

Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2006 IF-IVa&IVb
21 février 2006

1

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

2

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

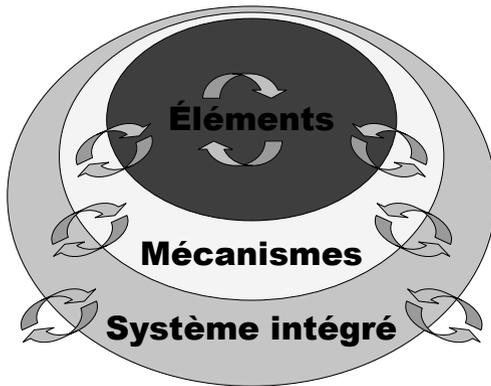
3

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)

4

Étude du système immunitaire



5

Émergence de l'Immunologie

- À la fin du 19^{ème} siècle, de la microbiologie
- Développement de la vaccination par Louis Pasteur (1822–1895) (choléra, anthrax, rage)
- Immunité naturelle:
Phagocytose des microorganismes par les macrophages (Metchnikoff)
- Immunité acquise:
Découverte des anticorps ou immunoglobulines (von Behring et Kitasato) → spécificité et mémoire de la réponse anticorps

6

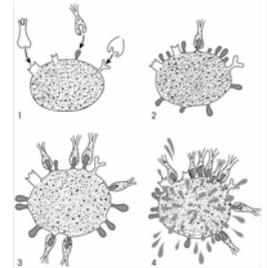
Théorie humorale de l'immunité

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

7

Théorie des chaînes latérales P.Erhlich (1854–1915)

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



8

Théories de la diversité des Ac

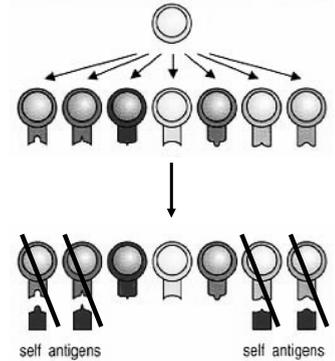
- Théorie sélective de Ehrlich réfutée par Landsteiner
→ anticorps contre des antigènes artificiels
- Comment la sélection naturelle conserve des gènes codant des anticorps dirigés contre des molécules qui n'existaient pas auparavant?
⇒ Émergence des théories instructives et directives
- Développements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

9

Théorie de la sélection clonale (1)

Burnet (1899–1985)

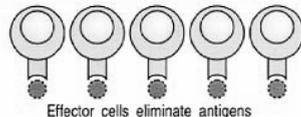
- Chaque lymphocyte exprime un type unique de récepteur spécifique d'antigène
- Les lymphocytes exprimant un récepteur dirigé contre un antigène du soi sont éliminés lors de la différenciation



10

Théorie de la sélection clonale (2)

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



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

11

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 ?

