

La pharmacologie du récepteur des lymphocytes T et de ses ligands

Denis Hudrisier
Jean-Édouard Gairin

Le système trimoléculaire constitué du récepteur des lymphocytes T (TCR), du peptide antigénique et de la protéine du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est au centre des relations entre les cellules cibles et les cellules effectrices du système immunitaire. Grâce aux connaissances acquises ces dernières années sur les interactions CMH-peptide et CMH-peptide-TCR, a pu naître une véritable pharmacologie du récepteur des lymphocytes T et de ses ligands. Certains peptides ont des propriétés agonistes, agonistes partiels ou antagonistes du récepteur des lymphocytes T, et la conception de ligands du TCR pharmacologiquement actifs permet de moduler, de façon contrôlée, les relations entre les cellules cibles et les lymphocytes T. Leur utilisation en immunothérapie de certains cancers, d'infections virales ou de maladies auto-immunes représente un défi scientifique majeur de ces prochaines années. En outre, la pharmacologie du TCR et de ses ligands endogènes devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de l'ontogenèse des lymphocytes T et des phénomènes d'échappement au système immunitaire.

L'activation d'un lymphocyte T résulte de l'interaction du récepteur qu'il synthétise (TCR, *T cell receptor*) avec son ligand spécifique, le complexe CMH-antigène présent à la surface d'une cellule cible ou présentatrice. D'une manière générale, l'activation de la cellule est le terme d'une cascade d'événements moléculaires (connue sous le nom de transmission ou de transduction du signal) déclenchée par l'interaction

d'un ligand, naturel ou exogène avec son récepteur. Tout ligand qui engendre ainsi un effet biologique est défini comme un agoniste. Les interactions ligand-récepteur ont surtout été étudiées dans le système neuro-hormonal. Leurs principes thermodynamiques, structuraux et pharmacologiques sont maintenant bien établis. Leur connaissance et leurs applications ont conduit à la mise en évidence de nouveaux ligands de structure plus ou moins

ADRESSE

D. Hudrisier : *doctorant MESR*. J.E. Gairin : *directeur de recherche au Cnrs*. Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, UPR 9062 Cnrs, 205, route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Singer SJ. Intercellular communication and cell-cell adhesion. *Science* 1992; 255: 1671-7.
2. Hérold C, Elhabazi A, Bensussan A, Bounsell L. Implication des molécules CD dans la transmission des signaux d'activation des lymphocytes T. *médecine/sciences* 1995; 11: 669-80.
3. Hivroz C, Le Deist F, Fischer A. Le déficit en tyrosine kinase ZAP-70: un modèle de déficit immunitaire héréditaire pour l'analyse de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T. *médecine/sciences* 1995; 11: 268-72.
4. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptor. *Cell* 1994; 76: 263-74.
5. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within asyngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974; 248: 701-2.
6. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee H. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991; 351: 290-6.
7. Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 587-622.
8. Engelhard VH. Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 13-23.
9. Matsumura M, Fremont DH, Peterson PA, Wilson IA. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 1992; 257: 927-34.
10. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Ramadi BKA, Rothbard J, Janeway Jr CA. Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature* 1992; 359: 429.
11. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-9.
12. Evavold BD, Allen PM. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* 1991; 252: 1308-10.
13. Evavold BD, Sloan-Lancaster J, Allen PM. Antagonism of superantigen-stimulated helper T-cell clones and hybridomas by altered peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2300-4.
14. Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen P. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 1993; 363: 156-9.

proche de celle du ligand endogène (ou naturel) et possédant des propriétés pharmacologiques différentes de ce dernier. Parmi ces ligands, les agonistes partiels et les antagonistes se sont révélés être d'un grand intérêt, tant fondamental qu'appliqué.

La pharmacologie du TCR et de ses ligands, qu'elle soit de type classique ou inverse, a rencontré de nombreux obstacles qui ont longtemps gêné son développement. Il s'est agi notamment de: (1) la méconnaissance de la nature chimique précise du ligand; (2) sa variété, nécessaire pour faire face à la diversité des pathogènes; (3) sa complexité structurale, puisqu'il résulte lui-même d'une interaction entre deux molécules; (4) la localisation membranaire à la fois du récepteur et du ligand et (5) la nécessité de co-facteurs d'activation des lymphocytes indépendants de l'antigène. Certaines difficultés ont été levées: on connaît aujourd'hui la nature biochimique et la structure du ligand du TCR et les techniques nécessaires à l'étude de leurs interactions se sont développées. La mise en évidence de ligands agonistes et antagonistes du TCR ainsi que l'étude de leur mode d'action sont devenues possibles. Les retombées attendues tant au plan fondamental (compréhension des mécanismes de sélection des lymphocytes T et d'échappement au système immunitaire par les pathogènes), qu'appliqué (conception et utilisation d'agents thérapeutiques) sont considérables. Nous nous proposons de faire ici une synthèse des travaux réalisés dans ce domaine, de proposer des mécanismes d'action possibles des ligands agonistes partiels et antagonistes du TCR (*figure 1*) ainsi que de présenter leurs rôles naturels ou thérapeutiques potentiels.

Le TCR et la transduction du signal

Le TCR est un complexe multimérique membranaire formé de deux chaînes α et β (ou γ et δ), de la molécule CD3 (chaînes γ , δ , ϵ) et de la chaîne ζ , associé au marqueur CD4 ou CD8 suivant la population lymphocytaire mûre considérée. Les chaînes α et β sont impliquées dans la reconnaissance du ligand (le complexe peptide-CMH) mais pas dans la transmission du signal. Cette trans-

mission (schématisée sur la *figure 2*) est assurée par les protéines CD3, ζ et CD4 ou CD8 vraisemblablement après formation de *patch* impliquant ces différentes chaînes [1]. L'activation maximale requiert la formation d'oligomères entre les différents intervenants, d'une part, et la présence d'un second signal indépendant de l'interaction du TCR avec son ligand, d'autre part. Ce second signal est apporté par des co-récepteurs qui renforcent l'adhérence cellulaire et/ou transduisent un signal [2]. Ces co-récepteurs sont couplés aux effecteurs immédiats, intermédiaires et tardifs de la transmission du signal souvent désignée dans le « jargon » par le terme de signalisation. Les effecteurs immédiats sont des protéine tyrosine kinases des familles Src (telles que p59^{l^yn} et p56^{l^{ck}}) et Syk (telles que ZAP-70) [3]. L'activation maximale du lymphocyte nécessite la mise en jeu de l'ensemble de ces kinases dont l'activité dépend de leur niveau de phosphorylation. Celle-ci est assurée par les phosphatases CD45 et Csk. Le modèle généralement admis attribue aux protéines kinases Src la phosphorylation de résidus tyrosine au niveau des séquences ITAM (*immunoreceptor activation motif*) des chaînes ζ (3 motifs ITAM) et CD3 ϵ (1 motif ITAM). Une fois phosphorylées, les ITAM lient la protéine tyrosine kinase ZAP-70 qui, à son tour, pourra être phosphorylée par une kinase de la famille Src. La phosphorylation de ZAP-70 conduit à l'activation de la phospholipase C γ_1 (PLC γ_1) couplée au cycle des phospho-inositides puis à la mise en jeu de la protéine kinase C (PKC). ZAP-70, PLC γ_1 et PKC sont les effecteurs intermédiaires de la voie de signalisation [2, 3]. Enfin, la mobilisation du calcium intracellulaire intervient tardivement et permet l'activation de la calcineurine et de Ras-GTP [4]. La transmission du signal aboutit à la synthèse d'IL2 et de son récepteur, à un signal de prolifération et à la synthèse de cytokines ou de lymphotoxines.

