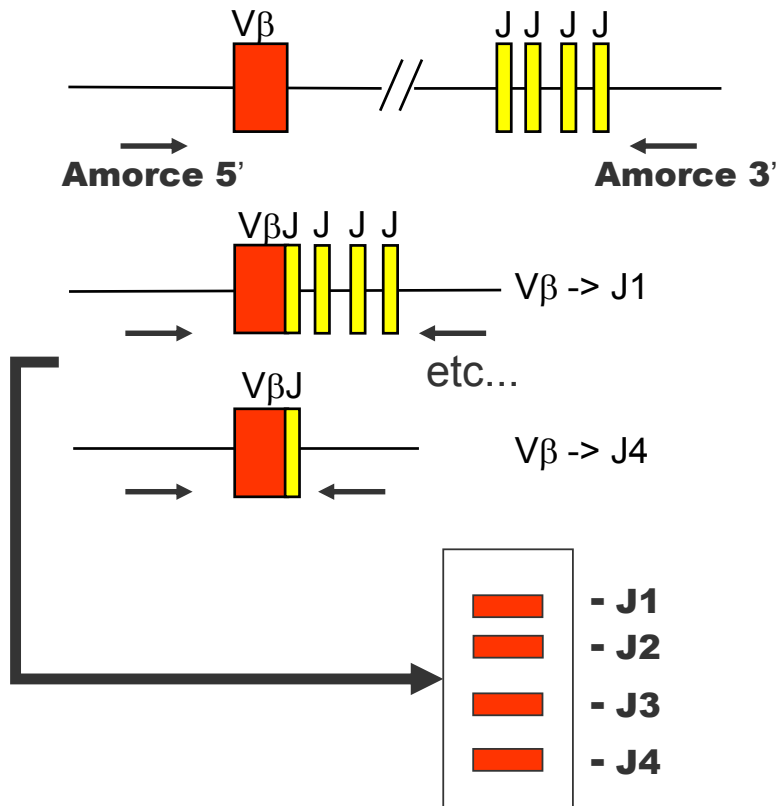
- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par la technique de Southern blot.



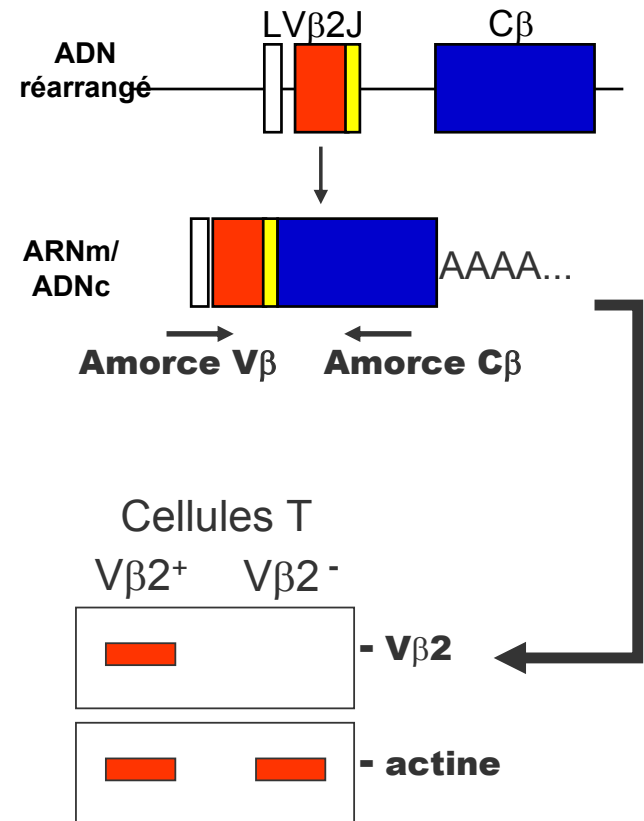
Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR aux niveaux ADN et ARN.

ADN



ARN

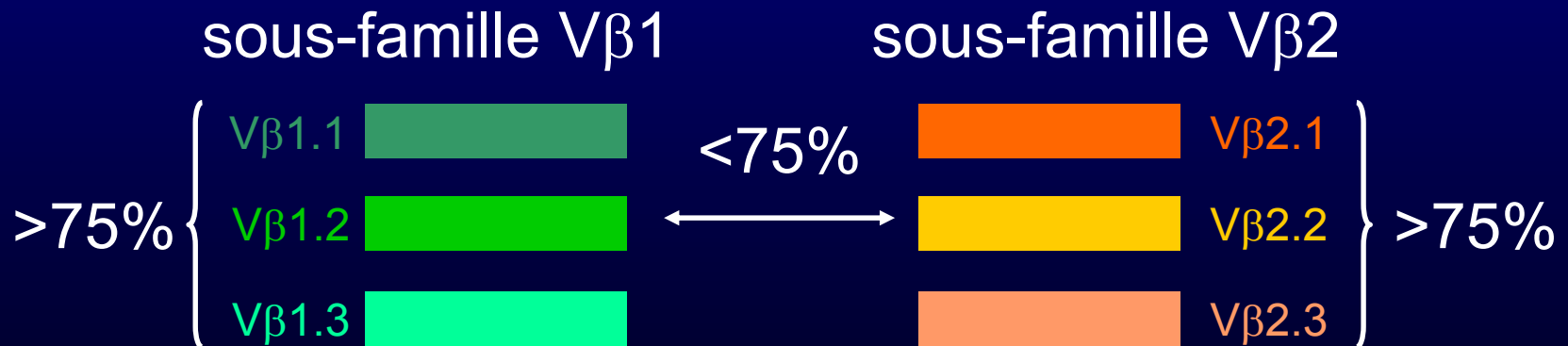


Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

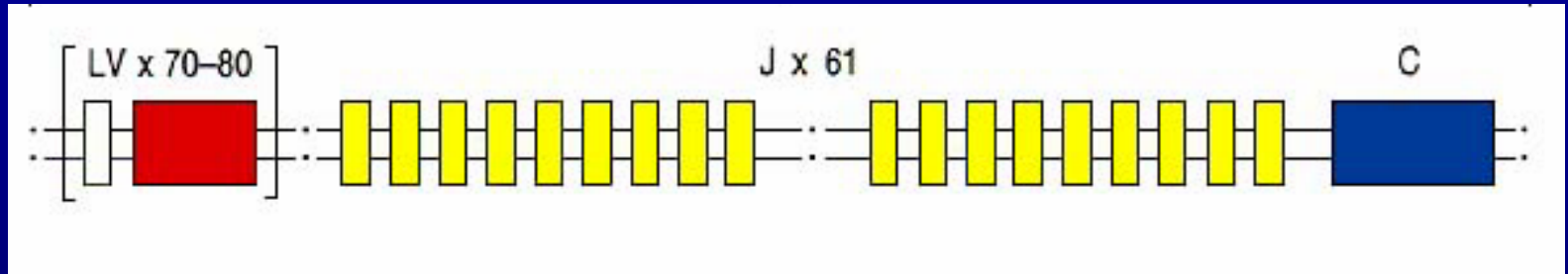
1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

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.