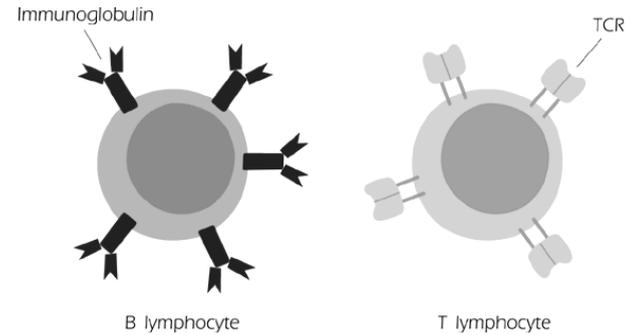
12

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

15

Les lymphocytes B et T

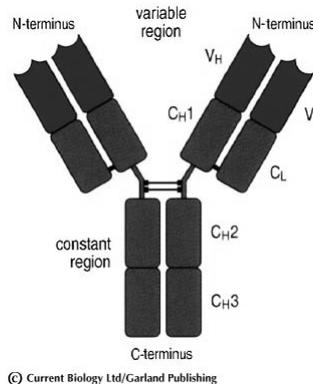


→ caractérisés par leur récepteur spécifique d'antigène

16

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

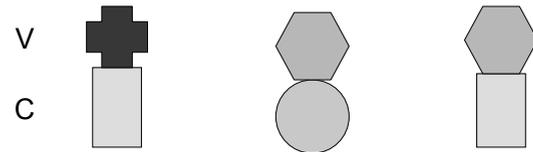


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

17

Fonctions anticorps et effectrice

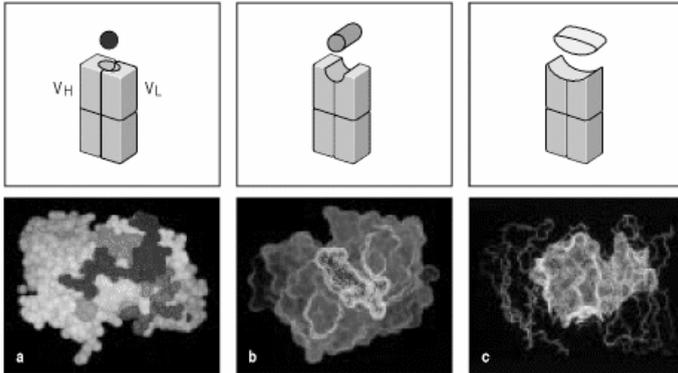
Fonction spécifique = Fonction anticorps



Fonction non spécifique = Fonction effectrice

18

Reconnaissance d'une forme



L'anticorps reconnaît directement l'antigène

19

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)

20

Identification des gènes de TCR

- En 1984, le gène 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**

21

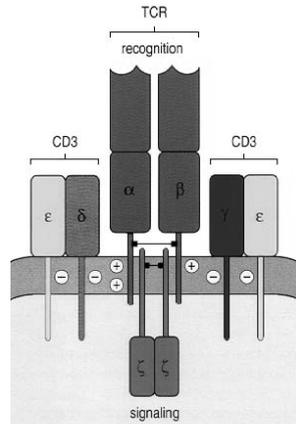
Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

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

22

Le complexe TCR – CD3

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



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

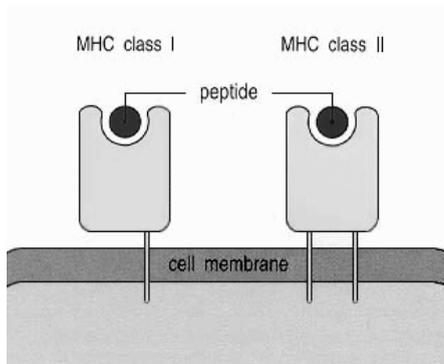
23

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*

24

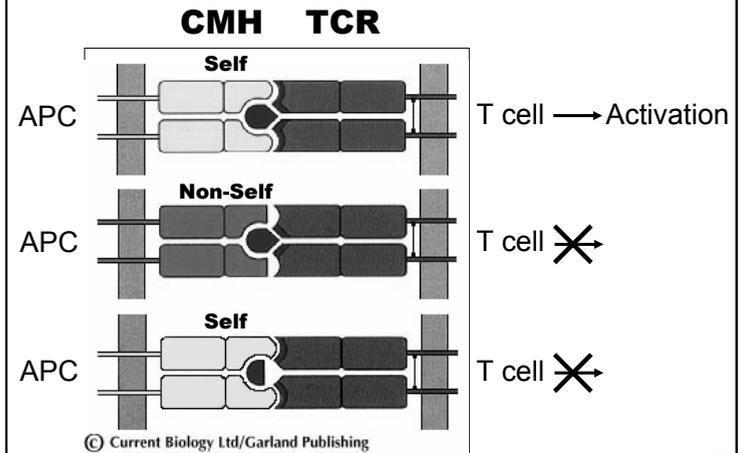
La présentation antigénique



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

25

Restriction par le CMH



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

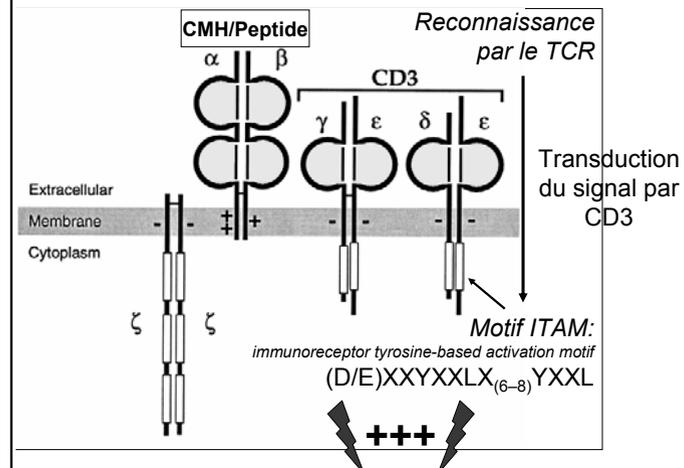
26

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)