Nature et structure du ligand du TCR: le complexe peptide-CMH

Le ligand du TCR est formé par l'association d'un peptide d'origine

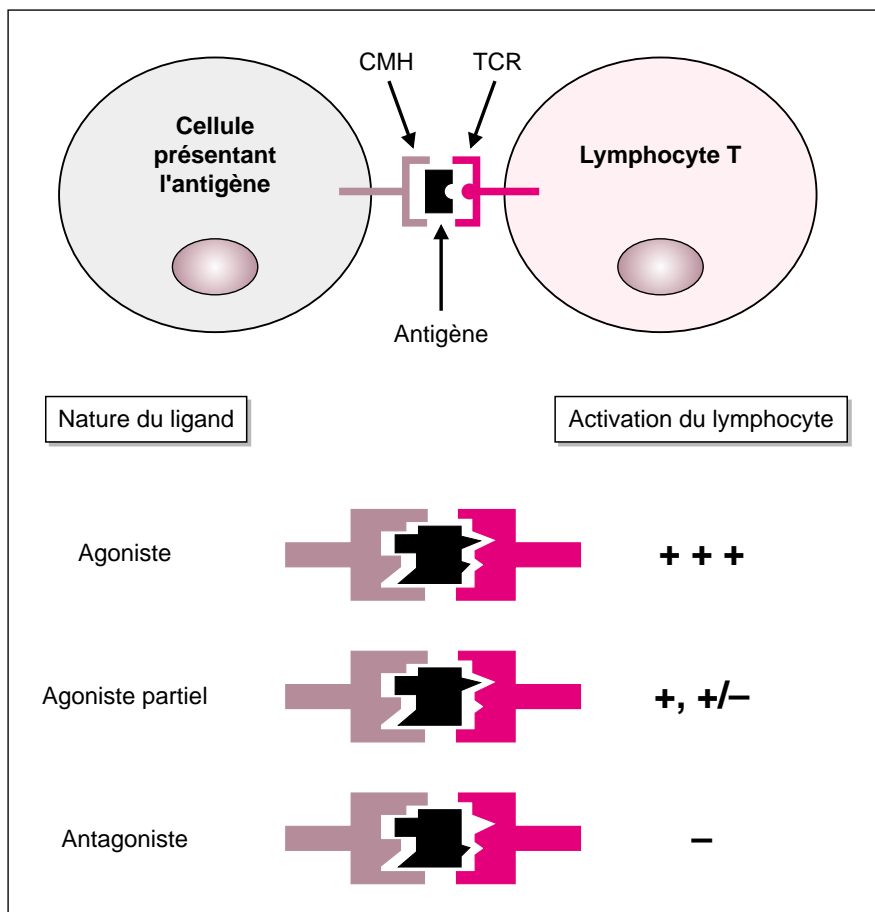


Figure 1. **Agonistes, agonistes partiels et antagonistes de l'activité lymphocytaire.** L'interaction du ligand agoniste (complexe antigène-CMH) avec le TCR (T cell receptor) déclenche l'activation du lymphocyte. Un ligand modifié (par substitution d'un résidu de l'antigène dirigé vers le TCR) peut, selon la substitution, se comporter comme un agoniste partiel ou un antagoniste vis-à-vis de l'activation lymphocytaire (activation partielle ou nulle).

virale, bactérienne, tumorale ou endogène avec les molécules du CMH de classe I ou II. Chaque peptide est présenté dans le contexte d'une molécule de CMH donnée, un phénomène appelé « restriction au CMH » [5]. La structure du ligand du TCR est maintenant bien définie grâce à l'identification des peptides associés au CMH [6] et à l'analyse radiocristallographique des complexes peptide-CMH [7].

• Les complexes peptide-CMH de classe I

Les molécules du CMH de classe I sont des dimères formés d'une chaîne lourde polymorphe constituée de trois domaines α_1 , α_2 et α_3 de type immunoglobuline associée de façon non covalente à une chaîne

légère, la β_2 -microglobuline. Elles sont exprimées par la majorité des cellules nucléées. Les peptides liés au CMH de classe I sont courts (8 à 11 acides aminés) et utilisent une combinaison d'au moins deux résidus d'ancrage (figure 3), spécifiques d'un allèle donné du CMH [8]. Un à trois autres résidus du peptide ainsi que certains résidus du CMH sont en contact avec le TCR [9]. Cette interaction moléculaire est responsable de l'activation du lymphocyte exprimant le TCR. Les lymphocytes qui reconnaissent les complexes peptide-CMH de classe I expriment le corécepteur CD8 et possèdent la fonction cytotoxique (CTL) ou suppressive (Ts). Les CTL activés sont capables de lyser la cellule cible produisant le complexe peptide-CMH spécifique. Cette fonction, essentielle pour élimi-

ner les cellules tumorales ou infectées par un pathogène intracellulaire (virus et parasites) peut se révéler néfaste lors de greffes par exemple, si la cellule éliminée exerce une fonction essentielle pour l'organisme ou si le peptide est issu du soi.

• Les complexes peptide-CMH de classe II

Les molécules du CMH de classe II, exprimées sélectivement à la surface des cellules dites « présentatrices d'antigène professionnelles » ou APC (macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques) sont constituées de deux sous-unités α et β portant chacune deux domaines de type immunoglobuline. Les domaines α_1 et β_1 forment le site de liaison de l'antigène, structurellement différent de celui du CMH de classe I. Les peptides liés au CMH de classe II sont plus longs (11 à 20 acides aminés), leurs résidus d'ancrage au CMH sont moins bien définis [10] et leurs extrémités débordent de part et d'autre du site de liaison [11]. Les lymphocytes T ayant pour ligand les complexes peptide-CMH de classe II expriment le marqueur CD4. Les lymphocytes CD4⁺ activés sont responsables de la fonction auxiliaire. Les lymphocytes Th1 (produisant IL2, TNF- β et IFN- γ) et Th2 (produisant IL4, IL5 et IL10) sont impliqués respectivement dans l'hypersensibilité retardée et la coopération avec les lymphocytes B.

Agonistes partiels et antagonistes du TCR

Une activité agoniste partielle ou antagoniste de certains complexes peptide-CMH vis-à-vis de l'activation des lymphocytes T n'a été mise en évidence que récemment, d'abord au niveau des lymphocytes CD4⁺ puis des CD8⁺. Les ligands agonistes partiels ou antagonistes du TCR correspondent dans la majorité des cas connus à des peptides analogues de peptides antigéniques présentant des substitutions de résidus en contact avec le TCR qui perturbent l'interaction avec ce dernier mais conservent l'affinité de liaison du peptide au CMH. C'est dans le modèle de la présentation de l'antigène Hb64-74 de l'hémoglobine murine par le CMH

