

Lymphocytes T Conventionnels

Caractéristiques phénotypiques :

Les Lymphocytes expriment différenciellement de nombreuses molécules qui leur confèrent des significations physiologiques particulières.

Nous avons focalisé notre étude sur les lymphocytes T qui partagent les caractéristiques suivantes :

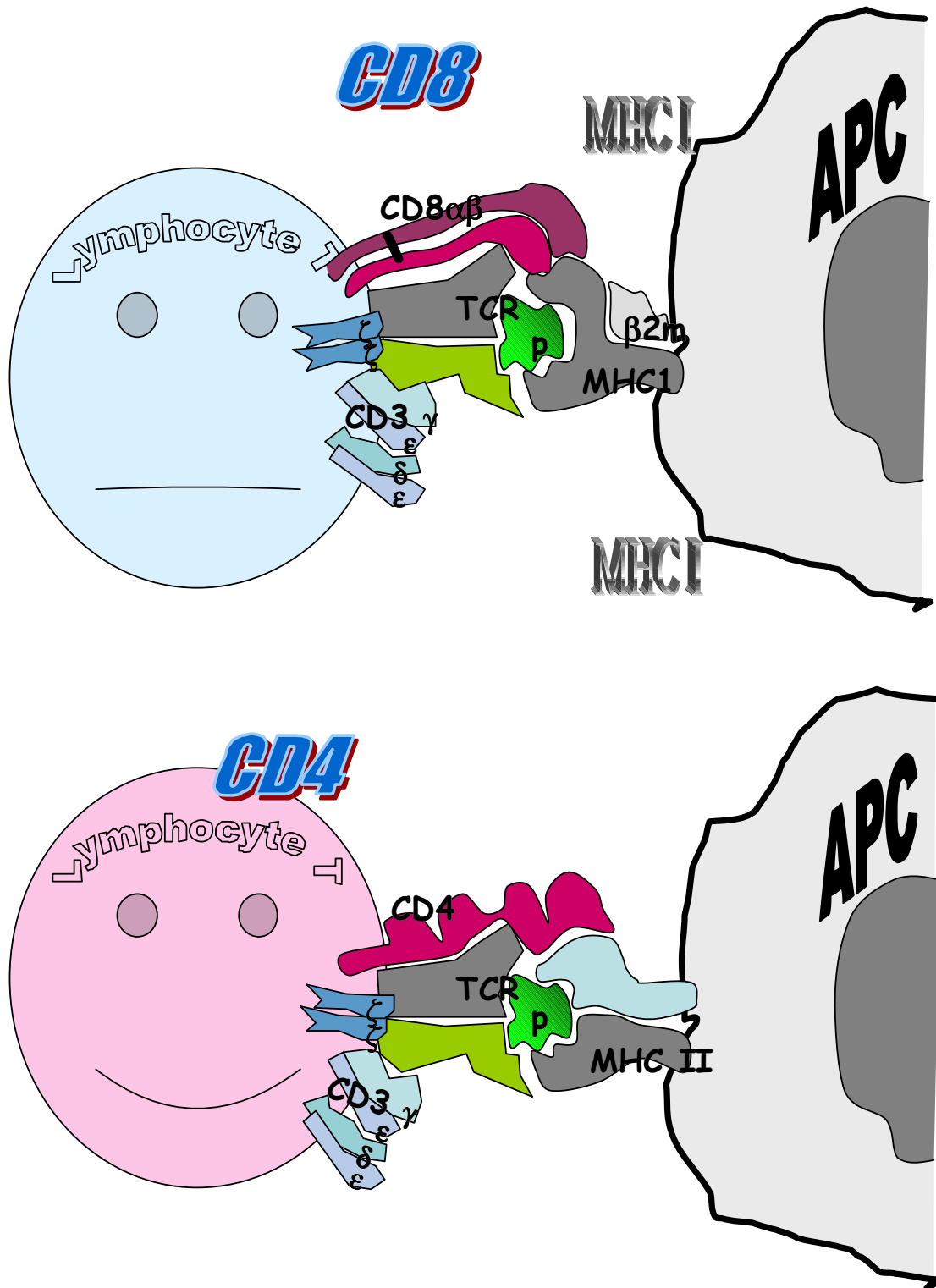
- expression homogène de CD45 fort, avec faible diffraction latérale
- expression de CD2, CD3, CD5 et d'un récepteur T (TCR)
- passage thymique au cours de leur ontogenèse
- diversité de spécificité et fonction.

La reconnaissance spécifique d'un déterminant antigénique par le lymphocyte T est possible grâce à son récepteur T (TCR) qui le caractérise (fig. 2.9). Le TCR est composé de deux chaînes différentes (hétérodimère). Il existe deux isoformes de TCR : soit $\alpha\beta$, soit $\gamma\delta$. Les lymphocytes qui expriment le TCR $\alpha\beta$ sont les plus nombreux dans le sang périphérique. Ils parcourent toute leur ontogenèse dans le thymus. Nous aborderons les caractères des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans un paragraphe dédié. L'expression du TCR est nécessaire à la survie du lymphocyte (Polic, 2001).

Spécificité lymphocytaire T : Les molécules TCR sont semblables dans leur grande partie. Seule une petite partie porte la spécificité pour l'antigène. Cette partie extrêmement diverse (hyper-variable) permet de reconnaître tout type d'antigène présent dans la nature. Chaque lymphocyte possède en principe une seule spécificité (plus ou moins précise –Wilson 2005-).

Expression du TCR : Le réarrangement concerne les deux allèles du génome. Le premier allèle qui s'avère efficace est maintenu. Le second est inhibé définitivement. Cependant, il existe quelques exceptions : dans certaines circonstances, le deuxième allèle peut être co-exprimé (Padovan 1995). Le lymphocyte exprime alors deux spécificités (estimé à 0.10% des lymphocytes circulants). Le sens de cette double expression n'est pas clairement élucidé. Le second allèle peut également être exprimé à la place du premier si ce dernier s'avère nocif (« TCR revision »), sauvant le lymphocyte (« Rescued T cell ») de la destruction programmée (« apoptose » Cooper 2004).

Figure 2.9 : Reconnaissance du complexe peptide-MHC par le récepteur TCR du lymphocyte T (CD4+ ou CD8+).



Rôle physiologique du CD3 : Tous les lymphocytes T ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) expriment le CD3, complexe protéique associé de façon non covalente au TCR. Le CD3 suit la même dynamique d'expression membranaire que le TCR (Minami, 1987 Liu 2000). D'autres molécules sont exprimées de façon quasi constante par les lymphocytes T comme le CD2 et le CD5 (Liu 1996, Green 2000 ; Sasada 2001, Raman 2002, Brossard 2003, Gi,ferrer 2003). Ces molécules sont moins utilisées pour les caractérisations de routine en dehors des processus tumoraux où leur expression est variable.

La reconnaissance du déterminant antigénique par le TCR induit un signal cytoplasmique requis pour la réaction cellulaire. Le TCR n'a pas de prolongement cytoplasmique qui lui permettrait la transmission du signal (Judd 2000 ; Nel 2002 I et II). Le TCR fait partie d'un complexe protéique qui comprend également le CD3 et le CD247, associés de façon non covalente et possèdent les chaînes cytoplasmiques nécessaires à la transduction du signal. Le CD3 est composé de 2 complexes hétéro-dimériques ($\gamma\epsilon$; $\delta\epsilon$). La chaîne ϵ est la cible des anticorps monoclonaux habituellement utilisés pour l'identification des lymphocytes T. Le CD247 composé de deux chaînes ζ (ou éventuellement $\zeta\eta$ chez la souris) est parfois appelé TCR $\zeta\zeta$. La chaîne ζ est requise et limitante (la moins produite) pour l'expression du complexe CD247- CD3.

Expression du CD4/CD8 : Les lymphocytes T $\alpha\beta$ périphériques, matures, expriment soit le CD8 (T CD8+) ou le CD4 (T CD4+) normalement de façon mutuellement exclusive. Dans les analyses de routine, les lymphocytes T sont donc généralement considérés en deux groupes : T CD4+ et T CD8+. Les T CD4+ et T CD8+ ont un comportement réactionnel intrinsèquement différent (Foulds 2002). Les T CD4+ ont une activité de modulation (auxiliaire) de la réponse immune (Appay 2002) alors que les lymphocytes T CD8+ ont plutôt une activité effectrice, notamment cytotoxique (Kessler 1997, Cho 2002). Les deux populations sont donc complémentaires dans la réponse immune (Gao 2002).

La population T CD4+ est prépondérante dans le sang périphérique chez l'adulte mais ce déséquilibre n'est pas retrouvé dans les autres compartiments (Jimenez 2002). Le CD4 aurait une plus forte activité co-activatrice et favoriserait un répertoire plus large de lymphocytes T en permettant l'activation d'un plus grand intervalle d'affinités (Wang 2001).

Le CD8 est une molécule hétéro-dimérique composée d'une chaîne α et une chaîne β . La molécule CD4 est composée d'une seule chaîne (fig. 2.9) et peut éventuellement se dimériser au cours de l'activation (Davis KA 1998, Moldovan JI 2002). La densité de surface du CD4 ou du CD8 est relativement stable sur la cellule au repos.

L'expression du CD8 ou du CD4 est nécessaire à l'activation (et à la survie) du lymphocyte (Luescher 1995, Vignalis 1994, Renard 1996, Feito 1997, Denkberg 2001, Moldovan 2002). Le CD8

ou le CD4 se lie directement à la molécule du CMH Classe I ou II respectivement (Sazmann, 1998 ; Wang 2001; Wooldrige, 2005). L'affinité de liaisons est significativement augmentée (Vignali, 1994, Luescher 1995, Garcia 1996, Renard 1996, Feito 1997, Denkberg 2001, Moldovan 2002). La résultante des deux liaisons est appelée avidité (Bachman 1996, Jiang 2005). Ils ont également une activité d'amplification du signal et permettent d'atteindre le seuil de signal requis pour le déclenchement de l'activation du lymphocyte.