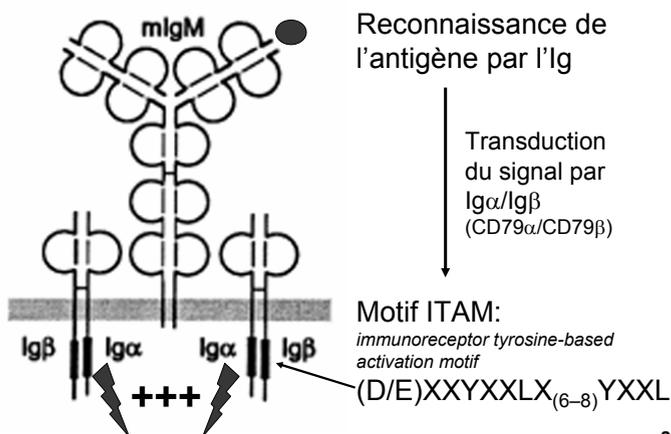
27

Transduction du signal TCR/CD3



28

Transduction du signal BCR



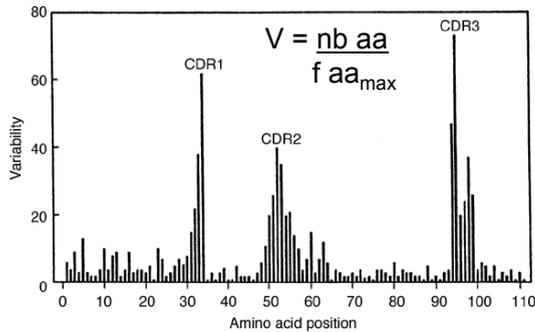
29

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

30

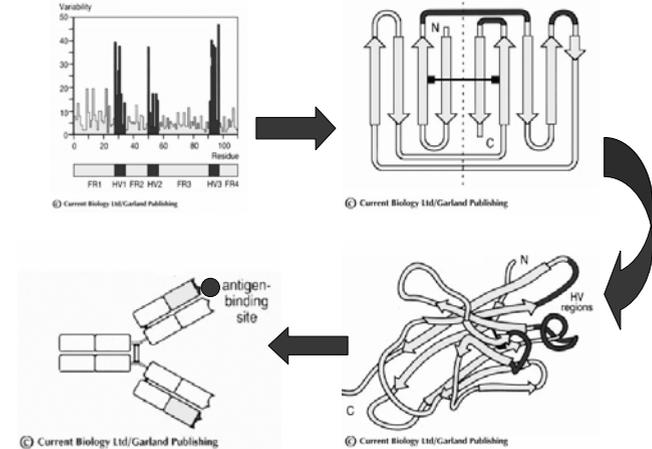
Les régions hypervariables (1)



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...

31

Les régions hypervariables (2)



32

Un paradoxe génétique

- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
 - ~30 000 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)

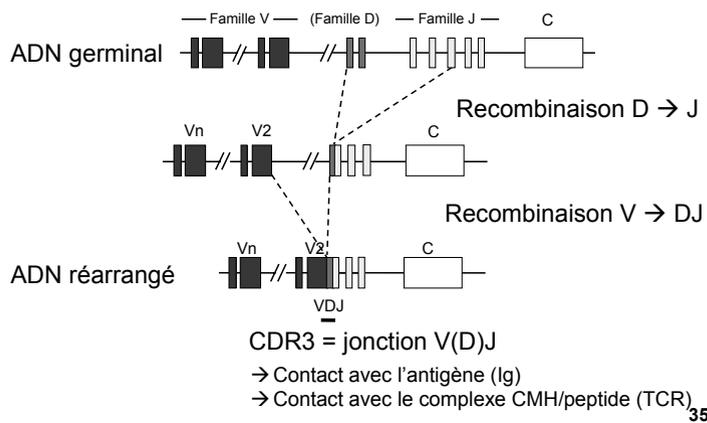
33

« 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.