RÉFÉRENCES

15. Gairin JE, Oldstone MBA. Design of high-affinity major histocompatibility complex-specific antagonist peptides that inhibit cytotoxic T lymphocyte activity: implications for control of viral disease. *J Virol* 1992; 66: 6755-62.
16. Jameson SC, Carbone FR, Bevan MJ. Clone-specific T cell receptor antagonists of major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1541-50.
17. DeMagistris MT, Alexander J, Coggeshall M, Altman A, Gaeta FCA, Grey HM, Sette A. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* 1992; 68: 625-34.
18. Racioppi L, Ronchese F, Matis LA, Germain RN. Peptide-major histocompatibility complex class II complexed with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. *J Exp Med* 1993; 177: 1047-60.
19. Sloan-Lancaster J, Shaw AS, Rothbard JB, Allen PM. Partial T cell signalling: altered phospho- ζ and lack of ZAP70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 1994; 79: 913-22.
20. Madrenas J, Wange RL, Wang JL, Isakov N, Samelson LE, Germain RN. ζ phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 1995; 267: 515-8.
21. Hudrisier D, Mazarguil H, Oldstone MBA, Gairin JE. Molecular dissection of MHC-peptide-TcR interaction: use of chimeric viral epitopes provides evidence of the hierarchical role of peptide residues in T cell receptor activation. *J Virol* 1996 (sous presse).
22. Evavold BD, Sloanlancaster J, Wilson KJ, Rothbard JB, Allen PM. Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity* 1995; 2: 655-63.
23. Cao W, Tykodi SS, Esser NT, Braciale VL, Braciale TJ. Partial activation of CD8⁺ T cells by self-derived peptide. *Nature* 1995; 378: 295-8.
24. Germain RN, Levine EH, Madrenas J. The T-cell receptor as a diverse signal transduction machine. *The Immunologist* 1995; 3: 113-24.
25. Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, Alramadi BK, Kim YS, Maher SE, Bothwell ALM, Margulies DH. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity - response. *Science* 1995; 268: 117.
26. Matsui M, Moots RJ, Warburton RJ, Peacebrewer AL, Tussey LG, Quinn DG, McMichael AJ, Frelinger JA. Genetic evidence for difference between intracellular and extracellular peptides in influenza A matrix peptide-specific CTL recognition. *J Immunol* 1995; 154: 1088-96.

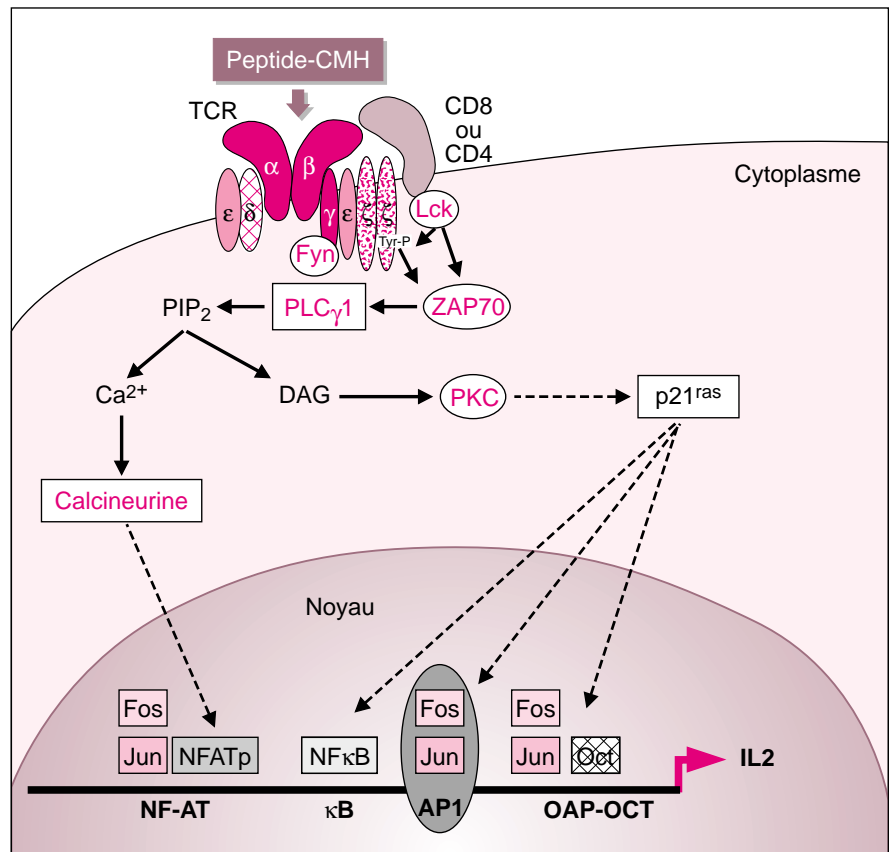


Figure 2. **La transduction du signal par le TCR.** L'interaction TCR-ligand déclenche la transduction du signal. Les kinases Fyn et Lck sont mises en jeu immédiatement et recrutent ZAP-70. La phospholipase $\gamma 1$ ($PLC\gamma 1$) puis la calcineurine, la protéine kinase C (PKC) et $p21^{ras}$ sont activées. Les facteurs de transcription Fos, Jun, NFAT, NF κ B et Oct se fixent sur les séquences promotrices du gène IL2, entraînant sa transcription [2]. PIP2: phosphatidyl inositol-bisphosphate; DAG: diacylglycérol.

de classe II I-E^k à des lymphocytes Th2, que les propriétés d'agonistes partiels de peptides modifiés ont d'abord été décrites [12]. Des variants monosubstitués de Hb64-74 interagissant avec le clone T restreint induisent la sécrétion d'IL4 et la coopération avec les lymphocytes B mais pas sa prolifération. Cet effet agoniste partiel peut être généralisé aux lymphocytes Th1, Th2 et même aux hybridomes T [13, 14]. Dans le cas des complexes peptides-CMH de classe I, nous avons décrit un antagonisme de l'activité lymphocytaire cytotoxique dans le modèle de la présentation des antigènes du virus LCMV présentés par le CMH H-2D^b [15]. Le peptide antagoniste n'est pas un analogue d'épitope modifié mais un peptide synthétique de forte affinité pour le CMH. Ce peptide entre en compétition avec les trois

épitopes viraux NP, GP1 et GP2 pour la liaison au CMH et, en conséquence, inhibe *in vitro* la lyse par les CTL de cellules infectées par le virus. *In vivo*, il prévient l'apparition, chez des souris transgéniques exprimant l'épitope NP, d'un diabète dépendant de l'infection par le LCMV ([15] et communication personnelle, M.G. von Herrath, J.E. Gairin, M.B.A. Oldstone). Cet antagonisme (dit « nul ») correspond à un blocage du CMH, peu ou pas spécifique du TCR. Il a aussi été montré dans le modèle de la présentation d'un épitope de l'ovalbumine par H-2K^b, que la majorité des substitutions effectuées au niveau des résidus de l'épitope interagissant avec le TCR engendrait des ligands agonistes partiels ou antagonistes compétitifs (par opposition aux antagonistes « nuls ») de l'activité cytotoxique [16].

Tableau I			
QUELQUES EFFETS OBSERVÉS APRÈS EXPOSITION DES LYMPHOCYTES À DES LIGANDS ALTÉRÉS			
Complexe peptide-CMH	Lymphocyte T étudié	Effet produit	Référence
Hb (64-76)/I-E ^k	Th ₂	Sécrétion d'IL4 et coopération avec les lymphocytes B sans prolifération	[12]
"	Th ₁	Anergie, inhibition de la prolifération, de la production de l'IL2, IL3, IFN- γ et d'inositol phosphate. Effet variable sur la synthèse d'IL2R et LFA-1. Pas d'effet sur CD3	[14]
"	Hybridome T	Inhibition de l'entrée en apoptose et de la production de cytokines	[13]
"	Th1, Th2	Antagonisme de l'effet prolifératif d'un superantigène	[13]
HA(307-319)/DR1	CD4 ⁺	Inhibition de la production de Ca ²⁺ et d'inositol phosphate, de la sécrétion d'IL2 et de la prolifération	[17]
"	CD4 ⁺	Inhibition de la prolifération, de la synthèse d'IL2R, la mobilisation de Ca ²⁺ , de la production d'inositol phosphate et de la formation de conjugués avec les CPA	[49]
"	CD4 ⁺	Inhibition de la prolifération	[45]
PCC(84-104)/I-E ^k	Th1	Antagonisme de l'alloréponse et de la sécrétion d'IL2. Pas d'effet sur la sécrétion d'IL3 ni sur la synthèse d'IL2R	[18]
LCMV/D ^b	CTL CD8 ⁺	Antagonisme de l'activité CTL	[15]
OVA (257-264)/Kb	CTL CD8 ⁺	Antagonisme de l'activité CTL, de la production de GM-CSF/IL3, de sérine esterase et de la mobilisation du Ca ²⁺	[16]

IL2R: récepteur d'IL2; CPA: cellule présentatrice d'antigène; CTL: cytotoxic lymphocytes.

