

Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et TCR

Adrien Six
Université Pierre et Marie Curie

IF2009 IF-VIa
février 2009

1

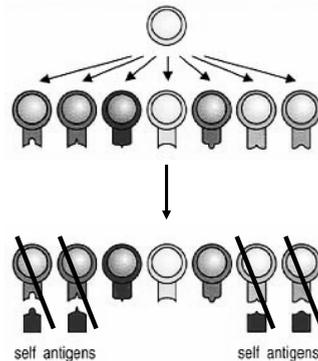
Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

1. Introduction
2. Recombinaison V(D)J
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. Conclusion

3

Théorie de la sélection clonale (1) Burnet (1899–1985)

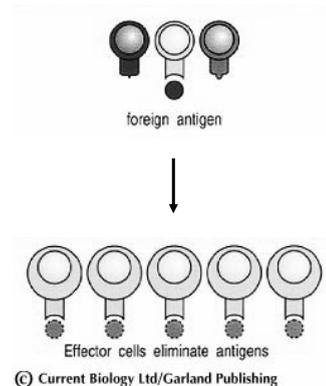
- Chaque lymphocyte exprime un type unique de récepteur spécifique d'antigène
- Les lymphocytes exprimant un récepteur dirigé contre un antigène du soi sont éliminés lors de la différenciation



7

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



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

8

Théorie de la sélection clonale (3)

Cette 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 ?

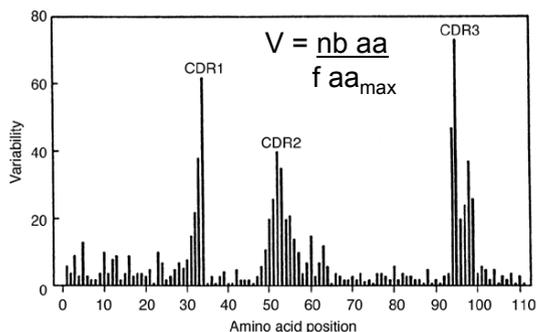
9

Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

1. Introduction
- 2. Recombinaison V(D)J**
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. Conclusion

10

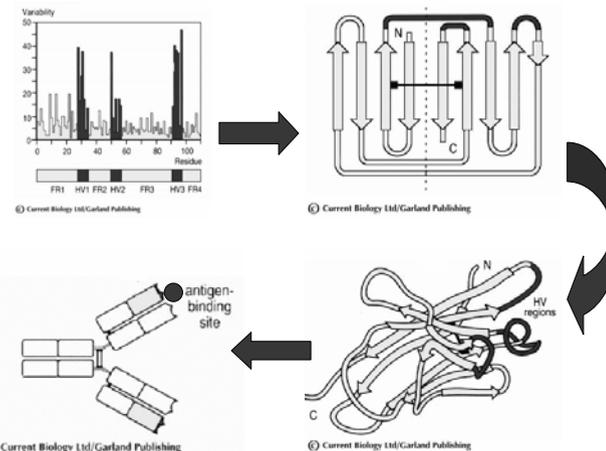
Les régions hypervariables (1)



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...

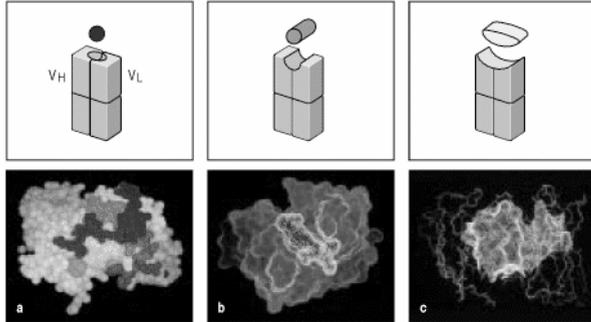
11

Les régions hypervariables (2)



12

Reconnaissance d'une forme



L'anticorps reconnaît directement l'antigène:

Paratope \leftrightarrow Epitope
 Site de liaison à l'Ag \leftrightarrow déterminant antigénique

13

Un paradoxe génétique

- Beadle et Tatum (1941): un gène, une protéine
- ~25 000 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)