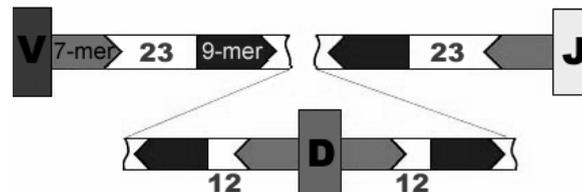
34

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



La recombinaison V(D)J (1)

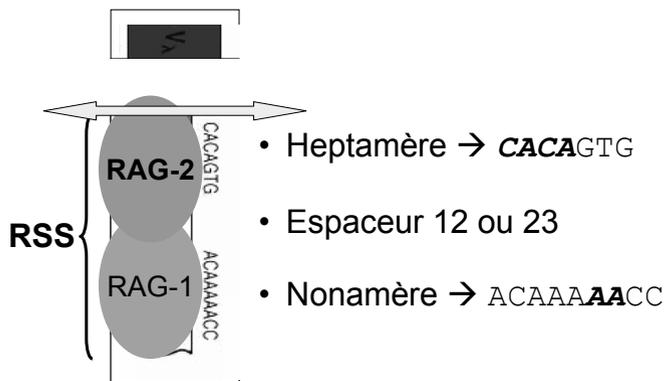
- Nécessite l'expression des protéines RAG-1 et RAG-2
- Nécessité de l'ouverture/accessibilité de la chromatine pour la recombinaison
- Reconnaissance de RSS : heptamère-espaceur-nonamère suivant la règle 12/23



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

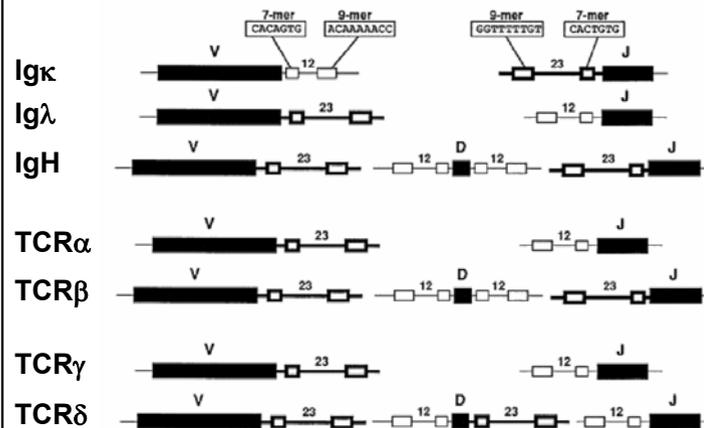
36

Séquences signal de recombinaison



37

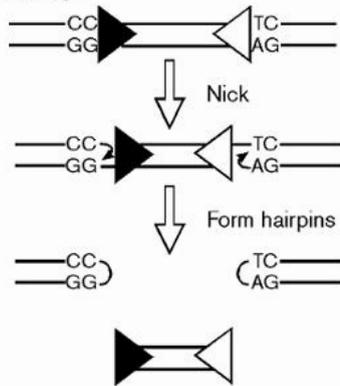
La règle 12/23 pour les Ig et TCR



38

La recombinaison V(D)J (2)

(a) Cleavage

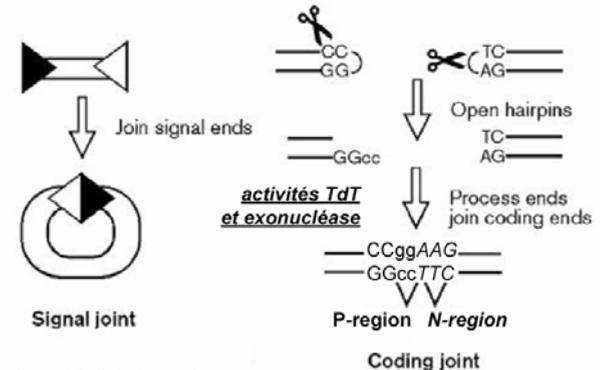


© 1996 Current Opinion in Immunology

39

La recombinaison V(D)J (3)

(b) Joining



© 1996 Current Opinion in Immunology

40

La recombinaison V(D)J (4)

Différentes protéines sont impliquées :

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

41

La recombinaison V(D)J (5)

