

Origine, différenciation et répertoire lymphocytaire T

Guy Gorochov, Jean Daniel Lelièvre, Gilles Thibault, Antoine Toubert

I-Introduction	2
II-Le récepteur T pour l'antigène (T-cell receptor ou TCR).....	2
II-1. Le TCR du lymphocyte T mature	2
II-2. Structure du complexe TCR - CD3 (Figure 18)	2
II-2-a. Module de reconnaissance - le TCR	2
II-2-b. Module de transduction du signal - le complexe CD3.....	3
II-2-c. Les molécules CD4 et CD8 (Figures 19 et 20)	3
III-Le thymus	3
III-1. Structure	3
III-2. Organogénèse et évolution durant la vie.....	4
IV-Le développement lymphocytaire T	4
IV-1. Les différents thymocytes	5
IV-2. TCR et sélections thymiques	5
IV-2-a. Les gènes du TCR.....	5
IV-2-b. Sélections thymiques	6
IV-2-c. Facteurs impliqués dans l'ontogénie et la survie des lymphocytes T	8
V-Les autres lymphocytes T : lymphocytes T $\gamma\delta$, lymphocytes NKT	8
V-1. Les lymphocytes T $\gamma\delta$	8
V-2. Les lymphocytes NKT.....	8

I-Introduction

Ce chapitre explique l'origine et la différenciation des lymphocytes T depuis la moelle osseuse jusqu'à la sortie du thymus. Durant cette différenciation les précurseurs lymphocytaires T acquièrent un récepteur de surface spécifique de l'antigène (TCR). La structuration finale du TCR dépendant des hasards des recombinaisons de l'ADN, plusieurs étapes de reconnaissance des TCR par des antigènes du soi s'effectuent dans le thymus. Ces étapes appelées **sélections** visent à conserver un répertoire de lymphocytes T capables de reconnaître un grand nombre d'antigènes extérieurs et de survivre en périphérie (sélection positive) mais ne reconnaissant pas les antigènes du soi (sélection négative). A côté des lymphocytes T $\alpha\beta$ dits conventionnels on décrit des lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes NKT ayant des fonctions et un développement différents. L'étude de ces lymphocytes sera abordée en fin de chapitre. Une grande partie des éléments sur lesquels reposent la connaissance des mécanismes régissant l'ontogénie T provient d'expériences effectuées dans les modèles murins. Le développement des lymphocytes T de la souris et de l'homme diffèrent cependant par certains points. Ce qui est observé chez l'homme est décrit ici, en ne précisant qu'à de rares exceptions les différences existant avec le modèle murin.

II-Le récepteur T pour l'antigène (T-cell receptor ou TCR)

II-1. Le TCR du lymphocyte T mature

Le lymphocyte T reconnaît via son TCR des peptides antigéniques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le TCR des lymphocytes T CD4 reconnaît des peptides de 12 à 25 acides aminés présentés par les CMH de classe II des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ces peptides proviennent de la dégradation intra cellulaire de protéines extracellulaires. Le TCR des lymphocytes T CD8 reconnaît des peptides de 9 acides aminés présentés par les CMH de classe I, présents sur toutes les cellules de l'organisme. Ces peptides sont d'origine intra-cellulaire.

II-2. Structure du complexe TCR - CD3 (Figure 18)

Il est important de distinguer le TCR proprement dit, permettant la reconnaissance de l'antigène, du complexe TCR-CD3 qui assure la transduction d'un signal d'activation dans le lymphocyte T suite à cette reconnaissance.

II-2-a. Module de reconnaissance - le TCR

On distingue deux types de TCR en fonction des chaînes qui le constituent : TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$. Ces derniers représentent un type de lymphocytes T particuliers minoritaires dans le sang circulant (<10 % des lymphocytes T) qui sera abordé en fin de chapitre. Les TCR ont une

structure de type « *immunoglobulin like* » (cf chapitre 7) et sont composés d'une chaîne α et d'une chaîne β comportant chacune un domaine variable et un domaine constant. Chaque TCR est différent d'un lymphocyte T à l'autre, les différences étant liées à des modifications dans les régions variables des chaînes qui le composent. Ces deux chaînes sont reliées par un pont disulfure. La partie intracytoplasmique (COOH terminale) du TCR est courte.