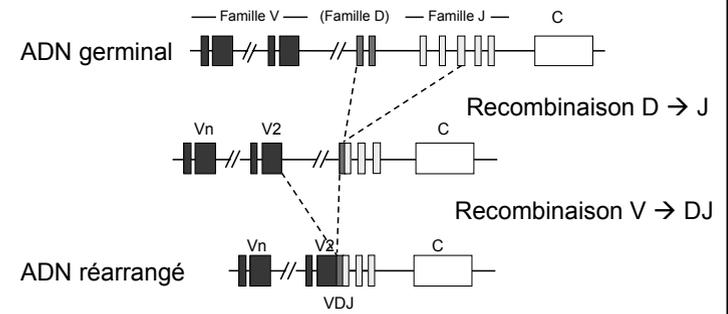
14

« 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.

15

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



→ CDR1 & CDR2
 sont codés dans
 les segments V

CDR3 = jonction V(D)J

→ Contact avec l'antigène (Ig)

→ Contact avec le complexe CMH/peptide (TCR)

16

Les régions CDR1, CDR2 & CDR3

Source of variation	CDR1	CDR2	CDR3
Sequence encoded by:	V segment	V segment	V _L -J _L junction; V _H -D _H -J _H junctions
Junctional flexibility	-	-	+
P-nucleotide addition	-	-	+
N-nucleotide addition*	-	-	+
Somatic hypermutation	+	+	+

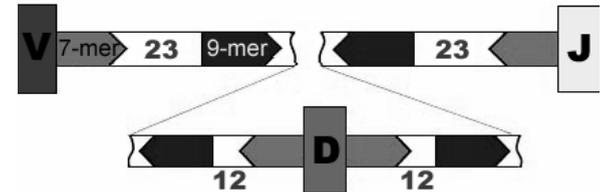
*N-nucleotide addition occurs only in heavy-chain DNA.

Table 5-3
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

17

La recombinaison V(D)J (1)

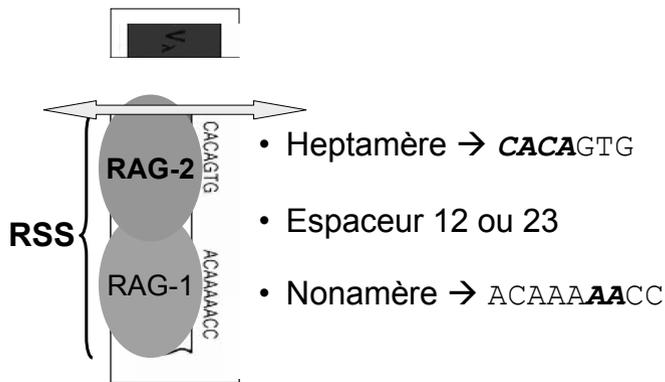
- Nécessite l'expression des protéines RAG-1 et RAG-2
- Nécessité de l'ouverture/accessibilité de la chromatine pour la recombinaison
- Reconnaissance de RSS : heptamère-espaceur-nonamère suivant la règle 12/23



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

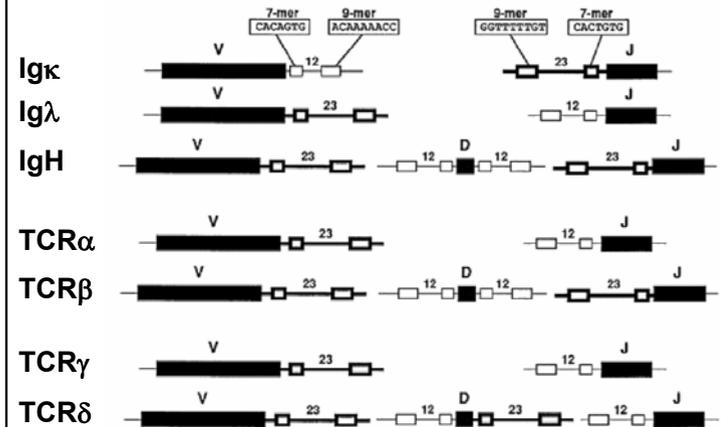
18

Séquences signal de recombinaison



19

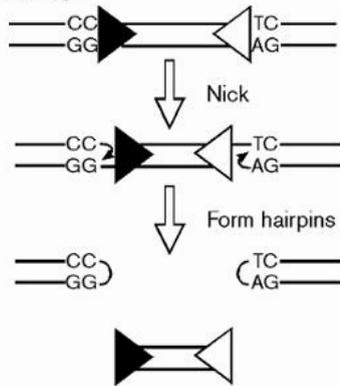
La règle 12/23 pour les Ig et TCR



20

La recombinaison V(D)J (2)

