

Développement et taille du répertoire T $\alpha\beta$ humain

La majorité des cellules T expriment à leur surface des récepteurs (TCR) hétérodimériques $\alpha\beta$ qui reconnaissent les antigènes sous forme de peptides associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Pour pouvoir répondre à un très grand nombre d'antigènes étrangers codés par de nombreux agents infectieux, les cellules T doivent disposer d'un répertoire de récepteurs très divers. Cette diversité est obtenue par le réarrangement de segments de gènes de TCR au cours du développement des cellules T dans le thymus. Le locus humain comprend 42 régions variables (V) et 21 régions de jonctions (J) et le locus β comprend 47 V, 2 régions de diversité (D) et 13 J (diversité germinale). Un gène fonctionnel est le produit de réarrangements V(D)J [1] au cours desquels les différents segments peuvent se combiner en grande partie au hasard (diversité combinatoire). La diversité est encore augmentée par la flexibilité du processus de jonction qui s'accompagne de délétions et d'additions aléatoires de nucléotides (diversité jonctionnelle). Toute la diversité T non codée par le génome germinale est contenue dans ces régions de jonction correspondant aux boucles CDR3 (région déterminant la complémentarité 3), responsables de la spécificité fine de la reconnaissance antigénique. En considérant que la combinaison des chaînes α et β se fait au hasard, la diversité théorique maximale a été estimée à 10^{15} récepteurs différents [2]. Si le répertoire réel est forcément beaucoup moins divers, car le corps d'un adulte humain ne contient qu'entre 10^{11} et 10^{12} cellules T, cette diversité était jusqu'à présent inconnue.

La taille du répertoire T $\alpha\beta$

Afin de mesurer la taille réelle du répertoire $\alpha\beta$ nous avons analysé dans le détail les séquences des régions CDR3 d'une petite fraction des cellules T et nous en avons déduit la diversité totale du répertoire $\alpha\beta$ humain dans le sang périphérique [3]. Notre approche expérimentale (figure 1) est fondée sur la méthode d'analyse de répertoire Immunoscope dans laquelle des régions variables réarrangées de TCR sont amplifiées par PCR (polymerase

chain reaction) avec des amorces V et J spécifiques de ces régions, et les produits d'amplification séparés sur des gels de polyacrylamide [4]. Nous avons poussé l'analyse plus loin en clonant et en séquençant les fragments d'ADN contenus dans de telles bandes, ce qui permet d'identifier et de compter les séquences de CDR3 différentes. Connaissant la fraction que représente la bande CDR3 analysée pour chaque région variable étudiée (correspondant à un réarrangement), ainsi que la fréquence de cette région variable dans la population générale des lymphocytes T, il est alors possible de calculer la taille du répertoire total (figure 1 et encadré). En répétant cette démarche à partir de bandes correspondant à des réarrangements différents obtenus à

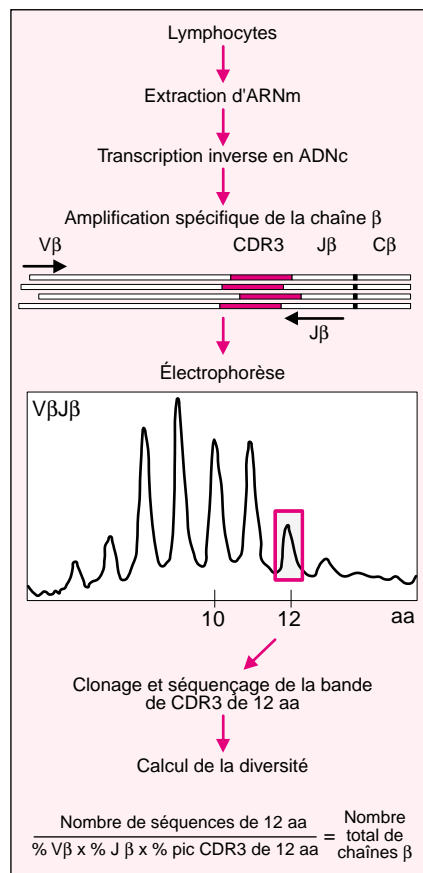


Figure 1. **Mesure de la diversité de la chaîne β du TCR.** L'approche est fondée sur la méthode « Immunoscope » [4]. L'ARN total extrait de lymphocytes du sang périphérique est rétrotranscrit en ADNc et amplifié par PCR avec des amorces spécifiques de régions V, C et J de chaînes β . L'analyse sur gel de polyacrylamide de l'ADN amplifié fluorescent à l'aide d'un séquenceur automatique révèle environ 8 pics, espacés de 3 nucléotides, correspondant à des transcrits en phase d'une chaîne β . Une bande correspondant à un réarrangement VJ d'une taille donnée (par exemple 12 acides aminés pour la protéine correspondante) est ensuite séparée, à nouveau amplifiée, clonée et séquencée. Le nombre des séquences différentes obtenues après séquençage à saturation divisé par le produit des fréquences respectives de la famille V, de la région J et du pic de taille cloné permet de calculer la diversité totale des chaînes β de l'échantillon de départ.