II-2-b. Module de transduction du signal - le complexe CD3

Le TCR qui reconnaît l'antigène est associé au complexe CD3 qui transmet un signal à l'intérieur de la cellule. Contrairement au TCR, le complexe CD3 est formé de plusieurs peptides invariants : les chaînes γ , δ , ϵ , et ζ/η . Les chaînes γ , δ , ϵ du complexe CD3 ont, comme les chaînes du TCR une structure « *immunoglobulin like* », mais possèdent toutefois une queue intra-cytoplasmique un peu plus longue. Les chaînes ζ et leur variant la chaîne η , dont le domaine extracellulaire est réduit, comportent à l'inverse une longue portion intracytoplasmique avec plusieurs motifs de type ITAM (Immuno-receptor Tyrosine Activation Motif) sièges de résidus tyrosine cibles de phosphorylation par des protéines kinases spécifiques à l'origine de la transduction d'un signal d'activation. Il y a aussi des ITAM sur les autres chaînes du CD3, 10 ITAM en tout pour un complexe TCR-CD3.

II-2-c. Les molécules CD4 et CD8 (Figures 19 et 20)

Les molécules CD4 et CD8 sont des déterminants majeurs des lymphocytes T et permettent de distinguer en périphérie des lymphocytes auxiliaires exprimant la molécule CD4 et des lymphocytes cytotoxiques exprimant la molécule CD8. Ces molécules, également importantes pour distinguer les différents stades de maturation des thymocytes au cours de l'ontogénie, appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Les molécules CD4 et CD8 stabilisent l'interaction CMH/TCR en interagissant avec une partie faiblement polymorphe du CMH et participent à la signalisation intracellulaire en recrutant des kinases de type lck.

III-Le thymus

III-1. Structure

Le thymus a été défini dans le chapitre 2. On peut préciser ici qu'il s'agit d'un organe impair, médian, bilobé, thoracique ou le plus souvent cervico thoracique, situé dans le médiastin antérieur. Son aspect classique en tomodynamométrie prend la forme d'un triangle.

Sur le plan histologique, chaque lobe thymique est organisé en unités fonctionnelles, les lobules séparés entre eux par des invaginations de la capsule appelées trabécules. Au sein de ces lobules on distingue une zone externe, la corticale, et une zone plus centrale, la médullaire. Les précurseurs lymphoïdes provenant de la moelle osseuse pénètrent dans le thymus par des

veinules post capillaires situées au niveau de la jonction cortico-médullaire, migrent vers le cortex pour se diriger ensuite vers la médullaire.

Ces différentes régions sont composées de cellules différentes. Outre les thymocytes à leur différents stades de développement (cf plus loin) on trouve dans le thymus des cellules épithéliales et des fibroblastes dans le cortex et dans la médullaire, cependant que des macrophages et des cellules dendritiques sont également présents dans la médullaire. Chez l'homme, au sein de cette dernière on retrouve des structures histologiques particulières, appelées corpuscules de Hassal, composées de cellules épithéliales et de cellules dendritiques et qui seraient le siège de la différenciation des cellules T régulatrices (cf chapitre 13).

III-2. Organogénèse et évolution durant la vie

Le thymus provient de la troisième poche pharyngée de l'endoderme. Il est fonctionnel dès la sixième semaine de vie embryonnaire. De très nombreux facteurs sont indispensables à sa formation. La déficience en facteur de transcription Tbx1 est à l'origine d'un syndrome malformatif complexe touchant la tête et les organes cervicaux et intrathoraciques (malformations cardiaques) s'accompagnant d'une absence de thymus et d'un déficit immunitaire grave, le **syndrome de Di George**.

C'est à l'intérieur du thymus que les précurseurs lymphoïdes provenant de la moelle osseuse terminent leur maturation pour aboutir à la formation de lymphocytes T matures dits naïfs. La plus grande part de l'activité du thymus a lieu durant la vie *in utero*. La longue durée de la gestation chez l'Homme fait que le thymus est totalement mature à la naissance et a déjà produit un grand nombre de lymphocytes T naïfs. Cependant contrairement à ce que l'on a longtemps pensé, le thymus reste actif après la naissance. La thymectomie post natale s'accompagne ainsi d'une diminution sensible du nombre des lymphocytes T naïfs. L'activité thymique diminue ensuite progressivement au cours de la vie, avec une chute plus rapide après l'adolescence, le tissu thymique étant progressivement remplacé par du tissu adipeux. Cependant cette involution est très variable selon les individus et une activité thymique notable peut parfois être mise en évidence à un âge très avancé. Il semble d'ailleurs qu'il existe une corrélation positive entre la persistance d'une activité thymique et la longévité.