(a) Cleavage

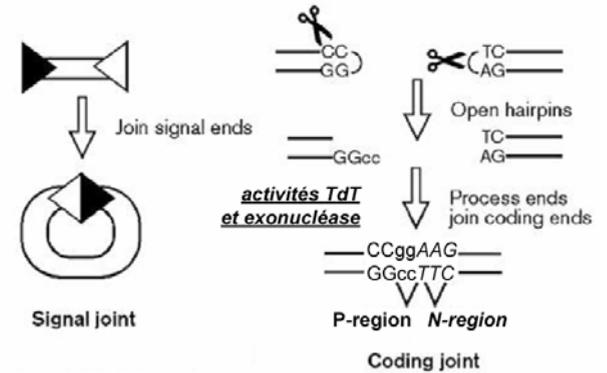


© 1996 Current Opinion in Immunology

21

La recombinaison V(D)J (3)

(b) Joining



© 1996 Current Opinion in Immunology

22

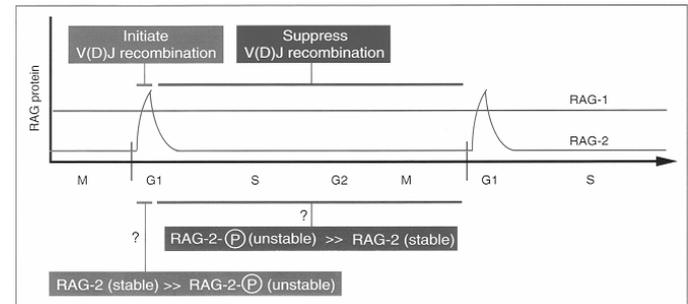
La recombinaison V(D)J (4)

Différentes protéines sont impliquées :

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

23

Régulation de l'expression de RAG



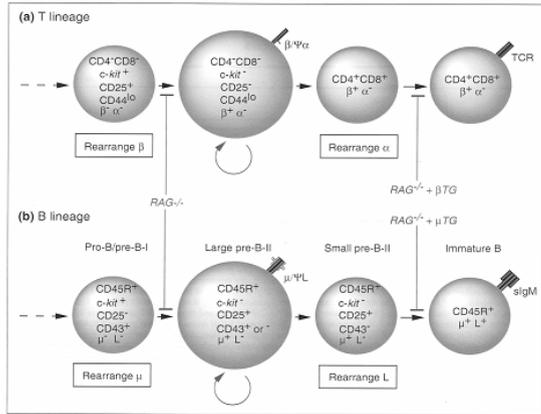
Au cours du cycle cellulaire:

- l'expression de RAG-1 est constante
- l'expression de RAG-2 active est limitée à la phase G1

Lin and Desiderio (1995) *Immunol. Today* 16:279-289

24

Régulation de la recombinaison V(D)J



Lin and Desiderio (1995) *Immunol. Today* 16:279-289

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

Réarrangements en série...

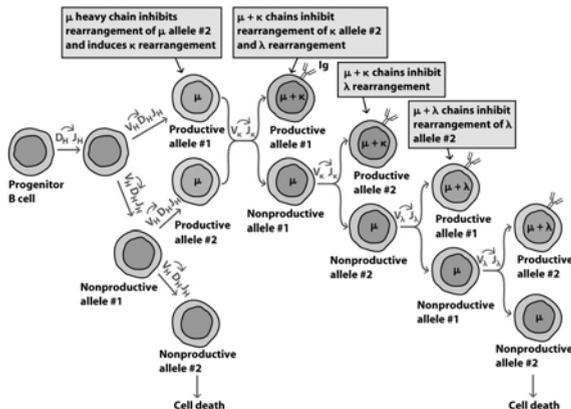


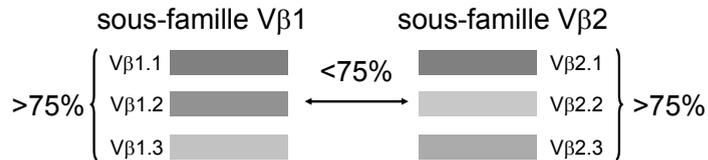
Figure 5-11
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