Ontogenèse des lymphocytes T $\alpha\beta$: L'ontogenèse du lymphocyte T est maintenant mieux comprise (Boyd 1991, Anderson 1999). Les précurseurs communs des lymphocytes naissent dans la moelle osseuse. Les précurseurs T précoces (ETP) quittent la moelle et migrent dans la zone para-corticale du thymus (Shortman 1992, Bhandoola 2003). Le lymphocyte immature n'exprime ni CD4, ni CD8, ni TCR. Le réarrangement de la partie variable de la chaîne β du TCR se produit (Table II). Si le réarrangement a été productif, les molécules CD4 et CD8 sont exprimées simultanément (double positif). Le CD8 pourrait être exprimé dans sa forme homodimérique avant d'acquérir la forme hétérodimérique (Carrasco 1995). Le réarrangement de la chaîne α du TCR est alors déclenché permettant la production du TCR($\alpha\beta$) complet (Hamman 1999, Chang 2000, Holfman 2003). Le réarrangement de la chaîne α entraîne la délétion des gènes de la chaîne δ qui est insérée dans les segments V α et J α .

Table II : Thymopoïèse

		CD1a	CD34	CD44	CD25	CD2	TCR	CD3	CD4	CD8	position	RAG	Tdt
CLP		-	+	-	-	-	-	-	-	-			
DN1	ELP	+	-	+	-	-	-	-	-	-	cortico-medullaire		
DN2	ETP	+	-	+	+	-	-	-	-	-	cortex		
DN3		+	-	+	+		β		-	-	scapsul	+	
Sélection de TCR β													
DN4	ProT	+	-	-	-		$\alpha\beta$	+	-	-	scapsul	+	+
Sélection positive													
DP		+	-	-	-	+	$\alpha\beta$	+	+	+	medull		
Engagement de lignée													
SP		+	-	-	-	+	$\alpha\beta$	+	+/-	-/+	medull		
Sélection négative													

CLP common lymphoid progenitor;

ELP early Lymphoid progenitor

ETP : Early T lineage precursors

DN double négatifs; DP doubles positifs; SP Simple négatifs

Yasmina Laouar (M/S 1999);

R Boyd et al Immunol Today 1991

Y Akashi et col, J Immunol 2000

A Bhandoola et col J Immunol 2003

Colleen Witt et col 2004

Bettina Ernst et col J Exp Med 1995

Le lymphocyte recherche un ligand MHC- peptide du soi convenable sur les cellules présentatrices du thymus. Si le lymphocyte ne reconnaît pas de ligand (neglected cells » -Fink 2000-) ou en reconnaît

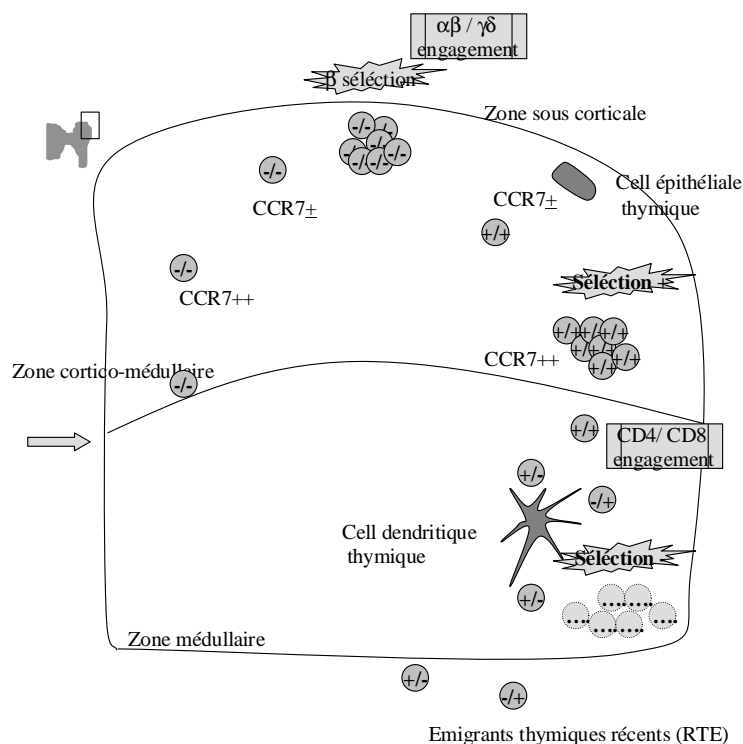
avec une affinité suffisante (Williams 1999), il est voué à une mort programmée (« Programmed Cell Death ») par apoptose (Shortman 1994, Hamann 1995, Chang 2000, Le Campion 2002). Dans le cas contraire, la cellule rescapée (« rescued T Cell ») prolifère (Yatsumo 2000, Basson 2000).

Les lymphocytes T spécifiques d'un peptide présenté par le CMH de type I utilisent le CD8 et les T reconnaissant des molécules présentées par le CMH II expriment le CD4 (Teh 1988, Chang 2000). La molécule co-activatrice inutile (CD4 ou CD8) disparaît et le thymocyte qui n'exprime plus qu'un seul co-récepteur : simple positif (SP) poursuit sa maturation (« lineage commitment » ; Basson 2000 ; Ernest, 1995 ; Anderson, 1996 ; von Boehmer 2000, Germain 2002, Glimcher 2002, Holfmann, 2003). Le CD4 pourrait être exprimé préférentiellement et l'expression du CD8, uniquement après induction (Moldovan, 2002). Le choix de lignée peut être influencé par la cinétique de liaison (Yatsumo 2000).

Les lymphocytes qui reconnaissent des déterminants antigéniques de façon inappropriée (trop forte avidité) sont éliminés (sélection négative).

Seuls les lymphocytes matures, simples positifs, non nocifs, sont exportés dans le sang et sont nommés subséquentement soit T CD4+ soit T CD8+.

Figure 2.10 : Ontogénèse des lymphocytes T conventionnels (thymocytes).



Les différentes étapes de l'ontogénèse se déroulent dans des sites différents du thymus (fig. 2.10). La cellule précurseur entre à l'interface cortico-médullaire (Boyd 1991, Witt 2004). Les doubles positifs sont sélectionnés positivement dans le cortex. Les simples positifs survivants migrent dans la médullaire. La distribution spatiale est dirigée par la production de chimiokines et la régulation

d'expression de leurs récepteurs respectifs (CXCR4 – CCR9 – CCR4 – CCR7/CxCR3 ; Annunziata 2001).

Dynamique de thymopoïèse : Le thymus est particulièrement actif pendant la vie foetale, surtout le troisième trimestre et les premiers mois de la vie. La production journalière dans le thymus a été estimée à 10^7 thymocytes par jour chez la souris (Tough, 1995) pour une production finale de 10^6 . Les DN ne représentent que 3.5% chez l'homme. Les doubles positifs sont la grande majorité (73%). Les SP CD4+ représentent 14% et les CD8+ 7% des thymocytes totaux (Ye, 2002).

Les mêmes taux sont observés chez la souris (Mehr 1997). Leur taux d'exportation est très faible. Seulement 1.5% des thymocytes produits sont exportés chaque jour. Plus de 95% sont éliminés. La majeure partie des éliminations dans le cortex est liée à la sélection positive alors que la sélection négative est 10 fois plus active dans la médullaire (Shortman 1994, Faro 2004). La production ainsi que le taux d'exportation sont adaptables et peuvent augmenter en cas de besoin (Le Campion 2002, Almeida 2005). L'ablation thymique entraîne une disparition des lymphocytes T naïfs en 6 mois chez la souris et la perte de capacité de maturation de réponse cytotoxique (Di Rosa 1999).

Chez le grand enfant, la thymopoïèse décroît rapidement et l'organe involue, n'étant plus qu'un amas graisseux chez l'adulte (Douek 2000, Aspinall 2002, Weerkamp 2005). Il est cependant possible d'observer, avec des techniques très sensibles, des émigrants thymiques récents (RTE), caractérisés par leur contenu en cercle d'excision du réarrangement du TCR (TREC) (Berzins 1998, Mc Farland 2000), même chez l'adulte (Poulin 1999). Dans de très rares cas, des conditions particulièrement drastiques (ex : reprise d'aplasie, lymphopénie) peuvent s'accompagner d'une reprise de la thymopoïèse (Chau 2005). Une lymphopoïèse est possible dans les sites immunologiques périphériques (Antica 1999).

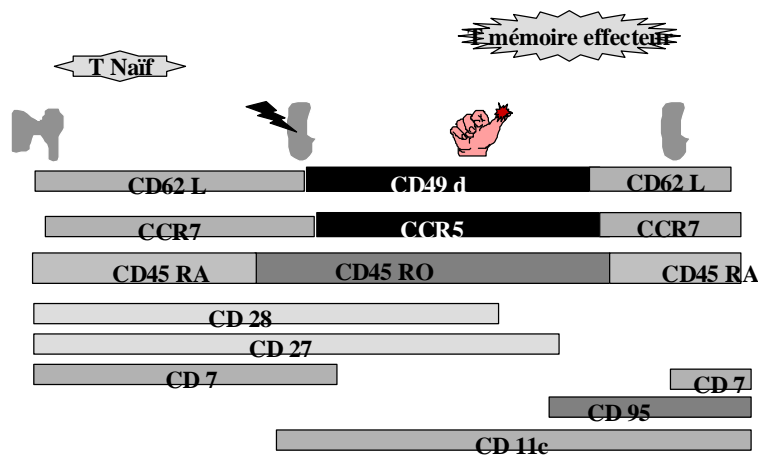
Un maturation de thymocytes est possible en dehors du thymus comme cela a été observé dans des conditions expérimentales chez la souris athymique (Kennedy 1992, Karrer 2003).

Circulation lymphocytaire : Dans la circulation périphérique, le lymphocyte re-circule et se disperse rapidement entre les différents sites lymphoïdes secondaires (ganglions, rate, amygdales) et des sites effecteurs où il rencontre éventuellement les cellules cibles. Leur migration tissulaire n'est pas complètement aléatoire mais guidée (adressage) par l'expression séquentielle de molécules d'adhérences (Bromley 2000, Davenport 2002). Les lymphocytes naïfs expriment le CD62L qui leur permet de migrer dans les ganglions (fig. 2.11). Les lymphocytes T effecteurs expriment le CD49d pour les tissus périphériques ; le CD103 / $\alpha E\beta 7$; E sélectine pour la peau ou encore l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ pour les muqueuses (Baekkevold 2005). L'expression de récepteurs de chimiokines les oriente selon le gradient : récepteur CCR7 pour les organes lymphoïdes, CCR5 pour la périphérie (Masopust 2001, Weninger 2001) ou encore CCR4 pour la peau (Beakkevold 2005).

Evolution phénotypique du lymphocyte T : Comme dans le thymus, la survie des lymphocytes périphériques est soumise à leur sollicitation par des peptides pertinents. Sans stimulus, la survie des lymphocytes T a été estimée à 26-28 jours (lymphocyte T CD4) et 17-19 jours pour les lymphocytes TCD8+ (Di Rosa 1999, Ferreira 2000, Labrecque 2001).

