



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Professeur Philippe Kourilsky

Cours 2007 - 2008

**Les systèmes immunitaires
dans l'évolution des espèces**



Les systèmes immunitaires dans l'évolution des espèces

INTRODUCTION / 1^{ère} partie : ANALYSE DESCENDANTE

- L'Homme et la souris

- Les mammifères

- Les autres vertébrés avec mâchoires: oiseaux et poissons

- Les vertébrés sans mâchoires et les procordés

- Les invertébrés

- Les plantes

2^{ème} partie : ANALYSE TRANSVERSALE ET CONCLUSIONS

- Bilan de l'analyse descendante

- L'émergence de l'immunité adaptative

- Quelle frontière entre immunité adaptative, anticipative, innée ?

- Les invariants

- Quelles forces de sélection ?

Date des
Cours 2008

30 janvier

6 février

13 février

20 février

27 février



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Professeur Philippe Kourilsky

Année 2008

Vertébrés sans mâchoire et procordés

- I. La lamproie et la myxine**
- II. Les procordés**



I. La lamproie et la myxine.

- Tous les vertébrés à mâchoires possèdent l'immunité adaptative, en plus de l'immunité innée.
- Les invertébrés font usage de la superfamille des immunoglobulines pour l'immunité innée.
- Quid des agnathes ?

Pancer Z, et al. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):174-80.

Alder, MN., et al. Diversity and Function of Adaptive Immune Receptors in a Jawless Vertebrate *Science* Vol 310, Dec 2005: 1970-1973.

Pancer Z, et al. Variable lymphocyte receptors in hagfish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9224-9.



A. Les fondements de l'immunité chez les agnathes

- **La lamproie et la myxine sont les deux seuls représentants vivants des agnathes (divergence : 500 millions d'années).**
- **Des cellules dotées des caractéristiques morphologiques des lymphocytes ont été trouvées chez les agnathes.**
- **Des éléments de machinerie moléculaire propres aux lymphocytes des gnathostomes sont présents dans ces cellules.**
- **Dans le génome, beaucoup de gènes régulateurs impliqués dans la transcription de gènes de l'immunité (GATA, IKAROS, etc.) ainsi que des composants des cascades NF Kappa B et STAT (exprimés dans les cellules de type lymphocytaire).**



- **Pas d'homologues clairs de gènes du CMH, mais présence de précurseurs hypothétiques de gènes de l'immunoprotéasome des gnathostomes.**

Klein J, Nikolaidis N. The descent of the antibody-based immune system by gradual evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 4;102(1):169-74.

- **Hypersensibilité retardée et rejet d'allogreffes (années 60).**
- **Agglutinines spécifiques après stimulation par des antigènes particuliers, de niveau accru après re-stimulation (pas de structure de type Ig démontrée).**

Litman GW, and al. The evolution of the immune response. 3. Structural studies of the lamprey immuoglobulin. *J Immunol.* 1970 Nov;105(5):1278-85.

- **Pas de structure analogues au thymus.**

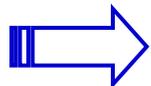
Amemiya, CT. et al. Evolution and development of immunological structures in the lamprey. *Current Opinion in Immunology.* Vol 19, 5, 485-602 (Oct 2007)



B. La découverte des VLR (Variable Lymphocyte Receptors)

a) La recherche négative de BCR et TCR

- Analyse transcriptomique (des cellules de type lymphocytaire) et génomique chez la lamproie.
 - Une copie unique d'un gène réarrangé V-J de type TCR.
 - Un gène de type VpreB.
 - Une famille de récepteurs de type Ig.

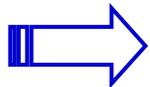


Mais pas trace de BCR, TCR réarrangeables [segment V(D)J].

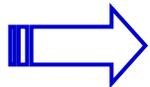


b) La recherche négative de nouveaux récepteurs.

- Lamproie immunostimulée plusieurs fois.
- Transcriptome de lymphoblastes.



Pas trace de transcrits de type BCR ou TCR.



Abondance de transcrits codant pour des protéines riches en LLR = Leucine rich repeats, d'une grande diversité de séquence, et baptisées VLR (Variable Lymphocyte Receptors).



- Les VLR sont constitués d'une tige invariante ancrée dans la surface :
 - par une liaison glycosyl-phosphatidylinositol (GPI).
 - et par un certain nombre de modules LRR, ayant eux-mêmes des séquences variables.

- Le clivage de la liaison GPI peut relarguer le VLR soluble.