1. Introduction
2. Recombinaison V(D)J
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. Mécanismes de diversification
5. Conclusion

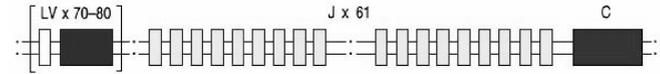
Sous-familles de gènes variables

- 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.



29

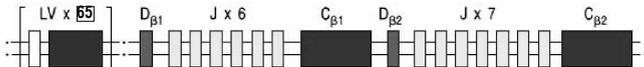
Organisation génomique du locus TCRα humain



- Chromosome 14
- 1.1 Mb
- 50-60 Vα groupés en 41 sous-familles
- 61 Jα, un seul Cα

30

Organisation génomique du locus TCRβ humain

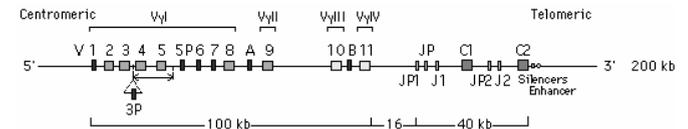


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

31

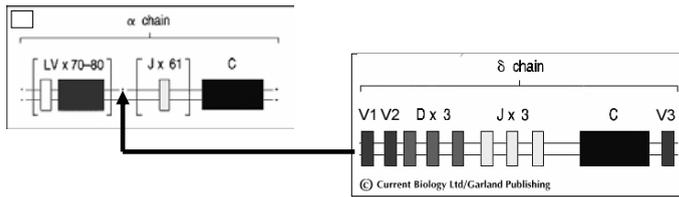
Organisation génomique du locus TCRγ humain



- 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

32

Organisation génomique du locus TCRδ humain

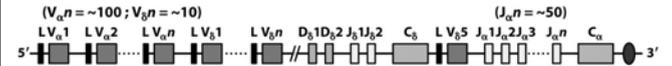


- Chromosome 14, inséré dans le locus TCRα
- 3 Vδ principaux, 3 Dδ, 3 Jδ, un seul Cδ
- Des Va sont utilisés par les chaînes TCRδ: Va/δ14.1, Va/δ23.1, Va/δ29.1, Va/δ36.1, Va/δ38.2
- 2 ou 3 Dδ souvent en tandem dans CDR3

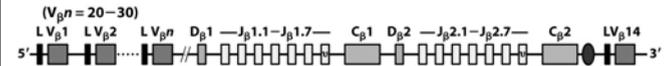
33

Organisation génomique des locus TCR chez la souris

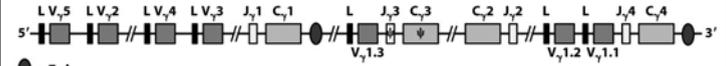
Mouse TCR α-chain and δ-chain DNA (chromosome 14)



Mouse TCR β-chain DNA (chromosome 6)



Mouse TCR γ-chain DNA (chromosome 13)



● = Enhancer
ψ = pseudogene

Figure 9-5
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

34

Organisation génomique du locus IgH humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