• Les peptides modifiés interagissent directement avec le TCR

Bien que rendue difficile par la structure complexe du ligand, sa localisation membranaire et la nécessité de co-facteurs d'activation, la démonstration que le ligand agoniste partiel ou antagoniste produit ses effets par interaction spécifique avec le TCR a pu être faite par différentes approches. Tout d'abord, il a été montré qu'un peptide modifié pouvait inhiber l'activation d'un clone de lymphocytes par un superantigène [13]: le superantigène se liant au CMH sur un site différent de celui du peptide, le peptide modifié n'entre donc pas en compétition avec lui au niveau de la formation du ligand. Par ailleurs, des lymphocytes ayant été anergisés en réponse à un agoniste partiel ne pouvaient plus être restimulés par l'agoniste même en absence de l'agoniste partiel [14]. Enfin, l'utilisation de doses suboptimales de ligand ago-

niste (permettant à l'antagoniste de se lier au CMH sans entrer en compétition avec l'agoniste) ont conduit à la mise en évidence des propriétés antagonistes de variants capables d'inhiber l'activation d'un clone T par l'épitope de l'hémagglutinine du virus de la grippe présenté par le CMH DR1 [17] ou à la caractérisation de l'effet antagoniste d'un ligand modifié présenté par des APC différentes de celles présentant l'agoniste [16]. Ces observations ont été indirectement confirmées par le fait que les co-récepteurs d'activation ne sont pas impliqués dans ce mécanisme. En effet, leur stimulation ne contrebalance pas l'effet du ligand modifié [13, 18]. De plus, l'antagonisme est maintenu même vis-à-vis d'hybridomes T (dont l'activation est indépendante des co-récepteurs). Enfin, l'effet du ligand modifié peut être compensé par ajout d'un agent intervenant en aval de la cascade de signalisation par le TCR [14].

• L'interaction d'un ligand modifié avec le TCR et ses conséquences sur la transduction du signal

L'analyse des événements biochimiques immédiats, précoces ou tardifs induits par la liaison de ligands modifiés au TCR rend compte du mode d'action des agonistes partiels ou des antagonistes. La comparaison stricte des résultats est rendue difficile par la multiplicité des réponses et des modèles étudiés (Tableau I). Il se dégage cependant que l'interaction d'un ligand modifié avec le TCR affecte systématiquement, parmi les événements biochimiques tardifs, la sécrétion d'IL2 et que la production d'autres lymphokines, bien que généralement inhibée, peut rester inchangée. L'expression des protéines de surface (CD3, récepteur de l'IL2, LFA1) n'est pas affectée bien que la formation de conjugués entre les APC et les lymphocytes (auxquels ces molécules participent) soit modifiée.

RÉFÉRENCES

27. Sykulev Y, Brunmark A, Jackson M, Cohen RJ, Peterson PA, Eisen HN. Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. *Immunity* 1994; 1: 15-22.
28. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995; 375: 148-51.
29. Harding CV, Unanue ER. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990; 346: 574-6.
30. Christinck ER, Luscher MA, Barber BH, Williams DB. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 1991; 352: 67-9.
31. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* 1994; 369: 750-2.
32. Jameson SC, Bevan MJ. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity* 1995; 2: 1-11.
33. Allen P. Peptide in positive and negative selection: a delicate balance. *Cell* 1994; 76: 593-6.
34. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone F. T-Cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994; 76: 17-27.
35. Page DM, Alexander J, Snoke K, Appella E, Sette A, Hedrick SM, Grey HM. Negative selection of CD4⁺ CD8⁺ thymocytes by T-cell receptor peptide antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4057-61.
36. Koup RA. Virus escape from CTL recognition. *J Exp Med* 1994; 180: 779-82.
37. Pircher H, Moskophidis D, Rohrer U, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants *in vivo*. *Nature* 1990; 346: 629-33.
38. Lewicki H, Tishon A, Borrow P, Evans CF, Gairin JE, Hahn KM, Jewell DA, Wilson IA, Oldstone MBA. CTL escape viral variants I. Generation and molecular characterization. *Virology* 1995; 210: 29-40.

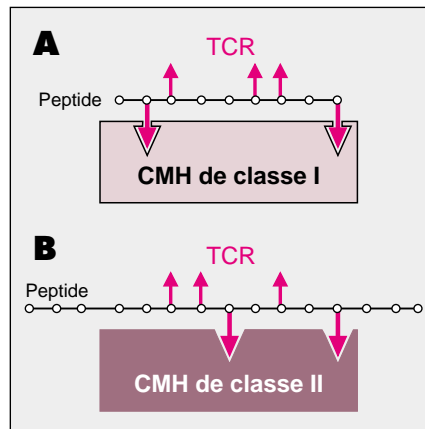


Figure 3. L'interaction peptide-CMH.
A. Des peptides de 8 à 11 acides aminés se lient au CMH de classe I. Deux résidus du peptide servent d'ancrage sélectif à un CMH donné, deux à trois autres sont dirigés vers le TCR.
B. Des peptides de 11 à 20 résidus se lient au CMH de classe II. Les extrémités N- et C- terminales débordent du site de liaison; des résidus du peptide permettent la liaison au CMH et d'autres sont orientés vers le TCR.

Parmi les effets plus précoces, l'hydrolyse des phospho-inositides et la mobilisation du calcium intracellulaire semblent systématiquement inhibées. De manière générale, certains effets (prolifération, cytolysse, coopération avec les lymphocytes B, sécrétion de lymphokines) peuvent être obtenus de façon indépendante, suggérant qu'ils sont produits, soit quantitativement à partir de seuils d'activation différents, soit qualitativement à partir d'effecteurs intracellulaires différents. Ces observations imposent donc d'analyser plus en amont les conséquences de l'interaction du TCR avec son ligand. Les preuves biochimiques que les événements immédiats de transmission du signal (la phosphorylation des tyrosines en particulier) sont qualitativement différents selon que le TCR interagit avec un agoniste ou un ligand modifié ont été apportées récemment [19, 20]. Deux modules de signalisation distincts interviennent de façon immédiate au niveau du TCR: l'un est formé par la chaîne ϵ de CD3, l'autre par l'homodimère ζ_2 . Leur phosphorylation a lieu quel que soit le ligand, mais la phosphory-

lation de ζ conduit à deux formes: une forme très phosphorylée et active, de plus haut poids moléculaire (appelée pp23 [19] ou pp21 [20] selon les auteurs), l'autre moins phosphorylée et moins active, de plus bas poids moléculaire (appelée pp18 [19] ou pp18 [20] selon les auteurs). Ces deux formes sont présentes en proportions équivalentes après interaction du TCR avec un agoniste alors que la forme de haut poids moléculaire devient minoritaire voire absente après interaction avec un ligand modifié. L'incapacité de la forme la moins phosphorylée de ζ de lier certains ligands expliquerait des profils de signalisation différents. Ainsi, la protéine ZAP-70, un ligand de ζ phosphorylée, n'est phosphorylée qu'après exposition à un agoniste et est inactivée en présence d'un agoniste partiel ou d'un antagoniste. L'inactivation de ZAP-70 est observée dans les mécanismes d'anergie en présence d'un agoniste partiel. On sait de plus que les ligands non agonistes jouent un rôle dans les processus de sélection positive ou négative dans lesquels ZAP-70 est impliquée (*m/s n° 11, vol. 11, p. 1602*).