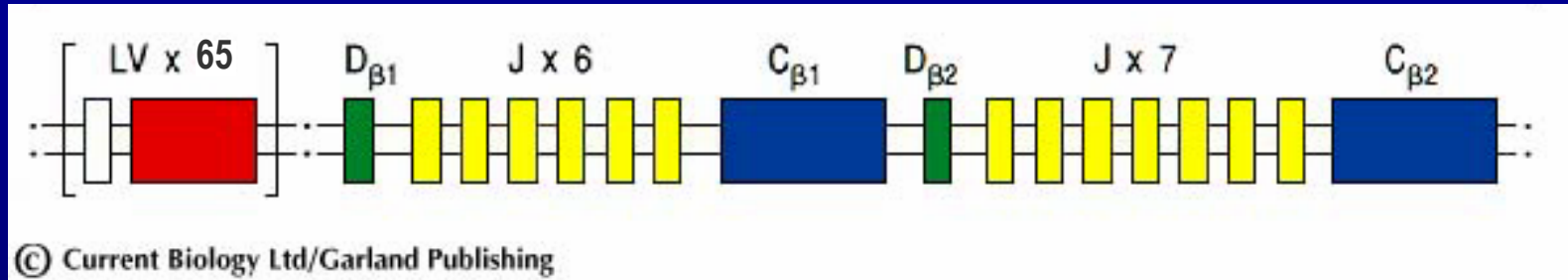


Organisation génomique du locus TCR α humain



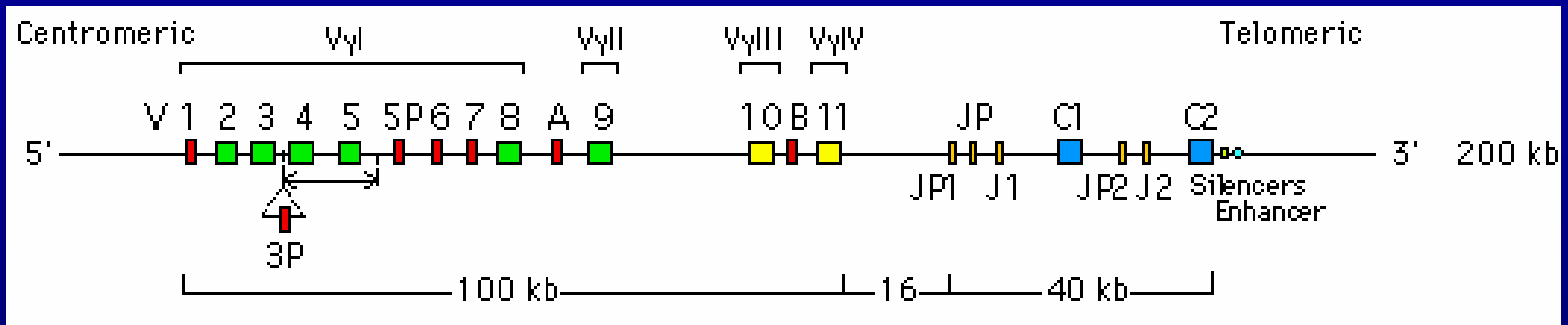
- Chromosome 14
- Entièrement séquencé (1.1 Mb)
- 70-80 V α groupés en 41 sous-familles
- 61 J α , un seul C α

Organisation génomique du locus TCR β humain



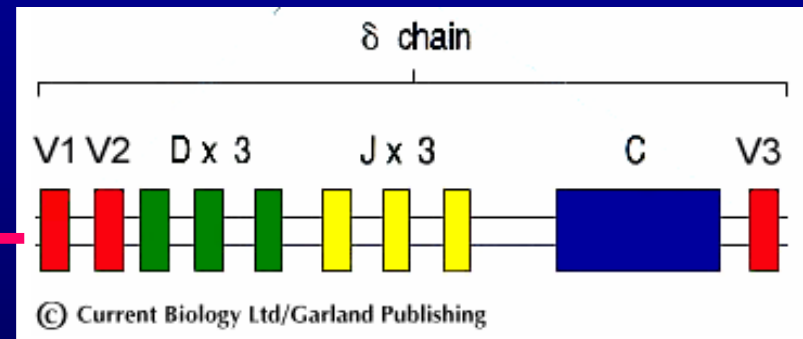
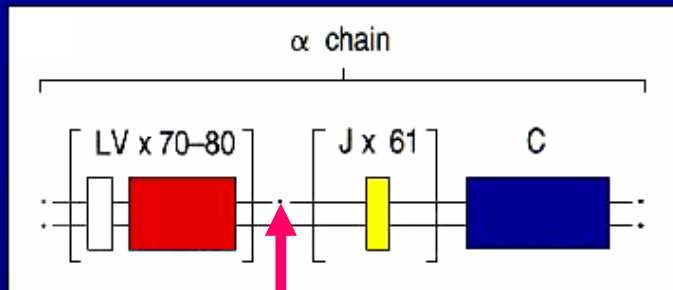
- Chromosome 7
- Entièrement séquencé (685 kb)
- 65 segments V β
- 30 sous-familles (1-9 membres)
- 2 D β , 13 J β , 2 C β , en deux répétitions

Organisation génomique du locus TCR γ humain



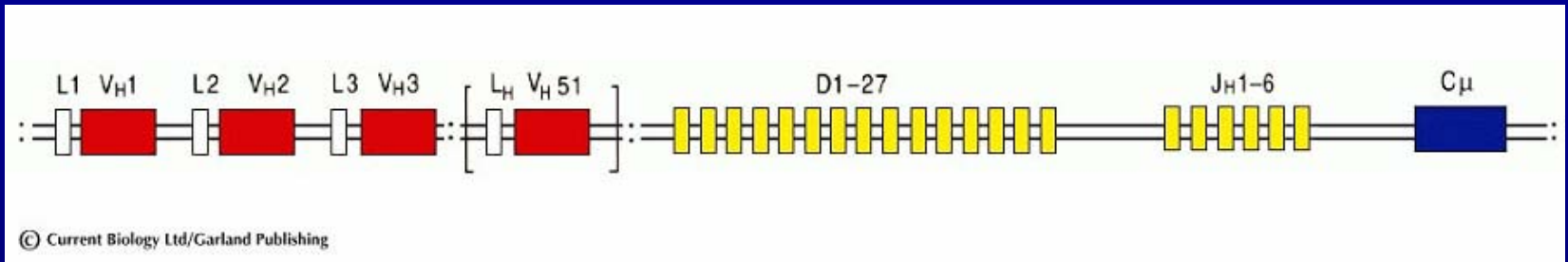
- Chromosome 7
- 14 V γ groupés en 4 sous-familles
- 5 J γ , 2 C γ , en deux répétitions
- Deux formes C γ 2 sans cystéine dans le peptide charnière → pas de pont disulfure avec la chaîne TCR δ

Organisation génomique du locus TCR δ humain



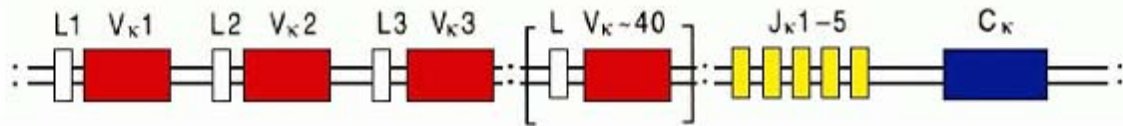
- Chromosome 14, inséré dans le locus TCR α
- 3 V δ principaux, 3 D δ , 3 J δ , un seul C δ
- Des V α sont utilisés par les chaînes TCR δ : V α / δ 14.1, V α / δ 23.1, V α / δ 29.1, V α / δ 36.1, V α / δ 38.2
- 2 ou 3 D δ souvent en tandem dans CDR3