35

Organisation génomique du locus Igκ humain

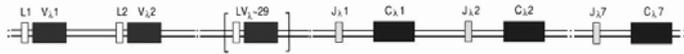


© Current Biology Ltd/Garland Publishing

- Chromosome 2
- 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

36

Organisation génomique du locus Igλ humain



© Current Biology Ltd/Garland Publishing

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

37

Organisation génomique des locus Ig chez la souris

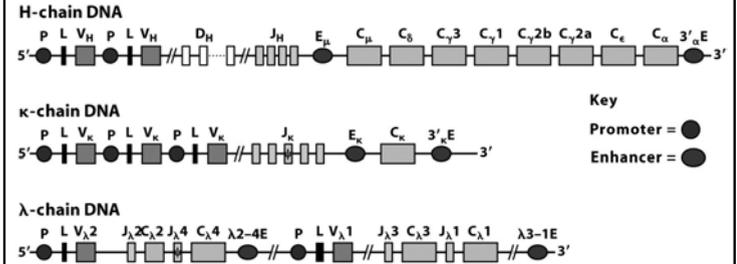


Figure 5-22
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

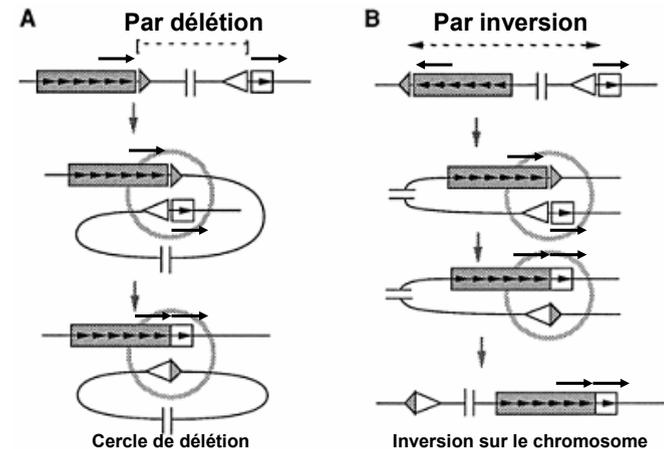
38

Mécanismes de génération de la diversité des anticorps et des TCR

1. Introduction
2. Recombinaison V(D)J
3. Organisation des locus TCR et Ig
4. **Mécanismes de diversification**
5. Conclusion

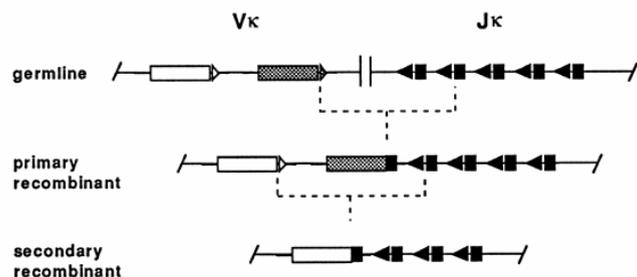
39

Différents types de réarrangements



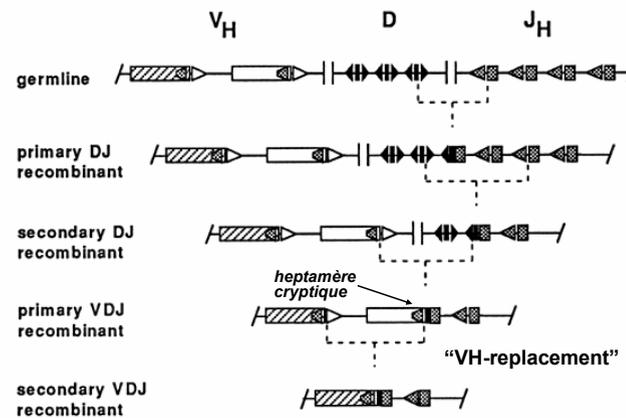
40

Réarrangements secondaires (1)



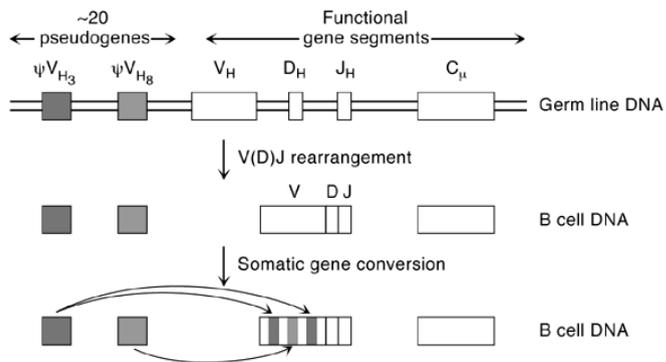
41

Réarrangements secondaires (2)