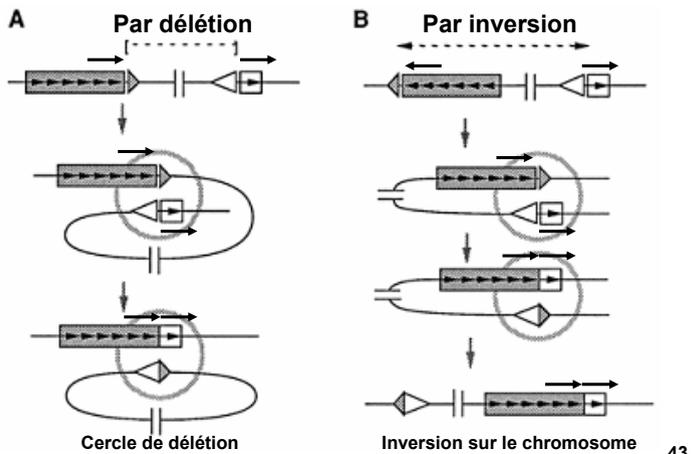
Réarrangements en phase vs. hors phase :

- 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 CTT TGGT	-
<i>TGT CGA CC</i>	g gaa	GCT TTG GT	-
<i>TGT CGA CC</i>	g gaa g	GC TTT GGT	+
<i>TGT CGA CC</i>	g gaa gt	G CTT TGGT	-
<i>TGT CGA CC</i>	g gga agt	GCT TTG GT	-
<i>TGT CGA CC</i>	g gga agt t	GC TTT GGT	+

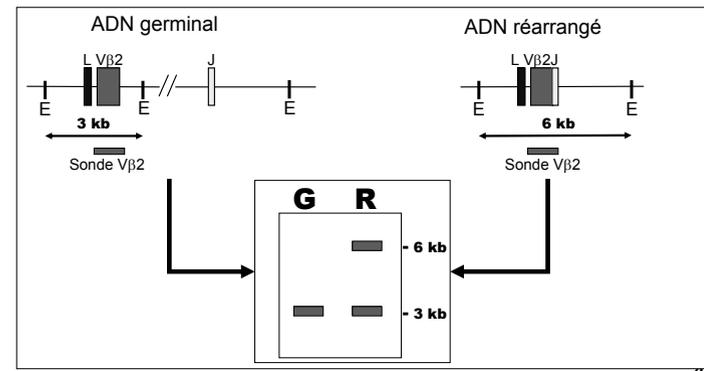
42

Différents types de réarrangements



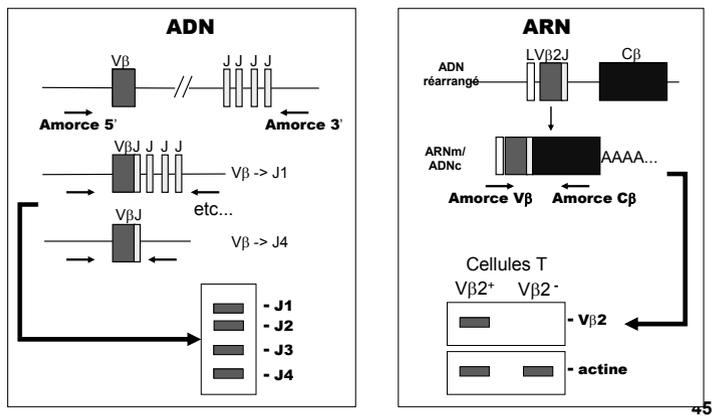
Détection des réarrangements (1)

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



Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR aux niveaux ADN et ARN.

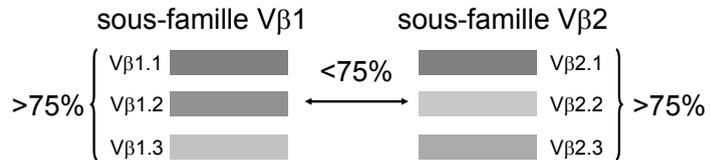


Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

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

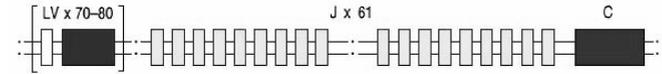
Sous-familles de gènes variables

- 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.