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

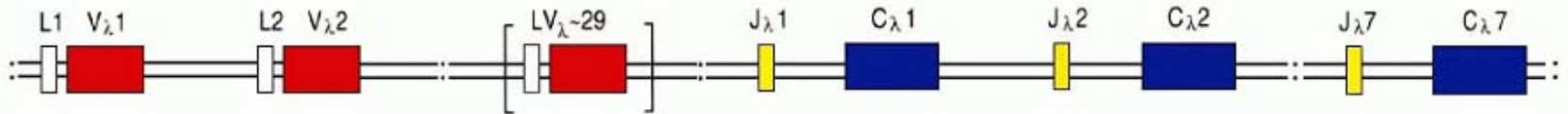
Organisation génomique du locus Ig κ humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

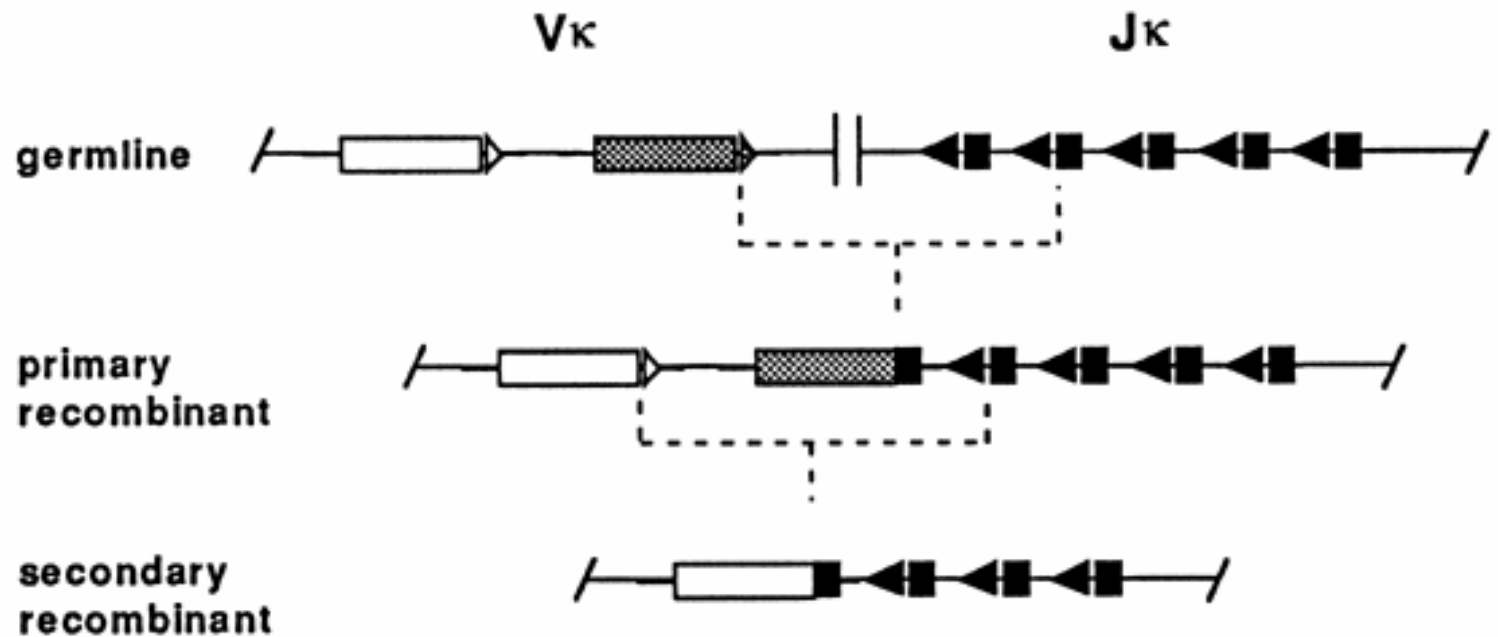
Organisation génomique du locus Ig λ humain



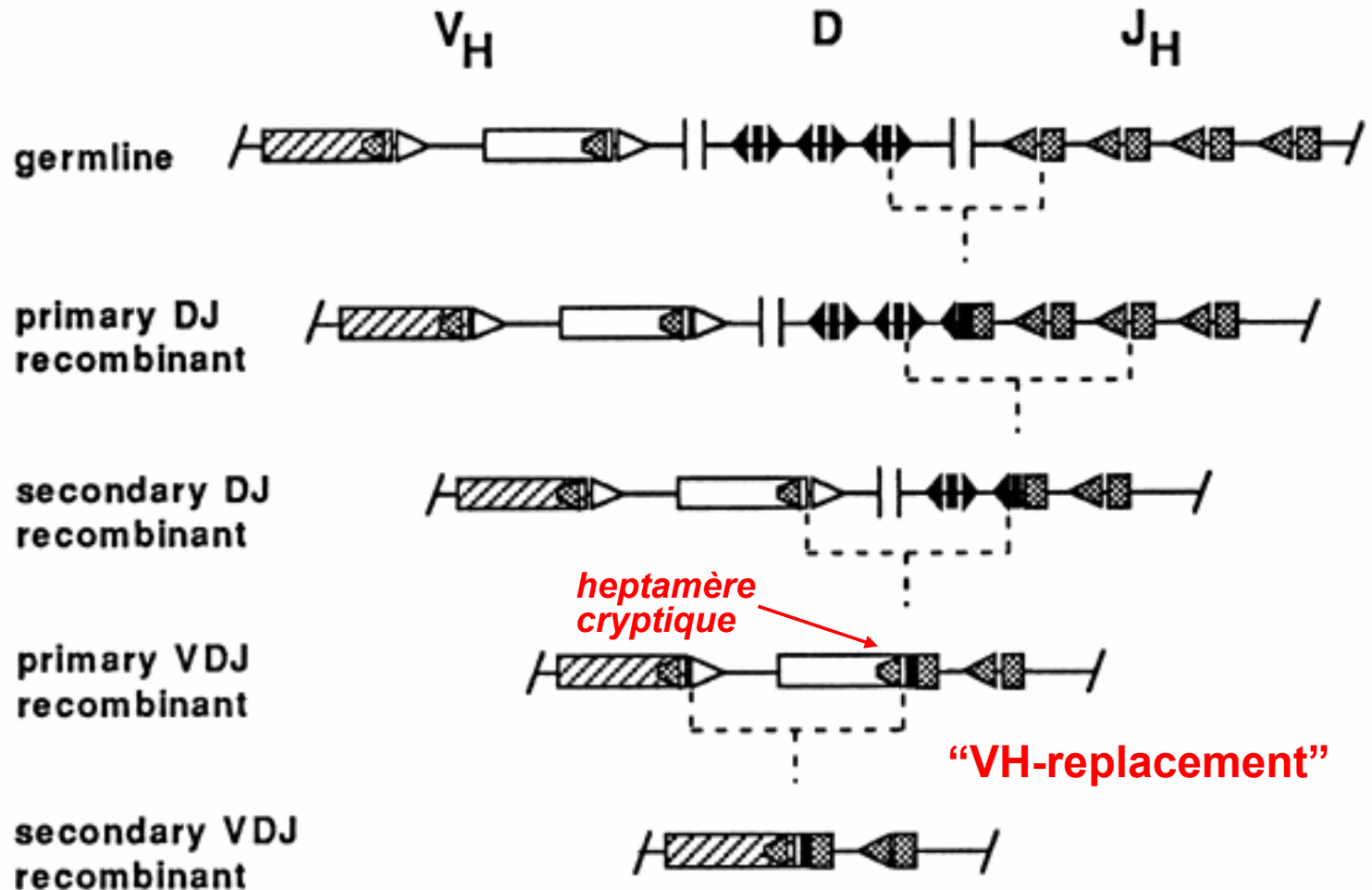
© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