IV-Le développement lymphocytaire T

Le passage dans le thymus permet aux précurseurs lymphoïdes de se développer pour donner naissance à des lymphocytes T matures dit « naïfs ». La production journalière est estimée à environ 10^8 lymphocytes par jour.

Lors de ce développement, les lymphocytes immatures appelées thymocytes subissent un certain nombre de modifications phénotypiques. A l'instar de ce qui se passe dans la moelle osseuse pour les lymphocytes B, les gènes codant pour les chaînes du TCR se réarrangent, aboutissant à la formation d'un pré-TCR puis d'un TCR mature permettant aux thymocytes d'interagir avec les autres cellules du thymus (cellules épithéliales et cellules dendritiques), le but final étant de produire des lymphocytes T susceptibles de reconnaître des antigènes extérieurs et ne réagissant pas avec des antigènes du soi.

IV-1. Les différents thymocytes

La maturation des thymocytes est caractérisée par une intense prolifération en réponse notamment à la synthèse intrathymique d'interleukine 7 (IL-7, cf plus loin) et par des phénomènes de mort/survie cellulaire sous la dépendance de signaux transmis par le TCR. En fonction du degré de maturation on distingue plusieurs stades de maturation thymocytaire.

Les principaux stades de développement des thymocytes sont les suivants (Figure 21):

- **Thymocytes multipotents** ou DN1 (Double négatif, *ie* : CD4⁻/CD8⁻): ces cellules peuvent donner naissance à des lymphocytes T, des lymphocytes NK et des cellules dendritiques
- **Thymocytes pro T ou DN2**: ces cellules peuvent donner naissance à des lymphocytes T et des lymphocytes NK mais n'ont plus le potentiel de se différencier en cellules dendritiques
- **Thymocytes DP** (Double positifs, *ie* : CD4⁺/CD8⁺) : il s'agit du premier stade exprimant le complexe TCR-CD3
- **Thymocytes SP** (Simple positifs, *ie* : CD4⁺/CD8⁻ ou CD4⁻/CD8⁺). Ces cellules ont passé l'étape de sélection négative (cf plus loin) et ont perdu soit le CD4 soit le CD8.

IV-2. TCR et sélections thymiques

IV-2-a. Les gènes du TCR

Parallèlement à l'évolution phénotypique les thymocytes fabriquent par réarrangement les gènes codant pour les chaînes du TCR. Les segments génétiques utilisés sont situés sur les chromosomes 14 (répertoires TCR α et δ) et 7 (répertoires TCR β et γ). L'organisation des loci génétiques concernés est très similaire à celle retrouvée au niveau des loci codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines (voir chapitre 6). On distingue ainsi des segments de type V (Variable), D (Diversité) et J (Jonction) pour les chaînes β et δ , V et J pour les chaînes α et γ .

Comme c'est le cas pour les immunoglobulines, on assiste à des réarrangements de type VJ, ou DJ puis VDJ au cours de la différenciation des thymocytes, liés à la présence de « séquences signal de recombinaison » de part et d'autres de ces segments. Ces signaux sont reconnus par le complexe enzymatique de la recombinaison (comprenant notamment les enzymes RAG

(**R**ecombination **A**ctivating **G**ene) capable de cliver puis de réparer l'ADN. Ceci explique que le déficit congénital en enzymes RAG soit responsable d'un déficit immunitaire touchant les populations lymphocytaires T et B. Les réarrangements ont lieu dans un ordre chronologique précis : δ , γ , β , α .

Les réarrangements s'accompagnent de l'excision de petits fragments d'ADN qui se retrouvent sous forme épisomale dans le cytoplasme, les TREC (**T** cell **R**eceptor **E**xcision **C**ircle), car un réarrangement productif de la chaîne α implique l'élimination complète du locus de la chaîne δ . La quantification des TRECs dans les lymphocytes T périphériques est utilisée pour apprécier l'activité thymique. Contrairement à ce qui est observé au cours de la maturation des lymphocytes B, il n'y a pas d'accumulation de mutations somatiques dans les gènes codant pour les TCR.

