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

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

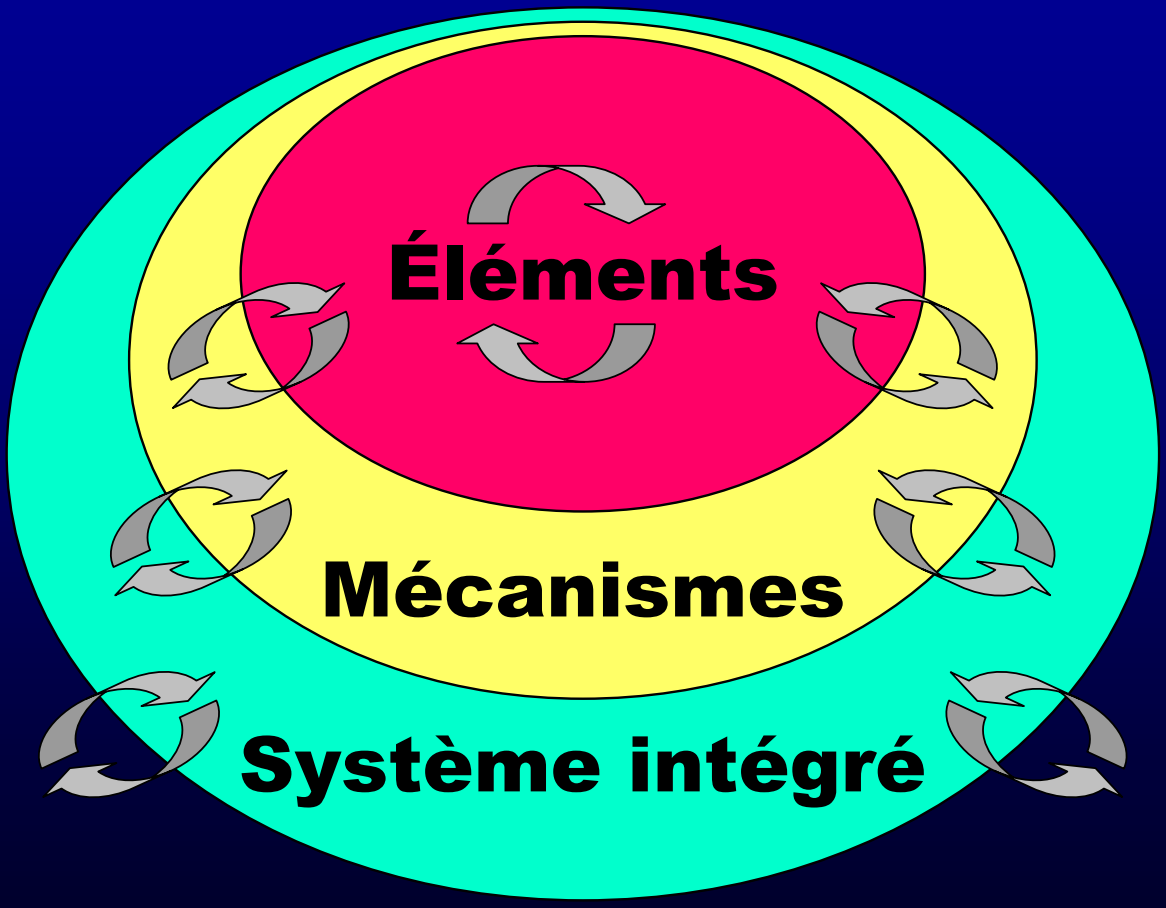
1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

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

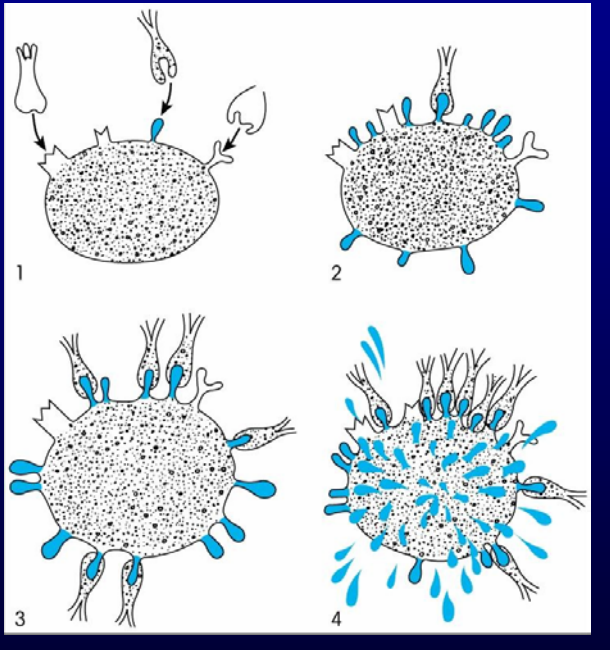
- À la fin du 19ème siècle, de la microbiologie
- Développement de la vaccination par Louis Pasteur (1822–1895) (choléra, anthrax, rage)
- Immunité naturelle:
  Phagocytose des microorganismes par les macrophages (Metchnikoff)
- Immunité acquise:
  Découverte des anticorps ou immunoglobulines (von Behring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

Théorie humorale de l'immunité

- La réponse immunitaire acquise est le résultat des anticorps secrétés 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'existaient pas auparavant?

⇨ Émergence des théories instructives et directives

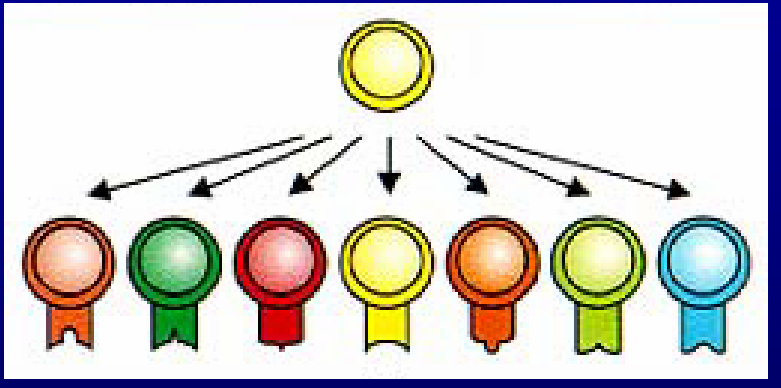
- Développements de la génétique impliquent qu'un tel phénomène suppose une modification de la séquence ADN après l'interaction pré-Ac/Ag

⇨ Retour aux théories sélectives (Burnet/Jerne)

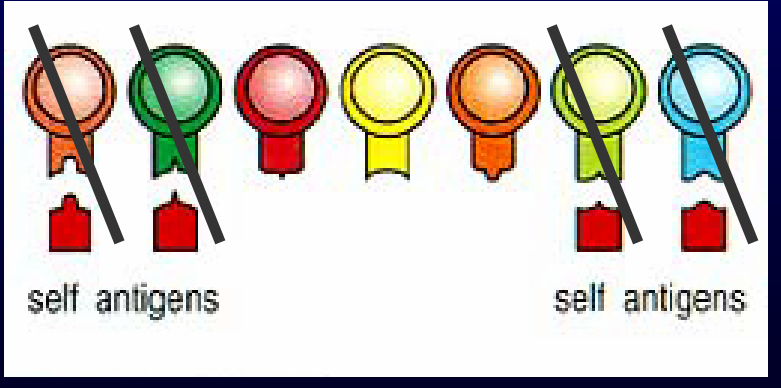
Théorie de la sélection clonale (1)

Burnet (1899–1985)

- Chaque lymphocyte exprime un type unique de récepteur spécifique d'antigène



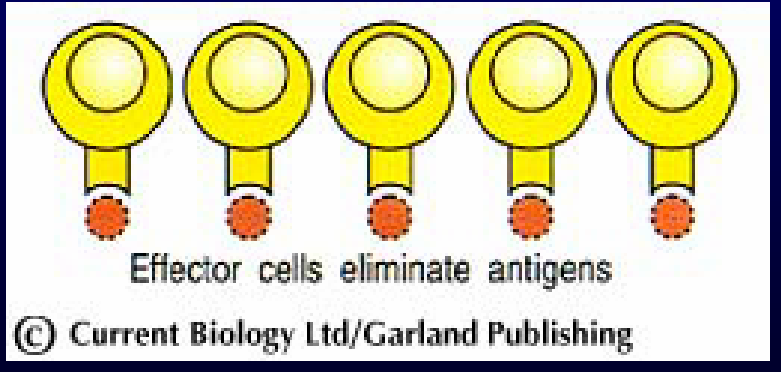
- Les lymphocytes exprimant un récepteur dirigé contre un antigène du soi sont éliminés lors de la différenciation



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)

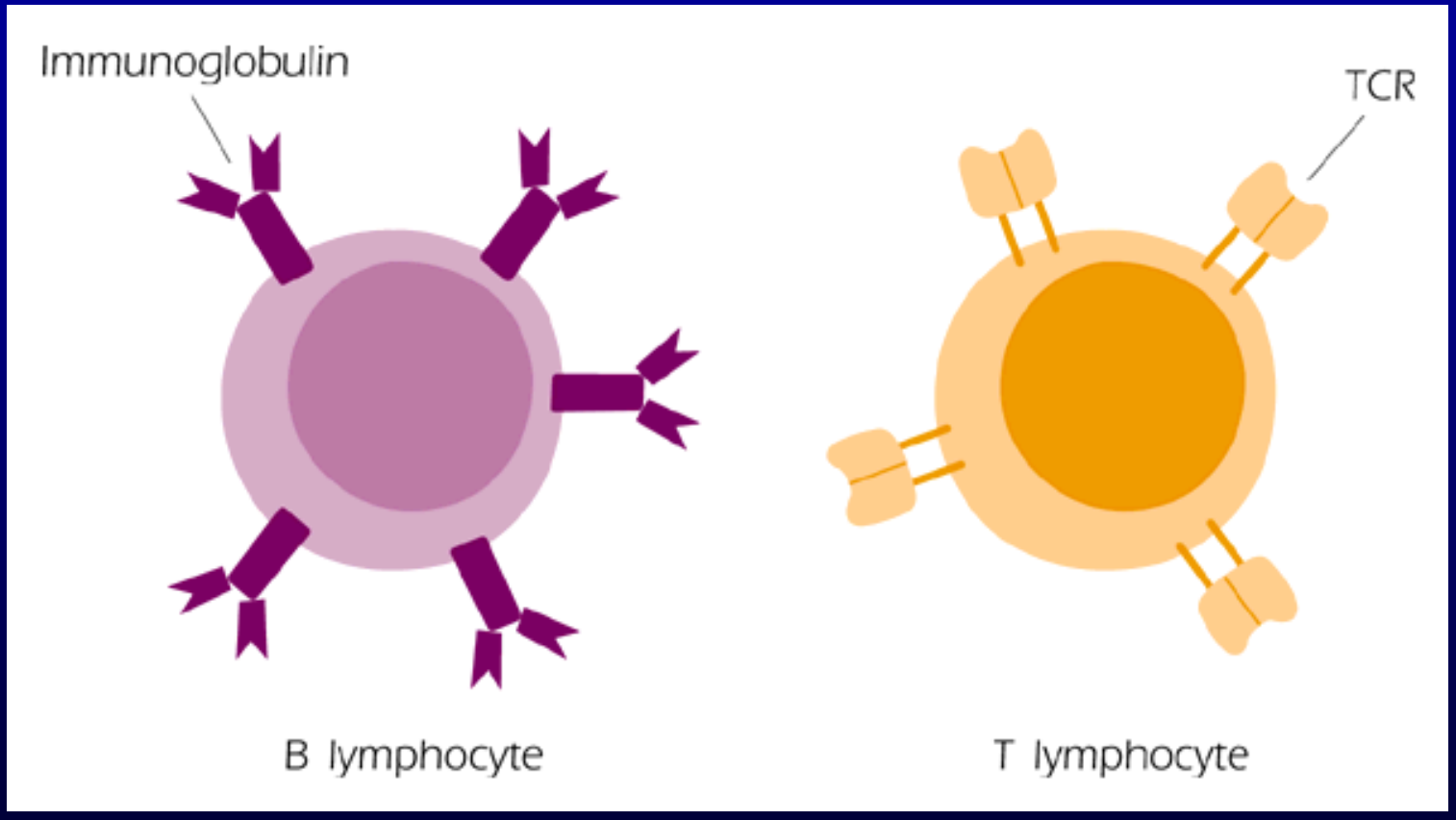
La théorie sélective pose néanmoins le problème de l'origine génétique de la diversité :

- 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 ?