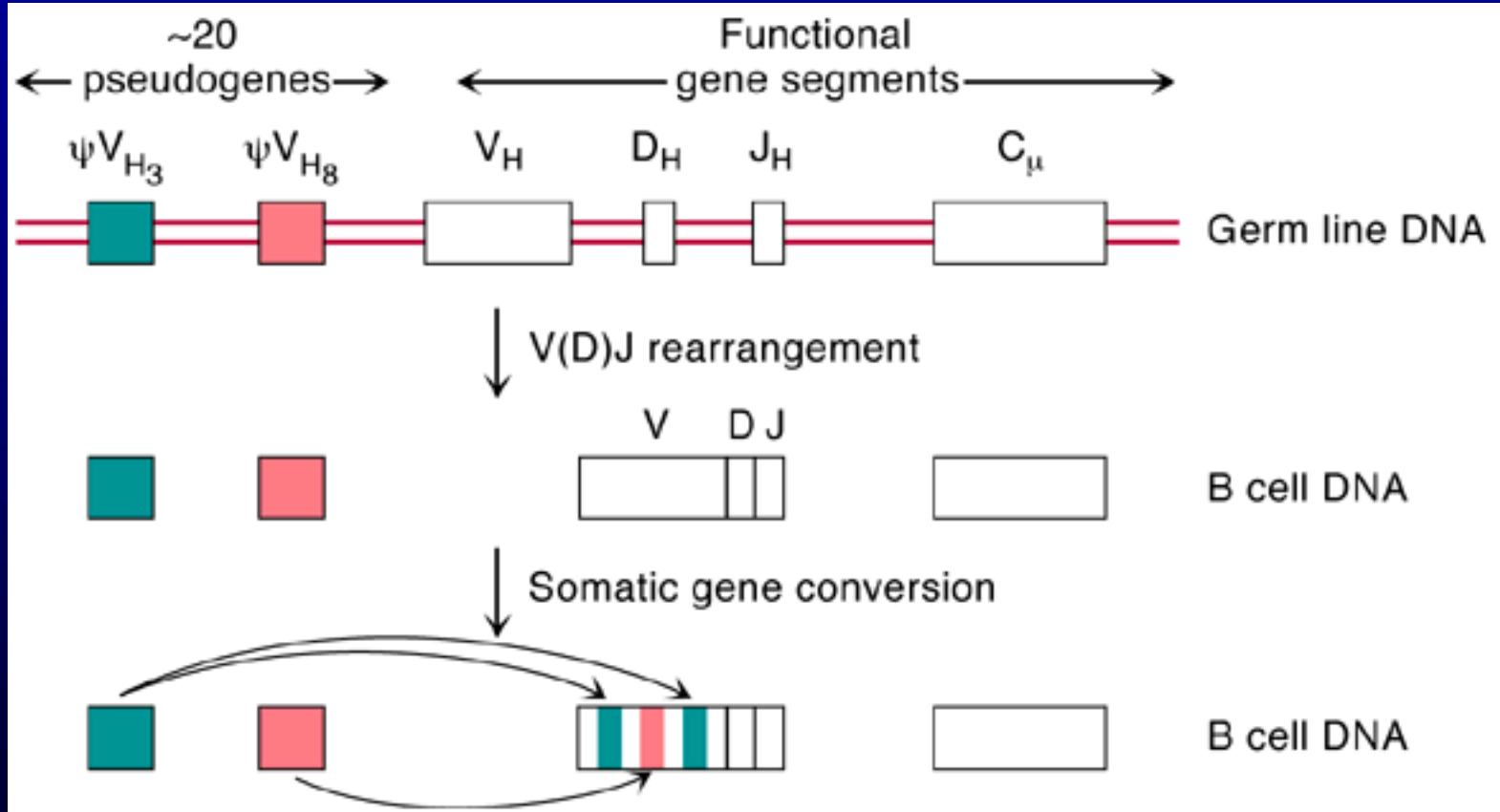
Réarrangements secondaires (1)



Réarrangements secondaires (2)



Conversion génique

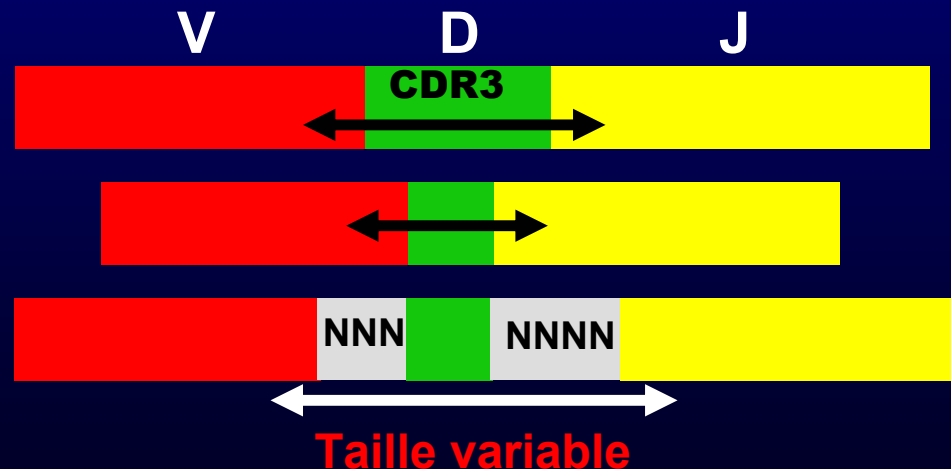


Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

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

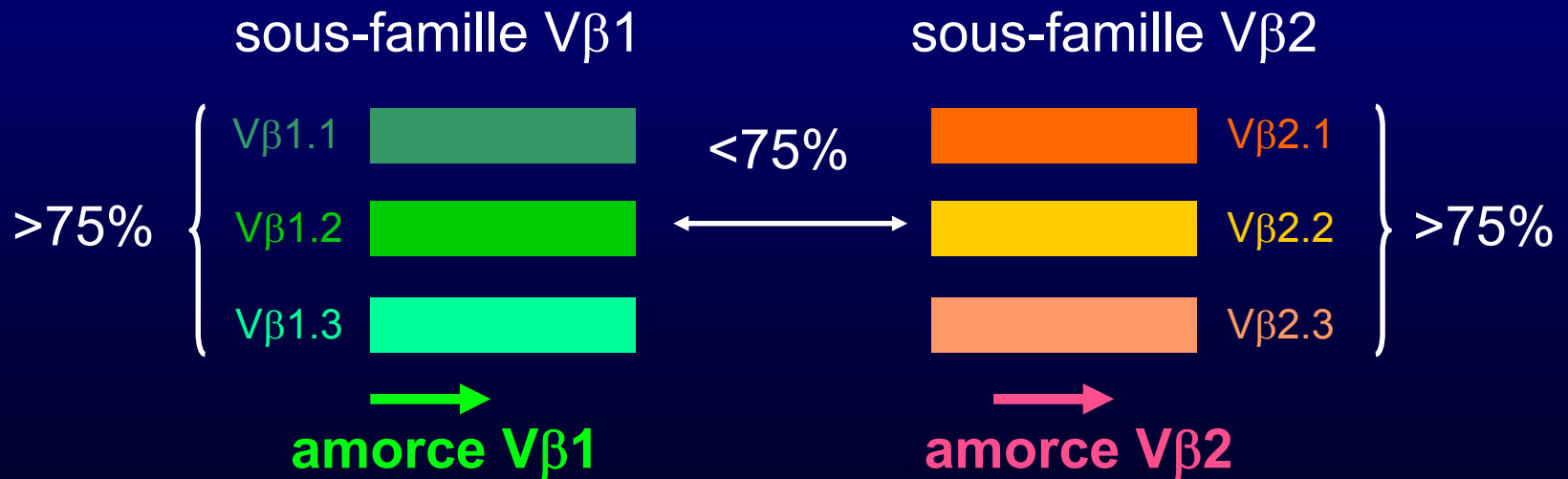
La région CDR3 concentre l'essentiel de la diversité