Alder, MN., et al. Diversity and Function of Adaptive Immune Receptors in a Jawless Vertebrate *Science* Vol 310, Dec 2005: 1970-1973.

Pancer Z, et al. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):174-80.

Pancer Z, et al. Variable lymphocyte receptors in hagfish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9224-9.



C. La génération de la diversité des VLR

- L'organisation génétique

- Un seul gène VLR incomplet avec 3 régions codantes séparée par 2 régions non codantes dépourvues de site d'épissage canonique.
- Insertion de modules comprenant 1, 2 ou 3 unités de LRR (plus de 2200 cassettes pour VLRA et de 4900 pour VLRB).
- Assemblage par étapes multiples (exclusif des lymphocytes).
- Analyse génétique ultérieure : environ 2000 « gènes » à LRR.



- **Mécanisme de « copy choice » et/ou conversion génique, différent de RAG1 RAG2, impliquant de courtes régions homologues pour copier les séquences LRR dans le gène.**

Nagawa F, et al. Antigen-receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice. *Nat Immunol.* 2007 Feb;8(2):206-13.

Rogozin IB, et al. Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):647-56.



- La diversité

- Par le seul jeu des recombinaisons, la diversité potentielle est du même ordre que celle des anticorps (10^{14} à 10^{17}).
- De plus, hyper mutation somatique ?
- En gros, idem chez la myxine.

Kasamatsu J, et al. Two variable lymphocyte receptor genes of the inshore hagfish are located far apart on the same chromosome. *Immunogenetics*. 2007 Apr;59(4):329-31.

- Chaque lymphocyte exprime un VLR (monoallélique). La diversité est uniquement limitée par le nombre des lymphocytes.



D. La réponse anticorps et la structure des VLR

1) La réponse anticorps chez la lamproie

Alder, MN. et al., Antibody responses of variable lymphocyte receptors in the lamprey. Nat Immunol. 2008 Feb 3; [Epub ahead of print]

- Production de VLRB contre des carbohydrates d'érythrocytes hétéologues (10^7 i.p., 19 jours ; rappel : 20x)
- Structure des « agglutinines » = VLRB = multimères avec liaison S-S.
- Réponse contre bacillus anthracis, pas contre antigène soluble (BSA).
- Distribution tissulaire des lymphocytes VLRB+ (\neq VLRA+), réponse et sécrétion.



- **Pas d'organe lymphoïde.**
- **Induction des réponses par des antigènes particuliers (analogue aux réponses T indépendantes).**
- **Mécanisme d'induction ? Adaptateur (ancrage GPI).**
- **Réponse secondaire, expansion clonale.**



2) L'AID

Rogozin IB, et al., Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):647-56.

- 2 gènes de type AID-APOBEC chez la lamproie (pas trouvés chez des cordés invertébrés).
- Mutagènes chez la levure.
- Mutagenèse impliquée.
- Dans la conversion génique ?
- Dans une éventuelle maturation d'affinité ?
- Dans la diversification (et l'évolution) des récepteurs germinaux ?
- Analogie des VLR avec le glycorécepteur des plaquettes des agnathans et des gnathostomes.



3. La structure des VLR de la myxine.

- La structure cristallographique de 3 VLR de la myxine a été résolue.
- Les VLR ont la forme (fer à cheval) caractéristique de la famille des LRR (plus de 20 structures). Les variations de séquence sont localisées sur la face concave de la protéine et identifient probablement le site d'interaction avec l'antigène.

Kim HM, et al. Structural diversity of the hagfish variable lymphocyte receptors. *J Biol Chem.* 2007 Mar 2;282(9):6726-32.



4. La structure des VLR de la lamproie.

- Production de VLR recombinants spécifiques de BcL A.
- Constitués de 4x2 ou 5x2 sous unités.
- Spécificité, avidité et stabilité élevées.
- Structure (modélisée + mutagénèse) analogue à la myxine.

Herrin BR, et al. Structure and specificity of lamprey monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 106-5 2040-5



II. Les procordés

- Les cordés (chordés) sont les animaux qui présentent (au moins dans les premiers stades de leur vie) une corde dorsale. Les cordés comprennent :
 - Cordés = vertébrés + procordés
 - Procordés = céphalocordés (amphioxus) + urocordés (Tuniciers)
- Les tuniciers, plutôt que les céphalocordés, sont les plus proches des vertébrés.

Delsuc F, et al. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*. 2006 Feb 23;439(7079):965-8.