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

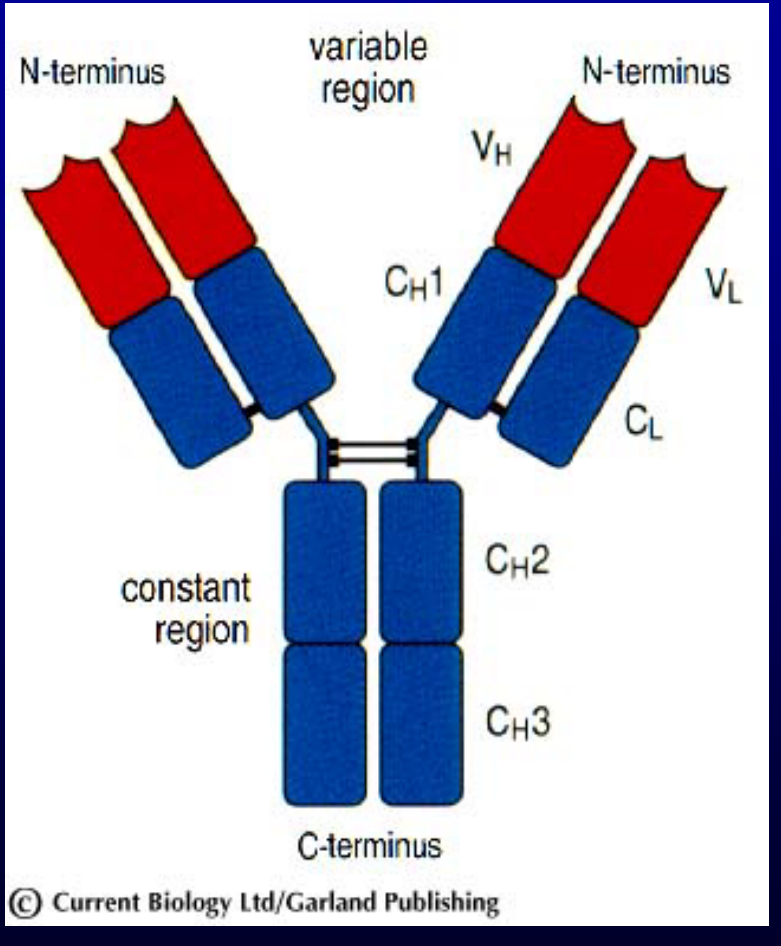
Les lymphocytes B et T



→ 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

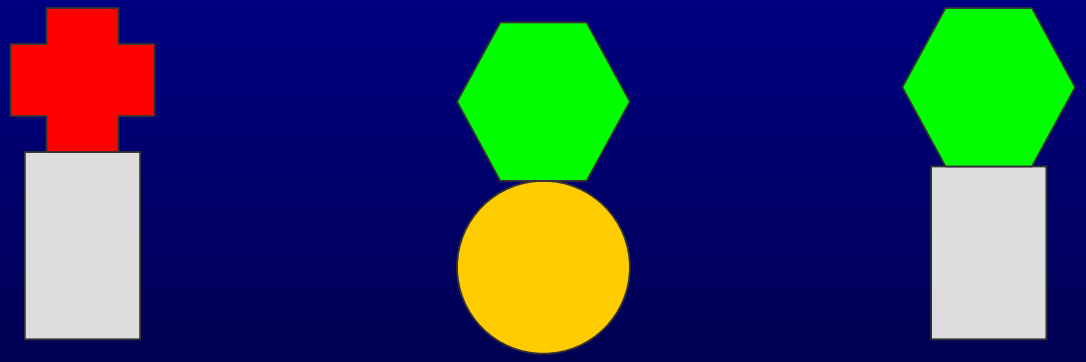


Fonctions anticorps et effectrice

Fonction spécifique = Fonction anticorps

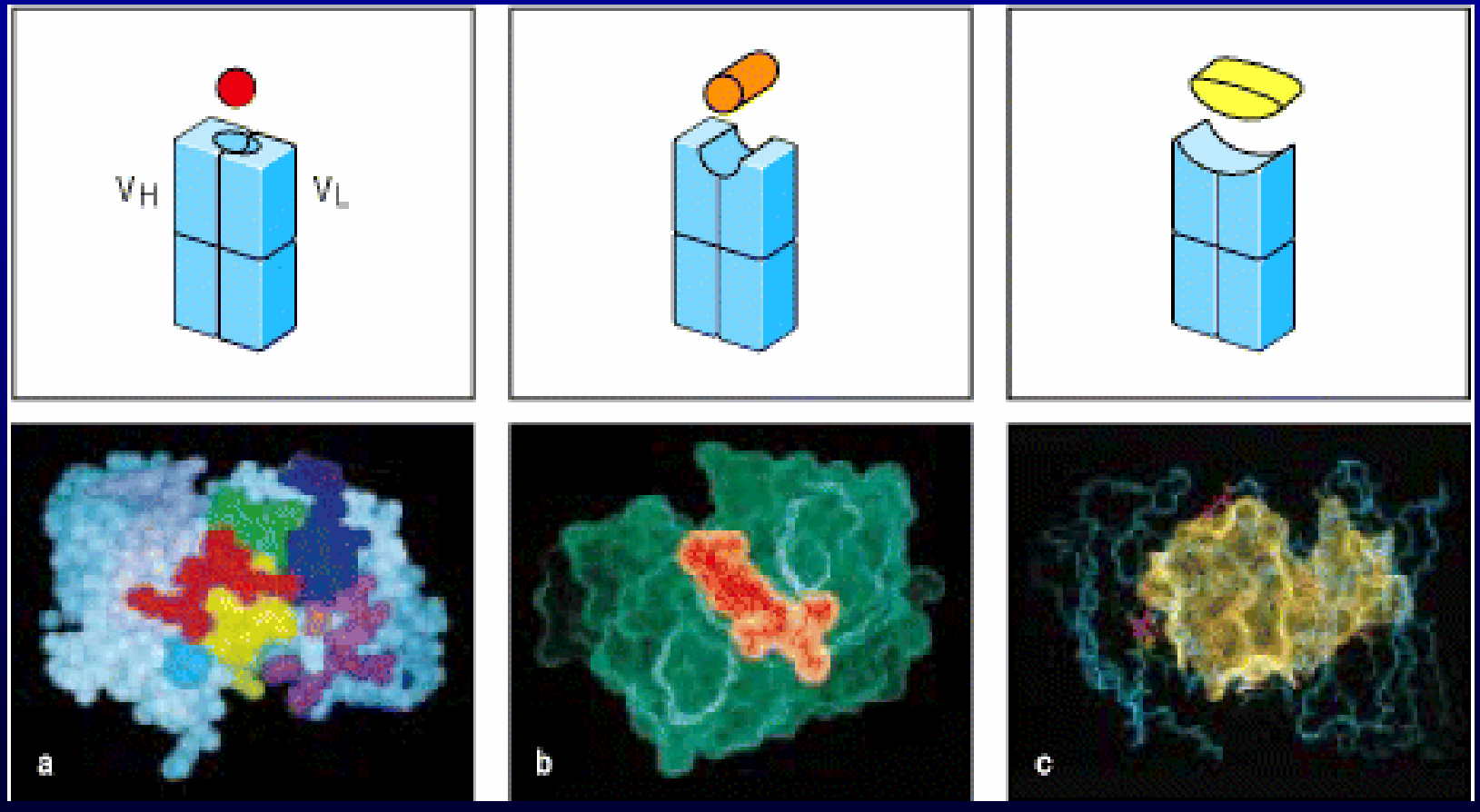
V

C



Fonction non spécifique = Fonction effectrice

Reconnaissance d'une forme



L'anticorps reconnaît directement 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

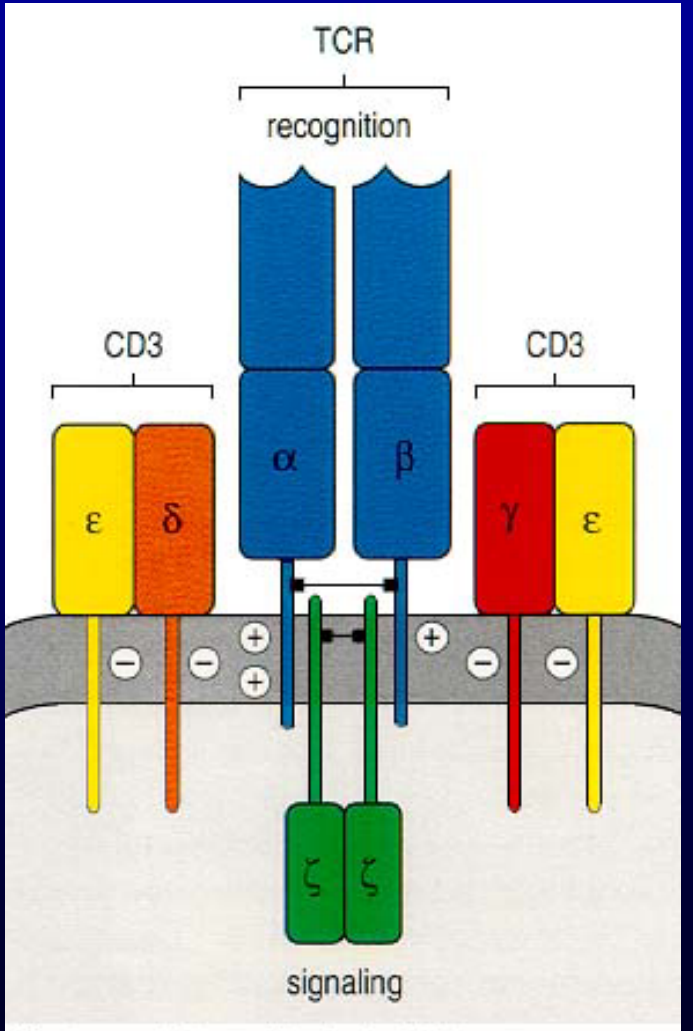
- En 1984, le gènes codant **TCRβ** est cloné par hybridation soustractive d'ADNc
- Ensuite une autre chaîne est clonée, d'abord appelée TCRα, puis renommée **TCRγ**
- Le "véritable" gène **TCRα** est alors cloné
- En 1986, il est montré que TCRγ fait partie d'un autre type de TCR
- La chaîne associée est clonée → **TCRδ**

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

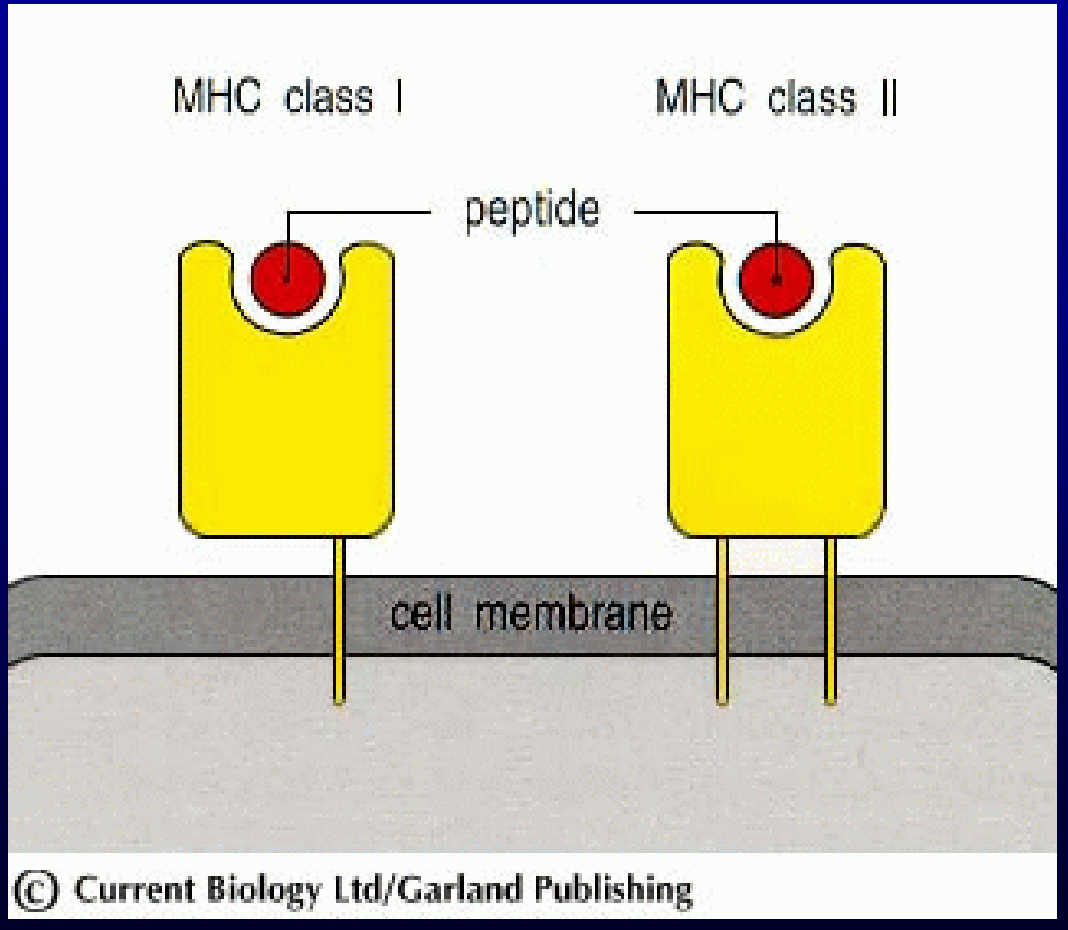
Les chaînes α/β ou γ/δ du TCR sont associées aux molécules de transduction du signal du complexe CD3



Reconnaissance par le TCR$\alpha\beta$

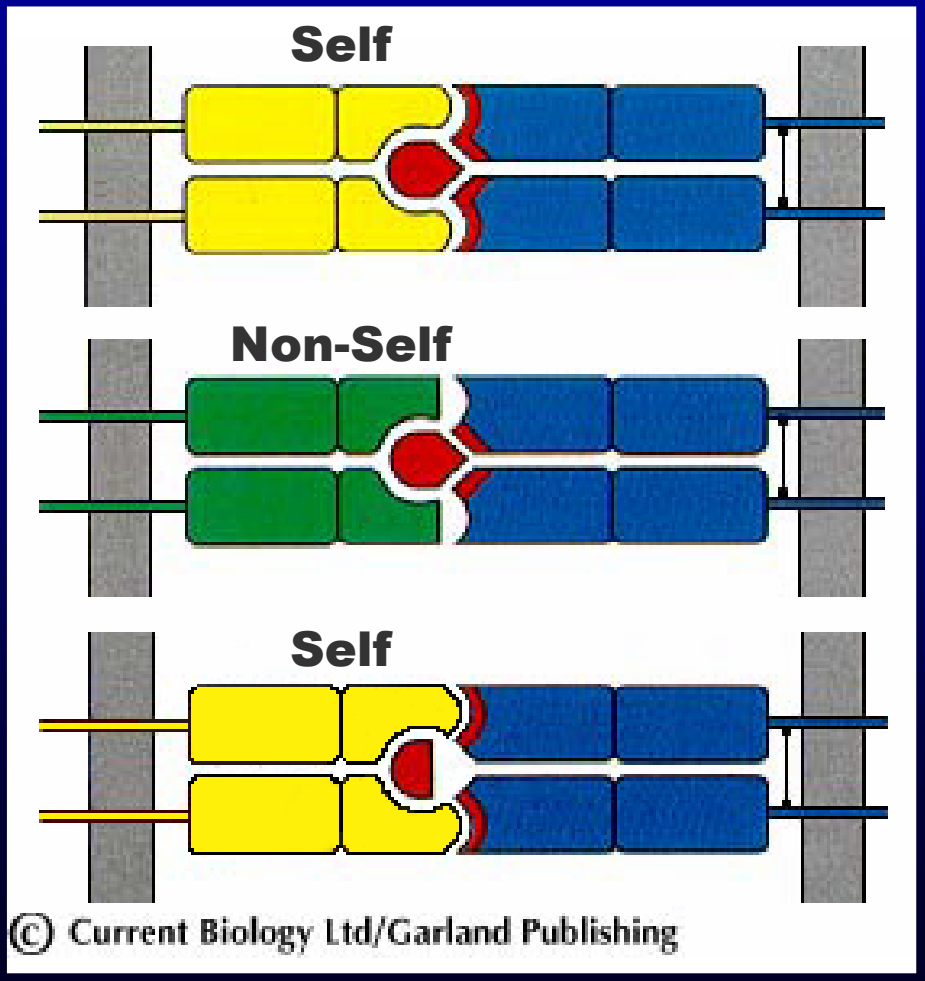
- A l'inverse des anticorps qui reconnaissent les protéines natives, le TCR reconnaît des petits *peptides*
  - produits de dégradation des protéines
  - présentés les molécules du MHC
- Pendant leur différenciation dans le thymus, les lymphocytes T sont "*éduqués*" pour reconnaître les molécules du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

La présentation antigénique



Restriction par le CMH

CMH TCR



APC — T cell → Activation

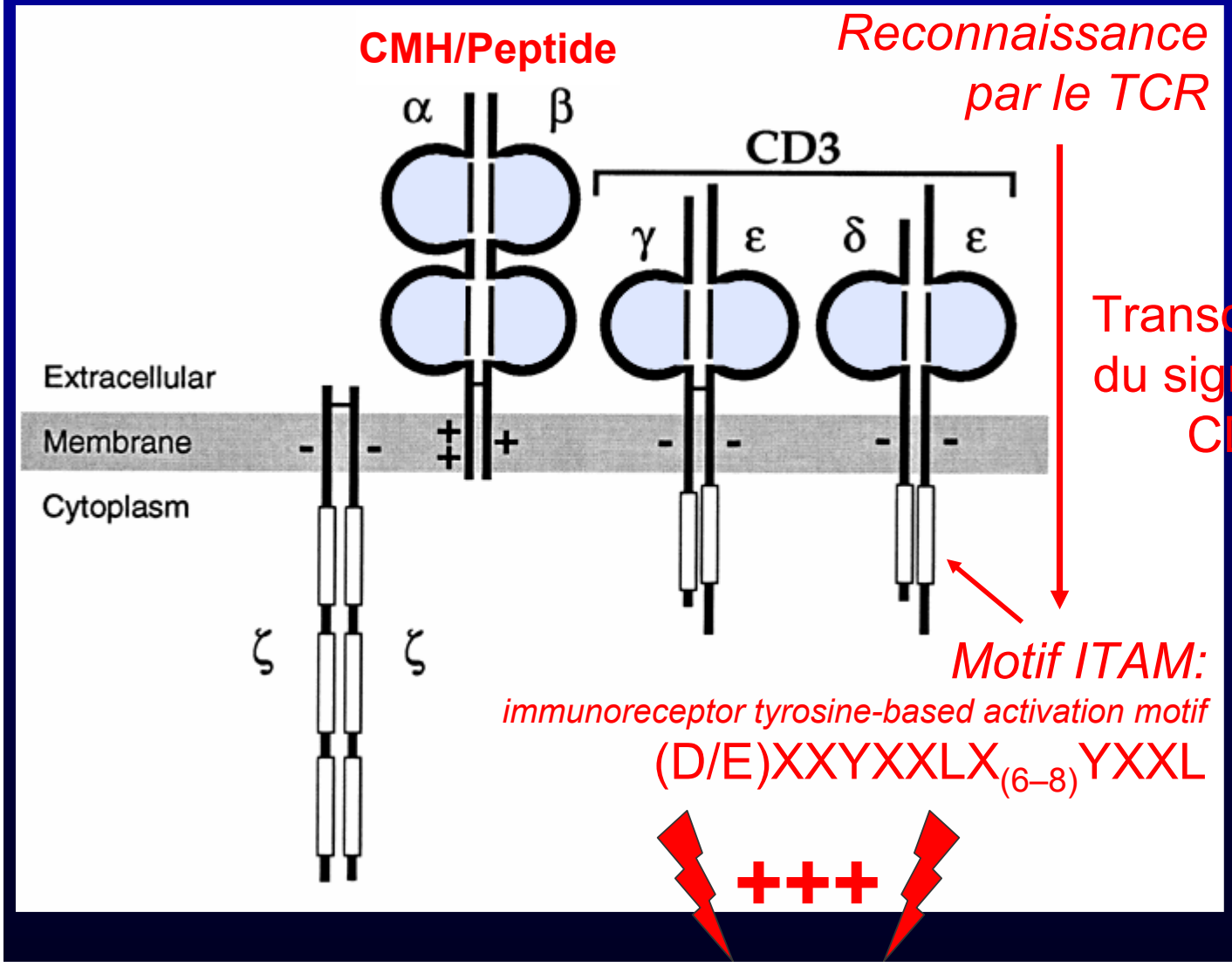
APC — T cell ✗

APC — T cell ✗

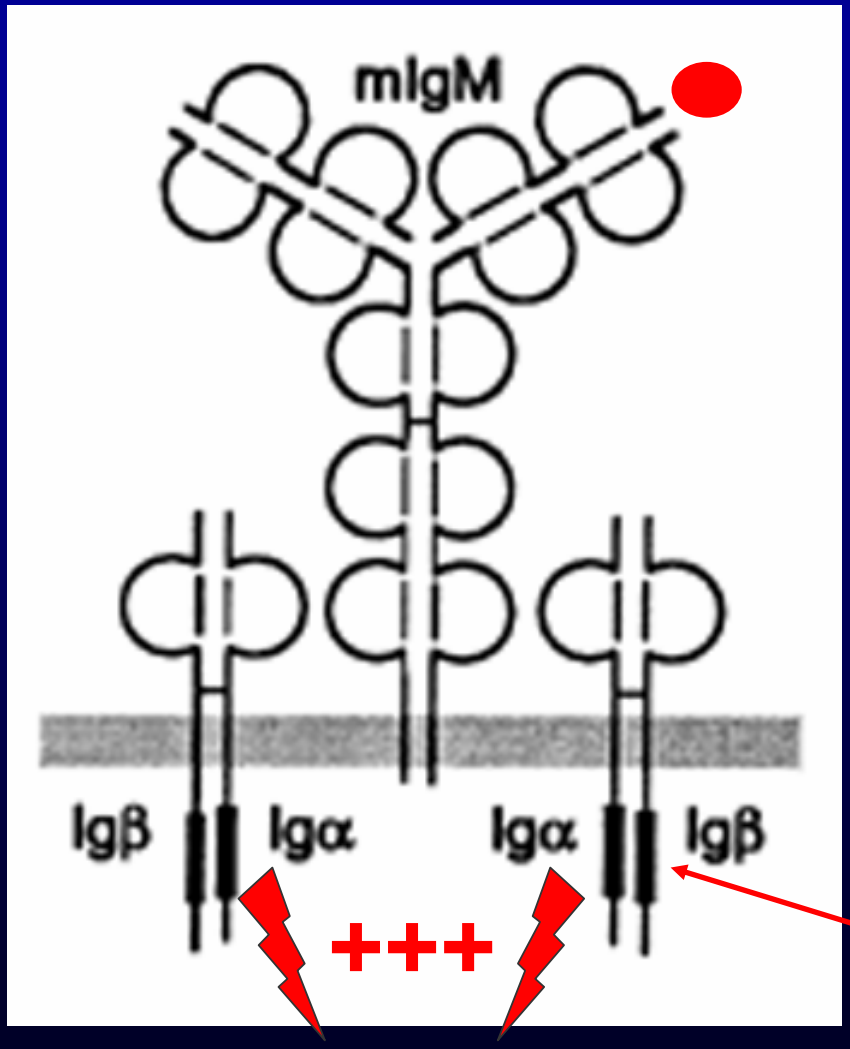
Reconnaissance par le TCR$\gamma\delta$

- 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



Reconnaissance de l'antigène par l'Ig

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

Motif ITAM:

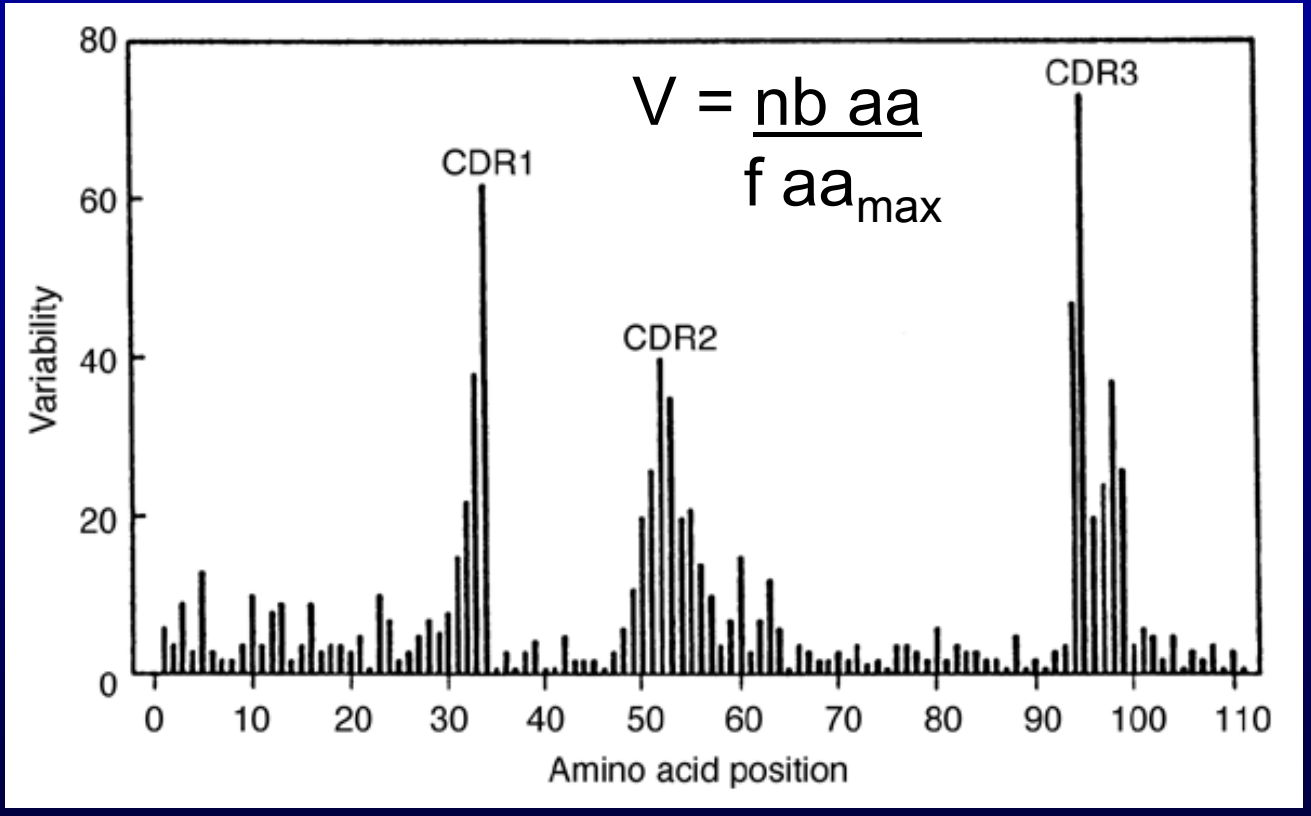
immunoreceptor tyrosine-based activation motif

$(D/E)XXYYXXLX_{(6–8)}YXXL$

Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

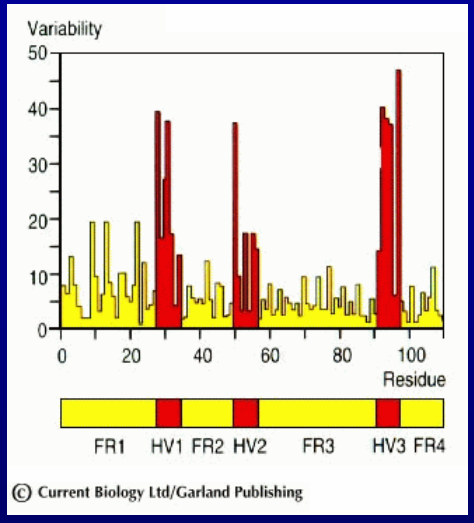
1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

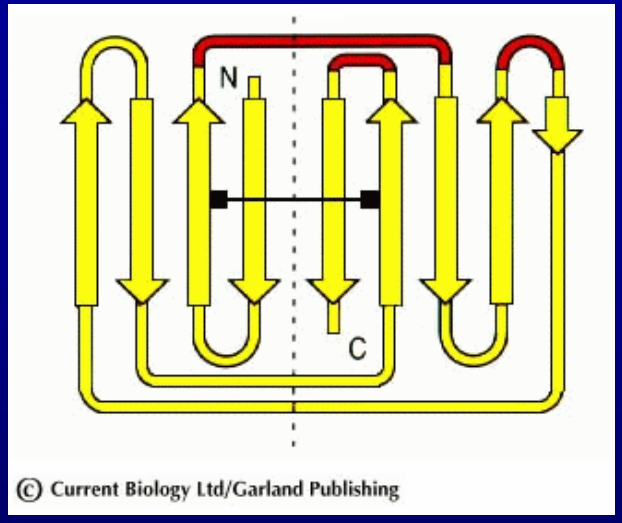
Les régions hypervariables (1)

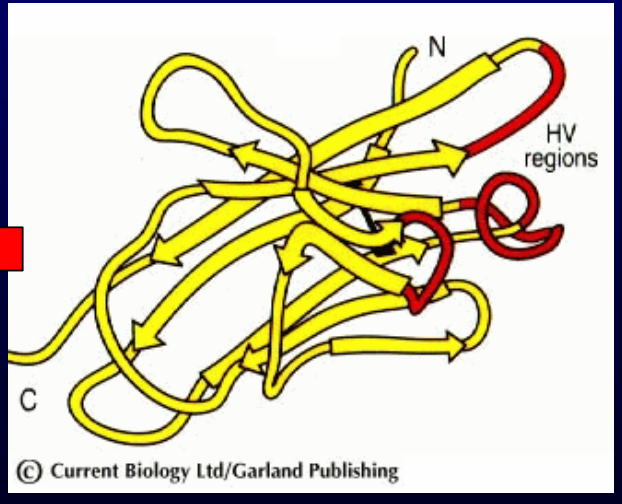


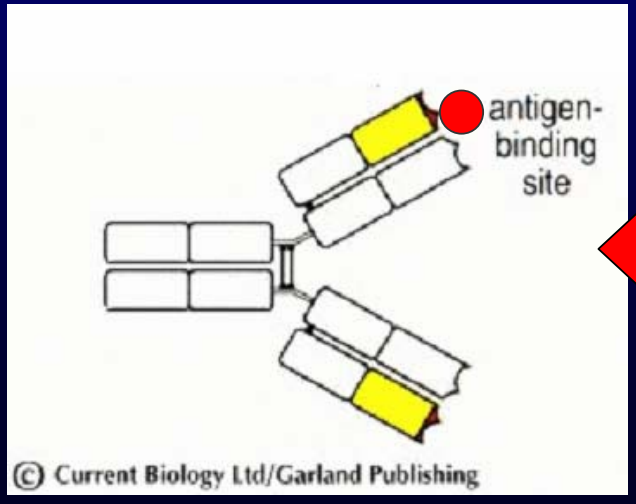
Si l'on aligne les séquences variables d'IgH ou IgL, on observe trois régions hypervariables dites régions «CDRs», qui forment le site de liaison à l'antigène…

Les régions hypervariables (2)









Un paradoxe génétique

- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
- ~30 000 gènes dans le génome humain

Mais…

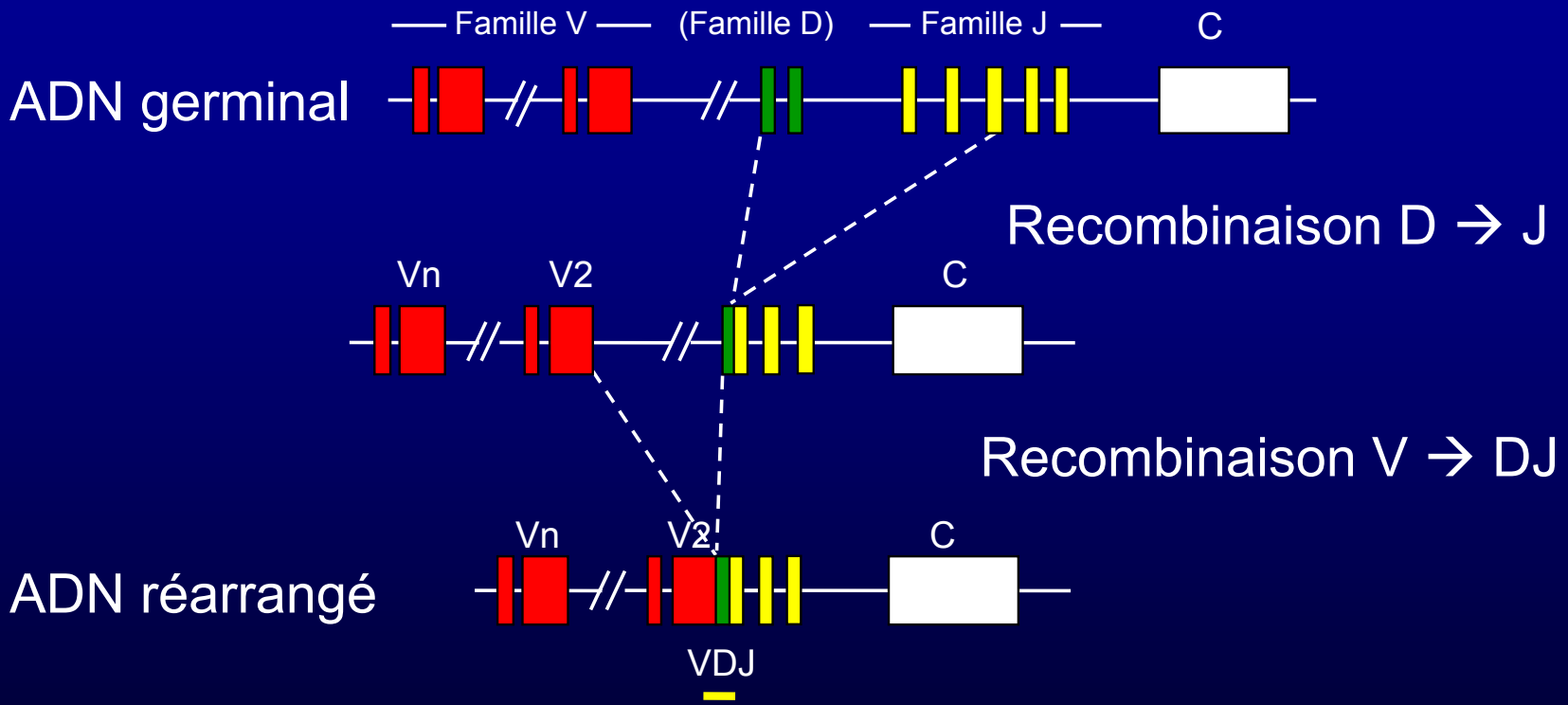
- Capacité de production d'une variété « infinie » d'Ig et de TCR (cf. Landsteiner)
- Constance des domaines constants *vs.* Diversité dans les domaines variables (cf. Edelman, 1969)
- Combien de gènes doit-on considérer ?

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

« 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



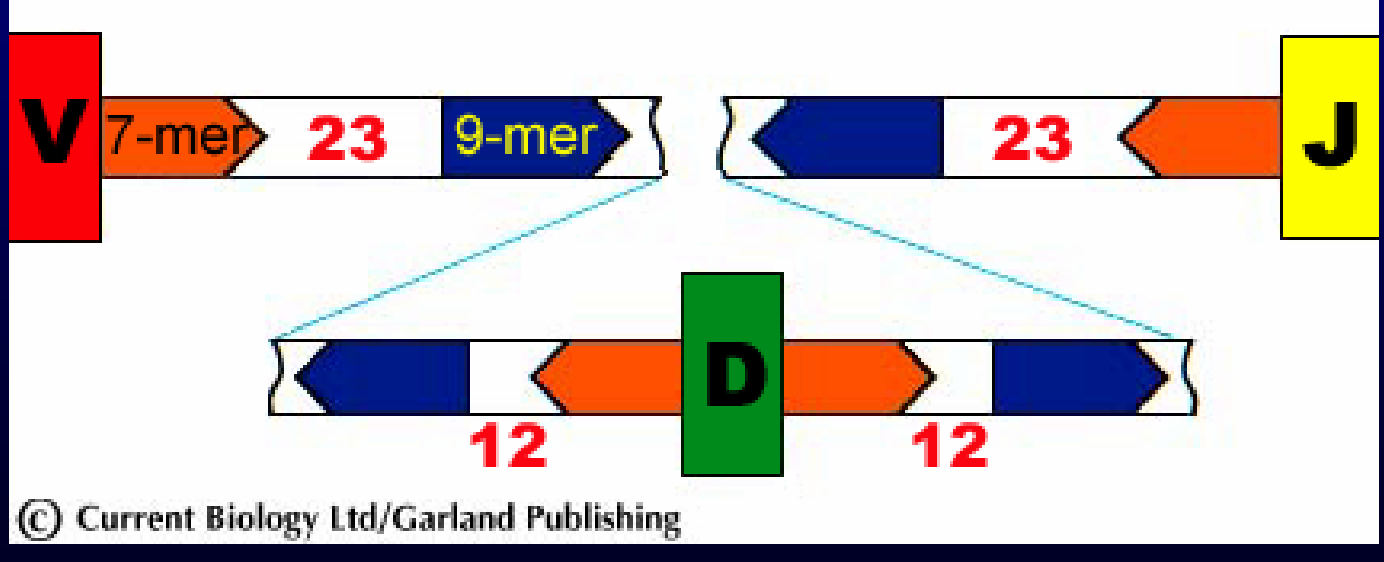
CDR3 = jonction V(D)J

→ Contact avec l'antigène (Ig)

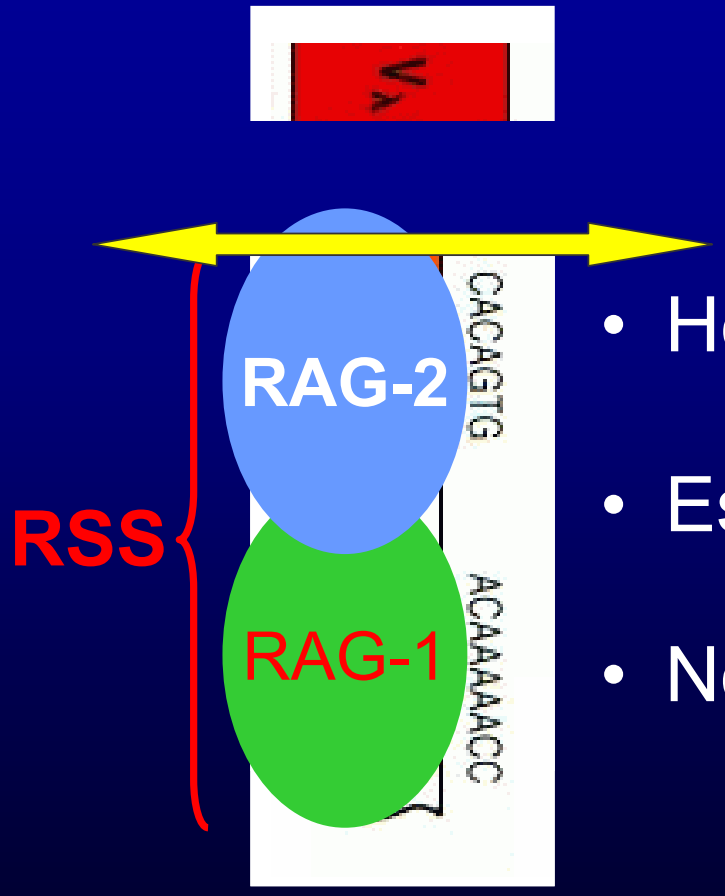
→ Contact avec le complexe CMH/peptide (TCR)