- 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*

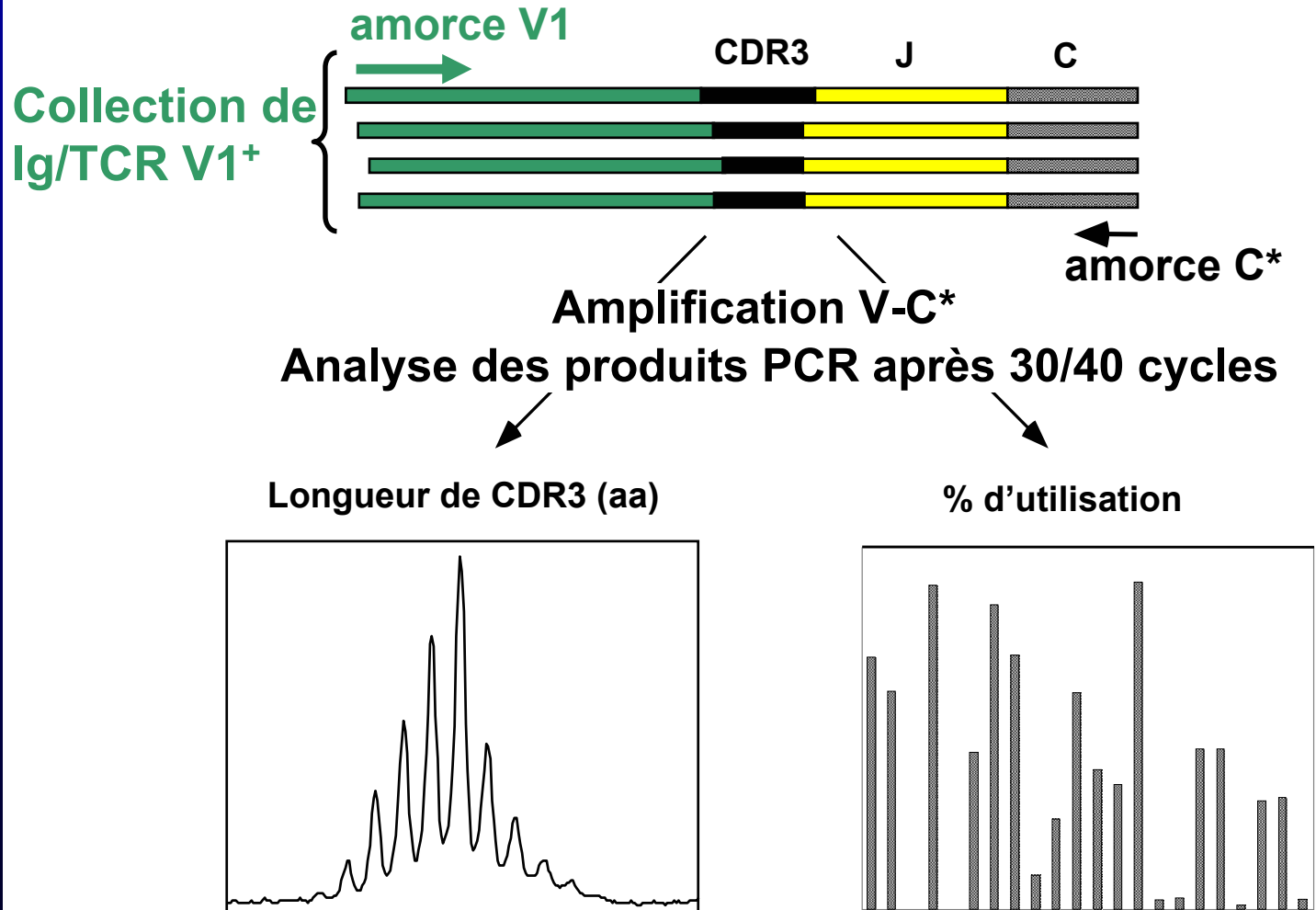


Amorces de sous-familles

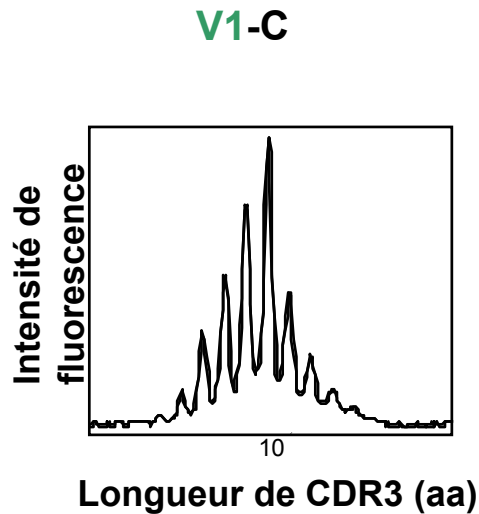
- Étant donné l'identité entre les membres d'une sous-famille Ig/TCR, il est généralement possible de dessiner des amorces spécifiques de sous-familles.



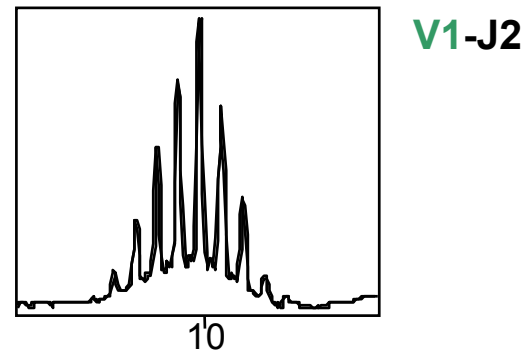
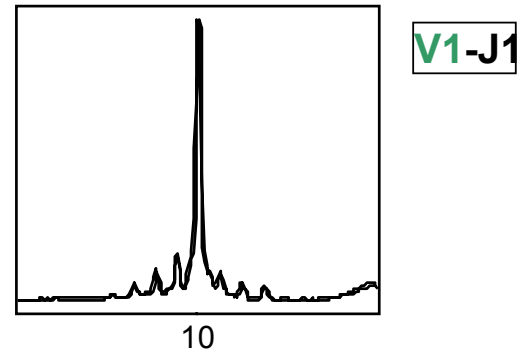
La technique Immunoscope (1)



La technique Immunoscope (2)



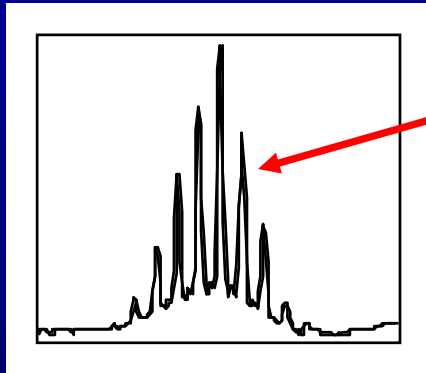
2 dimensions: VxCDR3



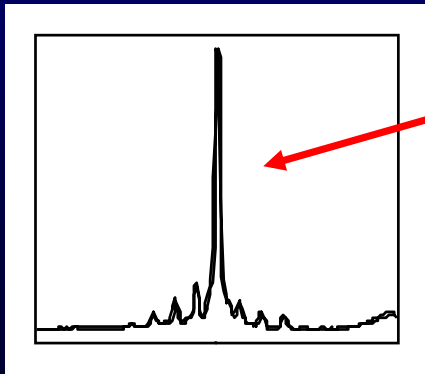
3 dimensions: VxJxCDR3

D'après Pannetier et coll. (1995) Immunol. Today 16, 176-180

La technique Immunoscope (3)