- **Pas d'homologues de Ig, TCR, RAG, TdT, CMH repérés par hybridation croisée, séquençage (séquence complète de « *Ciona intestinalis* ») ou clônage technique utilisant Amptrap)**

Cannon JP, et al. Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. Nat Immunol. 2002 Dec;3(12):1200-7.



A. L'histocompatibilité chez le tunicier *Botryllus schlosseri*

- Cet urocordé est une ascidie dont la vie commence comme un têtard mobile qui, après 24h, se transforme en un oozoid sessile.

- Ensuite, l'organisme forme des colonies, par bourgeonnement d'individus génétiquement identiques (les zoïdes). La colonie est irriguée par un réseau vasculaire commun, bordé aux extrémités par des ampoules (ampullae).



- Ces ampoules (ampullae) sont les sites de la réaction d'histocompatibilité lorsque 2 colonies se touchent. Il y a alors fusion (via la vasculature) ou rejet, qui dépend d'un locus polymorphe.
- FuHC: nombreux alleles.
 - 1 ou 2 allèles en commun : fusion.
 - Allèles différents : rejet.
- Le locus a été isolé par clonage positionnel.

De Tomaso AW, et al. Isolation and characterization of a protochordate histocompatibility locus. *Nature*. 2005 Nov 24;438(7067):454-9.

- Les gènes impliqués ont été repérés par leur polymorphisme élevé (cDNA)



- **cADN avec 1007 aa de séquence, dont 852aa extracellulaire, 1 domaine de type EGF, 2 domaines de type Ig en tandem.**
 - **Le gène : 33 Kb et 31 exons (épissages alternatifs)**
 - **Les analyses de ségrégation confirment qu'il s'agit bien d'un locus unique impliqué dans la fusion ou le rejet.**
 - **Polymorphisme élevé 10 individus → 18 allèles.**
 - ✓ **Divergence moyenne : 4% des nucléotides.**
 - ✓ **Pas de région hypervariable.**
 - ✓ **Expression ubiquitaire (sauf tissu germinale).**



- **FuHC n'est pas un homologue strict du CMH, ni au niveau des séquences, ni au niveau fonctionnel (la compatibilité est assurée par un seul allèle).**
 - **Mécanisme de type « missing self » : la reconnaissance d'un seul allèle bloque la réaction de rejet.**
 - **Un locus proche de FuHC, fester, est polymorphe, et sujet à diversification par épissage alternatif extensif. Fester code probablement pour le récepteur de FuHC..**

Nyholm SV, et al. fester, A candidate allorecognition receptor from a primitive chordate. *Immunity*. 2006 Jul;25(1):163-73.



- **Le dispositif est réminiscent du mode de fonctionnement des cellules NK. Le génome de l'ascidie « *Ciona instestinalis* » contient des gènes des NK des vertébrés.**

Azumi K, et al. Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". Immunogenetics. 2003 Nov;55(8):570-81.



B. Les récepteurs VCBP d'Amphioxus

- 2 familles de gènes codant pour des protéines secrétés avec deux domaines Ig de type V et un domaine de liaison à la chitine.

Ig Variable région chitin-binding proteins (VCBP)

Cannon JP, et al. Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. Nat Immunol. 2002 Dec;3(12):1200-7.

- Dans l'une des familles, régions V hyper-diversifiées, qui ne correspondent pas aux régions hypervariables classiques

(43 séquences différentes dans 13 animaux).



- **Des structures de VCBP ont été déterminées. Elles contiennent plusieurs caractéristiques du repliement des régions variables standards.**

Hernández Prada JA, et al. Ancient evolutionary origin of diversified variable regions demonstrated by crystal structures of an immune-type receptor in amphioxus. Nat Immunol. 2006 Aug;7(8):875-82.

Greenspan NS, Schroeder HW Jr. Recognition reversal in a spineless scrounger. Nat Immunol. 2006 Aug;7(8):797-8.



C. Les séquences immunes LRR chez les procordés

Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:497-518.

- **Le génome du tunicier solitaire (*Ciona savignyi*) contient :**
 - **7 à 19 gènes de type TLR.**
 - **Plus de 22 autres gènes à LRR sans introns.**



- Le génome « **C. intestinalis** » ne contient que 3 TLR, tous avec introns.
- Le génome de l'amphioxus **B.floridae** contient :
 - au moins 42 gènes TLR sans introns.
 - au moins 211 autres gènes (ou allèles) à LRR sans introns.
- Les gènes sans introns ont probablement été générés par rétro-transposition (symptôme probable d'évolution rapide).