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



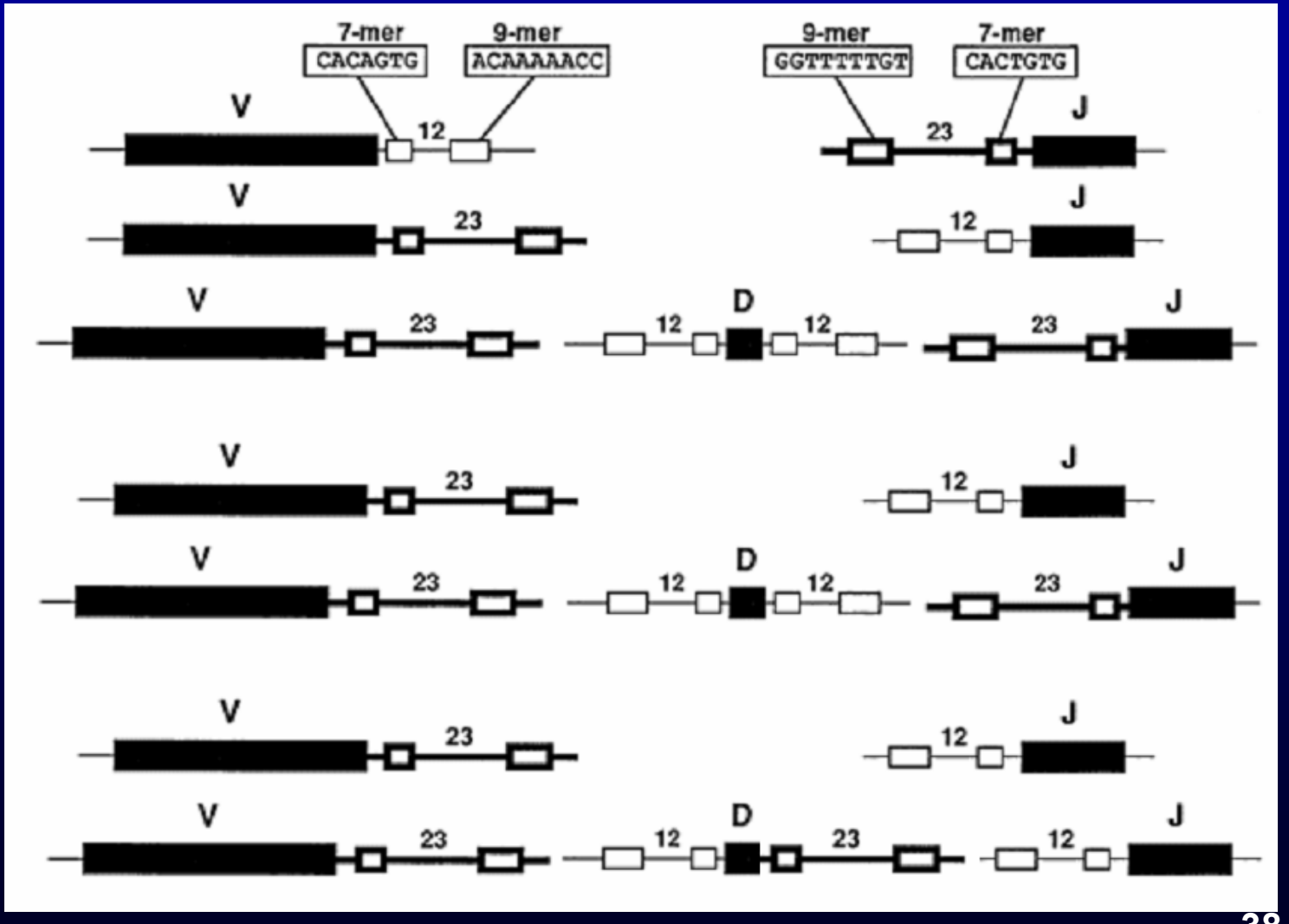
- Heptamère → ***CACA***GTG
- Espaceur 12 ou 23
- Nonamère → ACAAA***AA***CC

La règle 12/23 pour les Ig et TCR

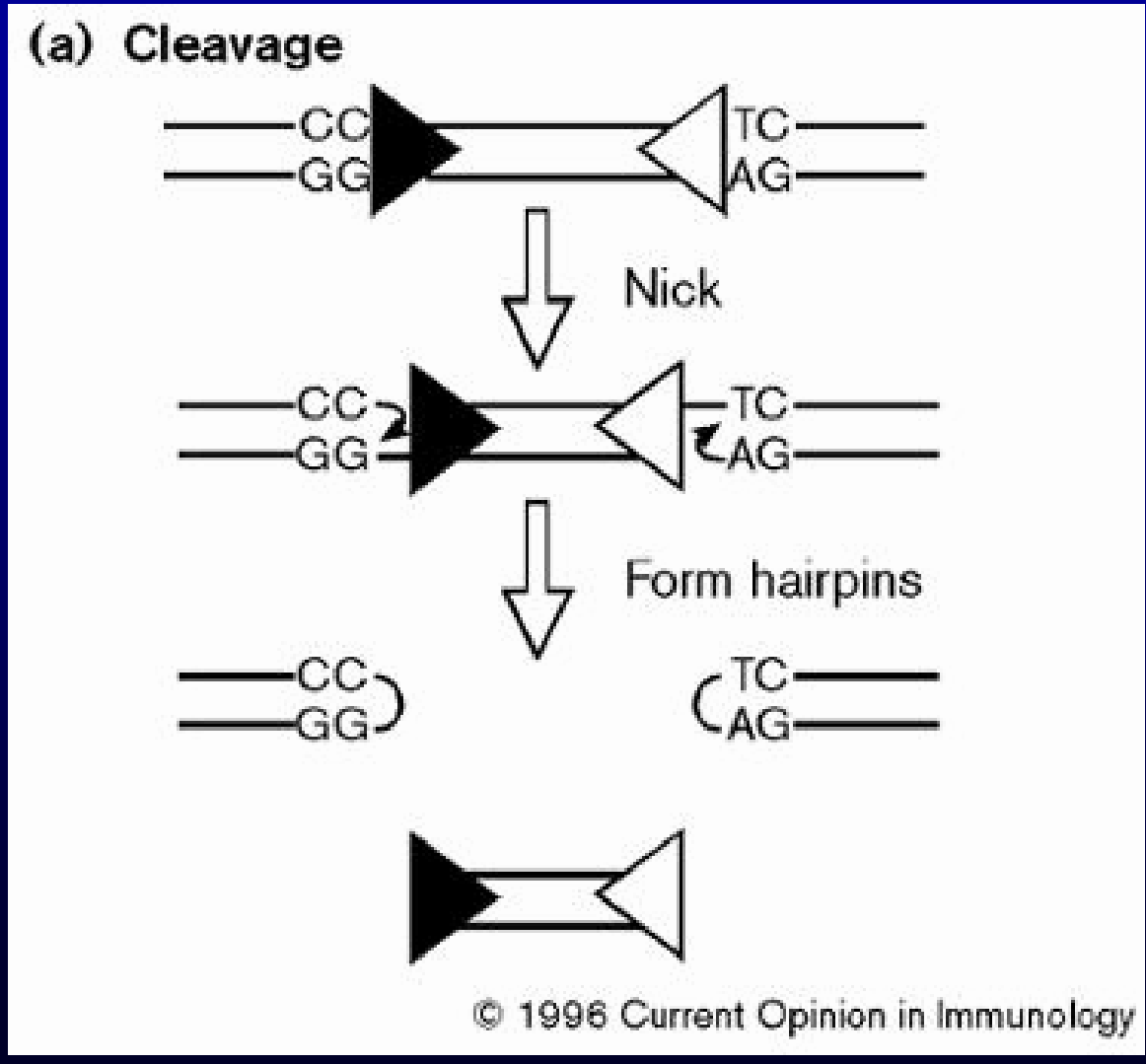
Igκ
Igλ
IgH

TCRα
TCRβ

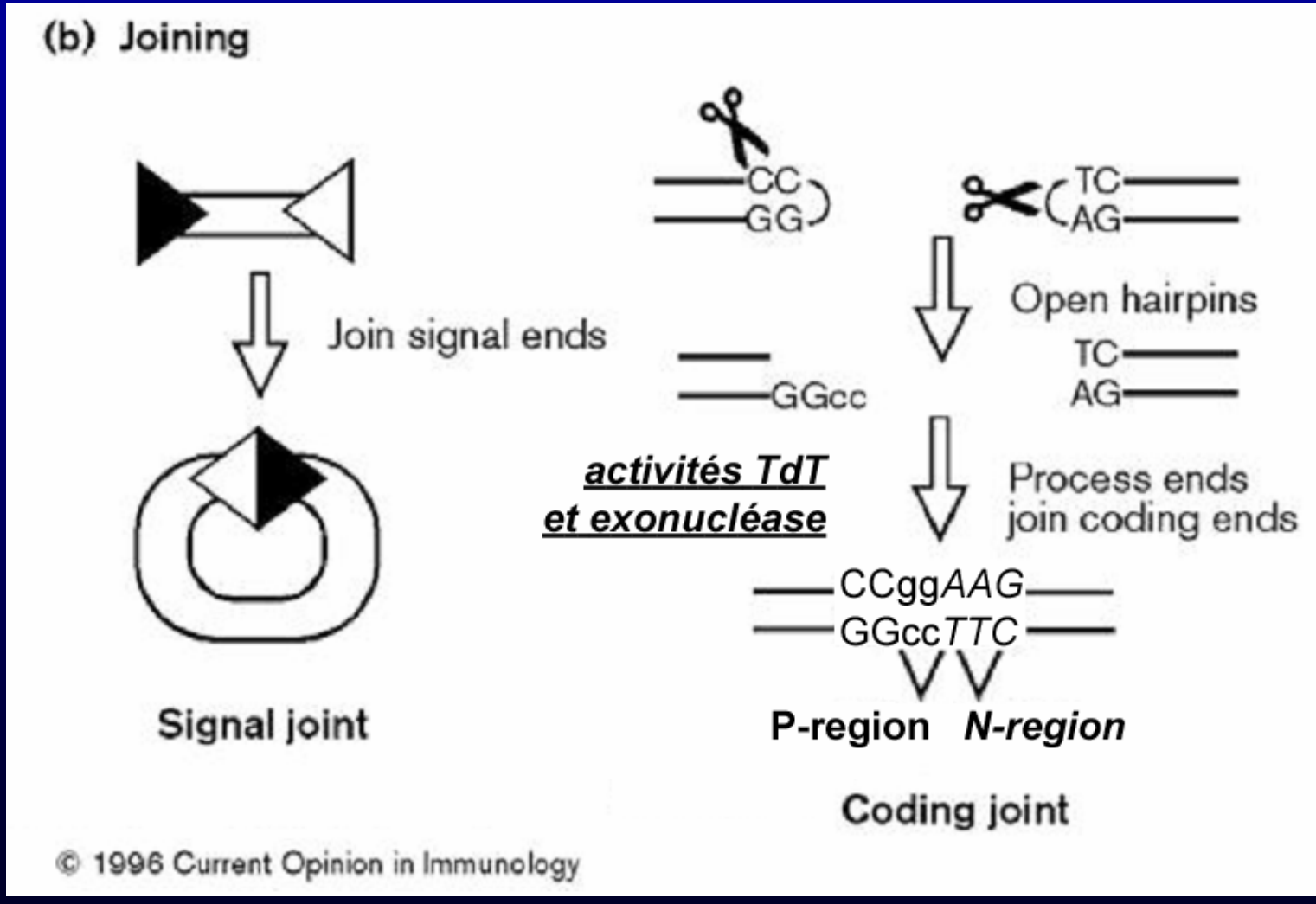
TCRγ
TCRδ



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

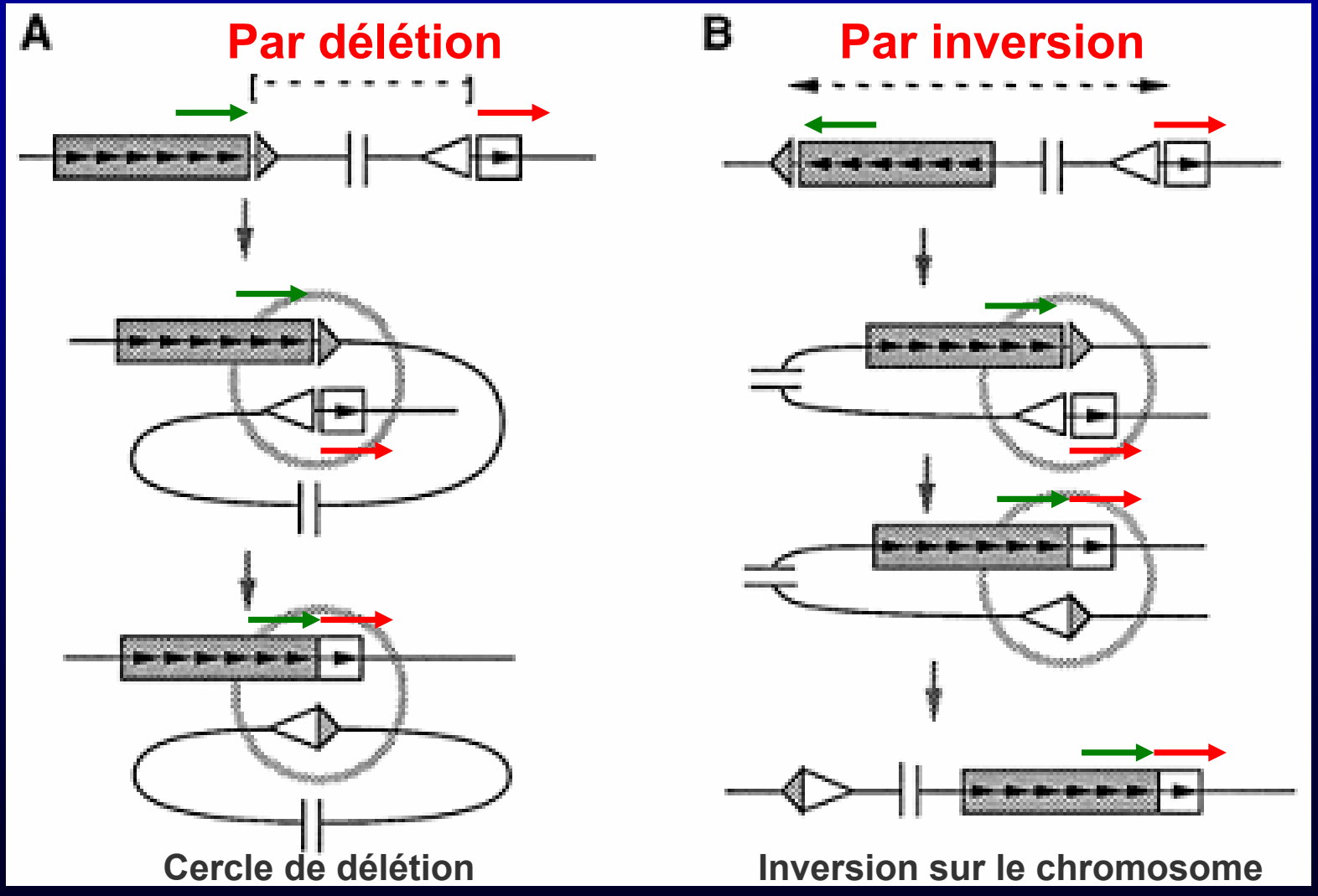
La recombinaison V(D)J (5)

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 (+).