Le phénotype du lymphocyte change selon les engagements et son niveau de maturation (fig. 2.11). Le lymphocyte naïf (CD62L, CD45RA, CD27+, CD28+, CCR7+) rencontre le peptide pertinent dans le ganglion qui draine le site de l'infection ou d'exposition. Il est prépondérant dans le sang périphérique et les ganglions, notamment chez le jeune enfant et de moins en moins chez la personne âgée (Nociani 2000). Le lymphocyte naïf répond faiblement à une stimulation antigéniques. Si le contexte est favorable (contexte de « danger » -P Matzinger 2002-), le lymphocyte naïf est activé (CD69+, CD25+ puis plus tard, HLA DR+, CD38+), se divise (de 1 à 5 divisions -Oehen 1998-). Avec l'aide des lymphocytes T CD4+ (Hu 2000), le lymphocyte naïf acquiert un "phénotype "engagé" : (CD45RO, CD62L-, CD49d+, CCR5+ ; CD27+, CD28+ -Sallusto 1999, Kaech 2001, Le François 2002, Aandahl 2003-).

Figure 2.11 : Vie du lymphocytes en périphérie. Evolution phénotypique au cours de la maturation induite par la rencontre avec l'antigène pertinent.



Par la suite, l'expression de CD7, CD28 puis CD27 disparaît progressivement (Hamann 1999, Appay 2002, Tomiyama 2002, Day 2003). Les lymphocytes s'orientent vers un phénotype mémoire (CD7-, 28- 27- -Hamann 1997-). La molécule CD45, commune aux lymphocytes est modifiée, perdant ses domaines (A, B, C) distaux, spécifiques du stade immature (RA) et acquiert l'isoforme "mature" (RO – Ferrer 1992, Prince 1992, Bell 1998-). La maturation vers le phénotype mémoire nécessite la présence de T CD4+, d'IL-2 et IL-7 (Bevan 2004). Les lymphocytes mémoires s'activent plus rapidement (délai avant entrée dans le cycle : 12 heures - comparé à 27 heures pour le cellule naïve) et sont plus efficaces notamment en terme de cytotoxicité, production de cytokines régulatrices (Ahmed 1996, Zimmeran 1999, Rogers 2000, Veiga-Fernandez 2000, Landon 2000, Gray-Ahmadzadeh 2001).

Il existe deux types de lymphocytes mémoires (Table III). Les lymphocytes mémoires ‘effecteurs’ (T_{EM}) CD7- (Wallace 2000) ; CD27-CD28-) ont une réponse rapide et forte capacité proliférative (Macallan 2004). Les T_{EM} sont prépondérants sur les sites effecteurs. Les lymphocytes mémoires ‘centraux’ (T_{CM}) ré-acquièrent les capacités de migration vers le tissu lymphoïde (CD62L+ ; CCR7+ ; - Geginat, 2001, Faint 2001, Hengel 2003 -). La production de mémoires centraux requière la production d’IL-15 plus que d’IL-2 et la résolution de la cause d’activation sous forme de disparition de l’antigène (Tough 2003, Bevan 2004). L’IL-7 peut également jouer un rôle (Kaech 2003). Ils sont prépondérants dans le sang périphérique et les ganglions. Le lymphocyte mémoire central peut même ré-acquérir le phénotype CD45RA (« Revertant cells » –Nociani 1999). Ces derniers constituent le contingent mémoire à long terme (Salusto 1999, Masopust 2001, Weninger 2001). Cependant, il persiste un inflation des T mémoires avec le temps (Kaech 2003). La filiation entre les deux isoformes (T_{EM} et T_{CM}) est encore source de discussion, certains auteurs proposant qu’il s’agisse de deux voies parallèles (Noble 2002)

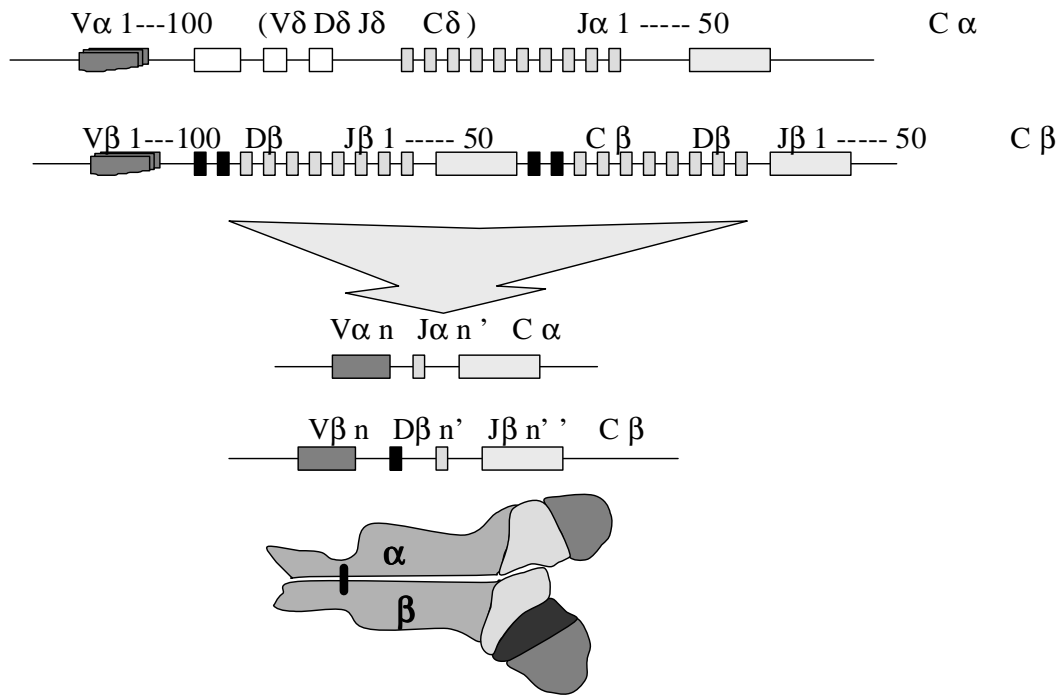
TABLE III : Phénotypage des lymphocytes T aux différents stades de maturité

	Naif	Rencontre Ag	Engagement	mémoire effecteur	mémoire centrale
CD62L	+	-	-	-	+
CCR7	+	+	-	-	+
CCR5	-	±	+	±	±
CD49 d	-	-	+	±	-
CD45	RA	RO	RO	RO	RA
CD7	+	+	dim	-	+
CD28	+	+	-	-	-
CD27	+	+	+	-	+
CD11a	bas	bas	haut	haut	haut
CD95	bas	bas	bas	haut	haut

Reconnaissance antigénique par le lymphocyte

Constitution de la diversité : La population lymphocytaire correspondant à la somme d’individualités aux comportements individuels, nous nous sommes intéressés à leur diversité. La partie hypervariable de chaque chaîne est constituée par recombinaison de fragments de gènes V (D) J (ré-arrangement –Davis M 1988 ; Nemazee 2000, Arstila 2000-),

Figure 2.12 : Bases génomiques de constitution de la diversité du récepteur T.



La spécificité des lymphocytes T, hautement diverse, est formée de façon stochastique par assemblages combinatoires de 3 segments VDJ (chaîne β) ou VD (chaîne α) comme les immunoglobulines (fig. 2.12). La spécificité de chaque lymphocyte (plus ou moins précise –Wilson 2005-) reste identique pendant toute sa vie contrairement aux lymphocytes B qui peuvent avoir des remaniements de leur séquence de la partie hypervariable du récepteur (Blish 1999). Le patrimoine génétique du lymphocyte T est donc plus stable.

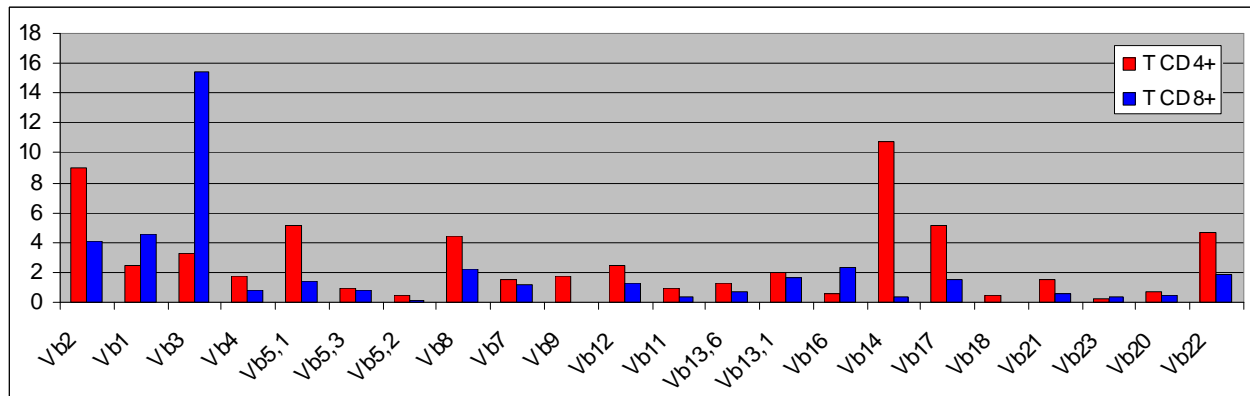
Les segments sont représentés en de nombreux exemplaires dans le génome (Table IV).