• Peut-on concevoir de façon rationnelle des agonistes partiels et des antagonistes du TCR?

Des agonistes partiels et des antagonistes des récepteurs à activité tyrosine kinase sont généralement obtenus par modification du ligand. Dans le cas des ligands du TCR, cette modification porte surtout sur la structure peptidique mais aussi du CMH [18]. La possibilité de ne jouer que sur la structure du peptide offre une opportunité unique pour concevoir de façon rationnelle des agonistes partiels ou des antagonistes. Des antagonistes peuvent être engendrés par substitution (généralement par l'alanine) d'un résidu au contact du TCR ou d'un résidu dirigé vers le CMH (antagonisme relayé par effet « conformationnel » [17]). Des antagonistes compétitifs et nuls obtenus par substitution d'un résidu chargé par un résidu de charge opposée ont aussi été décrits [16]. Ainsi, le caractère conservateur ou non de la mutation du résidu d'origine n'est pas clairement établi. Nous avons également montré que des épitopes chi-

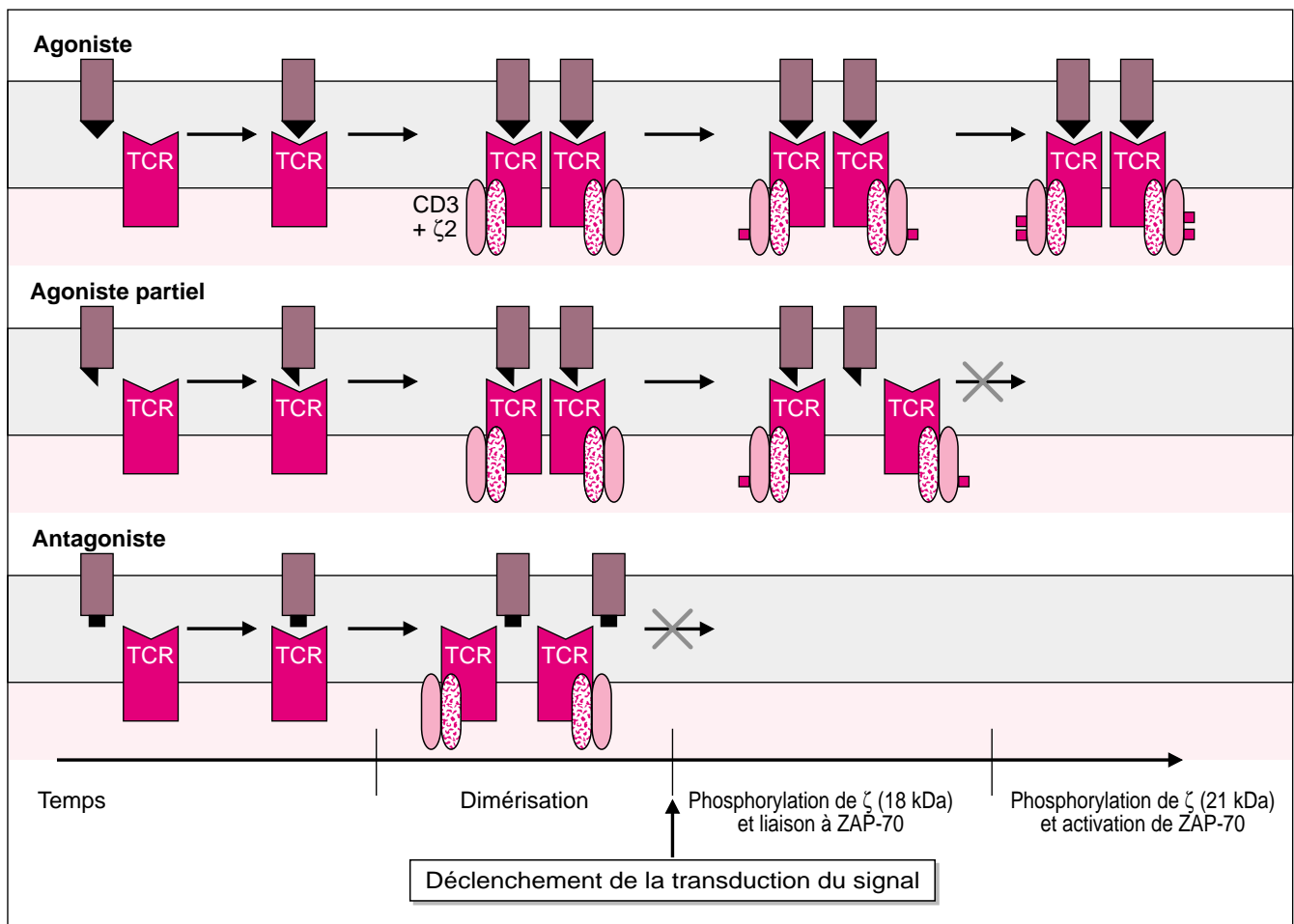


Figure 4. **Le modèle cinétique.** L'interaction du TCR avec son ligand induit la dimérisation des complexes et l'organisation fonctionnelle des sous-unités transductrices CD3, ζ 2 puis l'activation des événements précoces de la transduction du signal (phosphorylation (■) de ζ et activation de ZAP-70). L'interaction d'un ligand agoniste permet l'enchaînement correct de ces différentes étapes alors qu'un agoniste partiel ou un antagoniste favoriserait la dissociation du complexe ligand-récepteur avant dimérisation des complexes ou mise en place satisfaisante de la chaîne de transduction du signal.

mères peuvent se comporter comme des agonistes partiels ou des antagonistes [21]. Enfin, un peptide modifié ne possédant plus qu'un seul acide aminé en commun avec le ligand d'origine peut avoir des propriétés d'agoniste partiel [22, 23].

Hypothèses sur les mécanismes d'action des agonistes, agonistes partiels et antagonistes

Il existe différents modèles pour expliquer les mécanismes d'action des agonistes, agonistes partiels et antagonistes. Le premier (modèle d'affinité) – aujourd'hui dépassé –

était celui de l'occupation du TCR par son ligand, le caractère agoniste ou antagoniste d'un complexe peptide-CMH étant directement et uniquement lié à son affinité pour le TCR. L'affinité du complexe peptide-CMH pour le TCR reste toutefois un critère important. Si l'on considère que la modification d'un ligand, d'une part engendre un ligand de moindre affinité que celle du ligand d'origine et, d'autre part, induit des propriétés d'agoniste partiel ou d'antagoniste, on peut en déduire que l'affinité pour le TCR d'un ligand modifié est probablement moindre que celle d'un agoniste. A ce jour, de telles hypothèses ne peuvent être vérifiées, les techniques per-

mettant l'étude des interactions ligand-TCR n'étant pas suffisamment développées. Les rares études effectuées ont montré que, quelle que soit la nature du ligand, l'interaction entre le TCR et son ligand est de faible affinité ($1 \mu\text{M} < K_d < 1 \text{mM}$) [24-27]. Plusieurs modèles non exclusifs, intégrant la notion d'efficacité du ligand, une composante à la fois quantitative (affinité) et qualitative de l'interaction, sont proposés [24].