La taille théorique du répertoire des lymphocytes T $\alpha\beta$ est très grande. Lorsque l'on tient compte de la diversité germinale (nombre de différents segments V, D et J pour les deux chaînes), des différentes possibilités combinatoires qui en résultent pour chaque chaîne de TCR (réarrangements VJ ou VDJ), des différentes possibilités combinatoires entre chaînes et enfin de la diversité jonctionnelle (imprécision des processus de réparation après coupure aboutissant à la délétion ou l'addition aléatoires de nucléotides au niveau des boucles CDR3) on estime que, par ces mécanismes, 10^{15} TCR différents pourraient être générés. Le nombre de lymphocytes T dans l'organisme est toutefois limité à 10^{12} et la taille mesurée du répertoire est en fait de l'ordre de 10^8 TCR différents. L'essentiel de la diversité idiotypique des TCR repose sur les parties jonctionnelles qui codent pour les boucles hypervariables CDR3 des chaînes α et β , régions qui interagissent principalement avec les peptides antigéniques.

IV-2-b. Sélections thymiques

Les réarrangements des chaînes du TCR conduisent à l'expression de TCR plus ou moins complets à la surface des thymocytes. Ceux-ci permettent la reconnaissance de structures antigéniques présentées par les cellules non thymocytaires indispensables à la délivrance de signaux de survie ou de mort cellulaires. Les thymocytes passent, en fonction de la maturation de leur TCR, par plusieurs étapes durant lesquelles ils reçoivent ce type de signaux, ce sont les étapes de **sélection**. La finalité de celles-ci est de sélectionner des thymocytes ayant un TCR fonctionnel et non susceptibles d'induire des phénomènes d'auto-immunité en périphérie. Ce système est très coûteux en énergie car les cellules sont sélectionnées *a posteriori*.

Il est important de comprendre que seuls des antigènes du soi sont exprimés et présentés par les cellules épithéliales corticales et par les cellules dendritiques médullaires du thymus. L'avidité du TCR pour le complexe CMH-antigène détermine le type de signal que reçoit le

thymocyte. Les différentes étapes franchies au cours de la différenciation des thymocytes et aboutissant à la production de lymphocytes $\alpha\beta$ sont détaillées ci-après.

La β -sélection est la première à survenir. Lorsqu'ils ont réarrangé efficacement leur chaîne β , les thymocytes immatures expriment un TCR incomplet appelé pré-TCR correspondant à l'association d'une chaîne β à une chaîne dite preT α . Malgré son nom cette chaîne est très différente d'une chaîne α classique puisqu'elle ne contient pas de domaine variable et est donc identique sur tous les thymocytes. Ce pré-TCR transmet des signaux de survie et de prolifération. Plus de 90% des cellules qui arrivent à ce stade meurent du fait de l'absence d'expression de pré TCR à leur surface. Au cours de cette étape de prolifération survient le réarrangement du locus α . En principe, on pourrait donc trouver en circulation des lymphocytes partageant la même chaîne β , mais exprimant des chaînes α différentes.

La sélection positive a lieu au stade DP lorsque les thymocytes expriment un TCR $\alpha\beta$ potentiellement fonctionnel. Des antigènes du soi sont présentés par les cellules épithéliales corticales aux thymocytes DP. Les thymocytes dont le TCR ne reconnaît pas le complexe CMH-peptide du soi ne reçoivent pas de signal de survie et meurent. L'avidité du TCR pour le complexe CMH-peptide du soi est ici intermédiaire. Cette étape permet l'élimination des lymphocytes T impropres à collaborer avec les molécules HLA (CMH humain) de l'hôte. En effet, la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T a toujours lieu dans le contexte du CMH. On parle de « restriction de la reconnaissance de l'antigène par le CMH ».

La sélection négative, contrairement aux deux précédentes, s'accompagne d'une mort des cellules recevant un signal trop intense via le TCR. Elle entraîne ainsi la délétion des thymocytes exprimant un TCR ayant une trop forte affinité pour les antigènes du soi. Les cellules présentant ces antigènes sont ici les cellules dendritiques situées à la jonction cortico-médullaire. Ces cellules captent les antigènes exprimés par les cellules épithéliales médullaires et les présentent via leur CMH aux thymocytes double-positifs DP. La protéine cruciale de cette étape est la protéine AIRE (**A**uto**I**mmune **R**Egulator) présente dans les cellules épithéliales thymiques médullaires et indispensable à l'expression ectopique d'antigènes tissulaires (par exemple l'insuline).