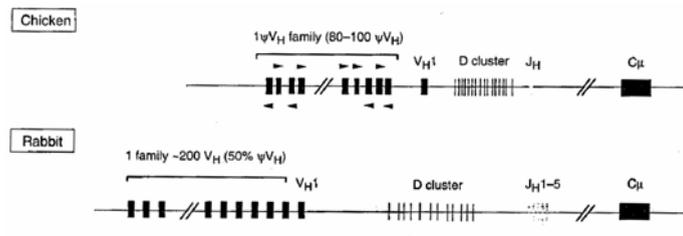
42

Conversion génique (1)



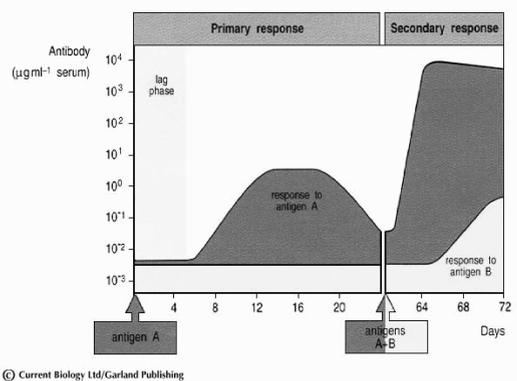
43

Conversion génique (2)



Weill and Reynaud (1987) *Science* 238:1094-1096

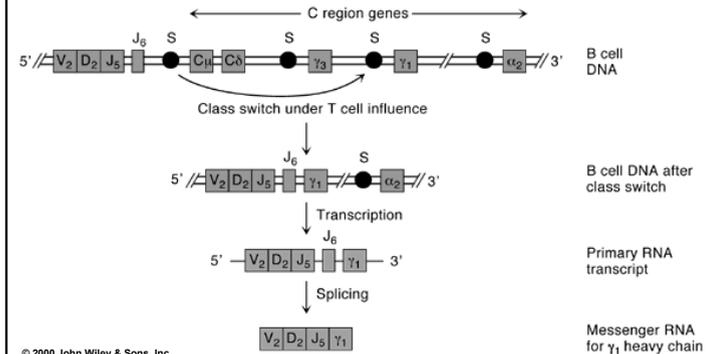
Mémoire immunologique



→ Principe de la vaccination

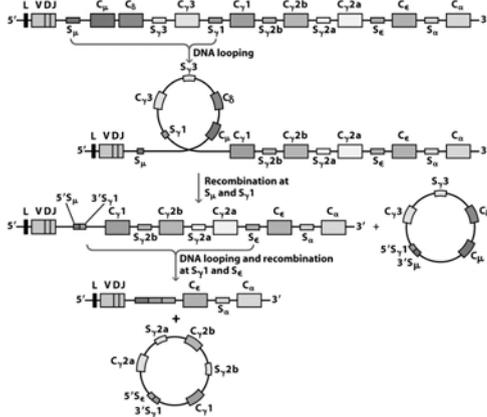
45

La commutation isotypique (1)



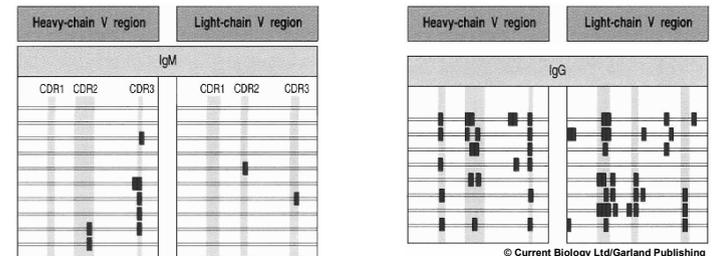
46

La commutation isotypique (2)



47

La maturation d'affinité



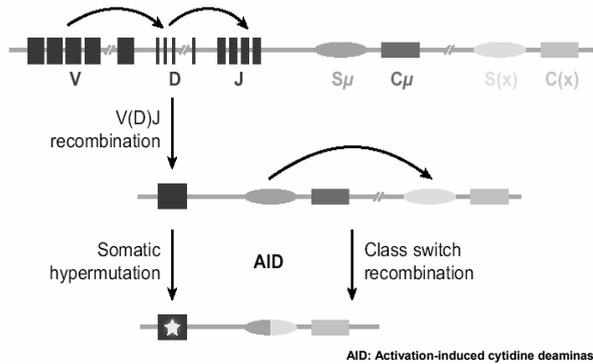
« Réponse primaire »
7 jours après la 1^{ère} immunisation

« Réponse secondaire »
7 jours après la 2^{ème} immunisation au jour 14

→ Hypermutation somatique dans les centres germinatifs

48

AID est nécessaire pour la commutation et l'hypermutation (1)



Teng & Papavasiliou (2007) *Annu.Rev.Genet.* 41:107.