• Modèle cinétique

Dans le modèle cinétique (figure 4), un même complexe peptide-CMH peut engager plusieurs TCR en série

RÉFÉRENCES

39. Klenerman P, Rowland-Jones S, McAdam S, Edwards J, Daenke S, Lalloo D, Koppe B, Rosenberg W, Boyd D, Edwards A, Giangrande P, Phillips RE, McMichael J. Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. *Nature* 1994; 369: 403-7.
40. Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, Penna A, Levrero M, De Carli M, Fiaccadori F, Ferrari C. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994; 407-10.
41. Guery JC, Adorini L. Selective immunosuppression of class II-restricted T cells by MHC class II-binding peptides. *Curr Rev Immunol* 1993; 13: 195-206.
42. Franco A, Southwood S, Arrhenius T, Kuchroo VK, Grey HM, Sette A, Ishioka GY. T cell receptor antagonist peptides are highly effective inhibitors of experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1994; 24: 940-6.
43. Ishioka GY, Adorini L, Guery JC, Gaeta FCA, Lafond R, Alexander J, Powell MF, Sette A, Grey HM. Failure to demonstrate long-lived MHC saturation both *in vitro* and *in vivo* – implications for therapeutic potential of MHC-blocking peptides. *J Immunol* 1994; 152: 4310-9.
44. Kuchroo VK, Greer JM, Kaul D, Ishioka G, Franco A, Sette A, Sobel RA, Lees MB. A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire. *J Immunol* 1994; 153: 3326-36.
45. Alexander J, Snoke K, Ruppert J, Sidney J, Wall M, Southwood S, Oseroff C, Arrhenius T, Gaeta FCA, Colon SM, Grey HM, Sette A. Functional consequences of engagement of the T cell receptor by low affinity ligands. *J Immunol* 1993; 150: 1-7.
46. Luescher IF, Cerottini JC, Romero P. Photoaffinity labeling of the T cell receptor on cloned cytotoxic T lymphocytes by covalent photoreactive ligand. *J Biol Chem* 1994; 269: 5574-82.
47. Hudrisier D, Mazarguil H, Oldstone MBA, Gairin JE. Relative implication of peptide residues in binding to major histocompatibility complex class I H-2D^b: application to the design of high-affinity, allele-specific peptides. *Mol Immunol* 1995; 32: 895-907.
48. Rognan D, Scapozza L, Folkers G, Daser A. Rational design of nonnatural peptides as high-affinity ligands for the HLA-B2705 human leukocyte antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 753-7.
49. Ruppert J, Alexander J, Snoke K, Coggeshall M, Herbert E, McKenzie D, Grey H, Sette A. Effect of T-cell receptor antagonism on interaction between T cells and antigen-presenting cells and on T-cell signaling events. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2671-5.
- [28]. Ce modèle, dérivé du modèle d'affinité, repose sur les observations montrant que l'interaction du TCR avec son ligand est de faible affinité et sur le principe qu'un faible nombre de complexes peptide-CMH suffit à déclencher l'activité lymphocytaire [29, 30]. Un ligand agoniste interagit avec le TCR le temps de recruter les effecteurs de la transduction du signal, puis le complexe se dissocie rapidement (du fait de la faible affinité), permettant au ligand redevenu disponible d'activer un autre TCR. Le signal transduit serait ainsi proportionnel au nombre de TCR engagés. Dans ce cas, il convient d'examiner les conséquences de l'interaction d'un ligand de plus faible affinité que celle de l'agoniste. Le recrutement et la phosphorylation de ζ_2 puis l'activation de ZAP-70 nécessitent un temps de contact minimum entre le TCR et son ligand. L'interaction suffisamment longue avec l'agoniste permet à l'ensemble de ce processus de se dérouler. En revanche, pour un ligand de faible affinité (agoniste partiel ou antagoniste), la dissociation se produit avant la mise en jeu de tous les effecteurs. Dans le cas d'un ligand de très faible affinité tel qu'un antagoniste nul, la dissociation peut avoir lieu avant même le déclenchement du signal.

• Modèle allostérique

Dans le modèle allostérique (figure 5), la liaison d'un ligand modifié induit une conformation inactive du TCR. Cette conformation inactive empêcherait l'accès de la chaîne ζ_2 à l'un ou l'autre des partenaires qui la phosphorylent. Elle pourrait également modifier l'agencement du complexe CMH-peptide-TCR avec le co-récepteur CD8 ou CD4 et les molécules d'adhérence, structure nécessaire au déclenchement de l'activation. Cette modification de conformation pourrait dépendre ou non de l'affinité du ligand.

• Modèle de la densité

Le modèle de la densité (figure 6) peut s'appliquer aux TCR et aux co-récepteurs. On sait maintenant que la densité de récepteurs à la surface cellulaire peut conditionner les

propriétés d'un ligand – agoniste ou agoniste partiel – suivant la densité – forte ou limitée – de récepteurs. Ainsi, c'est la stœchiométrie des effecteurs présents au moment de l'interaction qui pourrait dicter le comportement du ligand. L'interaction d'un agoniste permettrait à tous les acteurs de l'activation de se mettre en place. Une affinité du ligand et/ou une concentration moindre en co-facteurs entraîneraient la dissociation du complexe avant que tous les effecteurs ne soient recrutés. Quelques données expérimentales viennent à l'appui de cette dernière hypothèse. En effet, il a été montré que la liaison de forte affinité d'un ligand agoniste en présence de faibles concentrations des autres acteurs (par exemple le TCR au stade double positif ou l'un des cofacteurs CD8 ou CD4) conduisait à un comportement de type agoniste partiel [31].

Rôle physiologique, pathologique et thérapeutique des agonistes partiels/antagonistes

Les ligands des récepteurs à activité tyrosine kinase délivrent classiquement un signal à la fois de prolifération et de différenciation. L'implication des complexes peptide-CMH dans la prolifération et dans l'ontogénèse des lymphocytes confirme cette règle. De ce fait, on peut s'attendre à ce que des agonistes partiels ou des antagonistes du TCR aient également des effets biologiques sur ces événements, comme le suggèrent de récentes observations. De tels complexes pourraient intervenir dans la sélection positive et négative des lymphocytes au niveau thymique mais également sur leur état d'activation au niveau périphérique [32].

• Sélection positive et négative

La constitution du répertoire immunologique d'un individu a pour but de neutraliser les composantes du système immunitaire dirigées contre le soi et d'anticiper la rencontre ultérieure avec des pathogènes. Le répertoire des lymphocytes T est formé par la conjonction de deux mécanismes