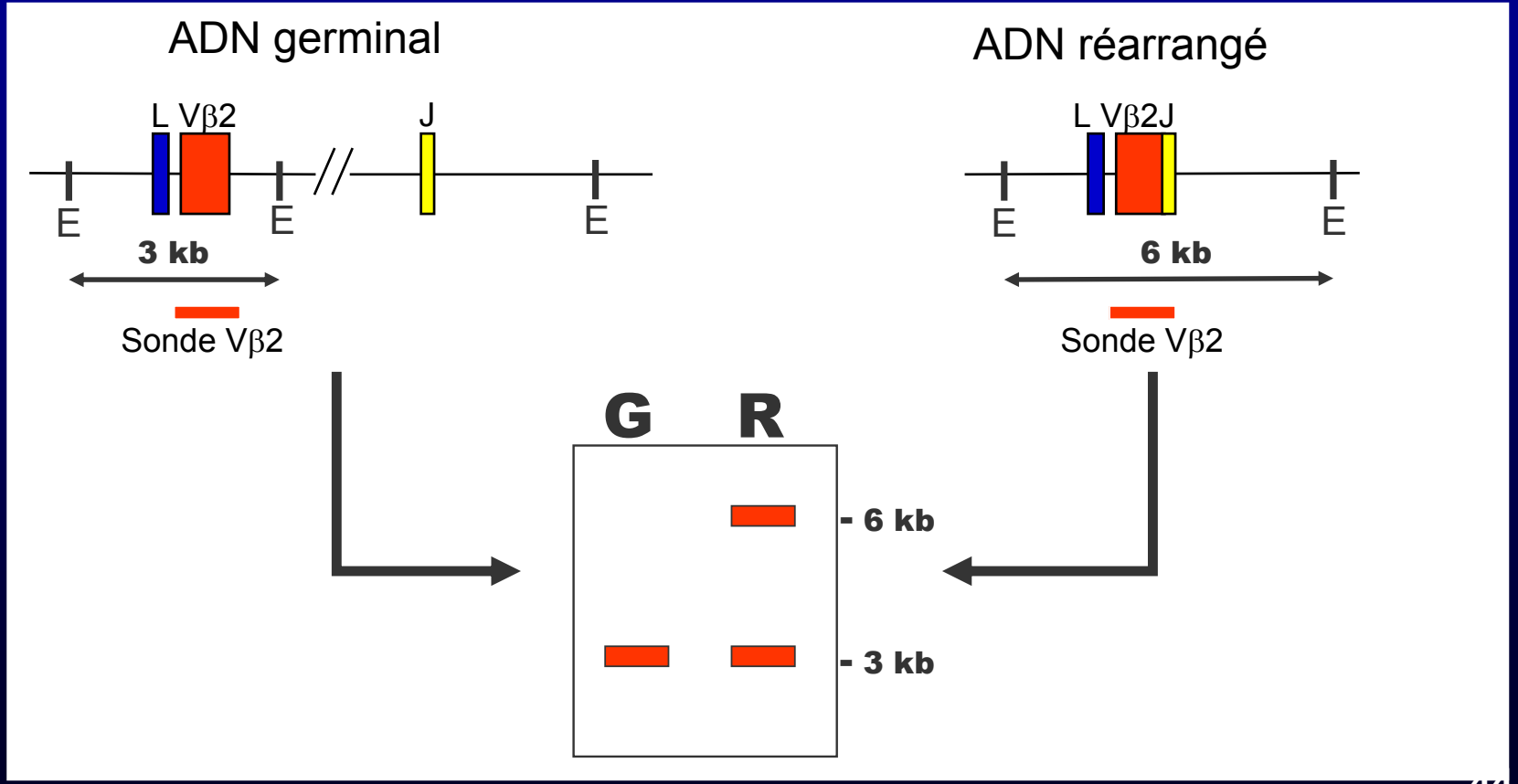
Cys Ala …V >	N(D)N	< J… *Phe Gly*	
TGT CGA CC		*TCGC TTT GGT*	
TGT CGA CC	g aa	G CTT TGGT	-
TGT CGA CC	g gaa	GCT TTG GT	-
TGT CGA CC	g gaa g	GC TTT GGT	+
TGT CGA CC	g gaa gt	G CTT TGGT	-
TGT CGA CC	g gga agt	GCT TTG GT	-
TGT CGA CC	g gga agt t	GC TTT GGT	+

Différents types de réarrangements



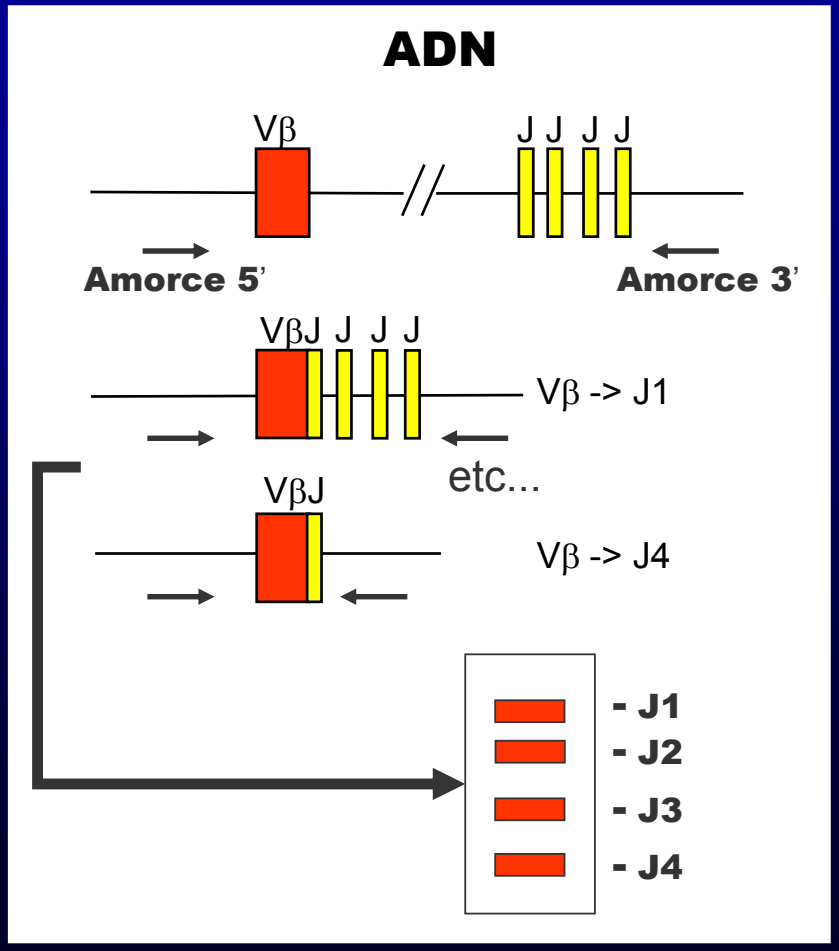
Détection des réarrangements (1)

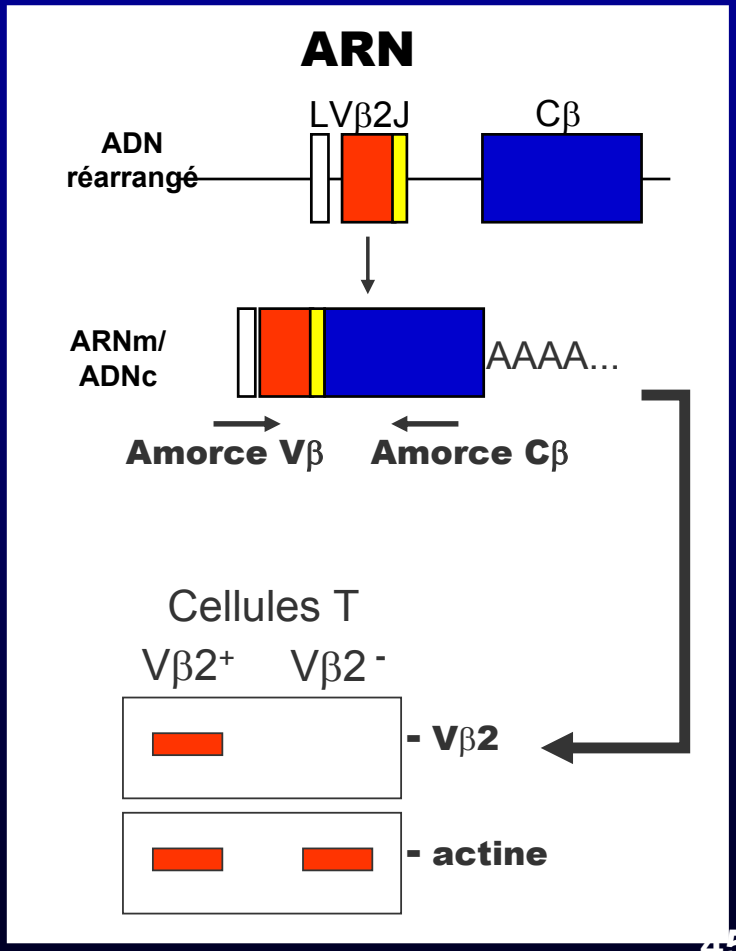
- RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) par la technique de Southern blot.



Détection des réarrangements (2)

- Détection par PCR aux niveaux ADN et ARN.



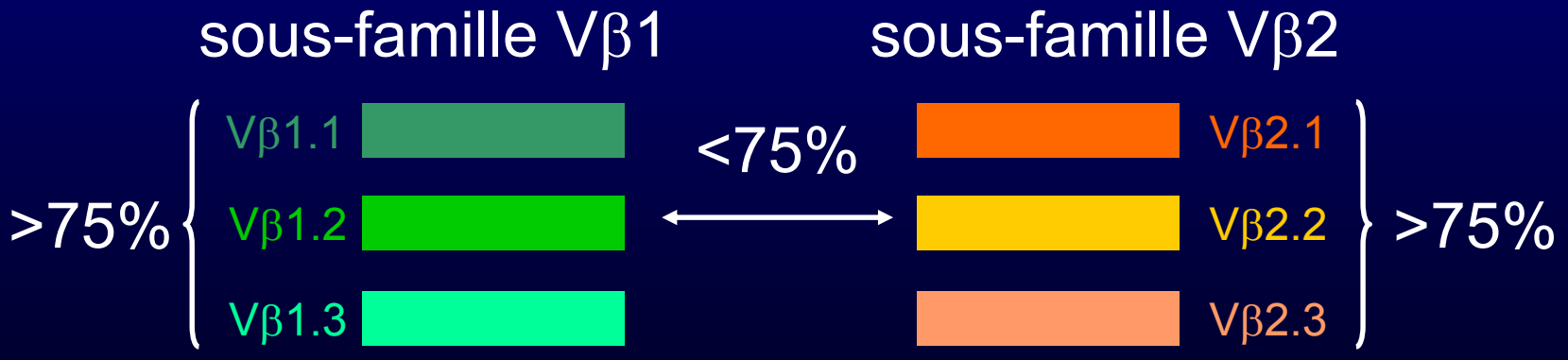


Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

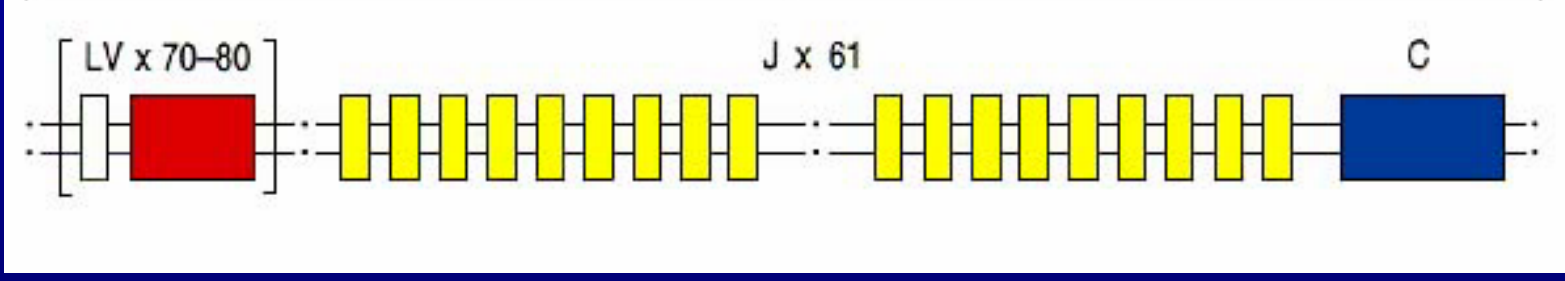
1. Introduction
2. Anticorps et TCR
3. Complexes TCR/CD3 et BCR
4. Recombinaison V(D)J
5. Organisation des locus TCR et Ig
6. La technique Immunoscope

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.

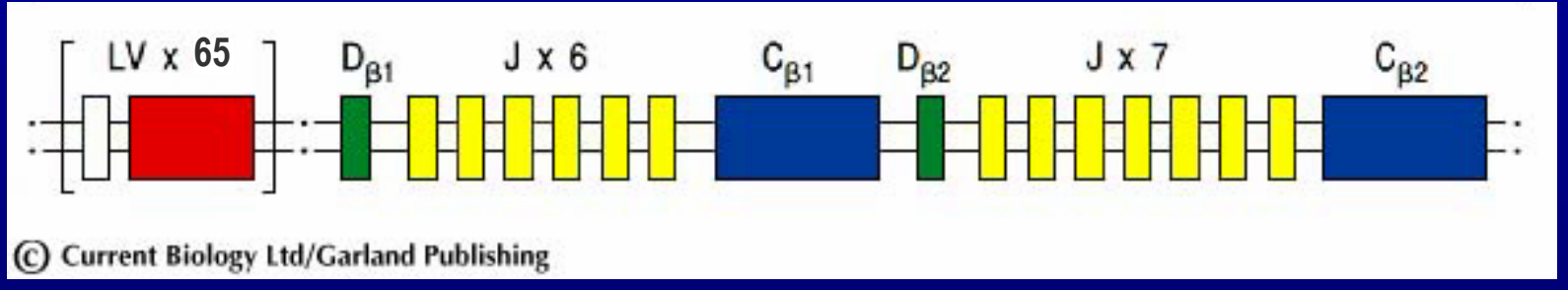


Organisation génomique du locus TCRα humain



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

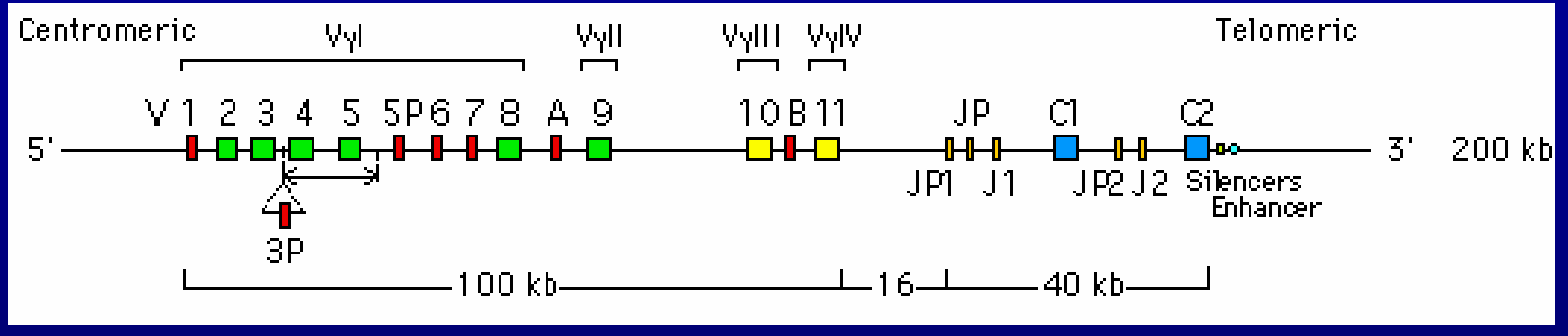
Organisation génomique du locus TCRβ humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

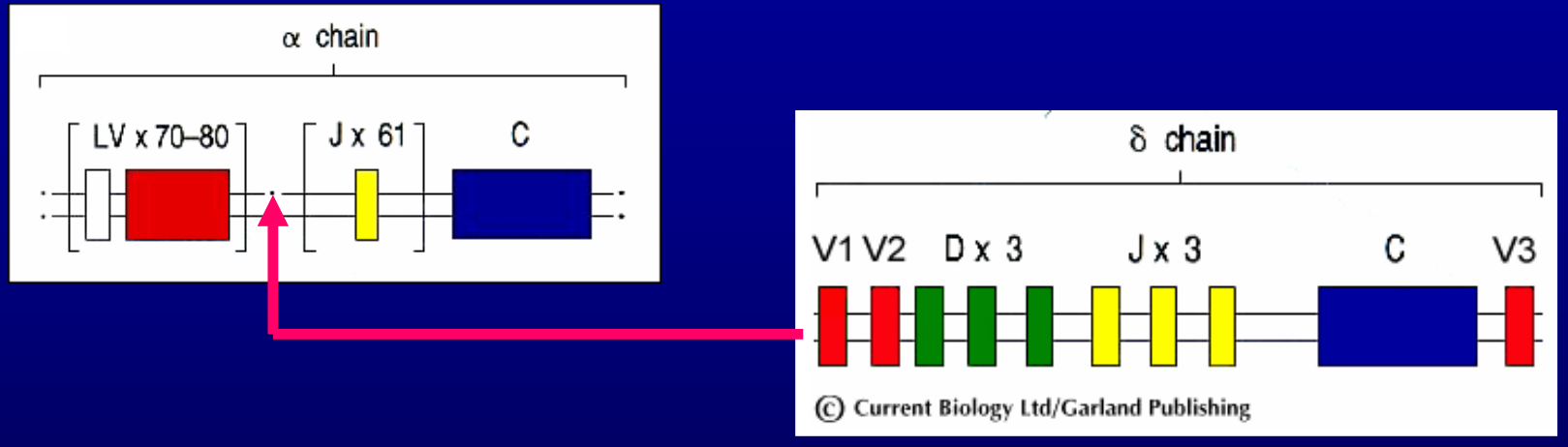
- Chromosome 7
- Entièrement séquencé (685 kb)
- 65 segments Vβ
- 30 sous-familles (1-9 membres)
- 2 Dβ, 13 Jβ, 2 Cβ, en deux répétitions