Les systèmes immunitaires dans l'évolution des espèces

Date des
Cours 2008

30 janvier

6 février

13 février

20 février

27 février

INTRODUCTION / 1^{ère} partie : ANALYSE DESCENDANTE

- L'Homme et la souris

- Les mammifères

- Les autres vertébrés avec mâchoires: oiseaux et poissons

- Les vertébrés sans mâchoires et les procordés

- Les invertébrés

- Les plantes

2^{ème} partie : ANALYSE TRANSVERSALE ET CONCLUSIONS

- Bilan de l'analyse descendante

- L'émergence de l'immunité adaptative

- Quelle frontière entre immunité adaptative, anticipative, innée ?

- Les invariants

- Quelles forces de sélection ?



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Chaire d'Immunologie Moléculaire

Professeur Philippe Kourilsky

Année 2008

Les invertébrés

- I. Echinodermes et mollusques
- II. Insectes
- III. Nématodes et cnidaires



I. Echinodermes et mollusques.

A. L'Oursin

- Séquençage du génome en 2006.

Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):941-52.

Bottjer DJ, et al. Paleogenomics of Echinoderms. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):956-60.

- Comparaison génétique / fossiles. Répérage des gènes impliqués dans la synthèse du tissu biominéral (le stéréome)

Rast JP, et al. genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):952-6.



1. L'immunité innée chez les oursins

a) 222 gènes codant pour des TLR (Toll-Like Receptors) / 2 familles

- Expansion : 211 gènes Type vertébré
 (30 % pseudogènes)
 + 11 gènes Type invertébré
- Domaines extracellulaires beaucoup plus diversifiés que les domaines intracellulaires
 - Reconnaissance directe plutôt qu'indirecte.
 - Profils d'expression dans les cœlomocytes (combinatoires ?).
- Organisation réminiscente des récepteurs olfactifs (restriction clonale sans réarrangement de l'ADN).



- b) Plus de 200 gènes codant pour des NLR (NACHT-LRR)**
 - Les gènes NLR n'avaient été décrits que chez les vertébrés.
 - Transcription abondante dans l'intestin (herbivore, mais symbiontes ?).

- c) 218 gènes (1095 domaines) codant pour des SCRC (=Scavenger Receptor Cystein rich proteins) (protéines modulaires de récupération).**

- d) La famille 185 / 333 (au moins 120 gènes) : expression accrue de façon différentielle dans diverses infections.**

Terwilliger DP, et al. Distinctive expression patterns of 185/333 genes in the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: an unexpectedly diverse family of transcripts in response to LPS, beta-1,3-glucan, and dsRNA. *BMC Mol Biol.* 2007 Mar 1;8:16.

Buckley KM, Smith LC. Extraordinary diversity among members of the large gene family, 185/333, from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *BMC Mol Biol.* 2007 Aug 15;8:68.

2. Les prémisses de l'immunité adaptative

- Les domaines de type Ig: une cinquantaine, susceptibles de coder pour des domaines V.
- Plusieurs facteurs de transcription analogues aux vertébrés.
- Gènes de la famille IL – 17 et TNF.
- Un gène « ancêtre » de la TdT.
- Rag 1 et Rag 2 (protéines recombinantes, complexes homologues et hétérologues (oursin / vertébré).

Fugmann SD, et al. An ancient evolutionary origin of the Rag1/2 gene locus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 7;103(10):3728-33.

- Rag 1 et Rag 2 sont transcrits pendant le développement et chez l'adulte, mais pas de recombinaison somatique. Les gènes de type IgV ne possèdent pas les séquences signal de recombinaison



3. Conclusions et questions

- **Protéines à LRR (vs Ig) particulièrement malléables ?**
- **Restrictions d'expression ? (cf. lymphocytes et NK des vertébrés).**
- **Immunité innée complexe et particulièrement développée : lien avec le style de vie des oursins (30 à 100 ans).**
- **Ebauches inattendues d'éléments de l'immunité adaptative.**



B. L'escargot

- **FREPs = Fibrinogen Related Proteins = polypeptides trouvés dans l'hémolymphe de *Biomphalaria glabrata* (hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*).**

Zhang SM, et al. An ancient evolutionary origin of the Rag1/2 gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 7;103(10):3728-33.