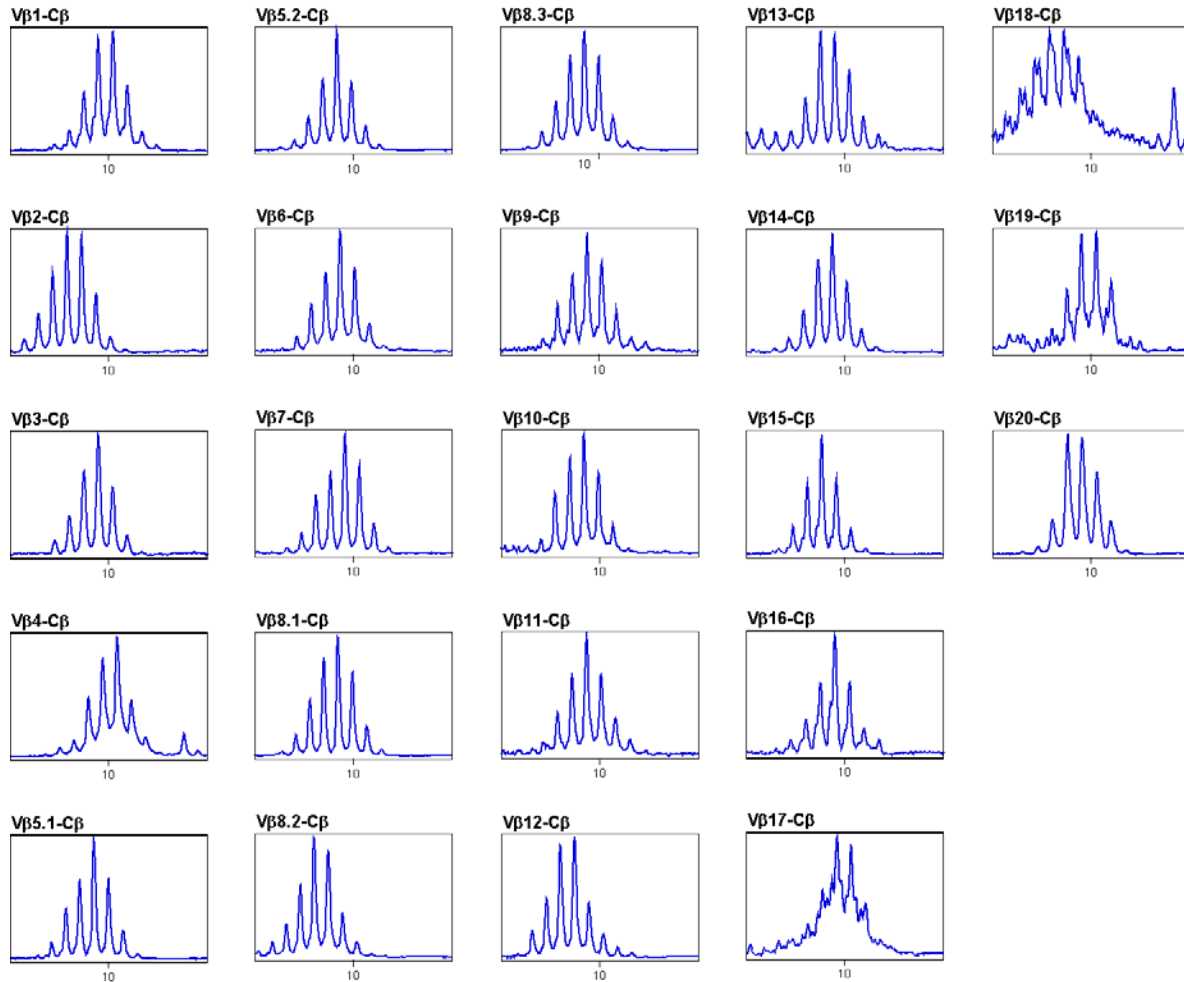


Courbe en cloche régulière:
indicatif d'une
population polyclonale

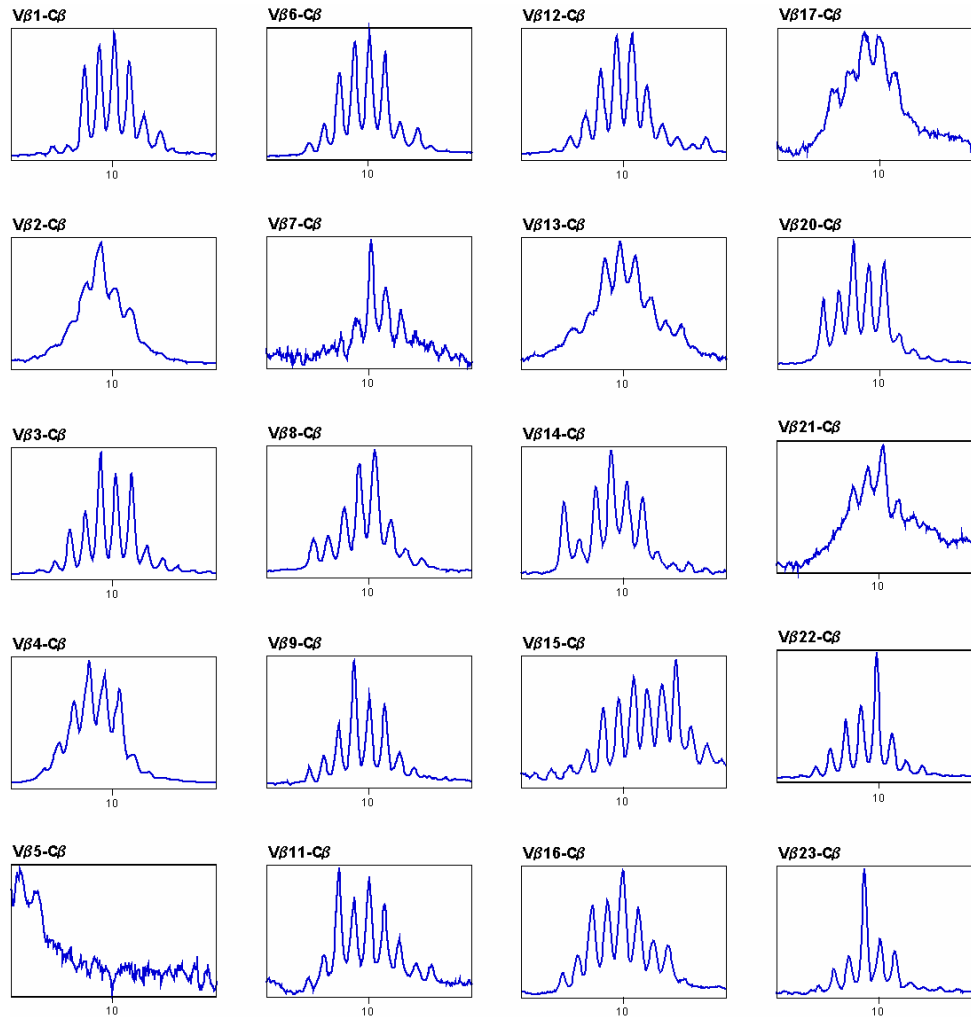


Pic proéminent:
indicatif d'une *population*
oligoclonale ou *clonale*
→ *expansion clonale*