Organisation génomique du locus TCRγ humain



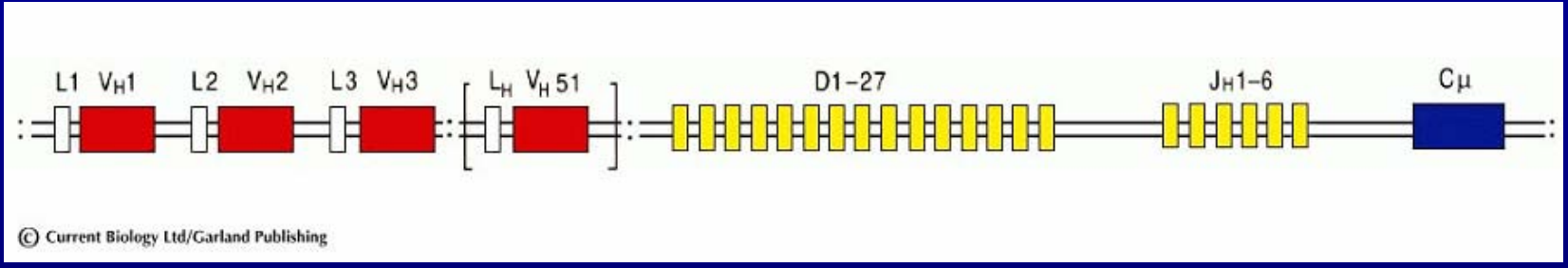
- Chromosome 7
- 14 Vγ groupés en 4 sous-familles
- 5 Jγ, 2 Cγ, en deux répétitions
- Deux formes Cγ2 sans cystéine dans le peptide charnière → pas de pont disulfure avec la chaîne TCRδ

Organisation génomique du locus TCRδ humain



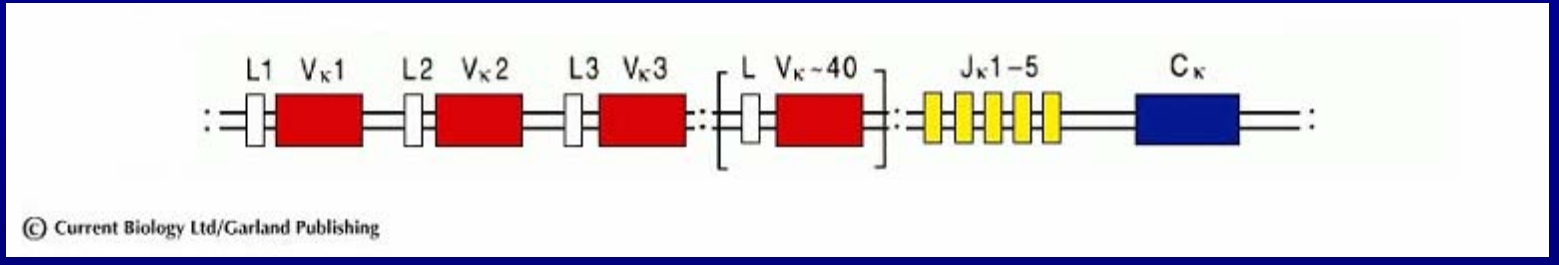
- Chromosome 14, inséré dans le locus TCRα
- 3 Vδ principaux, 3 Dδ, 3 Jδ, un seul Cδ
- Des Vα sont utilisés par les chaînes TCRδ: Vα/δ14.1, Vα/δ23.1, Vα/δ29.1, Vα/δ36.1, Vα/δ38.2
- 2 ou 3 Dδ souvent en tandem dans CDR3

Organisation génomique du locus IgH humain



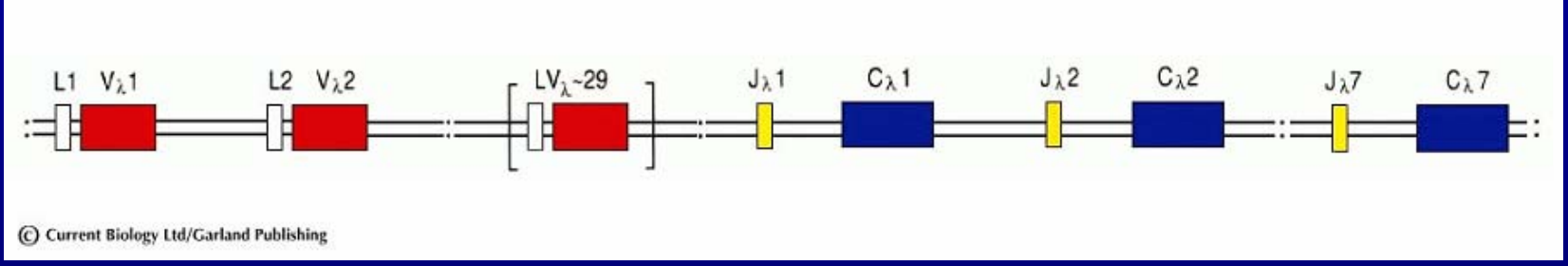
- Chromosome 14
- Entièrement séquencé (1,2 Mb)
- ~80 VH (dont ~50 fonctionnels) groupés en 7 sous-familles
- 27 DH , 6 JH, 9 CH

Organisation génomique du locus Igκ humain



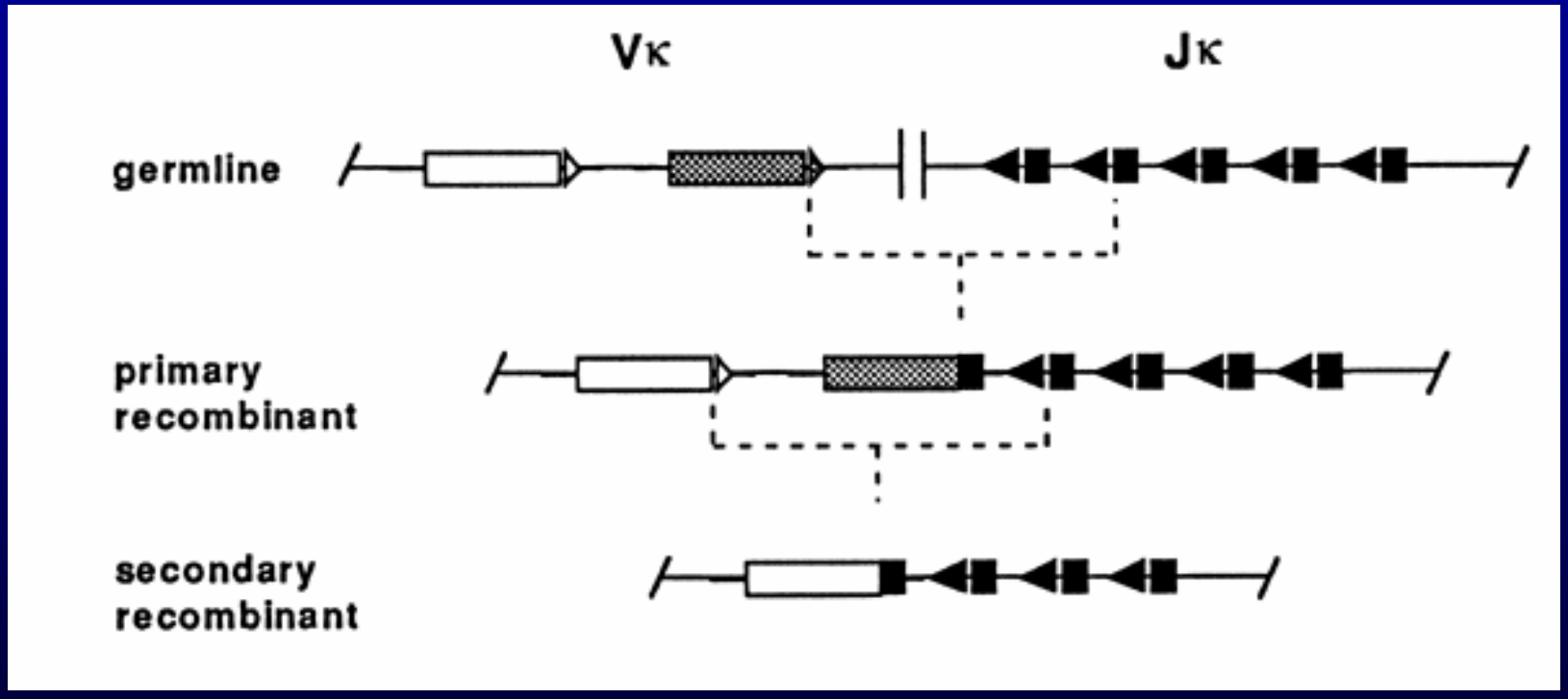
- Chromosome 2
- Entièrement séquencé (1,8 Mb)
- ~80 Vκ (dont ~40 fonctionnels) groupés en 7 sous-familles
- Vκ organisés en deux répétitions en miroir
- 5 Jκ, un seul Cκ

Organisation génomique du locus Igλ humain

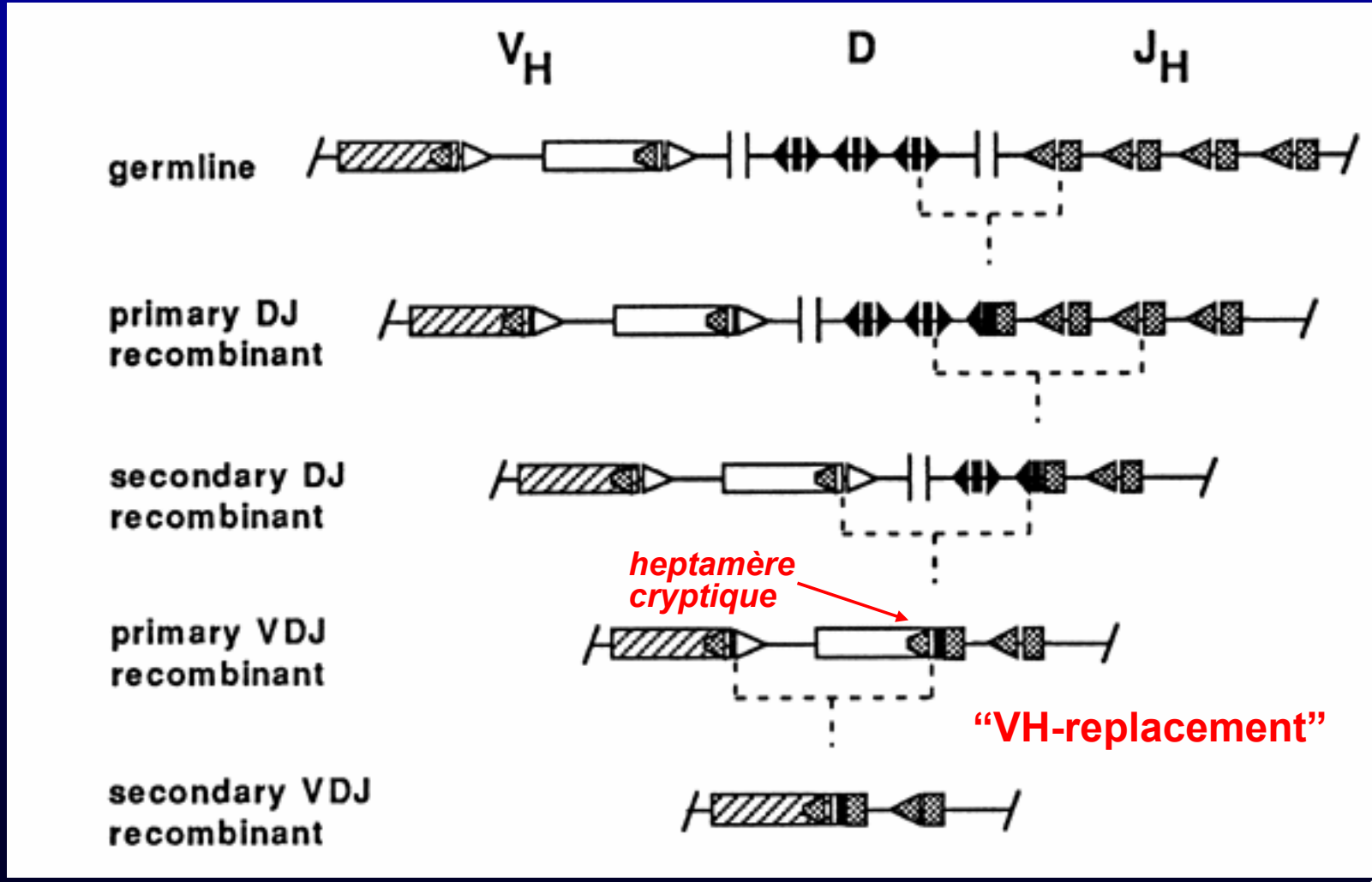


- Chromosome 22
- Entièrement séquencé (1 Mb)
- ~70 Vλ (dont ~30 fonctionnels) groupés en 11 sous-familles
- 7-11 clusters J–Cλ (4-5 fonctionnels)

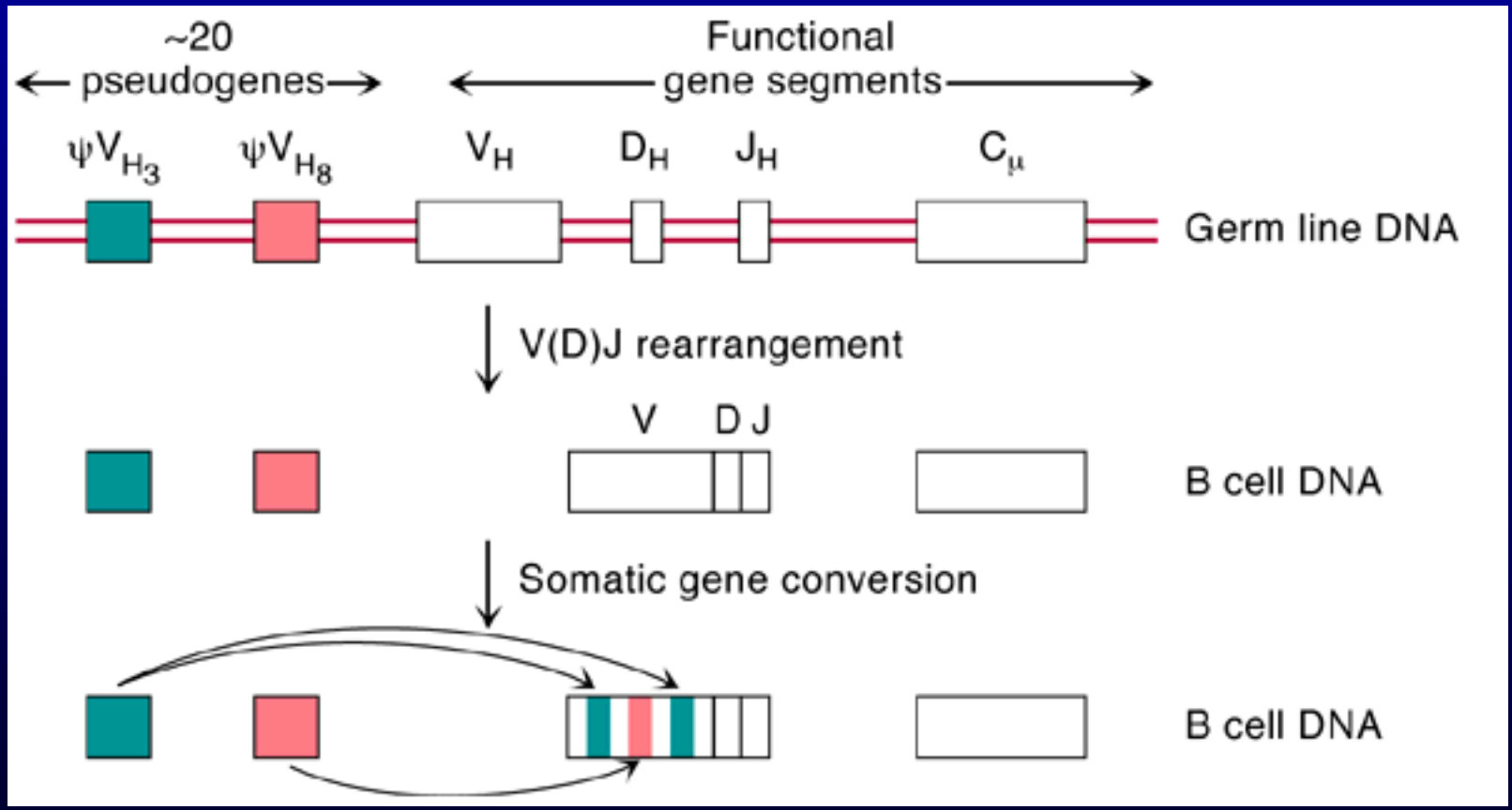
Réarrangements secondaires (1)



Réarrangements secondaires (2)