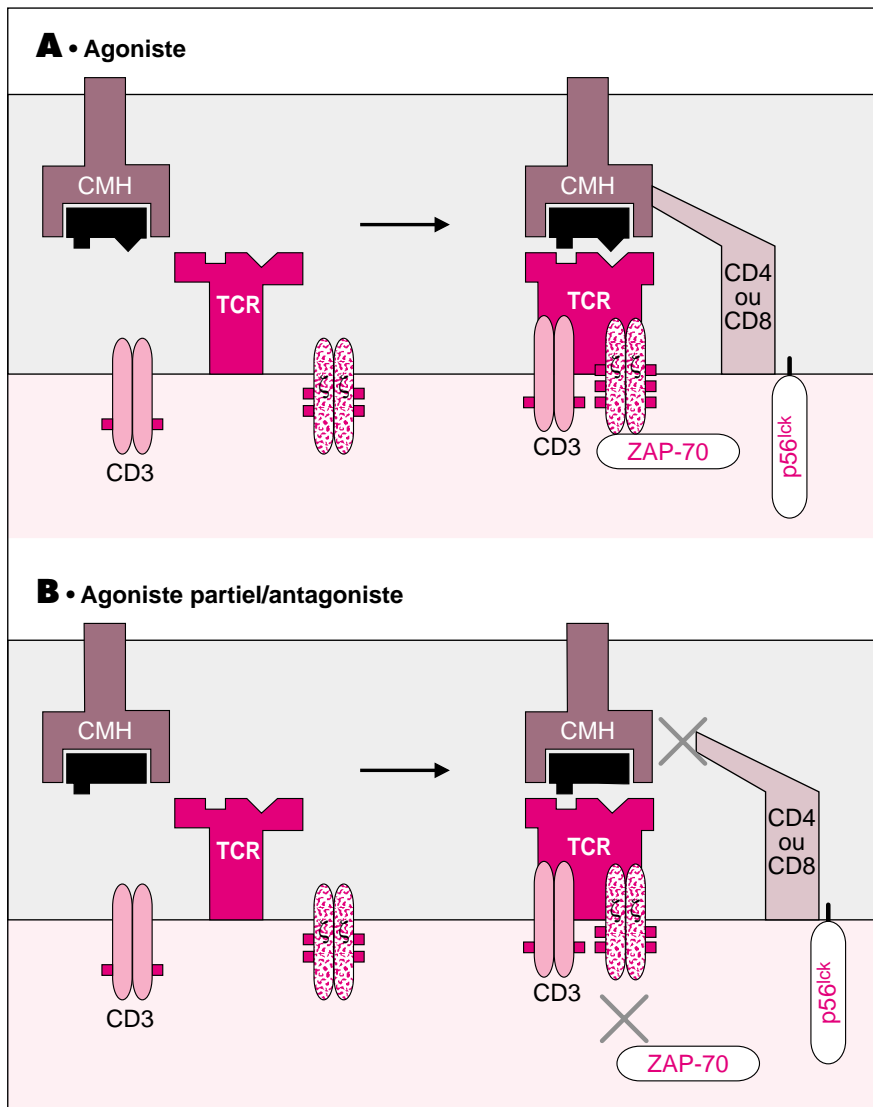


Figure 5. **Le modèle allostérique.** La conformation induite par l'interaction du TCR avec un ligand agoniste (en haut) ou un agoniste partiel/antagoniste (en bas) serait différente. La conformation induite par la liaison d'un agoniste permettrait la liaison fonctionnelle des chaînes ζ et CD3, leur association à ZAP-70 et l'activation de p56^{lck} par l'intermédiaire de la liaison du co-récepteur CD4 ou CD8. A l'opposé, la conformation induite par un agoniste partiel/antagoniste priverait celui-ci de l'interaction fonctionnelle avec la chaîne de transduction du signal et/ou la mise en jeu du corécepteur.

de sélection dans le thymus : la sélection positive sur la base de leur capacité de reconnaître les molécules du CMH autologues et la sélection négative sur la base de la reconnaissance des complexes CMH-peptides du soi. Bien que ces mécanismes ne soient pas encore précisément élucidés, il est clair que le TCR et les peptides du soi y sont fortement impliqués [33]. Il est généralement admis

qu'une affinité suffisante du complexe peptide-CMH pour le TCR conditionne le processus de sélection positive et qu'une affinité trop forte conduit à une sélection négative. Le rôle des peptides antagonistes dans la sélection positive a été démontré. Dans un modèle de souris transgéniques déficientes en β_2 -microglobuline et exprimant un TCR spécifique d'un épitope de l'ovalbumine pré-

senté par le CMH H2-K^b, des variants antagonistes de l'épitope conduisent à la sélection positive des cellules T exprimant ce TCR. De plus, en fonction du niveau d'expression du CMH, la sélection négative peut être induite par l'un de ces antagonistes [34]. La sélection positive se déroulant à un stade de faible expression du TCR, le modèle de la densité prévoit que des complexes CMH-peptide du soi puissent se comporter comme des agonistes partiels, permettant ainsi à de nombreux complexes de franchir cette étape de sélection. Un rôle possible des peptides antagonistes dans la sélection négative de lymphocytes CD4⁺ a aussi été montré [35]. L'observation que des ligands modifiés inhibent l'apoptose d'un hybridome T se rapproche également du mécanisme de franchissement de la sélection négative en sauvant de l'apoptose des cellules T capables de reconnaître ultérieurement l'antigène [13].

• Rôle sur les lymphocytes T périphériques

On peut se demander quel est le rôle des peptides agonistes partiels ou antagonistes sur les lymphocytes T périphériques dans la mesure où ces peptides ne peuvent être produits de façon constitutive sans risquer de bloquer en permanence la réponse immunitaire. Leur rôle dans la maintenance de la mémoire immunitaire a été suggéré [32]. Leur expression périodique permettrait d'engager le TCR spécifique et de maintenir ainsi la mémoire du lymphocyte T qui le porte, en lui fournissant un signal d'activation basale. Ce modèle permettrait d'expliquer le mécanisme de la mémoire immunitaire en absence de l'antigène. De plus, les mécanismes de l'anergie induite par un agoniste partiel ressemblent à ceux de la tolérance périphérique.

Les agents pathogènes (notamment les virus) utilisent de nombreuses stratégies pour échapper au système immunitaire [36]. Certaines consistent à réduire l'expression du CMH ou l'activité des transporteurs de peptides. D'autres sont fondées sur la capacité du virus de produire des mutations dans la séquence des épitopes. Ces mutations peuvent modifier la structure de l'antigène viral