Table IV: Diversité des récepteurs d'antigène T (TCR). Nombre de séquences composantes la diversité des TCR ab et gd (M Davis, Nemazee, Arsilla)

	H	L	alpha	beta	gamma	delta
V	250-1 000	250	100	25 -100	7	10
D	10	0		2		2
J	4	4	50-100	12 - 20	2	2
Nombre de combinaisons possibles						
V(D)J	62 500		2500 - 10 000		70	
avec jonctions	10^{11}		10^{15}		10^{18}	

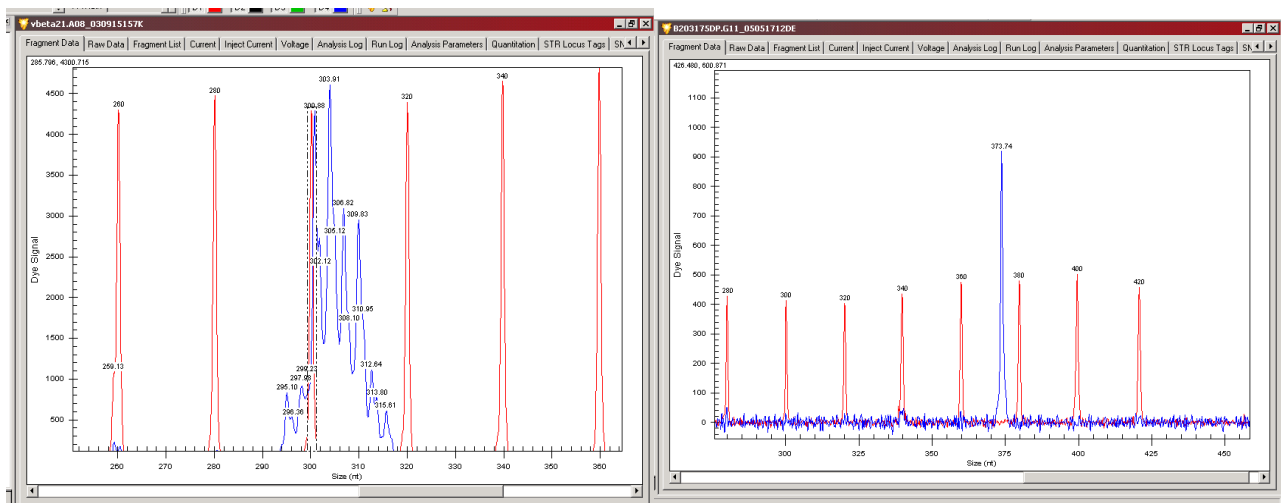
La combinaison est organisée par les « recombination activating gene » protéines RAG (Rag1 et Rag2) indispensables à la maturation des lymphocytes (Kranzel 2001). Un déficit d'expression d'une de ces protéines induit un déficit complet en lymphocytes T et B. La répartition d'expression des isotypes $V\beta$ peut être analysée par cytométrie en flux (fig. 2.13).

Figure 2.13 : Diversité ($V\beta$) du récepteur T CD4+ ou T CD8+ (protéomique) analysé par cytométrie en flux. Répartition différente pour les T CD4+ et T CD8+ chez des témoins sains.



La diversité peut être augmentée par l'adjonction aléatoire de 1 à 6 nucléotides à chaque jonction par l'action de l'enzyme « Terminal déoxynucleotidyl transferase » (Tdt). La longueur de la région varie selon le nombre de nucléotides supplémentaires (Cabaniols 2001) et peut être analysée par électrophorèse capillaire (Arstila 1999, Lim 2002 -fig 2.14-). Le nombre de combinaisons possibles a été estimé à 10^{15} (M. Davis 1988).

Figure 2.14 : Diversité du transcrite du récepteur T analysé par amplification du transcrite de la région CDR3 de la chaîne $V\beta$ (RT-PCR) : exemples de spectre polyclonal ou oligoclonal.



Sélection lymphocytaire : La production non déterministe de la diversité permet la production de tout type de spécificité avec le risque élevé de dysfonctionnements qui doivent être éliminés. Au réarrangement stochastique succède une très forte sélection (Chao 2004). La grande majorité des spécificités sont éliminées.

La première sélection se produit soit parce que le lymphocyte est "inutile", ne reconnaissant aucun ligand, soit parce qu'il en reconnaît avec une affinité trop faible pour permettre de générer le niveau de signal nécessaire à sa survie. Seuls les lymphocytes qui expriment un récepteur avec une affinité intermédiaire pour un ligand survivent (sélection positive).

Les lymphocytes avec une très forte affinité sont également éliminés, (sélection négative) évitant le risque d'induire des réactions excessives, inappropriées, et notamment de réagir contre des déterminants du soi ("To be usefull yet safe" ; Pamela Fink, 2000). La persistance de tels lymphocytes pourrait faire partie de mécanismes d'hypersensibilité (allergies, auto-immunité). La probabilité (chez la souris) d'échappement à la sélection est estimée à 10^{-11} (Muller 2003). Les lymphocytes qui ont survécu à cette sélection drastique finissent leur maturation thymique et se multiplient avant d'être libérés dans le sang périphérique.

Ligands naturels du TCR (objets de reconnaissance) : La très grande majorité des TCR $\alpha\beta$ reconnaît des déterminants polypeptidiques. Les déterminants antigéniques doivent obligatoirement être couplés à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) nommé Antigène Leucocytaire d'histocompatibilité (HLA) chez l'Homme (fig 1.5). Les molécules "classiques" du MHC sont de 2 types (table V) : Classes I et II. Les molécules de classe I sont présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme (Heinrichs 1990). Elles sont composées de 3 groupes : A, B, C. comportant chacun de nombreux allèles. Chaque cellule d'un organisme exprime 2 allèles par groupe (un par chromosome parental).

Table V : Allèles du complexes majeur d'histocompatibilité chez l'Homme

	MHC I			MHC II		
groupes	HLA A	HLA - B	HLA - C	HLA - DP	HLA - DQ	HLA - DR
nombre	26	35	14	4 A	13 A	57
				21 B	17 B	

Les molécules de classe II ont une expression restreinte à certaines cellules immunitaires : cellules présentatrices d'antigènes (APC) soit professionnelles (cellules dendritiques et les lymphocytes B) soit occasionnelles (lymphocytes T activés, cellules épithéliales périphériques). Les molécules de classe II comportent 3 groupes : DP, DQ, DR dont deux allèles sont exprimés par chaque cellule présentatrice.

Les deux groupes de molécules CMH sont hautement polymorphiques et la probabilité d'expression d'une même combinaison par deux individus non homozygotes est infime. Ces molécules composent l'identité immunitaire (antigènes du soi).

Les cellules dendritiques (DC) ont une forte capacité migratrice et de présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD4+. Les cellules sont d'origine médullaire (myéloïdes en majorité). Elle circulent dans le sang ou la lymphe (cellules voilées) sous forme très indifférenciée (CD34+, CD1a/b/c, CD11b/c, CD4+, HLA DR+, CD123 (IL-3 Rec) et CD209+ (DC-Sign). Elles ont une forte capacité de migrer dans les tissus (CCR1+ ; CCR5+, CCR6+, CXCR1+, CXCR2+) et peuvent acquérir des phénotypes spécifiques comme les cellules de Langerhans, cellules interstitielles...(table VI). Une capture d'antigène dans un contexte inflammatoire induit la maturation de la cellule dendritique (CD83+ ; molécules co-activatrices CD40+ et CD80/86+ ; molécules d'adhérence CD54+ et CD58+) et sa capacité de migration (CCR7, CXCR4) vers les tissus lymphoïdes secondaires (cellules interdigitées) très propices à l'activation lymphocytaire. Il existe des cellules dendritiques qui ont une origine lymphoïde (improprement nommées DC plasmocytoides) ou une origine non hématopoïétique (DC folliculaire dédiées à l'activation des lymphocytes B dans les follicules lymphoïdes. Enfin, les DC thymiques (corticales et médullaires) semblent également avoir une origine spécifique.

Table VI : Principales familles de cellules présentatrices d'antigène

	DC myeloïde		Langerhans	Cell interdigitées	Centres germinatifs	Plasmocytoïde
	immature	mature				
CD1a	+++	+/-	+			+
CD11b				+		
CD11c			+	faible	+	-
CD32	++	-				
CD14	-	-	Langerhine	-	-	-
CD54	+	+++				
CD80/86	-	++	+	+		+
CD83	-	+	+	+		+
CD40	+	+++	+	++	faible	faible
MHC I	++	++++				
MHC II	++	++++				
IL-12	-	++				
CD4					+	+
CD8				+/-		
Phagocytose	++++	-				
Stimulation	+	++++				

Rôle fonctionnel du MHC : le fonctionnement du système immunitaire d'un organisme dépend étroitement de sa capacité d'identification. Il distingue les molécules du soi, qu'il tolère et qui lui sont indispensables pour la réponse spécifique alors qu'il tend à détruire les éléments qu'il ne reconnaît pas comme partie du soi. Les molécules HLA sont liées au processus de reconnaissance des motifs antigéniques par le système immunitaire spécifique. Chaque molécule MHC a la capacité de se lier à un échantillonnage de peptides (de 8-10 AA pour la classe I et 14-18 AA pour la classe II) qu'il présente aux lymphocytes T (Busch 1998 ; Lim 2000 ; Wang 2002, Lippolis 2002, Hiltbold 2002). Le peptide se fixe de façon non covalente dans le sillon de la molécule MHC (formé par un plan β entre deux hélices α) par deux points d'ancrage à ces extrémités (Wang 2002). Ainsi, la composition de cet hétéro-complexe peptide- MHC (p-MHC) assure la double fonction des molécules du MHC : le peptide constitue le déterminant antigénique spécifique ; la molécule MHC constitue le déterminant du Soi.

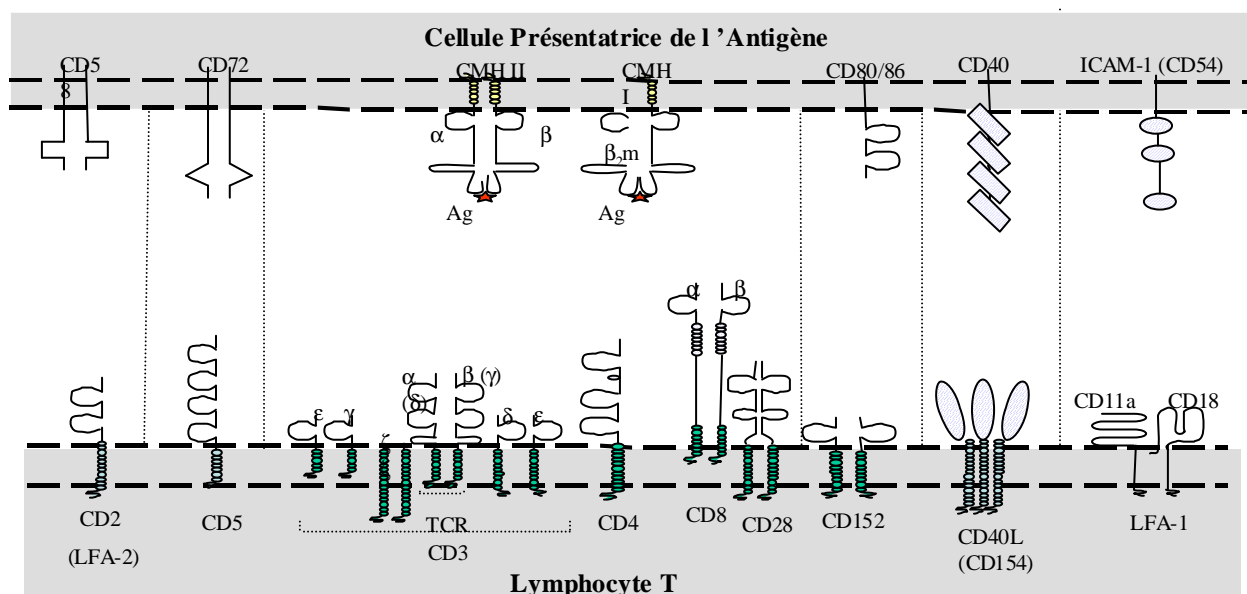
Tous les déterminants peptidiques des protéines naturelles ne sont pas reconnus (environ 10^{15} possibilités pour 10^{8-9} spécificités clonales dans l'organisme). Le nombre de peptides exprimé par des MHCI a été estimé chez la souris à $5 \cdot 10^6$ (Muller 2003). Les peptides immunisants sont sélectionnés notamment par le protéasome et la capacité de fixation au MHC (Mason 1995, Hiltbold 2001). Le lymphocyte ne reconnaît donc qu'une très petite fraction pour identifier une protéine complexe. Des peptides peuvent être communs à plusieurs protéines (réaction croisée). Des peptides proches peuvent être reconnus par le même TCR (réponse dégénérée –Wilson 2005-).