47

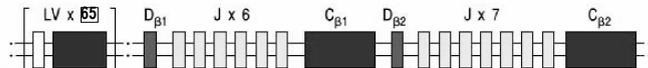
Organisation génomique du locus TCRα humain



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

48

Organisation génomique du locus TCRβ humain

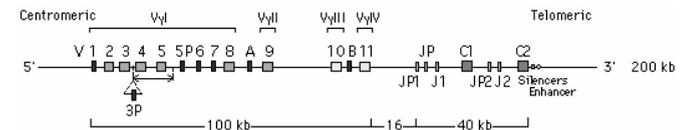


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- Chromosome 7
- Entièrement séquencé (685 kb)
- 65 segments Vβ
- 30 sous-familles (1-9 membres)
- 2 Dβ, 13 Jβ, 2 Cβ, en deux répétitions

49

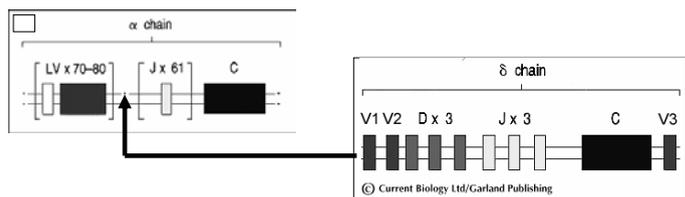
Organisation génomique du locus TCRγ humain



- Chromosome 7
- 14 Vγ groupés en 4 sous-familles
- 5 Jγ, 2 Cγ, en deux répétitions
- Deux formes Cγ2 sans cystéine dans le peptide charnière → pas de pont disulfure avec la chaîne TCRδ

50

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

51

Organisation génomique du locus IgH humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- 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

52

Organisation génomique du locus Ig κ humain

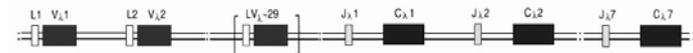


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- 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

53

Organisation génomique du locus Ig λ humain

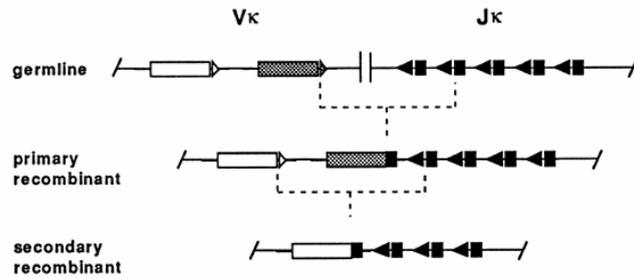


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- 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)

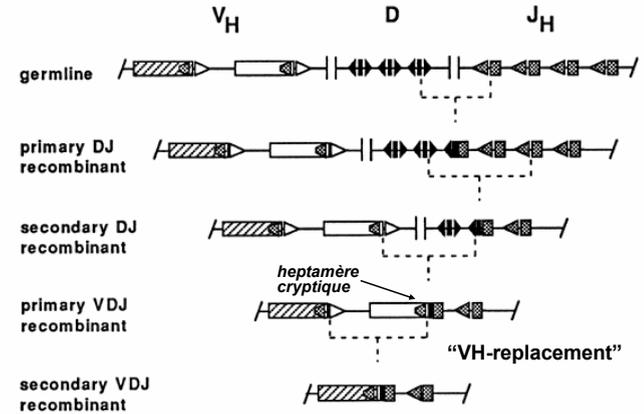
54

Réarrangements secondaires (1)



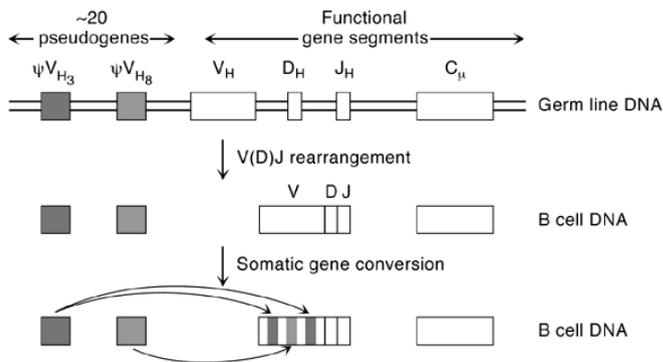
56

Réarrangements secondaires (2)