Suite à ces différentes étapes, les thymocytes donnent naissance à des lymphocytes T naïfs simple-positifs (SP) CD4+ ou CD8+ qui quittent le thymus par les vaisseaux de la jonction cortico-médullaire. Au cours des rencontres ultérieures avec l'antigène, il ne surviendra ni mutation somatique, ni commutation de classe au niveau des loci des TCR.

IV-2-c. Facteurs impliqués dans l'ontogénie et la survie des lymphocytes T

De nombreux facteurs sont impliqués dans l'ontogénie des lymphocytes T. Deux facteurs précoces sont particulièrement intéressants à connaître car ils sont impliqués dans des pathologies observées chez l'Homme ou peuvent s'avérer utiles dans le cadre de stratégies de reconstitution lymphocytaire T : l'IL-7 et les protéines Notch. Le répertoire est ensuite considérablement modulé en périphérie par l'interaction avec les différents antigènes. Ces derniers induisent des expansions clonales pouvant persister pendant plusieurs mois.

V-Les autres lymphocytes T : lymphocytes T $\gamma\delta$, lymphocytes NKT

A côté des lymphocytes T $\alpha\beta$ « classiques » on distingue d'autres populations de lymphocytes T, les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes NKT. Ces lymphocytes ont une ontogénie différente et surtout une diversité beaucoup plus restreinte.

V-1. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Bien qu'ayant des caractéristiques phénotypiques assez similaires les lymphocytes T $\gamma\delta$ se distinguent des lymphocytes $\alpha\beta$ par un grand nombre de points. Contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$, la plupart des lymphocytes T $\gamma\delta$ matures ont un phénotype double-négatif DN CD4⁻ CD8⁻, ou simple positif SP CD8⁺, ou exceptionnellement SP CD4⁺.

Pendant l'ontogénie, les lymphocytes T $\gamma\delta$ ne passent pas par les mêmes étapes de différenciation intrathymique et la dichotomie $\gamma\delta / \alpha\beta$ se produit précocement au cours de l'ontogénie T.

La répartition tissulaire des lymphocytes T $\gamma\delta$ après leur sortie du thymus est différente de celle des lymphocytes $\alpha\beta$ qui sont majoritairement dans les ganglions et le sang. On retrouve les lymphocytes $\gamma\delta$ essentiellement dans les tissus, les muqueuses et la peau.

La diversité des TCR $\gamma\delta$ est beaucoup moins grande que celle des TCR $\alpha\beta$. Ainsi une même chaîne V γ est exprimée par la majorité des lymphocytes $\gamma\delta$, celle-ci variant suivant l'âge. Les TCR $\gamma\delta$ ne sont pas restreints par le CMH. Ils ne reconnaissent pas des épitopes classiques mais plutôt des épitopes conservés au sein des pathogènes. Pour ces raisons les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont considérés comme des cellules appartenant à l'immunité innée.

V-2. Les lymphocytes NKT

Les lymphocytes NKT représentent un groupe hétérogène de lymphocytes T. Comme leur nom l'indique ils possèdent des caractéristiques phénotypiques propres aux lymphocytes T (notamment un TCR et la présence de CD3) mais également aux lymphocytes NK (expression des molécules CD56 et CD16).

Le TCR des lymphocytes NKT est quasi invariant. La chaîne α est toujours formée à partir de la même association de segments génétiques $V\alpha 14$ et $J\alpha 18$. Il existe par ailleurs une certaine diversité des chaînes β exprimées par ces cellules, mais beaucoup plus restreinte que dans le cas des lymphocytes $\alpha\beta$ classiques. Le TCR ainsi formé reconnaît non pas des peptides présentés par le CMH mais des lipides et des glycolipides présentés par la molécule CD1d. La fréquence dans le sang des lymphocytes NKT est assez variable (0,001 à 3% des lymphocytes circulants). Ces cellules jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires et leur absence, ou dysfonction, est à l'origine de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou tumorales.

A retenir

- Le thymus est le lieu de l'éducation des lymphocytes T. Les lymphocytes T qui ont une affinité faible ou trop forte pour les complexes CMH/peptides y sont éliminés dans des étapes de sélection positive, puis négative.
- La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T est restreinte par les molécules du CMH.
- Comme pour les anticorps, le répertoire TCR résulte du réarrangement de segments génétiques initialement séparés sur l'ADN des précurseurs de lymphocytes T.
- A la différence des anticorps, il n'y a ni accumulation de mutations somatiques ni commutation de classe au niveau des loci des TCR. Il n'y a donc pas de maturation d'affinité de la réponse T.
- Contrairement aux immunoglobulines qui existent sous forme membranaire et sécrétée, le TCR n'existe que sous forme membranaire.