Ligands non classiques : Cependant, une petite fraction de lymphocytes T a la capacité de reconnaître des déterminants autres que les peptides (glycolipides, phospholipides...). Ces molécules sont alors présentées par des molécules non classiques du MHC (classe I) notamment le CD1 a, b, c et surtout d, MICA, MICB, Qa... (Heinzel 2002), Ces cellules ont des propriétés particulières, encore insuffisamment connues et qui seront évoquées plus tard.

Mécanismes de reconnaissance par le TCR : Le TCR se lie au p-MHC pertinent en position diagonale (Sette 1995). Le fragment CDR3 de la partie variable du TCR comporte la principale liaison avec le peptide, au centre. Le fragment CDR1 lie la partie N terminale de la chaîne α et C terminale de la chaîne β du MHC. La région CDR2 se lie à l'hélice α de la chaîne α du MHC (Liu 2000, Reiser 2002, Wang 2002). L'affinité de liaison du TCR à son ligand est très faible (Matsui 1991, Manning 1999). La liaison spécifique doit durer suffisamment longtemps pour permettre une activation efficace du lymphocyte (Kundig 1996, William 1999, Bousso 1999, Pacini 2000, Kalergis 2001). Les TCR engagés sont éliminés et le nombre de TCR à la surface du lymphocyte T baisse rapidement au cours de la reconnaissance de l'antigène (Valitutti 1997) malgré la présence d'une réserve (Mcneil 2003). La liaison avec son ligand entraîne un changement conformationnel du TCR (Lee 2004).

Des molécules accessoires consolident et prolongent cette liaison (fig. 2.15) :

Figure 2.15 : Molécules impliquées dans la coopération entre lymphocyte T et cellule présentatrice.



Molécules accessoires : L'engagement, non obligatoire, d'autres molécules peut influencer la réaction cellulaire qualitativement « hypothèse des doubles signaux » (Chambers 2001) le CD28 (exprimé sur les T naïfs et centraux) est requis pour l'activation de cellules naïves alors que le CTLA-4 induirait plus volontiers une anergie (Ledbetter 1990, Azuman 1993, June 1994, Kuiper 1994, Bachmann 1996, Van den Merwe 1997, Edmead 1997, Salazar-Fontane 1998, Gett 2000, Bromley 2001). Les deux molécules se lient « indifféremment » aux deux molécules B7.1 et B7.2 (CD80 et CD86). Le CD28 aurait une plus forte affinité pour B7.2 et CTLA-4 pour B7.1 (Margulies 2003, Linsley 1999). L'engagement du CD28 peut réduire le délai d'activation et la quantité de peptide requis (Viola 1996, Gett 2000, Lezzi 1998, Gascoigne 2004) et amplifier plus de 100 fois le signal (Lezzi 1998). La CTLA-4 n'est pas présent sur la membrane de la cellule au repos et est induit au cours de l'activation, particulièrement au centre de la synapse et pourrait avoir un effet régulateur de la réponse (Margulies 1997, Chikuma 2002).

La molécule CD40L (expression sur les T induite par activation) pourrait induire une activation de la cellule présentatrice en liant le CD40 (exprimé constitutivement sur les APC -Howland 2000, Lefrançois 1999).

Le CD28 serait requis pour les stimulations de faible intensité et notamment les infections prolongées et une activité de type Th2 (King 1995) alors que le CD40L favoriserait la production d'IFN γ et l'activité Th1 (Bachmann 1998).

Le CD5, en liant le CD72 aurait une activité régulatrice, notamment sur la différenciation des lymphocytes activés (Zhou 2000, Azzam 2001, Smith 2001). L' $\alpha 4\beta 1$ se lie au VCAM-1.. La molécule CD95 fortement exprimée sur les cellules T matures pourrait limiter le niveau d'activation en induisant l'apoptose de la cellule présentatrice. Le CD9 (exprimé sur les lymphocytes matures) pourrait favoriser l'induction d'apoptose plutôt que la production d'IL-2 (Tai 1997). Quand la cellule présentatrice est un lymphocyte B, la molécule CD23 lie le CD21. Le rôle de cette liaison n'est pas encore clairement élucidé.

Chaque récepteur possède des constantes d'affinité différentes (table VII).

Table VII : Affinités comparatives de molécules impliquées dans la reconnaissance de l'antigène (p-MHC) par le lymphocyte T (Krummel, 2000)

Recepteur T	PM	Locus	Ligand APC	Chromosome	k on **	k off /sec	Phosphorylation	Transduction
TCR			p-MHC		0,85-25	0.01 - 0.25	non	non
antagoniste					3,4	4,95		
agoniste faible					1,5	0,36		
agoniste fort					0,9	0,57		
CD3 γ	25	11q23					ITAM	p56lyn
CD3 δ	20	11q23					ITAM	p56lyn
CD3 ϵ	20	11q23					ITAM	p56lyn
CD3 ζ	16	1q22					ITAM x3	p56lyn
CD3 η (souris)	22						ITAM x4	p56lyn
CD4	55	12p12	MHC II $\beta 2$		nd	nd	oui	p56lck
CD8 α	33	2p12	MHC I $\alpha 3$		1,2-100	0.05 - 18	oui	p56lck
CD8 β	33	2p12	MHC I $\alpha 3$					
CD28	40 x 2	2q33	CD80/CD86	60 3q21	660	1.6	oui	
CD152 (CTLA 4)	33	2q34	CD80/CD87		940	0.43	oui	
CD154 (40L)	33 x 3	Xq26,3	CD40	48 20q12			oui	
CD2 (LFA-2)	50	1p13	CD58 (LFA-3)		400	4		
CD11a-	180	18p11						
CD18 (LFA-1)	95	21q22,3						Talin
ICAM-1								
CD5	67	11q13	CD72	43-39 x2 9p				
CD7	40	17q25						
CD45			CD22					Photase
CD62 L					200	10		

* Grakaoui

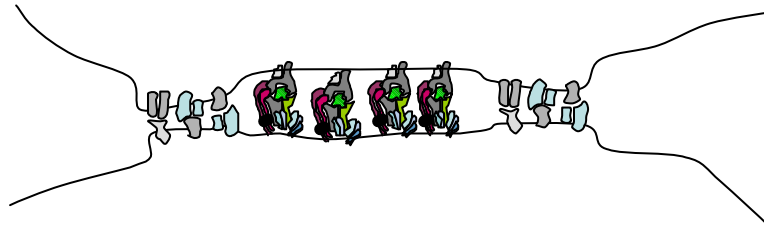
** x103 /MxSec

nd : non disponible

Molécules d'adhérence et synapse : La liaison p-MHC – TCR-CD4/CD8 reste malgré tout très brève (de 2 à 30 secondes –Davis M 1995-) et nécessite d'être prolongée plus longtemps (jusqu'à 15 à 60 min en moyenne) pour permettre l'accumulation suffisante de signal cytoplasmique (Lezzi 1999, Lanzavecchia 1999). Des TCR doivent être stimulés en nombre minimum pour atteindre le seuil

d'activation du lymphocyte (Labrecque 2001). Des molécules d'adhérence sont mises en oeuvre pour maintenir un contact proche entre le lymphocyte et la cellule présentant l'antigène sur une portion de leur surface (10 à 20% de la surface totale) : notamment les molécules d'adhérence CD2 qui se fixent sur leur ligand l'APC (LFA-3 ou CD58 ; CD48 ; CD59 -Green 2000, Sassada 2001, Yang 2001, Lanzavecchia 2001, van den Merwe 2002-); ICAM 1, 2 ou 3 qui se lient à LFA-1 (Dustin 2001). Cette zone de proche contact est nommée **synapse** par analogie à la structure neurologique (Grakoui 1999, Lee 2002, Dustin 2002, Wetzel 2002). La synapse se constitue en 3 à 5 minutes et peut durer 150 min (fig. 2.16 - Lanzavecchia 2001, Dustin 2001).

Figure 2.16 : Construction de la synapse immunologique entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice.



La synapse crée un micro environnement propice à l'activation lymphocytaire par rapprochement des récepteurs entre les deux cellules (SMAC Supramolecular Activation marker –Davis DM 2004-). De plus, alors que les molécules d'adhérence s'organisent en périphérie de la synapse, les TCR, CD4/8 et molécules co-activatrices se rassemblent progressivement au centre de la synapse (Dustin 1999, QI 2001, Brossard 2005). Les cytokines produites et éventuels facteurs cytotoxiques sont préférentiellement produit dans le volume restreint de la synapse (Davis SJ 2001).