Répertoire TCR β naif de la souris



Répertoire TCR β chez l'homme sain

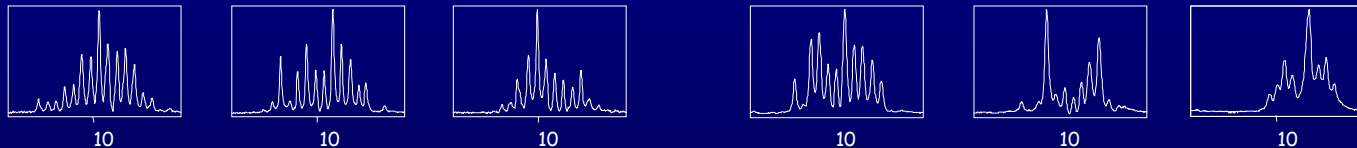


Réponse IgG anti-DNP oligoclonale chez les souris B6. $\kappa^{-}\lambda^{SEG}$

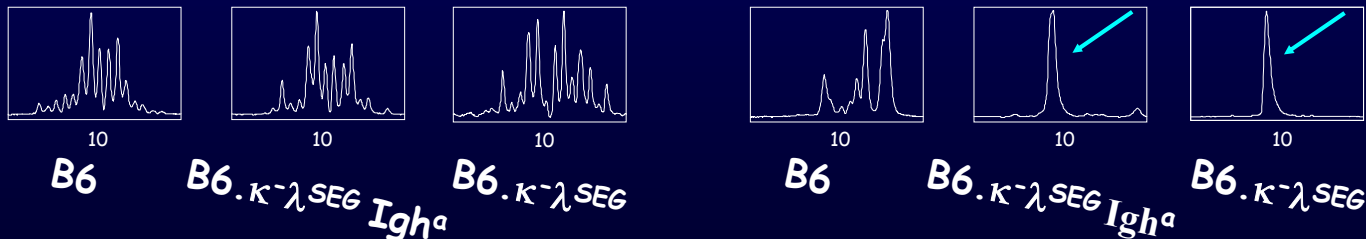
VH J558

VH 36-60

Témoins



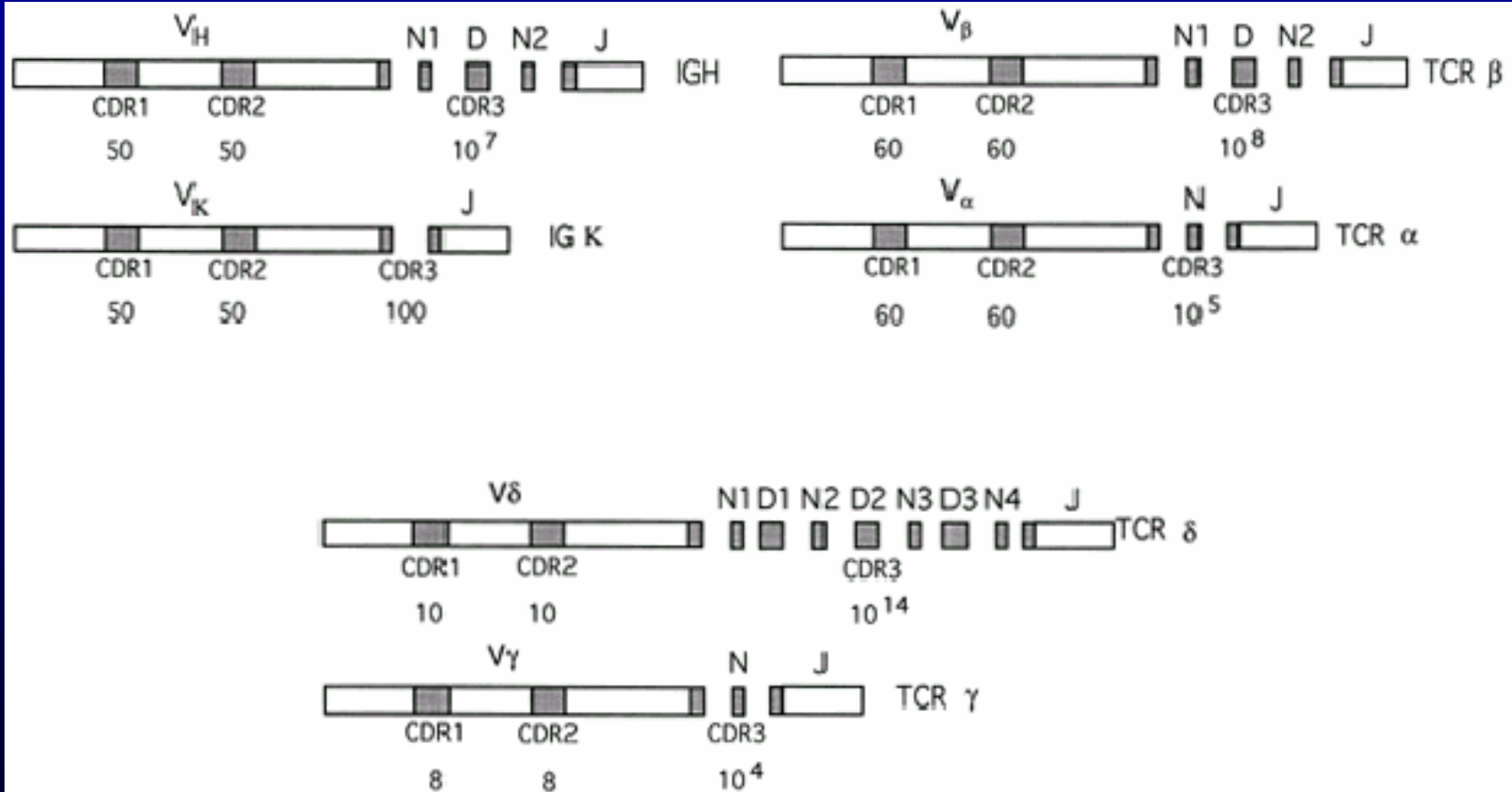
Immunisés



Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

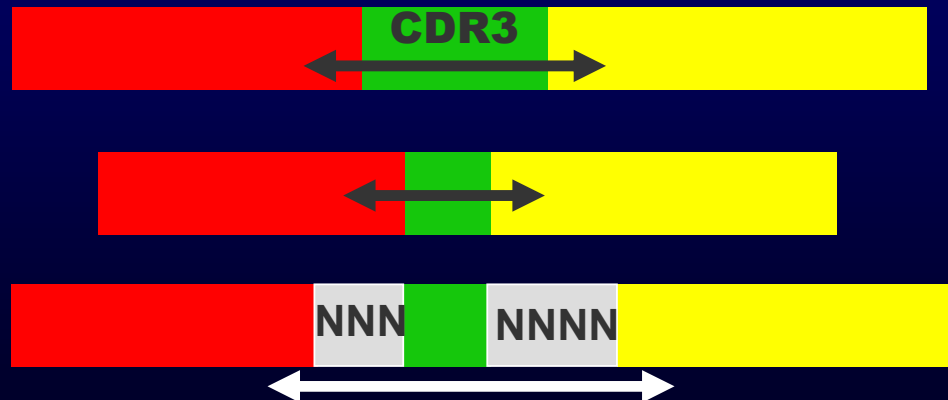