Figure 18. Le TCR, récepteur pour l'antigène des lymphocytes T.

Le TCR est, à la surface du lymphocyte T, un complexe multimoléculaire comportant :

- un module de reconnaissance, ou TCR proprement dit, constitué d'un hétérodimère de la famille des immunoglobulines (ici α/β), avec pour chaque chaîne un domaine variable distal, un domaine constant proximal, une partie transmembranaire et quelques acides aminés intracytoplasmiques
- un module de transduction du signal, ou complexe CD3 qui comporte
 - o 4 molécules de la superfamille des immunoglobulines avec un domaine extra cellulaire arrangées, de part et d'autre du TCR, en deux hétérodimères $\gamma\epsilon$ et $\delta\epsilon$,

o un dimère $\zeta\zeta$ ou $\zeta\eta$ localisé entre les deux chaînes du TCR, Dix motifs d'activation ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Activating Motif) sont présents sur les portions intracytoplasmiques du complexe CD3.

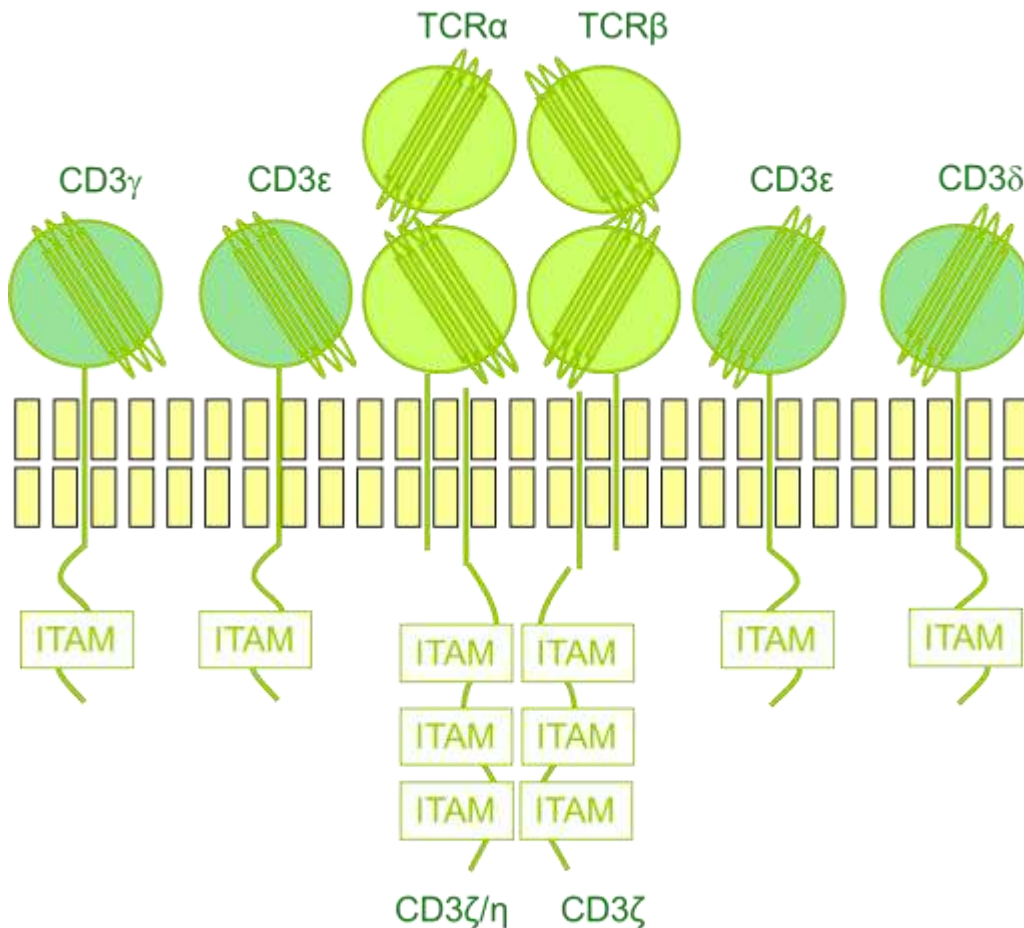


Figure 19. Association TCR/CD4. La taille du CD4 lui permet de se fixer au MHC de classe II sur la cellule présentatrice d'antigène.