Conversion génique

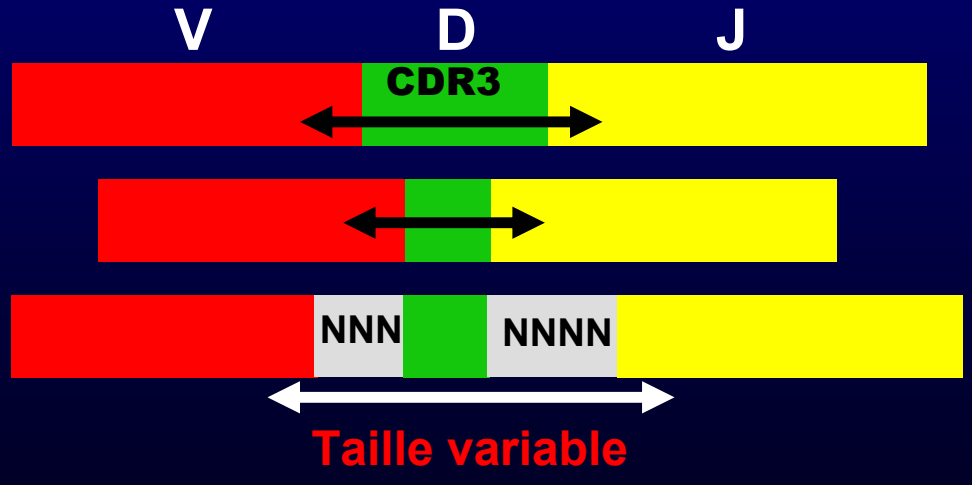


Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

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

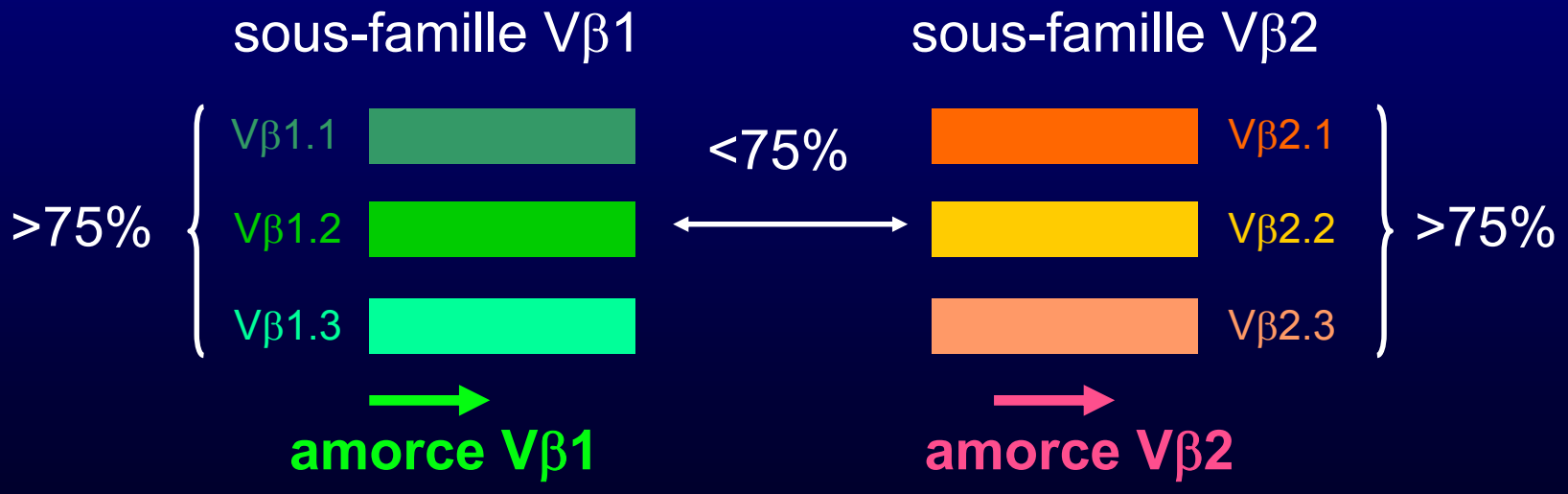
La région CDR3 concentre l'essentiel de la diversité

- 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*

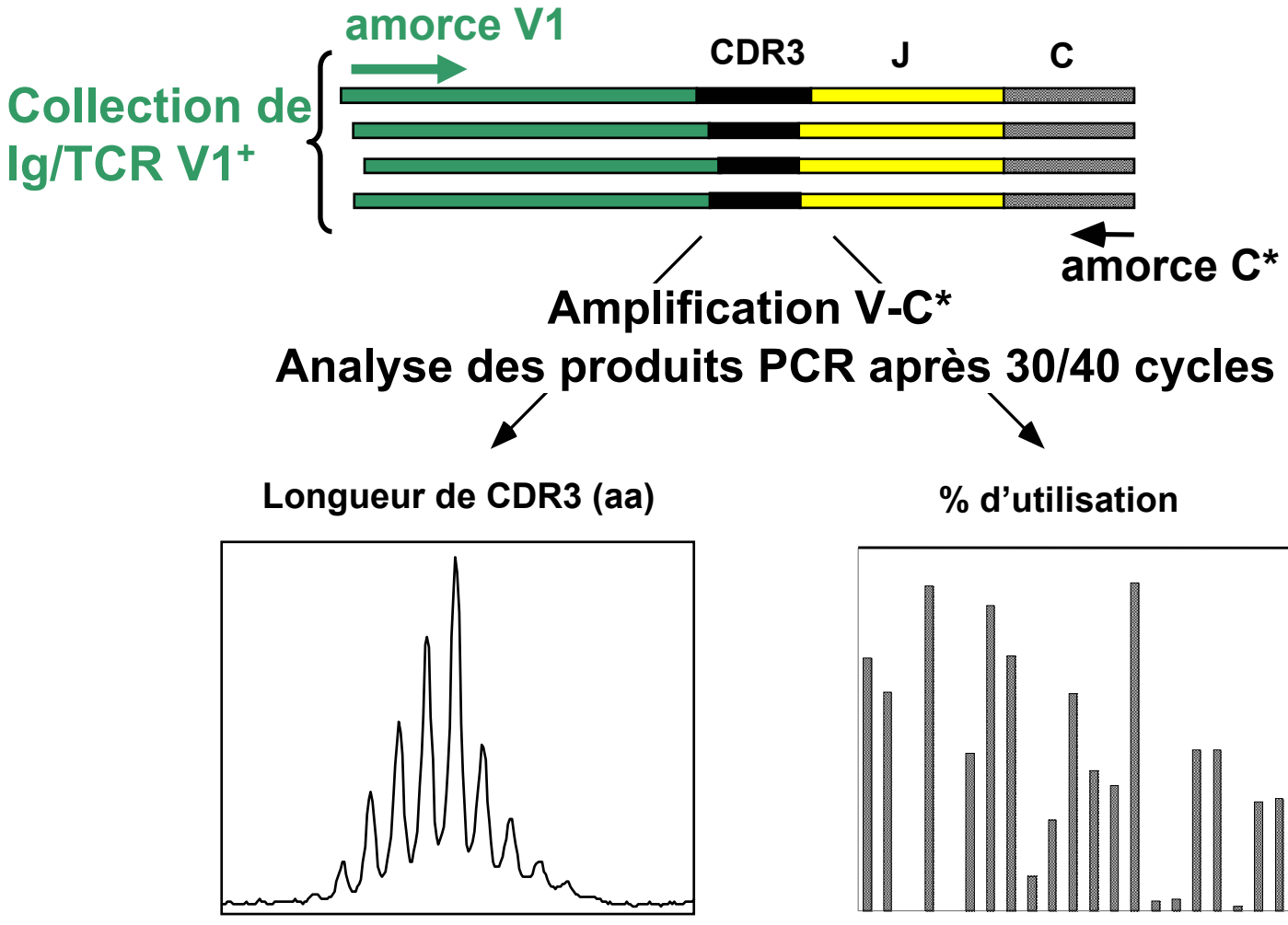


Amorces de sous-familles

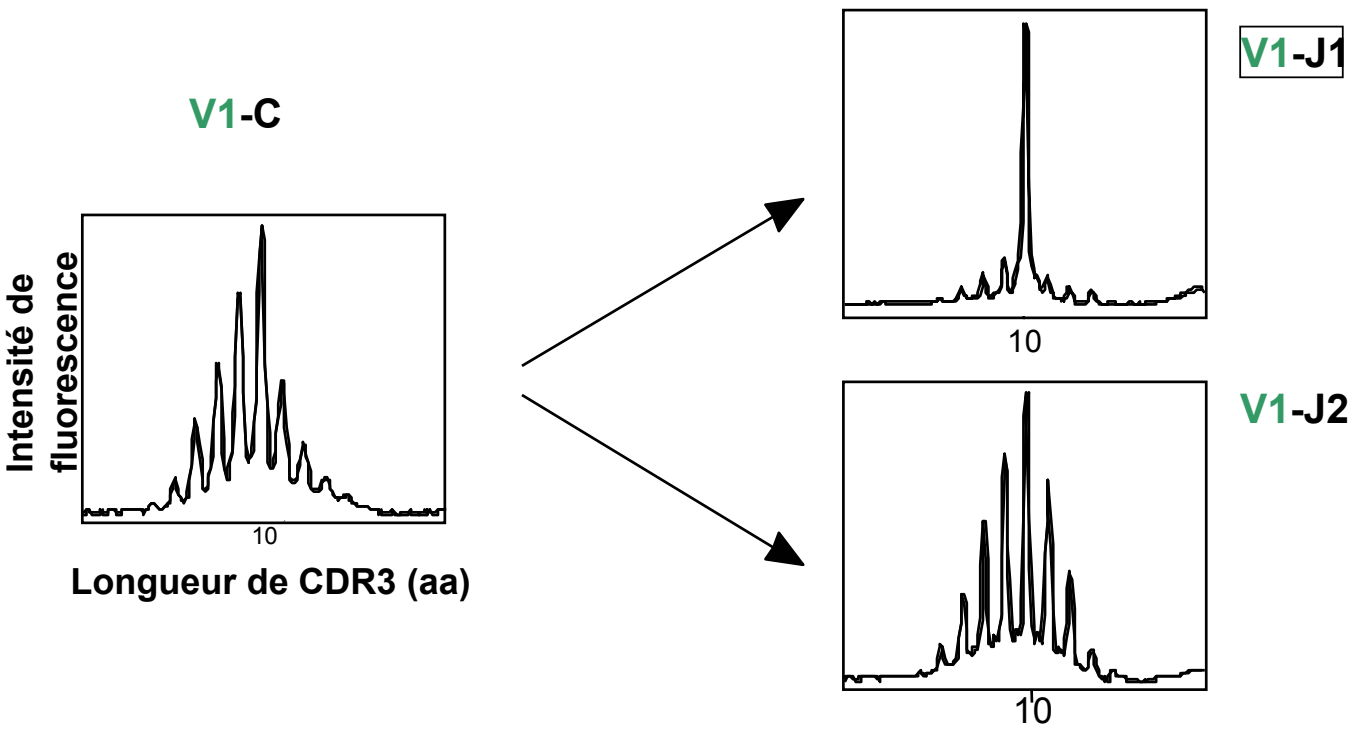
- Étant donné l'identité entre les membres d'une sous-famille Ig/TCR, il est généralement possible de dessiner des amorces spécifiques de sous-familles.



La technique Immunoscope (1)

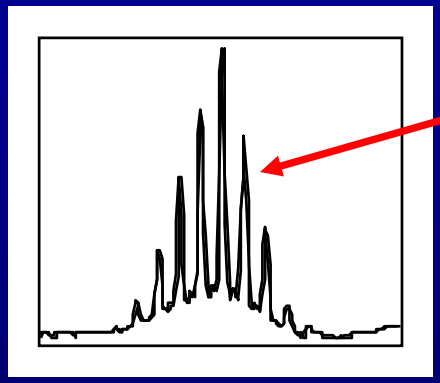


La technique Immunoscope (2)

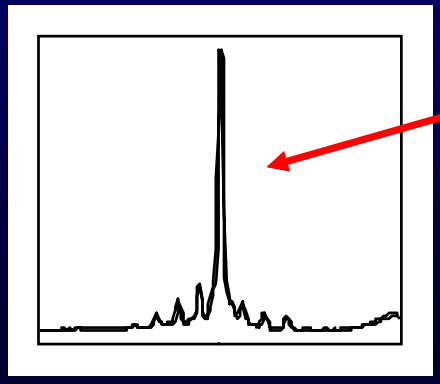


D'après Pannetier et coll. (1995) Immunol. Today 16, 176-180

La technique Immunoscope (3)



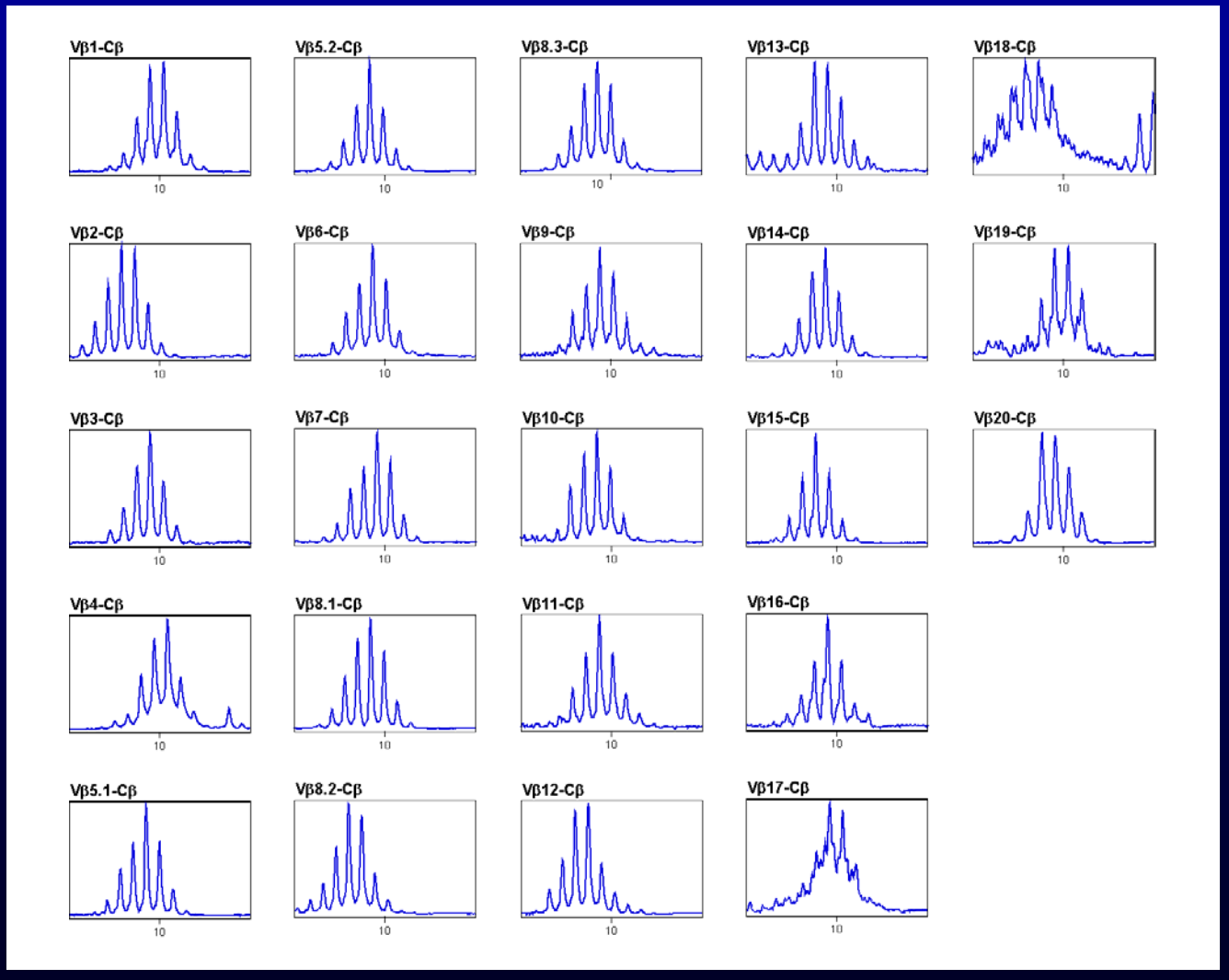
Courbe en cloche régulière: indicatif d'une *population polyclonale*