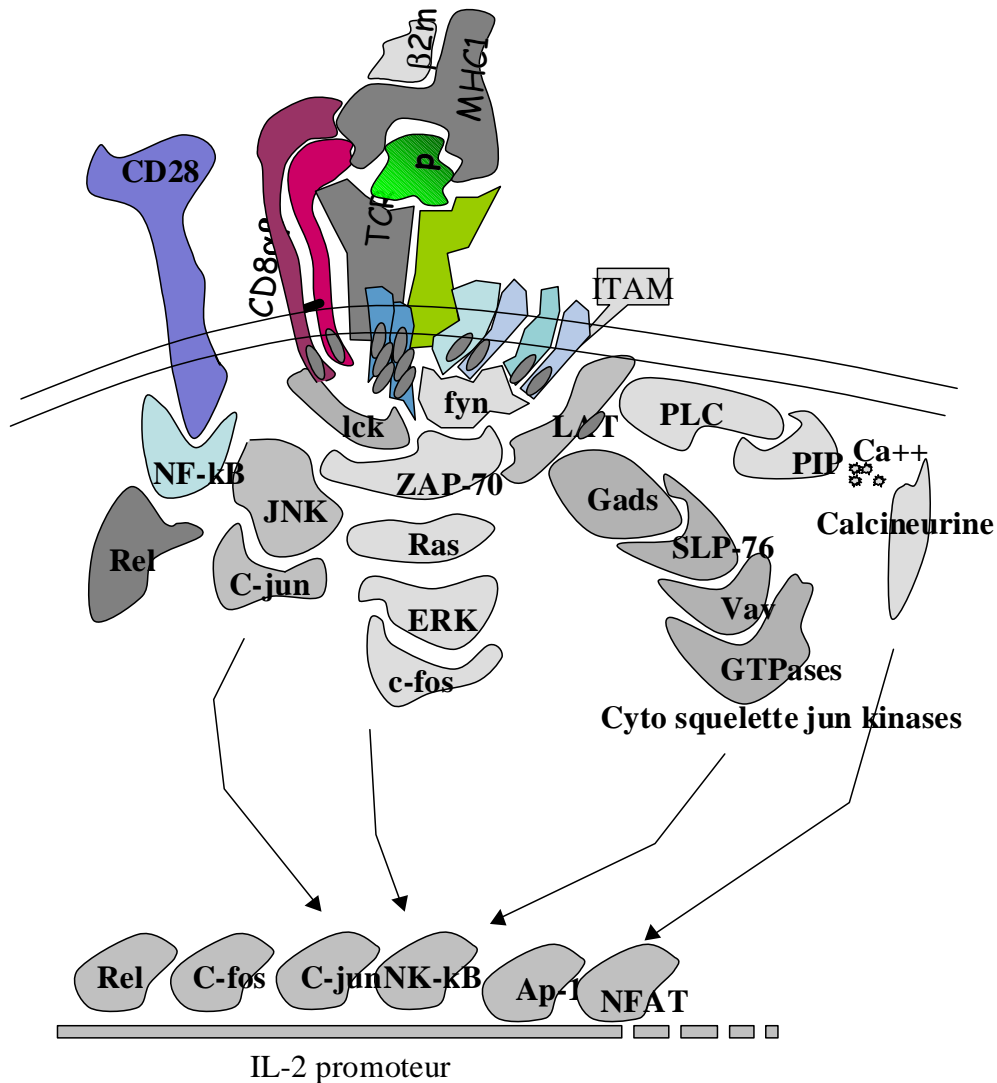
La formation synaptique permet donc de rapprocher des structures membranaires (lipid raft) et cytoplasmiques (séquences ITAM, tyrosines kinases) impliquées dans le mécanisme de transduction du signal (Lee 95, Hiltbold 2003, Lee 2002, Nel 2002 I et II, Krogsgaard 2003-). Le CD45 qui a une activité phosphatase régulatrice est repoussé vers la périphérie.

La formation de la synapse est requise pour l'activation mais aussi l'engagement de lignée (Maldonado 2004) ou la cytotoxicité (Davis SJ 2001).

Transmission du signal : La liaison du TCR au peptide pertinent entraîne l'activation du CD3 qui, par un mécanisme très complexe et redondant, va aboutir à l'activation de la cellule (Cantrell 1998, Germain 1999, Ehrlich 2002, Glimcher 2004) selon l'état fonctionnel de la cellule T (Gett 2003).

Résumé brièvement (fig. 2.17), les kinases de tyrosine de la famille syk (Lck et Fyn) induisent la phosphorylation des fragments cytoplasmiques ITAM du CD3. Chaque chaîne CD3 possède un motif ITAM sauf la chaîne ζ qui en exprime 3). La phosphorylation par les protéines Syk active alors la protéine Zap-70 (Lee 2002, Minami 1987). Les molécules CD4/CD8, qui possèdent aussi un motif ITAM cytoplasmique (Arcaro 2001), amplifient la phosphorylation du CD3 par l'intermédiaire de la tyrosine kinase p56^{lck} qui interagit directement avec ZAP-70.

Figure 2.17 : Transmission du signal induit par la liaison spécifique du TCR au ligand p-MHC pertinent. Induction de phosphorylation des motifs ITAM des molécules CD3 jusqu'à l'activation des facteurs nucléaires qui déclenchent la lecture des gènes d'activation (CD69, IL-2, IL-2 récepteurs..).



La phosphorylation des récepteurs membranaires entraîne l'attraction et l'activation de la molécule Zap-70 qui, à son tour, active des kinases de la famille Tec. Ces processus en chaîne ont un effet d'auto-amplification et induisent l'activation des adaptateurs (LAT, SLP-76, vav, Rac, c-Cbl, p62dok..) et enzymes (Phospholipase C, Calcineurine A –cible de la cyclosporine et du FK506-..). L'activation se poursuit par les cascades de GTPases, mitogène activated protein kinases (MAPK), Phosphatidyl Inositol 3 kinases (PI-3k)... La combinaison complexe de ces cascades concourt à l'activation de régions de régulation des gènes par les facteurs de transcription (c-fos, c-jun, NFAT, NF-κB, AP-1...) avec des effets variables (stimulation, apoptose...) selon le contexte. Le CD28 amplifie le signal et l'oriente vers l'activation (MEKK2 – JNK, p38 et NF-κB) plutôt que l'apoptose (c-myc). Les facteurs STAT4, JNK2, p38 favorisent l'activité de type Th1 alors que les STAT6, GATA-3, NFATc, cEBP, c-MAF..) favorisent l'activité Th2 (Glimcher 1999).

Interleukine 2 : La survie de la cellule et peut-être son entrée dans le cycle nécessitent la présence d'Interleukine-2 (Cantell, 1984 ; Perkins 1993, Chakrabarti 1999) ou de son homologue IL-15 (Li 2001). Pendant l'activation, le lymphocyte exprime très rapidement de l'IL-2 et son récepteur (après 72 à 96 heures). L'expression du récepteur la rend sensible à l'interleukine et est le facteur limitant de la réponse cellulaire T (Lezzi 1999). L'intensité d'expression du récepteur est proportionnelle à son degré d'activation. La capture et internalisation de l'IL-2 couplé à son récepteur sont nécessaires pour l'activation cellulaire (Duprez 1992). Il peut utiliser directement l'IL-2 qu'il sécrète (autocrine) mais une production externe survient par activation d'autres lymphocytes proches (Perkins, 1993).

Cinétique p-MHC : L'antigène est rapidement capturé par les cellules macrophagiques. Ces cellules migrent vers le ganglion le plus proche et mûrissent en cellules présentatrices d'antigène. Les délais de présentation sont assez courts (environ 24 heures –Langenkamp 2000, Miller 2004). Probablement du fait de la compétition entre peptides de différentes natures, le nombre de molécules impliquées dans la présentation du peptide spécifique est environ 0.1% des molécules disponibles à la surface de la cellule (en moyenne 200 000 molécules par cellule Harding 1990) c'est-à-dire 1000 à 2000.

Un lymphocyte T scanne les cellules dendritiques qu'il rencontre jusqu'à reconnaissance d'un peptide pertinent. La durée de scanning a été estimée à 5 min chez la souris et environ 4000 DC sont scannées (Miller 2004).

La majorité des p-MHC est engagée dès les 5 premières minutes de la rencontre avec le lymphocyte spécifique (Grakaoui 1999). La présentation des p-MHC reste stable pendant une durée moyenne d'activation. Cependant, les cellules présentatrices ont une courte durée de vie (environ 100 heures) et meurent dans les 48 heures après leur reconnaissance par le lymphocyte T (Lanzavecchia, 2000).

L'apoptose des APC peut être induite par liaison du p-MHC avec le TCR (Drénou 1999, Vlad 2005). Ceci représente un mode de régulation de la réponse Immunitaire.

Cinétique d'activation lymphocytaire : Le processus d'activation lymphocytaire joue un rôle fondamental dans les différentes étapes de production, sélection, et maturation du lymphocyte. Au cours de l'ontogenèse, la reconnaissance d'un ligand substitutif (peptide du soi) détermine la sélection d'allèles codant le TCR, et de survie / prolifération de la cellule. La quantité théorique de peptides de substitution (self-peptides) a été estimée à $3 \cdot 10^7$ chez la souris (Muller 2003). En périphérie, la rencontre de l'antigène pertinent détermine la survie, l'expansion clonale (pour les clones les plus adaptés) et la persistance mnésique.

Si le signal cytoplasmique induit par la reconnaissance du complexe p-MHC atteint un seuil suffisant pendant un temps limité, le lymphocyte entre en cycle de prolifération qui déclenchera des divisions (prolifération) et sa maturation. L'effet de la reconnaissance dépend donc directement de la cinétique de liaison, très variable selon le peptide présenté (Valitutti 1995 ; Souza 2000). L'affinité du TCR (Valitutti 1995, Salzman 1998 ; Rosette 2001, Kersh 2001, Wang 2002, Krummel 2002, Jäger 2002, Dutoit 2002) pour le complexe p-MHC est très faible ($k_{on} : 10^5/M/sec$) et la constante de dissociation très rapide (0.02/sec Corr 1994). Ces variables cinétiques ont pu être déterminées pour quelques molécules par méthode de résonance de plasmon (ex Biacore®) et sont résumées dans la table VI. La liaison avec le complexe p-MHC est très brève : 1/2 vie d'environ 35 sec (Lord 1999).

La nature des peptides a un rôle important pour la qualité de la réponse (rapidité, amplitude) immunitaire qu'ils induisent (Margulies 1997, Madrenas 1999, Manning 1999, Kumar 2001). En fait, l'avidité de reconnaissance semble au final plutôt influencer sur la qualité de la réponse (ex choix de lignée T4/T8, orientation fonctionnelle Th1/Th2) tout en gardant un avantage de compétition (Kassiotis 2003). Des peptides peu différents (par substitution d'un seul acide aminé) peuvent modifier les constantes cinétiques de telle façon que le peptide peut ne plus être stimulant (antagoniste –Grakoui 1999-).