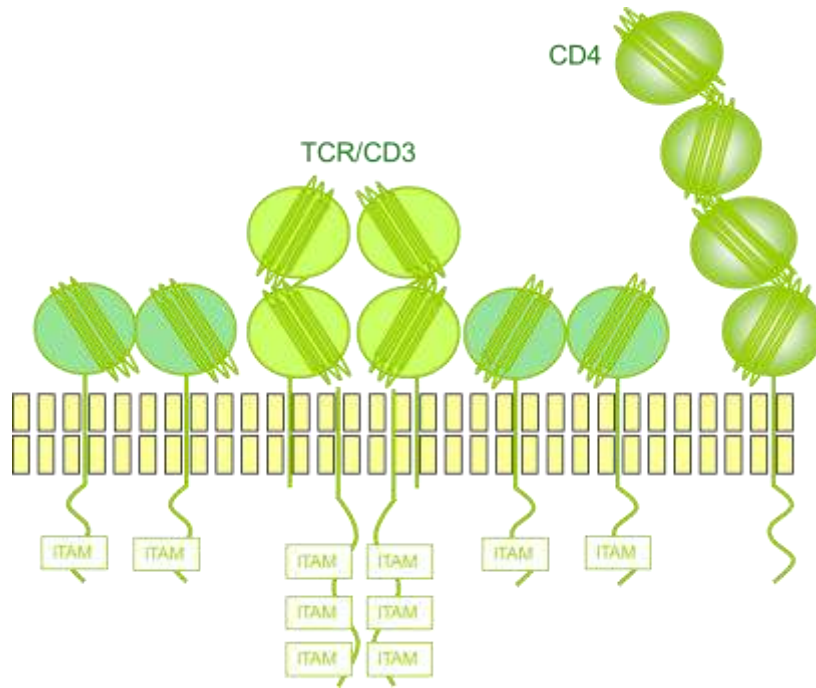


Figure 20. Association TCR/CD8. La taille du dimère CD8 lui permet de se fixer au MHC de classe I sur la cellule présentatrice d'antigène.

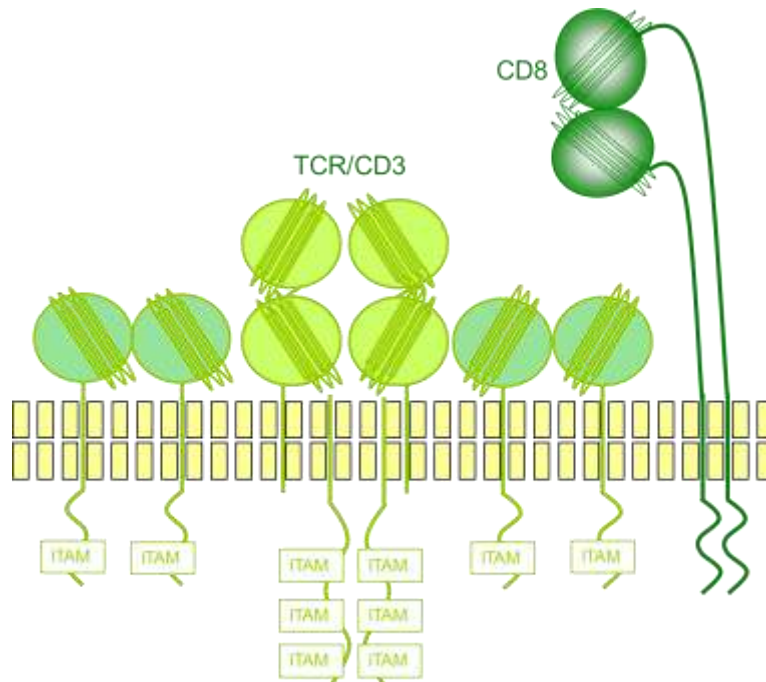


Figure 21. Ontogénèse des lymphocytes T.

Ce schéma décrit les principales étapes de maturation des lymphocytes T dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique, puis dans le thymus. Ces étapes se caractérisent par l'expression séquentielle d'antigènes de différenciation (CD, **C**luster of **D**ifferentiation), une migration des cellules de la moelle osseuse vers la corticale puis la médullaire thymique dans laquelle se déroulent les étapes de sélection clonale centrale (voir le texte).

Les cellules naïves, CD4 ou CD8 gagnent les organes lymphoïdes secondaires où elles mûriront après activation antigénique.