49

AID est nécessaire pour la commutation et l'hypermutation (2)

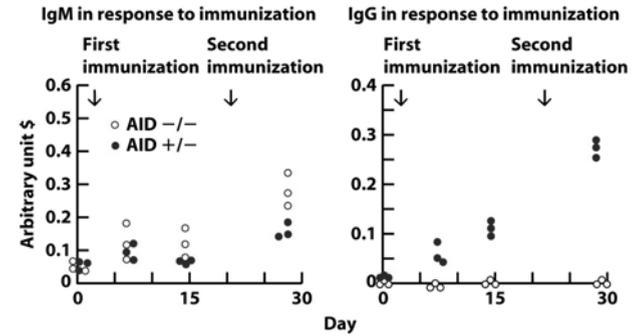


Figure 5-17a
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

50

AID est nécessaire pour la commutation et l'hypermutation (3)

Mutations in variable-region mRNA

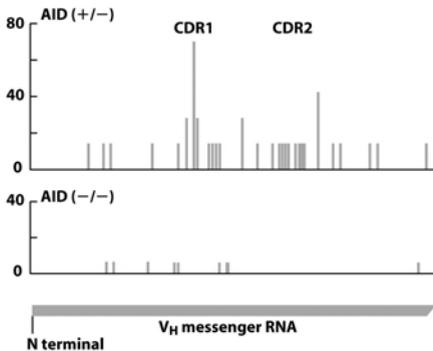
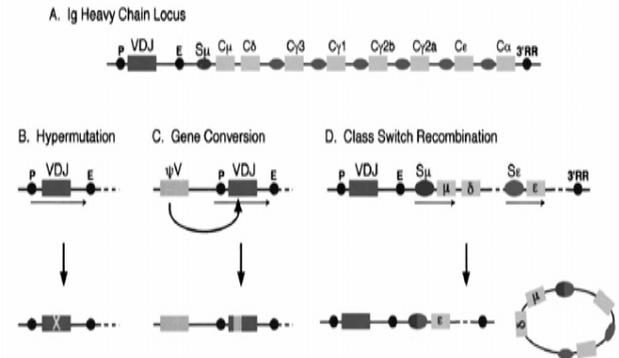


Figure 5-17b
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

51

AID est également nécessaire pour la conversion génique



Papavasiliou & Schatz (2002) *Cell* 109:S35.

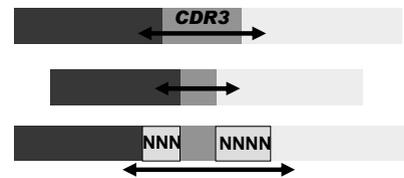
52

Conclusion

53

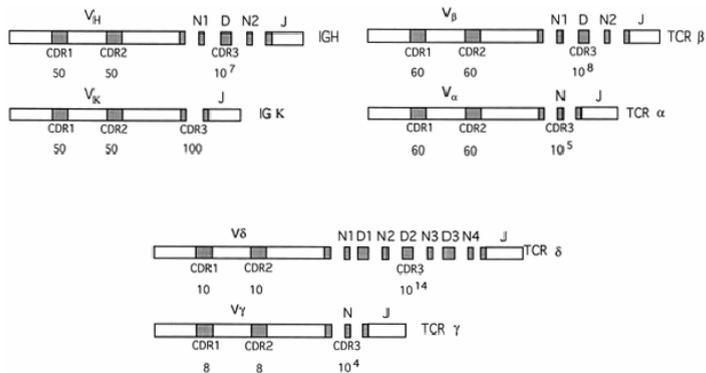
Diversité des chaînes Ig et TCR

- 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)



54

Diversité jonctionnelle CDR3 : une stratégie générale



55

Estimation de la diversité (1)