57

Conversion génique



58

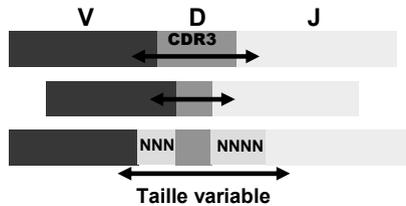
Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

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

59

La région CDR3 concentre l'essentiel de la diversité

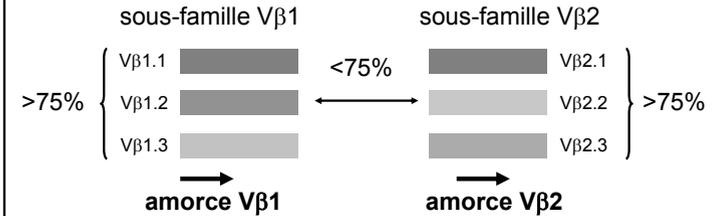
- La recombinaison V(D)J est imprécise
- Activité exonucléase → délétions aléatoires
- Activité TdT → additions N aléatoires
- La région CDR3 est de taille variable; c'est la *signature du réarrangement*



60

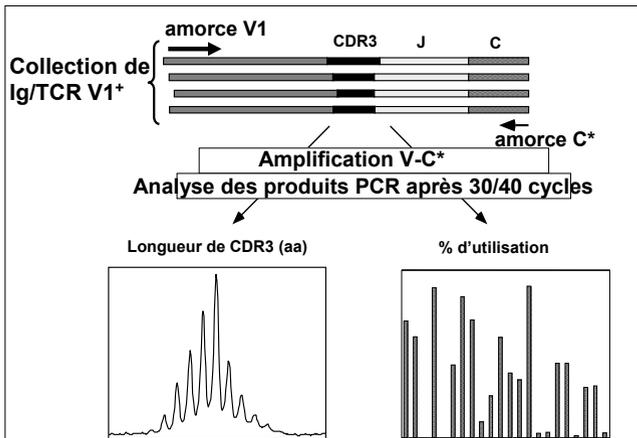
Amorces de sous-familles

- 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.



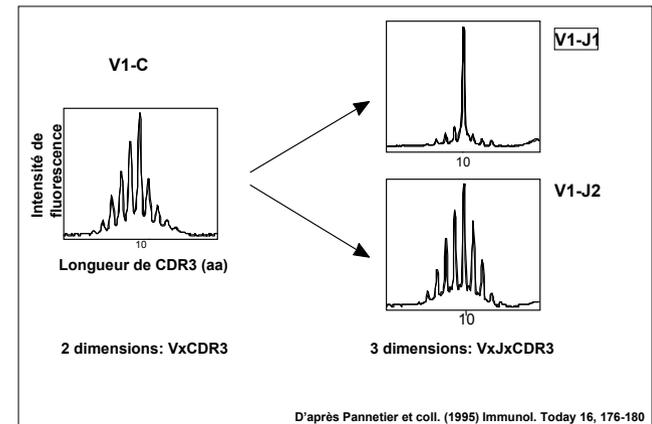
61

La technique Immunoscope (1)



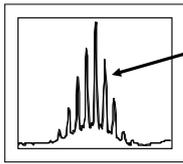
62

La technique Immunoscope (2)

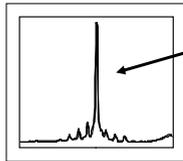


63

La technique Immunoscope (3)



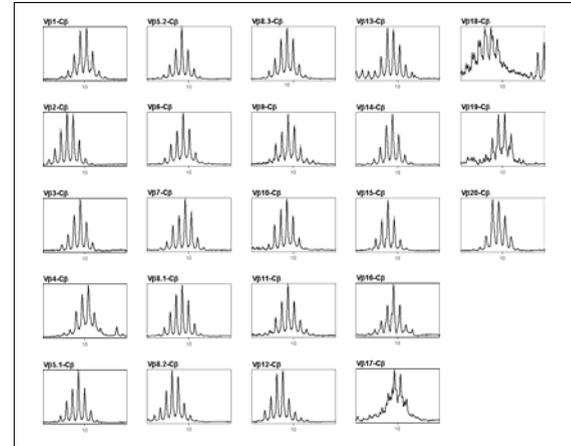
Courbe en cloche régulière:
indicatif d'une
population polyclonale