- **Juxtaposition de 1 ou 2 domaines IgSF avec domaine C terminal du fibrinogène.**
- **Abondance accrue après infection.**
- **Capables de précipiter des antigènes solubles.**



- **13 sous-familles et séquences très variables dans les domaines IgSF et FBG.**
 - Dans un même individu.
 - Peu de recouvrement entre deux individus.
- **Diversité considérable (gènes et cDNA) (beaucoup de mutations ponctuelles), supérieure au nombre de loci (probablement 2 x 5 pour PREP 3).**
- **Hypothèse : diversification par mutations somatiques.**

Zhang SM, Characterization of immune genes from the schistosome host snail *Biomphalaria glabrata* that encode peptidoglycan recognition proteins and gram-negative bacteria binding protein. *Immunogenetics*. 2007 Nov;59(11):883-98.



II. Insectes

A. La drosophile

1. Régulation des systèmes de défense

Uvell H, Engström Y. A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet.* 2007 Jul;23(7):342-9.

Pham LN, et al. A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependent on Phagocytes. *PLoS Pathog.* 2007 Mar;3(3):e26.



2. Les DSCAM = Down Syndrome Cell Adhesion Molecules

- **Gene SCAM identifié chez l'homme en 1998 (retards mentaux).**
 - ✓ **Séquence : IgSF et épissage alternatif (3 transcrits dans zones différentes du cerveau adulte).**

Schmucker D, et al. *Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity.* Cell. 2000 Jun 9;101(6):671-84.

- **Protéine isolée par affinité avec une protéine axonale (Dock)**
- **Analyse génétique : existence probable de formes multiples, et potentiel pour 38.000 isoformes, avec une région « constante » et une région « variable ».**



Watson FL, et al. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*. 2005 Sep 16;309(5742):1874-8.

- « Fat body cells » : produisent la plupart des protéines de l'hémolymphe.
- Hemocytes : phagocytose et cicatrisation.
- Analyse des CDNAs de DSCAM dans les 2 populations : nombreux variants, en partie distincts du cerveau, jusqu'à 18.000 isoformes immunitaires.



- **Des molécules circulantes sont trouvées dans l'hémolymphe, qui pourrait contenir des milliers d'isoformes.**
- **Des hémocytes déficients en Dscam sont moins actifs pour phagocyter E-coli.**
- **Mouches traitées par RNAi : phagocytose réduite (idem avec anticorps anti-Dscam).**
- **Certaines isoformes de Dscam se tient à des bactéries.**
- **Système probablement semblable chez d'autres insectes (coléoptères, lépidoptères et moustiques)**

Dong Y, et al. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol.* 2006 Jul;4(7):e229..



- **Systeme nerveux : répulsion des dendrites provenant de la même cellule nerveuse. Perte de Dscam : accroissement des auto-reconnaissances.**

Signal de répulsion induit par la reconnaissance du domaine extracellulaire et médié par la queue cytoplasmique.

Zinn K. Dscam and neuronal uniqueness. Cell. 2007 May 4;129(3):455-6.

Matthews BJ, et al. Dendrite self-avoidance is controlled by Dscam. Cell. 2007 May 4;129(3):593-604.



B. Les moustiques

Garver LS, et al. Immunoglobulin superfamily members play an important role in the mosquito immune system. *Dev Comp Immunol.* 2008;32(5):519-31.

- 138 gènes de l'IgsF dans le génome d'*Anophèle gambiae*.

85 au moins sont régulés lors de l'infection par des bactéries Gram +/-

2 gènes contiennent l'infection par *Plasmodium falciparum*

Waterhouse RM, et al. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science.* 2007 Jun 22;316(5832):1738-43

}	Aedes aegypti (Aa)	Dengue, fièvre jaune.
	Anophèles gambiae (Ag)	Malaria
	Drosophila melanogaster (Dm)	



Blandin SA, Levashina EA. Phagocytosis in mosquito immune responses. Immunol Rev. 2007 Oct;219:8-16.

Meister S, et al. Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Aug 9;102(32):11420-5.

Osta MA, et al. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. J Exp Biol. 2004 Jul;207(Pt 15):2551-63.

Christophides GK, et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. Science. 2002 Oct 4;298(5591):159-65

Christophides GK, et al. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Immunol Rev. 2004 Apr;198:127-48.



III. Nematodes et Cnidaires.

A. *C. Elegans*

Kim DH, Ausubel FM. Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol*. 2005 Feb;17(1):4-10.

B. Cnidaires

Miller DJ, et al. The innate immune repertoire in cnidaria--ancestral complexity and stochastic gene loss. *Genome Biol*. 2007;8(4):R59. **Figure 1. Relationships at the base of the Metazoa.**