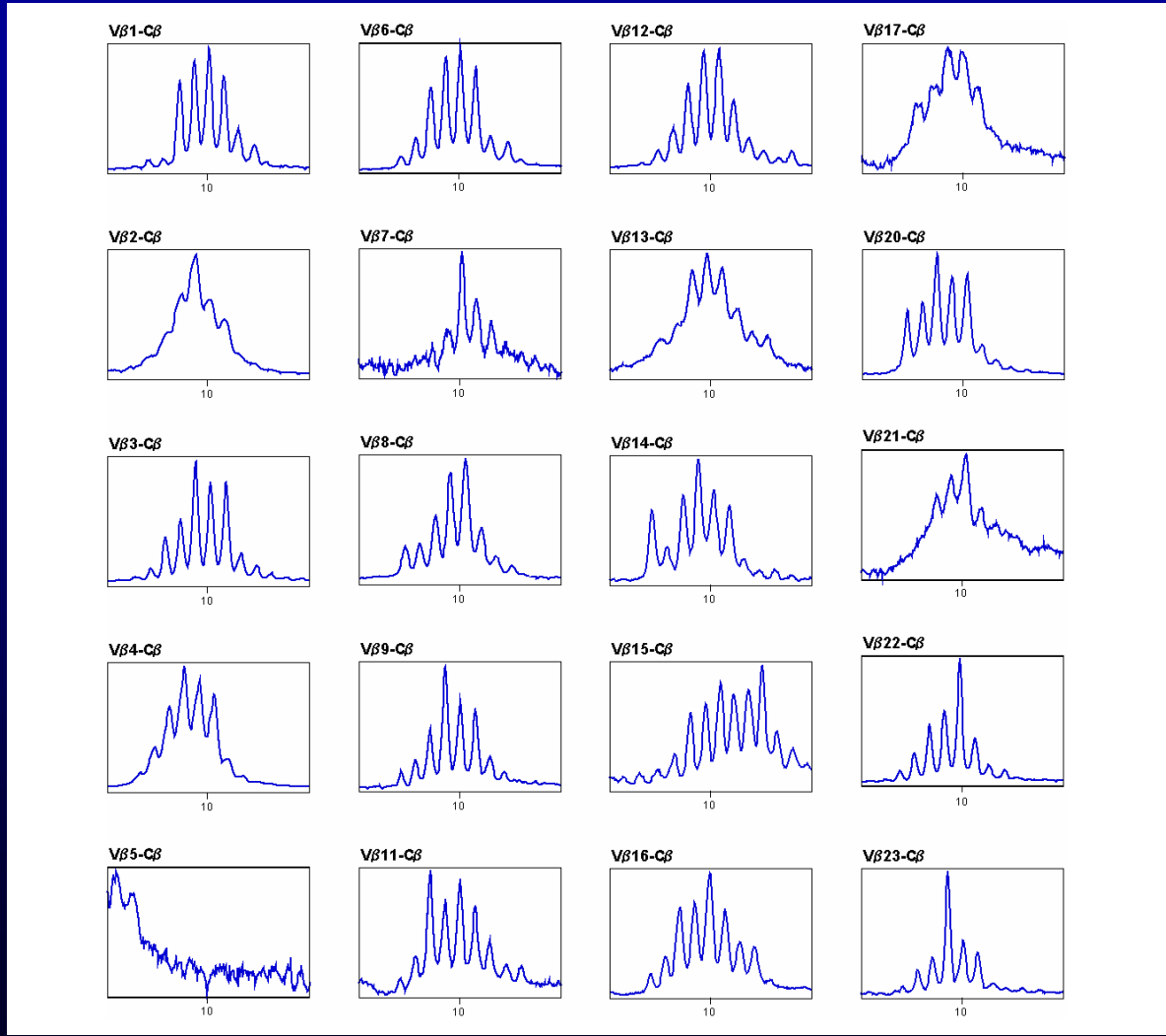
Pic proéminent: indicatif d'une *population oligoclonale* ou *clonale*

➔ *expansion clonale*

Répertoire TCRβ naïf de la souris



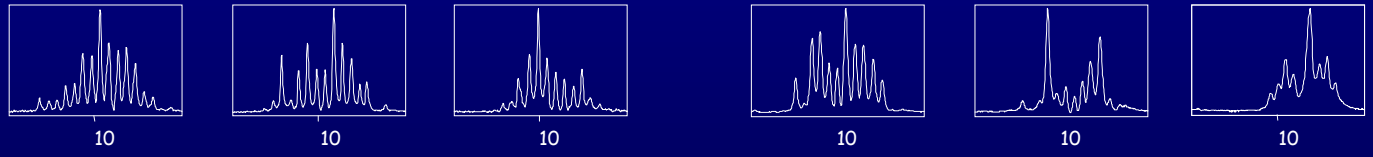
Répertoire TCRβ chez l'homme sain



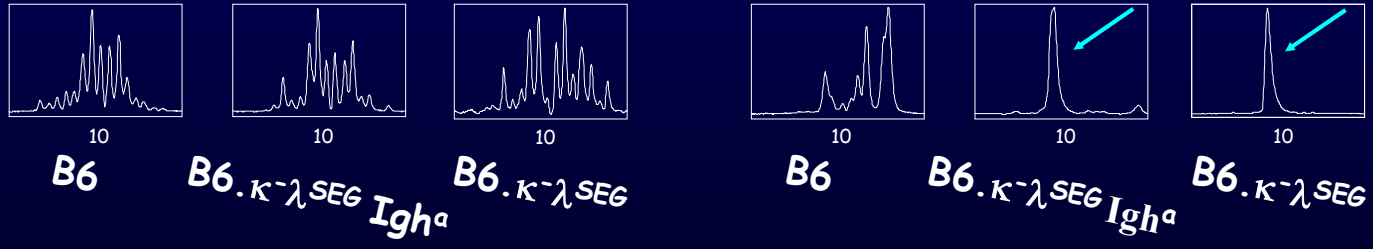
Réponse IgG anti-DNP oligoclonale chez les souris B6.$\kappa^{-}\lambda^{SEG}$

VH J558 **VH 36-60**

Témoins



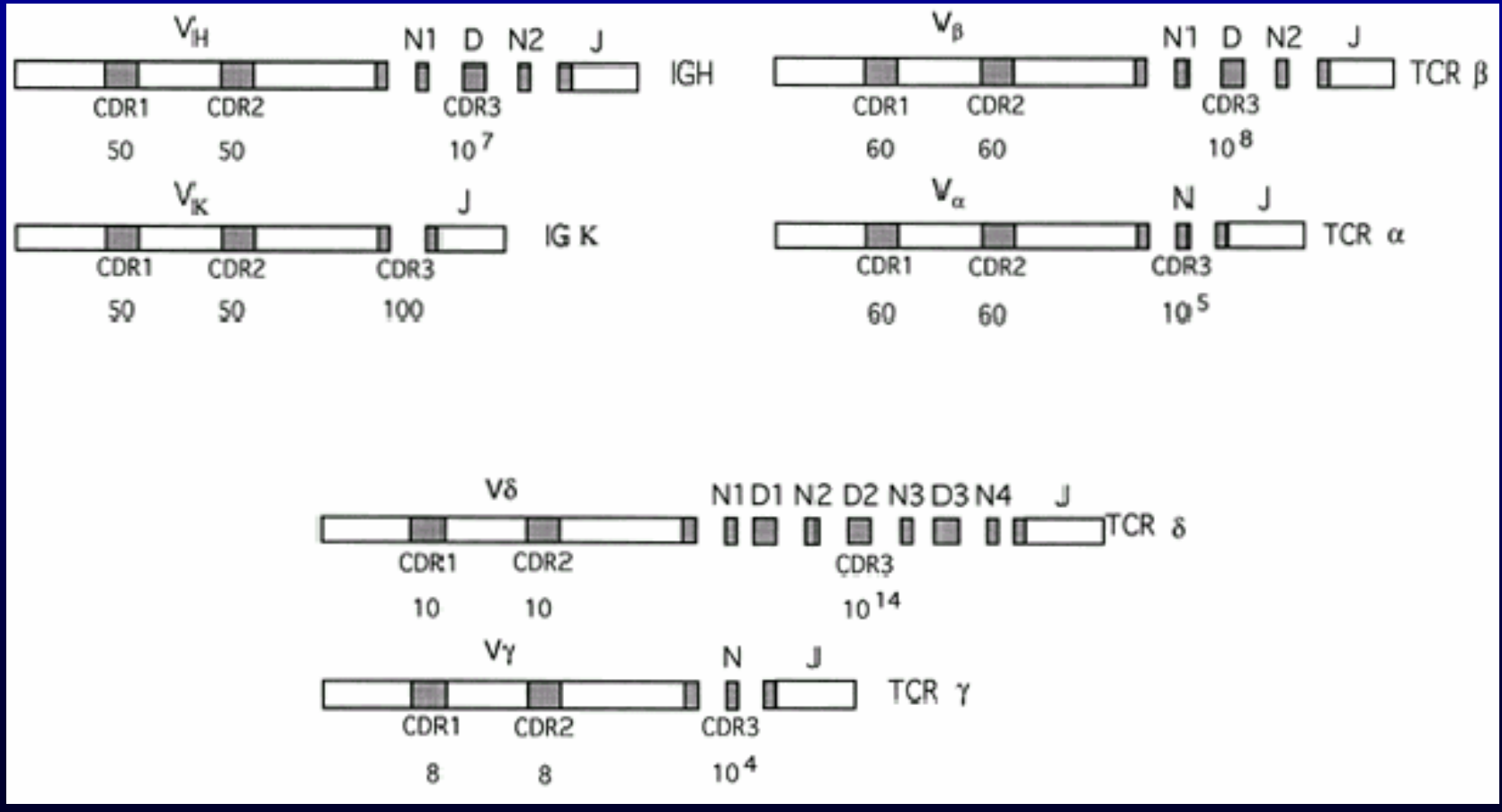
Immunisés



Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

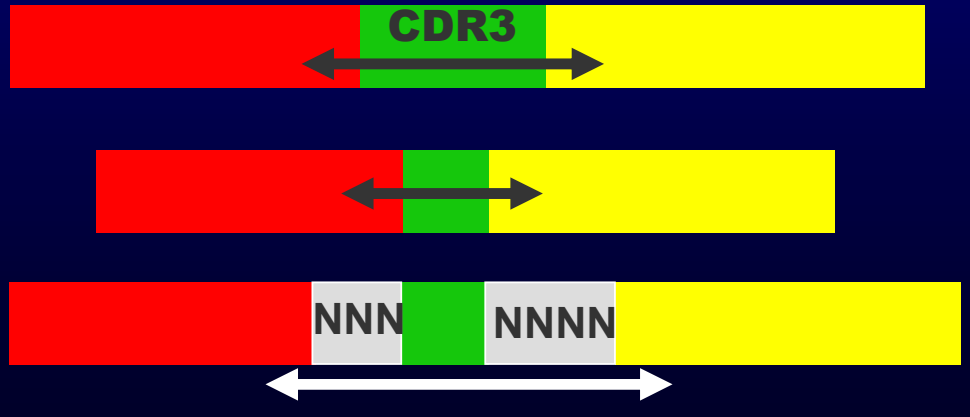
Conclusion

Diversité jonctionnelle CDR3 : une stratégie générale

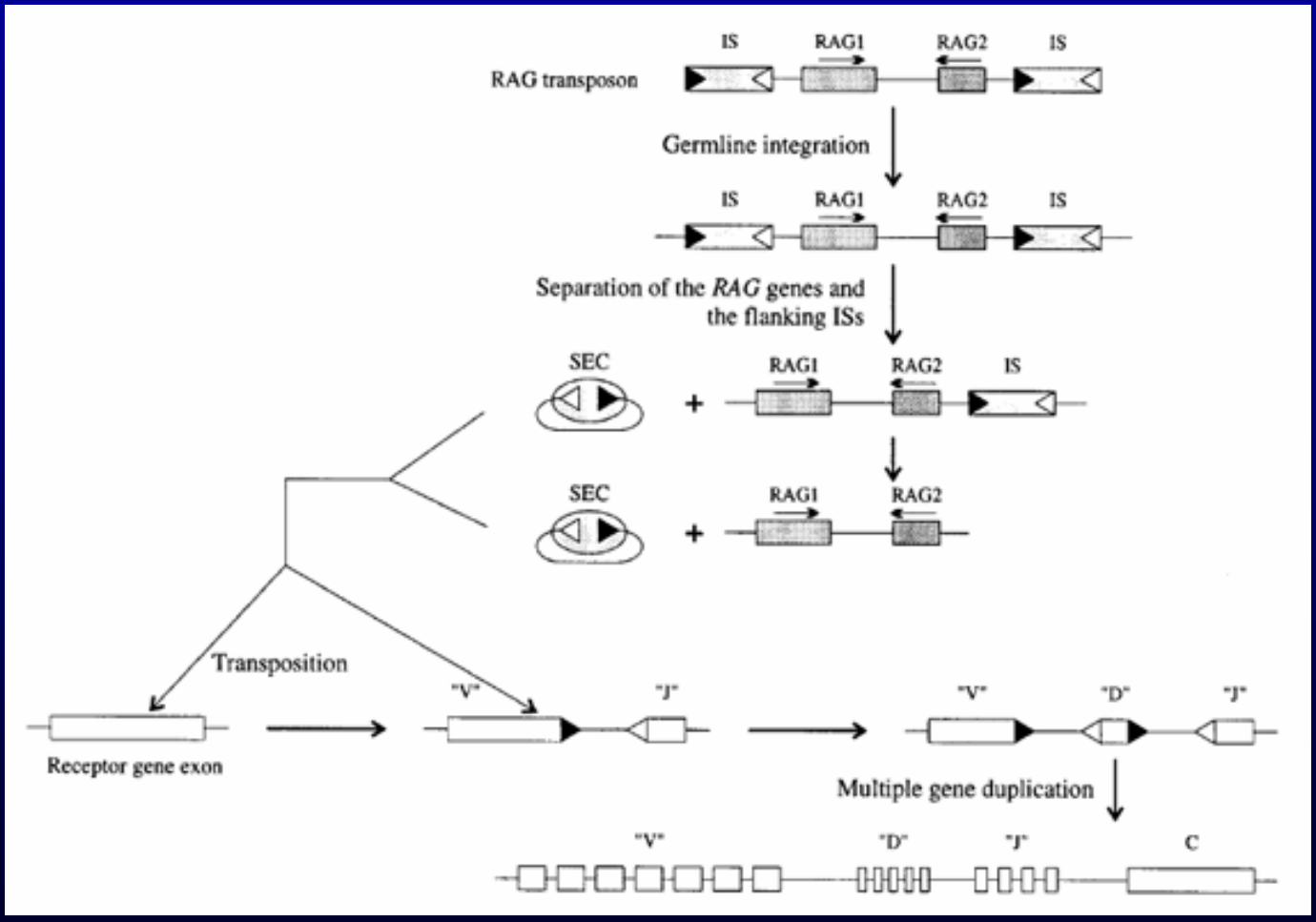


Diversité des chaînes Ig et TCR

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

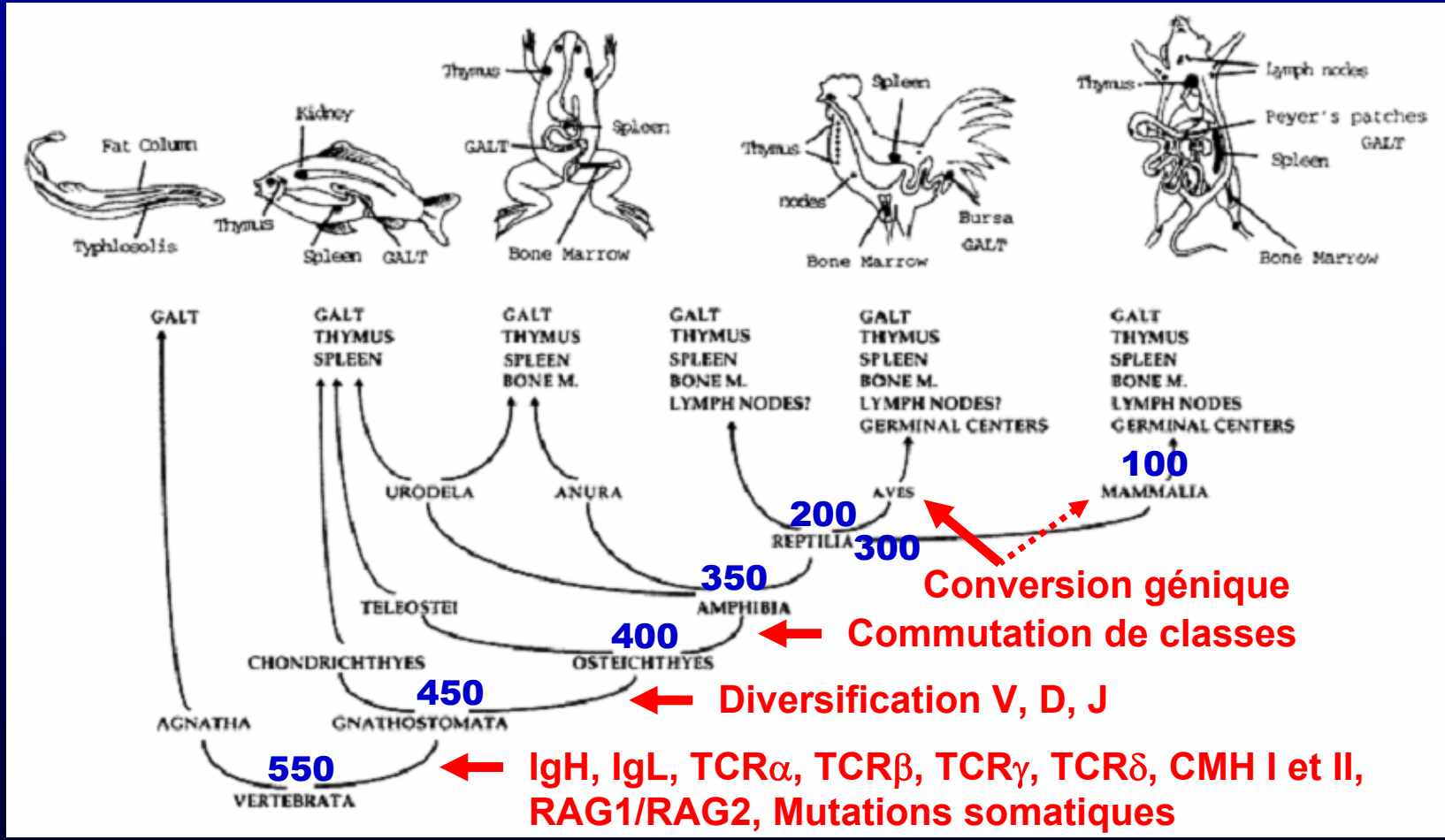


Origine de la recombinaison V(D)J



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

Questions/Discussion...