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

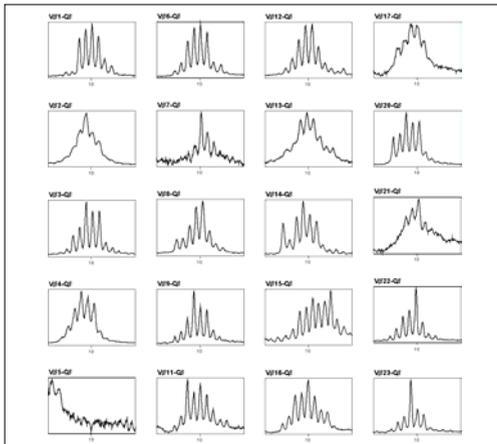
64

Répertoire TCRβ naïf de la souris



65

Répertoire TCRβ chez l'homme sain



66

Réponse IgG anti-DNP oligoclonale chez les souris B6.κ^λSEG

VH J558

VH 36-60

Témoins



Immunisés



B6 B6.κ^λSEG Igh^α B6.κ^λSEG B6 B6.κ^λSEG Igh^α B6.κ^λSEG

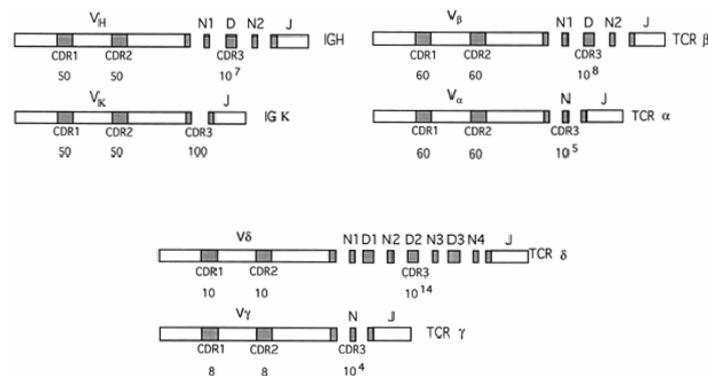
67

Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

Conclusion

68

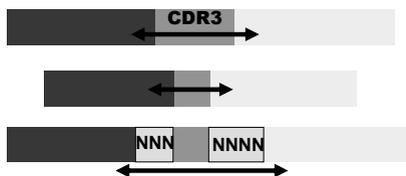
Diversité jonctionnelle CDR3 : une stratégie générale



69

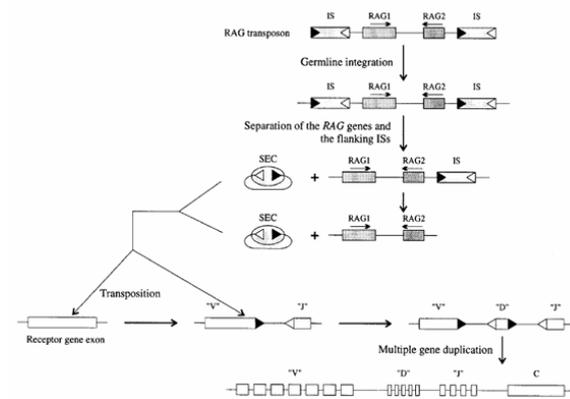
Diversité des chaînes Ig et TCR

- 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)



70

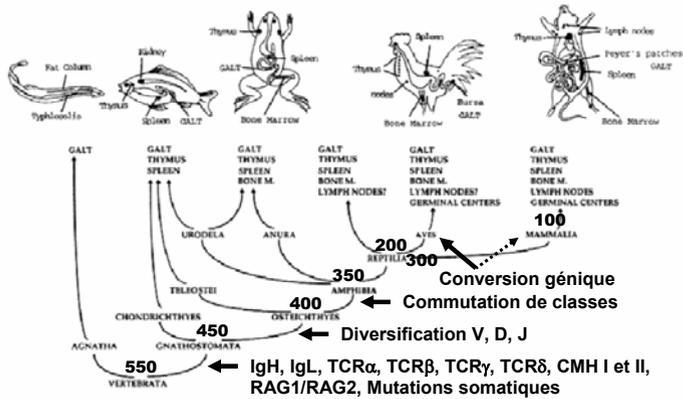
Origine de la recombinaison V(D)J



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

71

Éléments d'immunologie comparée



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

72

Questions/Discussion...

73