N-region nucleotide addition

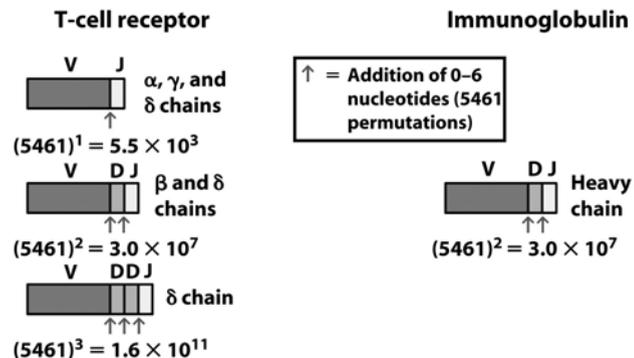


Figure 9-8d
Juby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

57

Estimation de la diversité (2)

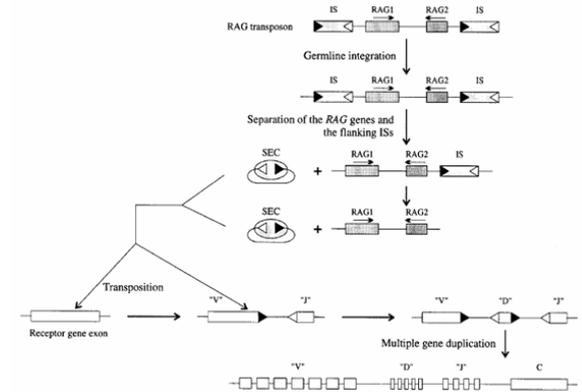
Mechanism of diversity	IMMUNOGLOBULINS		αβ T-CELL RECEPTOR		γδ T-CELL RECEPTOR	
	H Chain	κ Chain	α Chain	β Chain	γ Chain	δ Chain
ESTIMATED NUMBER OF FUNCTIONAL GENE SEGMENTS*						
V	101	85	79	21	7	6
D	13	0	0	2	0	2
J	4	4	38	11	3	2
POSSIBLE NUMBER OF COMBINATIONS†						
Combinatorial V-J and V-D-J joining	$101 \times 13 \times 4$	85×4	79×38	$21 \times 2 \times 11$	7×3	$6 \times 2 \times 2$
Alternative joining of D gene segments	-	-	-	(some)	-	(often)
Junctional flexibility	+	+	+	+	+	+
N-region nucleotide addition‡	+	~10 ¹²	+	~10 ¹⁵	+	~10 ¹⁸
P-region nucleotide addition	+	+	+	+	+	+
Somatic mutation	+	+	+	-	-	-
Combinatorial association of chains	+		+		+	

*Immunoglobulin data from Table 5-2, TCR data from Baum et al., 2004, *Nucleic Acids Research* 32:D51.
 †A plus sign (+) indicates mechanism makes a significant contribution to diversity but to an unknown extent.
 ‡A minus sign (-) indicates mechanism does not operate.
 §See Figure 9-8d for theoretical number of combinations generated by N-region addition.

Table 9-3
 Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

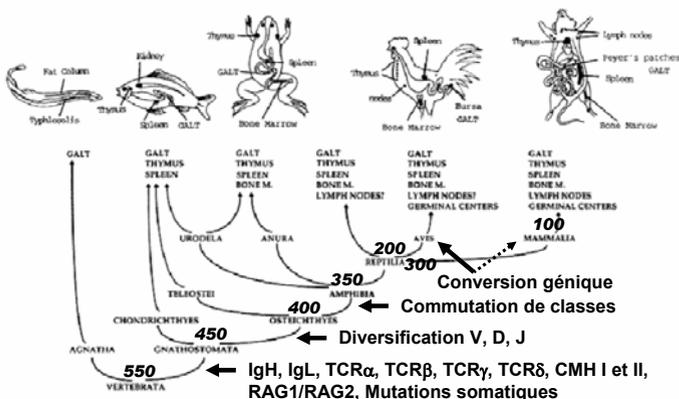
58

Origine de la recombinaison V(D)J



D'après Fugmann et al. (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18:495-529

Éléments d'immunologie comparée



D'après Du Pasquier et Flajnik, in *Fundamental Immunology*, 4th edition, W.E. Paul 60