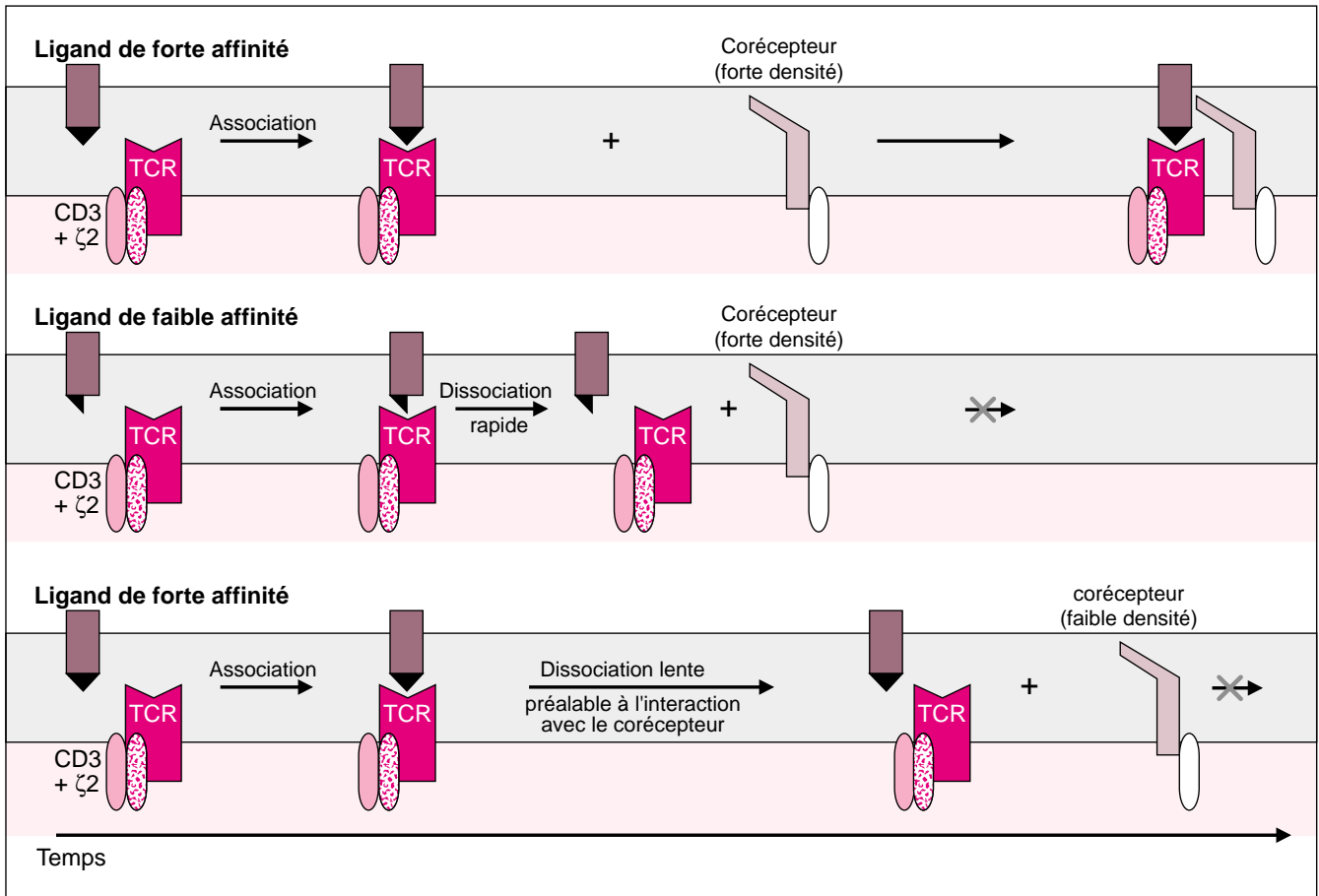


Figure 6. **Le modèle de la densité.** L'affinité du ligand pour le TCR mais aussi la densité des récepteurs ou des co-récepteurs influencerait sur la transduction du signal par le TCR. Un ligand de forte affinité se comporterait comme un agoniste ou comme un antagoniste selon que le co-récepteur est présent en forte densité ou en faible densité (figurée par une dissociation préalable du complexe ligand-TCR) à la surface cellulaire. De même, un ligand de faible affinité pourrait se dissocier du TCR avant interaction du co-récepteur (même à haute densité de ce dernier).

sur un résidu d'ancrage au CMH ou auxiliaire empêchant ainsi sa présentation en surface [37, 38], ou sur un résidu en contact avec le TCR spécifique de l'antigène [37] empêchant ainsi sa reconnaissance. L'hypothèse selon laquelle de telles mutations pouvaient conduire à des peptides antagonistes a été récemment démontrée [39, 40] : des variants des virus VIH ou de l'hépatite B inhibent l'activité de clones de CTL provenant de porteurs asymptomatiques ou chroniques du virus. L'épitope muté se comporte comme un antagoniste en inhibant la lyse des cellules infectées ainsi que la sécrétion d'IFN- γ . Ce mécanisme pourrait également avoir

lieu dans d'autres processus pathologiques tels que le cancer ou les infections bactériennes ou parasitaires.

• Applications thérapeutiques

Les modèles d'immunosuppression sélective ont apporté une preuve directe du rôle thérapeutique potentiel des agonistes partiels ou des antagonistes [41]. Dans le modèle expérimental d'encéphalomyélite allergique, maladie auto-immune murine comparable à la sclérose en plaque chez l'homme (*m/s n° 8, vol. 8, p. 872*), relayée par la MBP (*myelin basic protein*) et la PLP (*proteolipid protein*), des antagonistes compé-

titifs dérivés d'un épitope de la PLP présenté par I-A^s bloquent non seulement l'activation des lymphocytes T spécifiques de l'épitope *in vitro* mais également l'induction de la maladie *in vivo*. Des peptides de forte affinité pour I-A^s dépourvus d'activité antagoniste compétitive (c'est-à-dire bloquant le CMH mais n'interagissant pas avec le TCR) sont aussi de bons inhibiteurs mais à des doses 10 à 100 fois supérieures à celle des antagonistes et avec une présence permanente dans les fluides biologiques [42-44]. D'autre part, l'injection d'un peptide antagoniste de la MBP provoque une diminution du taux d'IFN- γ et de TNF- α ,

deux cytokines impliquées dans le développement de la maladie. Bien que ces travaux démontrent la faisabilité de l'utilisation en thérapeutique de peptides antagonistes, de nombreux obstacles restent encore à franchir. Les applications thérapeutiques se limiteront à des affections dans lesquelles l'épitope mis en cause est précisément identifié, cas encore rares. De plus, la propriété antagoniste d'un peptide est définie par rapport à un TCR précis (c'est-à-dire par rapport à un clone). Ce même peptide pourra avoir des propriétés différentes vis-à-vis d'un autre clone [16] ou voire, pour un même clone en fonction de sa concentration [45]. Or, la réponse immunitaire est presque toujours polyclonale. L'épitope devra donc être immunodominant ou entraîner une réponse T de faible variabilité au niveau des TCR. L'utilisation d'agonistes partiels pourrait être *a priori* plus prometteuse dans la mesure où ce type de ligand peut modifier le profil d'expression de cytokines et, par conséquent, l'incidence de la maladie. Enfin, pour éviter la dégradation rapide des peptides dans les fluides biologiques ainsi que la dissociation *in vivo* des complexes CMH-peptide exogène, l'utilisation de complexes covalents peptide-CMH [46, 47] et/ou des analogues non peptidiques [48] pourrait être avantageusement mise à profit.

Conclusions

Les résultats rapportés ci-dessus montrent qu'un TCR n'a pas un ligand unique mais une multitude de ligands différents. Ces ligands pourraient jouer un rôle dans la diversité du répertoire couvert par les lymphocytes non seulement en permettant quantitativement à un récepteur de reconnaître plusieurs agonistes mais surtout qualitativement en « adaptant » la réponse lymphocytaire. Si l'existence de peptides du soi ayant le rôle d'agoniste partiel ou d'antagoniste n'a pas été formellement démontrée, il reste qu'elle est fortement probable [22]. Les rôles, réels ou spéculatifs, attribués aux ligands modifiés devraient être de nature à modifier notre vision du système immunitaire ainsi que notre capacité d'intervention sur son activité ■

Summary

The pharmacology of the T cell receptor and its ligands

The trimolecular system made of the T cell receptor (TCR), the antigenic peptide and the major histocompatibility complex (MHC) glycoprotein plays a pivotal role in the interaction between target cells and effector cells of the immune system. Based on the knowledge of MHC-peptide and MHC-peptide-TCR interactions, the pharmacological principles of TCR-ligand interaction have recently been defined. It is now well established that TCR ligands may be endowed with agonist, partial agonist or antagonist properties. The design of pharmacologically active TCR ligands that modulate recognition of target cells by T lymphocytes and their use in new immunotherapeutic approaches against cancer, viral infection or autoimmune diseases represent one of the major scientific and clinical challenges of the next decade. Further, the pharmacological principles of TCR-ligand interaction should allow a better understanding of the mechanisms involved in T cell ontogenesis and in evasion to the immune system.

TIRÉS À PART

J.E. Gairin.

m/s

Vient de paraître
Numéro spécial

30 ANS DE RECHERCHE
AU DÉPARTEMENT
DES SCIENCES
DE LA VIE DU CNRS

 **GUIDE ROSENWALD**
LE GUIDE DE LA RECHERCHE EN SCIENCES DE LA VIE