Conclusion

Diversité jonctionnelle CDR3 : une stratégie générale

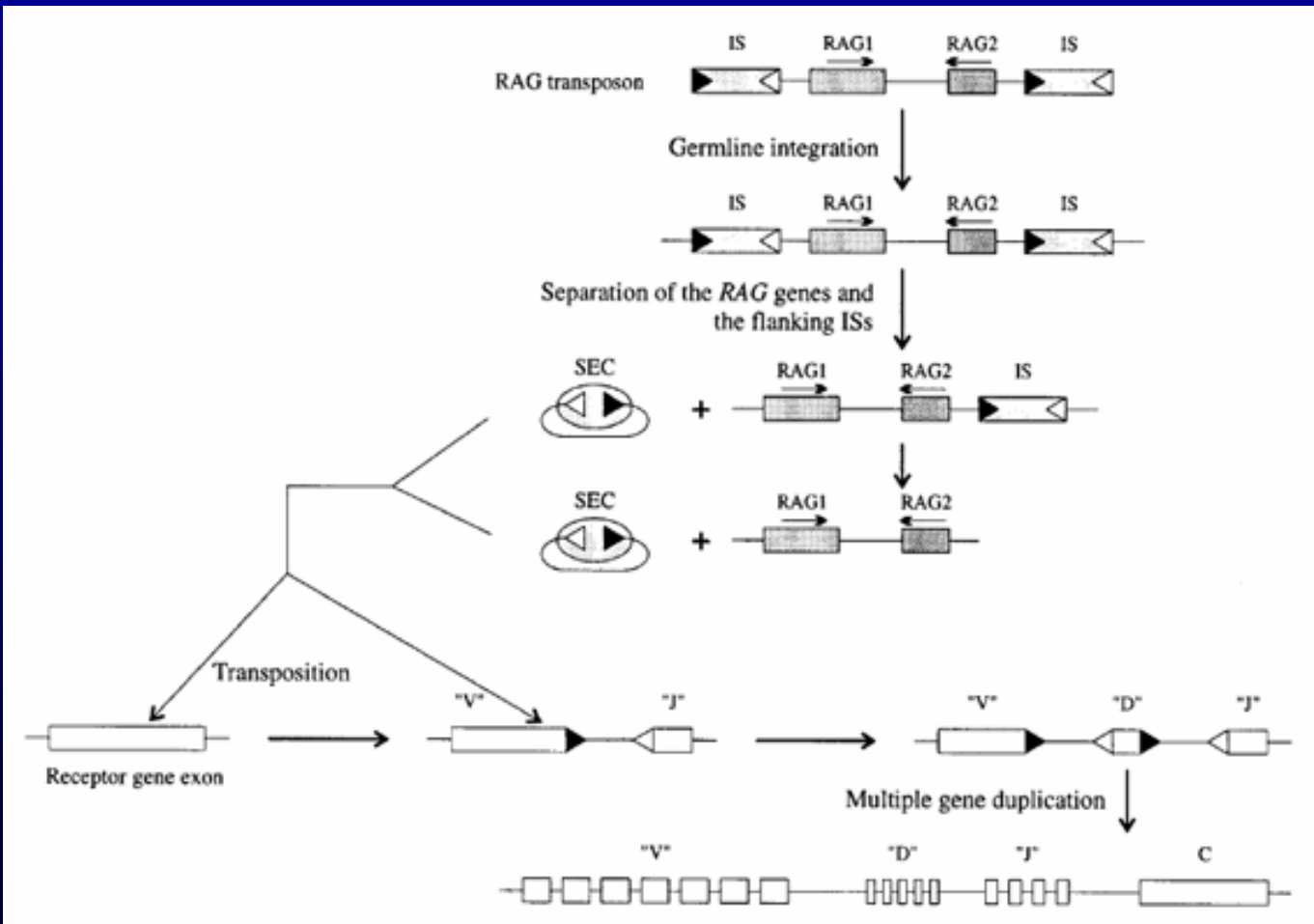


Diversité des chaînes Ig et TCR

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

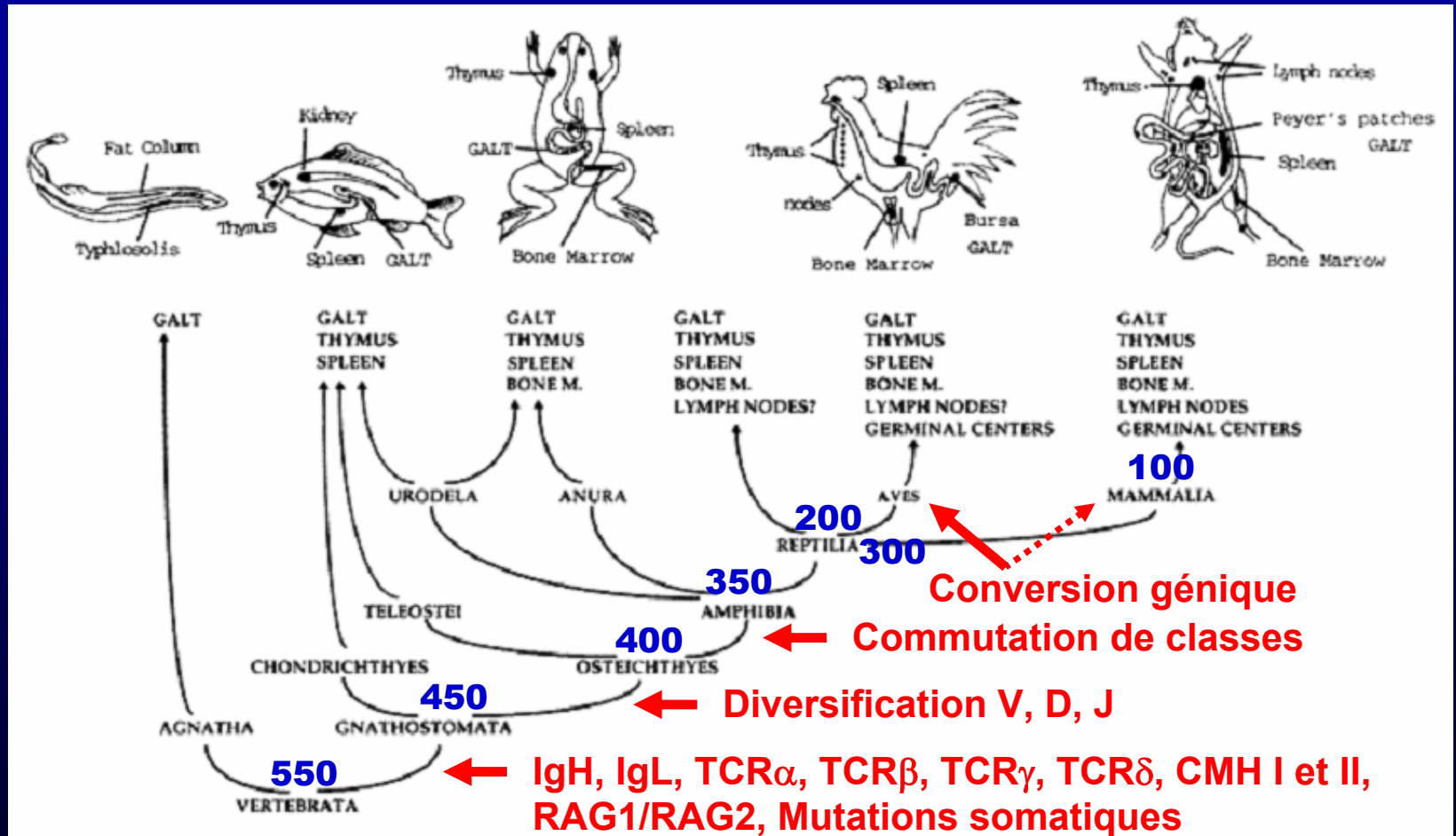


Origine de la recombinaison V(D)J



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*, 4th edition, W.E. Paul ed.

Questions/Discussion...