Effets durée et doses de l'antigène : Le degré d'activation dépend de la concentration de l'antigène (Korb 1999, Savage 1999, Rosette 2001, DiPaolo 2002). Pour atteindre le seuil de signal suffisant pour déclencher la prolifération du lymphocyte (Langenkamp 2002), un nombre minimal de peptides (estimé à 100-1000 par cellule) doit être présent (Demotz 1989, Christinck 1991, Harding 1996, Valitutti 1996, Grakoui 1999,). De 10 à 50 peptides par synapse sont nécessaires pour activer un lymphocyte T CD8+ et 50 à 100 pour le T CD4+ (Irvin 2002). Chaque peptide spécifique représente moins de 1% des divers peptides exprimés à la surface de l'APC. Un nombre de peptides trop petit ou des peptides à faible affinité (peptide antagoniste) peuvent avoir un effet inverse sur l'activation du lymphocyte T (anergie - Korb 1999, Grakoui 1999, Kersh 2001-). La concentration des peptides module le niveau (nombre) d'activation des lymphocytes mais non pas le nombre de divisions (Lee 2002).

L'activation doit durer au moins 20 heures pour être efficace sur les lymphocytes T naïfs alors qu'une heure est suffisante pour les lymphocytes mémoires (Lezzi 1998). La présence du peptide n'est nécessaire que dans les premières étapes d'activation des lymphocytes T effecteurs et mémoires (Lee 2002). La persistance du peptide est requise pour une expansion clonale (Lefrançois 2003). Ceci explique la plus forte réponse aux vaccins vivants inactivés comparés aux vaccins tués ou antigènes purifiés.

L'implication d'une molécule de co-activation (CD28) permet de réduire considérablement concentration minimale de peptides (1/5 à 1/8) ou la durée nécessaire pour la stimulation (Lezzi 1998). Mais, la plupart de ces études cinétiques de cellules spécifiques *in vivo* ont été pratiquées dans des conditions très artificielles, chez la souris, en utilisant des lymphocytes transgéniques pour le TCR.

Disponibilité des TCR membranaires : Le TCR est exprimé en densité très stable à la surface du lymphocyte au repos (25-35 000 TCR par cellule). Il semble en fait que les TCR suivent un cycle permanent à la surface de la cellule avec des internalisations et réexpressions. Le total des TCR est recyclé en environ 1 heure (Liu 2000, Favier 2001). Une petite fraction est éliminée mais remplacée par une production constante (1.4 à 2.3%, Liu 2000).

En cas de liaison à un ligand pertinent, les TCR (et CD3 qui lui sont associés) qui ont été utilisés sont éliminés du cycle de renouvellement (Ginaldi 1996, Dietrich 2002), conduisant à une décroissance de la densité membranaire du complexe TCR-CD3 (Valitutti 1997, Lee KH 2003). La décroissance a une demi-vie de 15 à 30 secondes et atteint un plateau dans les 3 heures (Valitutti 1995). Elle persiste 5 à 8 jours (Viola 1996). Ce phénomène a été utilisé pour mesurer la cinétique d'activation du lymphocyte (Valitutti, 1995 ; Viola, 1997 ; Jäger, 2002). La décroissance est spécifique de l'engagement sur le p-MHC. Par exemple, en cas de double TCR, seul le TCR impliqué est éliminé (Padovan 1995). Elle est corrélée à l'affinité du TCR pour le complexe p-MHC (Kim 1996). La cinétique de renouvellement ne semble pas modifiée par l'activation mais le taux de renouvellement (synthèse) du TCR peut être triplée (Von Essen, 2004). Par contre, des TCR sont recrutés de toute la surface du lymphocyte (Edinger 2003, Dustin 2004). Le mode de reconnaissance sont très variés (Friedl 2002).

Les autres molécules CD4 et CD8 sont étroitement liés à l'expression du TCR au cours des mouvements de membrane (« co-capping » -Biselli 1992, Carruso 1997-). Elles sont également consommées au cours du processus de reconnaissance suivant la cinétique du TCR-CD3 (Viola 1997, Cawthon 2002).

De nombreux TCR sont engagés simultanément. Les TCR consommés peuvent être remplacés par recrutement de TCR hors synapses (Shaw 1997, Geisler 2004). La disponibilité de complexe p-MHC peut être limitante. Le nombre de peptides pertinents peut être augmenté par recrutement au sein de la

synapse (Hiltbold 2003). De plus, plusieurs (de 10 - 200) TCR peuvent lier le même complexe p-MHC successivement (« serial engagement » - Valitutti 1995, Davis M 1995 ; Hudrisier 1998, Itoh 1999, Borovski 2002-) bénéficiant de la synapse.

Un nombre suffisant de TCR doit être activé (Tanchot 2001, Bitmansour 2002). Un minimum de 8 000 TCR membranaires (1000 avec engagement du CD28) est requis (Viola 1996 ; Lanzavecchia 1999). Si le nombre initial de TCR engagés est insuffisant, le processus d'activation peut échouer avant d'atteindre le point de non retour vers l'entrée dans le cycle. La consommation (inefficace) de TCR peut le mettre dans un état réfractaire en attendant la reconstitution du nombre nécessaire. L'anergie peut persister 7 à 21 jours (Foulds 2002).

Phénotypes d'activation lymphocytaire : Au cours de l'activation, les lymphocytes acquièrent des molécules de surface le CD69 (Mardiney, 1993 ; Rosette 2001, Wallace 2004) et le CD25 (chaîne alpha du récepteur d'IL2 (Smith 1989), HLA-DR et CD 38 notamment (Biselli 1992, Carruso 1997). Les CD69 (Marzio, 1999, D'Ambrozio, 1993) et CD25 jouent un rôle d'amplification dans le processus d'activation et sont nécessaires à la survie et éventuellement à l'entrée dans le cycle du lymphocyte. Le CD69 est une lectine calcium-dépendante fixant des ligands carbohydrates ubiquitaires (Bezouska 1995). Il apparaît dès 16-18^H d'activation et persiste 1 à 2 jours. L'IL-2 est produite dans les 24-48 heures (Burke 1997). Des données récentes suggèrent que la production individuelle in vivo soit encore plus précoce (6-8 heures Sojka 2004). Le CD25 apparaît après 72 à 96 heures d'activation et persiste 2 à 3 jours (Nakamura 1989). Le HLA DR et le CD38 apparaissent plus tard et persistent plus longtemps (Liu 2001). Le rôle du CD38 dans l'activation n'est pas élucidé.

Dynamique de la population lymphocytaire

La population lymphocytaire T $\alpha\beta$ est estimée à 10^{10} à 10^{12} dans un organisme de 70kg (Pakker 1998, Sprent 1994). Environ 0.01 à 1.4% des lymphocytes sont renouvelés chaque jour ce qui correspond à une production journalière de 10^8 à 10^9 (10^9 dans la reconstitution de lymphopénie induite par VIH –Wei 1995, Ho 1995-). La population T garde une très grande diversité, estimée à 10^9 - 10^{10} spécificités différentes par personne (Davis M 1995).

La représentation de chaque individualité au sein de la population lymphocytaire dépend donc de la diversité initiale, fortement sélectionnée mais varie constamment dans le temps en fonction des sollicitations extérieures. Du fait des sollicitations permanentes de l'organisme, par le milieu extérieur ou saprophyte, de nombreuses spécificités sont sollicitées successivement. En l'absence de régulation drastique, ces expansions cumulées pourraient conduire à une importante inflation de la population globale ou de certains de ces clones.

Dynamique d'un clone stimulé par un antigène : La reconnaissance efficace d'un antigène conduit les lymphocytes T concernés à une entrée en cycle et à une prolifération importante (Callan 1996). Si le signal est suffisant, les lymphocytes T CD8⁺ entrent en cycle de division après environ 36-60^h avec un maximum au 3-4^{ème} jour (Hasbold 1999, Gett 2000, Foulds 2002, Lee 2002). Il s'ensuit 6 à 8 divisions (nombre x64 à x256) pour les T CD8⁺ ; pouvant atteindre éventuellement 15 divisions (10⁴ cellules en 7-8 jours (Hasbold 1999, Bevan 2004). Le nombre de divisions reste relativement constant (Lanzavecchia 2000). Pour des raisons inconnues les lymphocytes T CD4⁺ ont une cinétique de prolifération plus faible : 3 à 5 divisions pour les T CD4⁺ (nombre x 8 à x 32), délai de première division supérieur (48-72 h), prolifération maximale à 8 jours (Foulds 2002) et sont moins résistants. Inversement, les T CD4⁺ sont moins sensibles à l'apoptose induite par l'activation (Maini 1998). Chaque nouvelle division dure environ 8 à 10 heures (Lanzavecchia, 2000, Schrum ; Gett 2000). La présence du peptide n'est pas requise après l'induction initiale (1-2 heures pour les lymphocytes mémoire (Lee SJ 2002). La population concernée croît pendant 7 à 10 jours et commence à décroître ("contraction") après 11 jours. L'activation étant généralement suivie de la mort cellulaire (« activation induced cell death » Callan 2000). La fréquence des lymphocytes T spécifiques ne dépasse généralement pas 1-2% des lymphocytes circulants (Di Paoli 1993, Mollet 2000, Belz 2001, Davenport-Calina 2002, Appay 2002). En cas de nouvelle sollicitation, la croissance est plus précoce (pic à 5-7 jours) et plus intense (Ahmed 1996, Zimmerman 1999, Badovinac 2000, Roger 2000). La cinétique mais aussi la qualité de réponse dépendent de la durée d'exposition à l'antigène (Roger 1999). Des expansions oligoclonales sont possibles (Maini 1999) Ainsi, des vaccinations à germes vivants atténués induisent une plus grande réponse qu'avec des germes inactivés (Lefrançois, 2003).

La fraction de cellules spécifiques représente alors moins de 1% de la totalité des lymphocytes T circulants (Lefrançois, 2003). La stimulation expérimentale de lymphocytes par infection à un virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) entraîne une très forte expansion (d'une centaine de cellules initiales à 10⁷ après 1 semaine et 14 divisions successives). Le pool mémoire résiduel est réduit à 10⁵ cellules (Blattman 2002). La présence de lymphocytes T spécifiques d'un antigène tumoral (MART-1 de mélanome) a été trouvée à 0.7 ± 0.6 pour 1000 lymphocytes alors que la fréquence des lymphocytes spécifiques de la grippe (Influenza matrix) était de 3^{±5} pour mille (Pittet 1999). Des valeurs équivalentes ont été retrouvées pour le virus CMV (Bitmansour 2001) et étaient un peu plus élevées pour le virus EBV (1 à 4% -Hislop 2001)

Une très faible fraction de la population stimulée peut persister des décennies formant la mémoire immunitaire (Maini 1999). Ce phénomène est encore mal expliqué. La durée de vie d'une cellule immunitaire habituellement très courte (quelques semaines) peut être prolongée pour les cellules mémoires centrales dans un contexte environnemental particulier. La persistance de peptides d'intérêt a également été évoquée bien que le mécanisme n'en soit pas connu. Les peptides du soi pourraient

participer à cette mémoire antigénique. Quoiqu'il en soit, cette mémoire lymphocytaire est très minoritaire et difficile à évaluer par les moyens technologiques actuels.

Modifications qualitatives : Les propriétés de liaisons du TCR sont définitives contrairement aux immunoglobulines, la structure du TCR n'est pas influencée par l'environnement (Blish 1999). Par contre, les expositions aux antigènes influent directement sur la dynamique de population, favorisant les spécificités les plus concernées aux dépens des autres (expansion sélective, -Busch 1999-). Les lymphocytes T CD8+ sont en compétition pour entrer en contact avec le p-MHC et les spécificités qui ont la meilleure affinité seront stimulées en priorité, favorisant certains épitopes (dominance d'épitope) et certains récepteurs (maturation d'affinité) lymphocytaires (Kedke 2000).

En absence de stimulation antigénique (expérimentale, chez la souris), le renouvellement homéostatique des lymphocytes est plus lent et moins intense : T CD4+ 1 seule division, T CD8+ 3-4 divisions (Feirrer 2000).

Homéostasie lymphocytaire : L'espace disponible pour les lymphocytes étant constant au cours de la vie, des mécanismes sont en place pour réguler leur production et prolifération en fonction de l'encombrement spatial (« space sensing » Jameson 2002, Freitas 1999).

Homéostasie régulatrice : La très forte prolifération des lymphocytes sollicités crée un déséquilibre de l'homéostasie lymphocytaire. Des mécanismes de maintien du volume total (homéostasie) entraînent une décroissance compensatrice de certaines spécificités moins sollicitées. Après la résolution de la cause de cette extension (ex : infection..), la prolifération est rapidement réversible (Tanchot 1997). Les clones impliqués subissent une "contraction" naturelle pour revenir à une représentation faible bien que légèrement supérieure au niveau initial. En absence de nouvelle sollicitation (rappel), le clone continue à décroître doucement avec le temps (Badovinac 2002).

Les mécanismes ne sont pas encore clairement élucidés. Les mécanismes d'activation pourraient être auto-limitants du fait de la courte disponibilité du peptide pertinent, la saturation de récepteurs, la compétition entre les ligands pour des récepteurs communs, la production de récepteurs solubles... Les lymphocytes T régulateurs pourraient jouer un rôle important (Almeida 2005). La décroissance rapide doit alors être compensée par un comblement par les autres clones à moins qu'une autre stimulation apparaisse.

Un clone ne peut pas persister à taux élevé, pendant une grande période de temps si la sollicitation antigénique a disparue en dehors de prolifération autonomisée (syndrome lympo-prolifératif). La survie totale d'un lymphocyte T naïf CD4+ a été estimée à 78 jours et 162 pour les T CD8+ (Polic 2001). La survie est réduite à 48 et 16 jours respectivement si le TCR n'est pas exprimé expérimentalement (mimant l'absence de stimulation). La sénescence lymphocytaire semblant

inélucltable après 35 cycles de division (Davenport-Callan 2002). La fréquence de lymphocytes spécifiques naïfs a été estimée à 10^{-6} alors que les cellules spécifiques mémoires, résiduelles après expansion et contraction peuvent atteindre 10^{-4} à 10^{-3} (Dunbar 2000, McMichael 2001, Pittet 2002) ce qui correspond à environ 10^7 ou 10^8 cellules dans l'organisme (Dunbar 2000).

Homéostasie compensatrice : Inversement, en cas de lymphopénie ou d'absence de stimulus, une expansion spontanée se produit pour maintenir un taux de « remplissage » optimum. Nous avons déjà mentionné que la production thymique peut être augmentée mais il semblerait que la majeure compensation se produise au niveau des tissus lymphoïdes secondaires (Dummez 2001), notamment de « niches » où l'environnement est particulièrement favorable (Khaled 2002). Les mécanismes ne sont pas clairement compris. La survie des lymphocytes est fortement compromise en absence d'antigène, particulièrement les T CD5+ (Ferreira 2000). Le TCR peut être impliqué mais les molécules co-activatrices ne sont pas requises (CD28, CD40... -Prlic 2001-). Les lymphocytes pourraient acquérir une plus grande sensibilité aux peptides du soi et aux antigènes périphériques (Fry 2001, Plas 2002, Kieper 2004, Almeida 2005) par baisse de leur seuil d'activation (Marleau 2005) maintenant la prolifération de certains clones, même au stade de mémoire (Schuler, 2004). La production de facteurs de croissance semble importante, notamment d'IL-7 pour les lymphocytes naïfs et T CD4+ alors que l'IL-15 serait plus active sur les lymphocytes cytotoxiques (T CD8+, NK et $T\gamma\delta$ -Marrack ; Prlic 2002-). En cas de lymphopénie aiguë importante, une prolifération active rapide, indépendante d'IL-7 est observée (Min 2005).

Au cours de la croissance, la production thymique est importante pour adapter le nombre de lymphocyte nécessaire (Tanchot 1997). La compensation peut également être observé dans les reconstitutions immunes par exemple au cours du traitement du SIDA (Appay 2002, Hatzakis 2000). Inversement, les mécanismes d'homéostasie peuvent être utilisés pour augmenter la réponse dans les traitements par transfert cellulaire, en favorisant la multiplication des cellules transplantées (Baccala 2005)

Une production homéostatique, non déterministe, pourrait être à l'origine de trouble dysimmunitaire en permettant à certains clones indésirables de proliférer - notamment un déséquilibre entre les stades de maturité. Ce mécanisme pourrait expliquer l'immuno-sénescence (restriction de diversité croissante avec l'âge, augmentation de dysimmunité -Le Maoult -) et l'augmentation du risque des désordres auto-immuns chez les immunodéprimés (King 2004 ; Morell). Il a été démontré que seule une partie (30%) des lymphocytes était sensible à la prolifération homéostatique (Suh). L'abaissement du seuil d'activation pourrait être un mécanisme de prévention de la prédominance d'un petit nombre de clones (oligoclonal) en élargissant le nombre de spécificités stimulées (Marleau 2005) et la compétition clonale (Troy 2003). De plus, il semblerait que la régulation soit restreinte à chaque compartiment T naïfs, T

matures, B et T $\gamma\delta$ permettant de maintenir un équilibre (Freitas 1999, Tanchot 1997). Par exemple ; la prolifération homéostatique ne permet pas la maturation de cellules naïves en cellules mémoires (Tanchot 1997). Par contre, ces mécanismes peuvent dépasser le clivage T CD4/ T CD8 permettant une lymphocytose T CD8 compensatoire dans la lymphopénie T CD4 induite par VIH.

Sociologie lymphocytaire : L'analyse quantitative globale de la population lymphocytaire n'a donc pas grande signification. Les variations quantitatives significatives n'apparaissent qu'à des stades tardifs quand les mécanismes de compensations sont dépassés. L'analyse de la population dans son ensemble ne peut pas refléter un désordre dont seul un petit groupe lymphocytaire minoritaire (oligoclonal ou monoclonal) peut être responsable.

La stimulation antigénique ne modifie pas la structure hypervariable des TCR mais les compétitions favorisent progressivement l'expansion des clones les plus performants et/ou utiles, surtout au cours des rappels, réduisant l'aspect la diversité de façon déterministe (Bouso 2000).

Compte tenu de son étendue, il est difficile d'analyser la diversité des TCR $\alpha\beta$. Deux moyens sont disponibles : une série d'anticorps solubles, spécifiques de la partie V de la chaîne β du TCR (24 anticorps disponibles) permet d'approcher leur distribution par cytométrie en flux (fig. 2.13). Pratiquement tous les isotypes peuvent être représentés sur les Lymphocytes T CD4+ (de 0.2 à 5% de lymphocytes T CD4+ en général). La distribution est plus restreinte pour les lymphocytes T CD8+ mais aucun pic n'est exprimé par plus de 10% des lymphocytes. La longueur de la séquence de la partie variable peut également être analysée par électrophorèse capillaire sur séquenceur après RT-PCR pour chaque chaîne V β (Cabaniols, 2001, Arstila, 1999). Elle est habituellement répartie en 6 à 9 pics, répartis de façon gaussienne représentant les différents nombres de nucléotides jonctionnels ajoutés (fig.2.12). Une restriction de diversité peut être observée sur des sites inflammatoires (Polymyosite - Nishio 2001).

La détection de clones spécifiques est maintenant possible avec les techniques de polymères de molécules MHC (Pittet 1999, Dunbar 1998).

Inversement, la détection d'un groupe lymphocytaire très homogène (peut-être monoclonal) persistant (plus de 6 mois) au sein d'une population aussi diverse doit avoir une signification.

Conclusion : Les lymphocytes ont des caractères phénotypiques très stables, en qualité et en densité, en dehors de sollicitation physiologiques. Seuls les récepteurs « utiles » sont exprimés et chaque marqueur de surface a une signification physiologique. La modification de densité ou une expression ectopique d'un marqueur doivent donc avoir une signification sur une sollicitation en cours ou récente et sur un risque de dysfonctionnement. Inversement, il est possible que des sous-types fonctionnels particuliers restent à identifier.

La population lymphocytaire est hautement diverse, adaptative, en perpétuel remaniement (plasticité) selon ses sollicitations. L'étendue de la diversité reflète l'étendue du spectre antigénique auquel le système peut réagir. Une réduction de diversité peut être due à un trouble immunitaire actuel ou passé et peut signifier une fragilité face à un environnement agressif. La détection d'un clone prédominant à plus de 1% de la population étudiée, pendant une durée de quelques mois pourrait signifier la persistance du phénomène causal (infectieux) dans des conditions physiologiques ou l'autonomisation du clone avec des risques lymphoprolifératifs qui restent à évaluer.

Ces propriétés de reconnaissance, adaptation (plasticité), réaction appropriée et mémoire confèrent au système immunitaire spécifique les caractéristiques d' "intelligence" ou cognitif (Cohen).