Calcul des répertoires β et $\alpha\beta$

Le calcul du répertoire β est fondé sur les principes suivants: l'intensité de la bande correspondant à un réarrangement $V_{\beta}J_{\beta}$ d'une taille donnée est proportionnelle à la diversité totale de ce réarrangement (% pic CDR3); connaissant la fréquence d'utilisation de V_{β} et celle de J_{β} dans les cellules T du donneur étudié, la fréquence moyenne pour n'importe quelle chaîne β donnée est la suivante:

$\% \text{ pic CDR3} \times \% V_{\beta} \times \% J_{\beta} / \text{nombre de séquences différentes du pic CDR3 étudié}$

La diversité du répertoire β est estimée par l'inverse de la fréquence.

Le principe de calcul du répertoire $\alpha\beta$ total est le suivant: la diversité des chaînes β est déterminée pour une chaîne V_{α} donnée selon la même méthode que celle décrite pour le répertoire β total. Connaissant la fréquence de cette chaîne V_{α} dans la population totale des lymphocytes du donneur ($\%V_{\alpha}$), le répertoire total est égal au rapport: diversité β (V_{α})/ $\%V_{\alpha}$.

partir de plusieurs donneurs, nous avons trouvé qu'environ 10^6 chaînes β de TCR différentes existaient dans les cellules T du sang périphérique [3]. Un autre niveau de diversité correspondant à la combinaison des chaînes α et β , nous avons ensuite isolé une sous-population exprimant une région variable α unique et mesuré, par la même méthode, la diversité des chaînes β associées. Ceci nous a permis de conclure que chaque chaîne β pouvait s'apparier à au moins 25 chaînes α différentes, ce qui équivaut à 10^7 à 10^8 clones T $\alpha\beta$ différents dans le sang périphérique d'un adulte jeune en bonne santé (voir encadré) [3]. Celui-ci contenant au total environ 10^{11} cellules T, la taille moyenne d'un clone portant un TCR identique est donc de 10^3 à 10^4 cellules

Le nombre de chaînes β différentes trouvées reflète avant tout les étapes précoces du développement thymique [5]. Les précurseurs T qui

entrent dans le thymus contiennent des locus α et β non réarrangés et s'y divisent un certain nombre de fois (figure 2). Cette première période de prolifération majeure est suivie du réarrangement génomique des chaînes β . Une partie seulement de ces réarrangements aboutit à des chaînes β fonctionnelles capables de s'apparier à des chaînes préT α , le locus α n'étant alors pas encore réarrangé. Cet appariement permet l'expression du pré-TCR et est une étape indispensable pour la survie de la cellule et son développement ultérieur. Chaque cellule ayant survécu à cette première étape prolifère ensuite pour ne s'arrêter qu'après le réarrangement productif d'une chaîne α , et la substitution d'un TCR $\alpha\beta$ au pré-TCR. Ainsi, la taille du répertoire α , et plus particulièrement le nombre de chaînes α pouvant s'apparier à une seule chaîne β , est déterminée par le temps écoulé entre les réarrangements des deux

chaînes et le nombre de divisions cellulaires effectuées pendant la période de prolifération. Chez l'homme, cette phase de prolifération serait de quelques jours [7], ce qui correspond au maximum à 10 divisions cellulaires, soit une expansion d'un facteur 2^{10} et donc un appariement possible d'environ 1000 chaînes α avec chaque chaîne β . Cependant, avant de devenir des cellules T mûres $CD4^+$ ou $CD8^+$, ces cellules doivent passer les étapes de sélection positive et négative [8, 9] permettant d'éliminer les cellules incapables de reconnaître des complexes antigéniques CMH-peptide ou qui reconnaissent les antigènes du soi avec une affinité trop importante. Plus de 90 % des thymocytes en cours de développement sont éliminés à ce stade et le nombre d'environ 100 chaînes α par chaîne β donnée est une estimation maximale acceptable et compatible avec nos résultats expérimentaux.

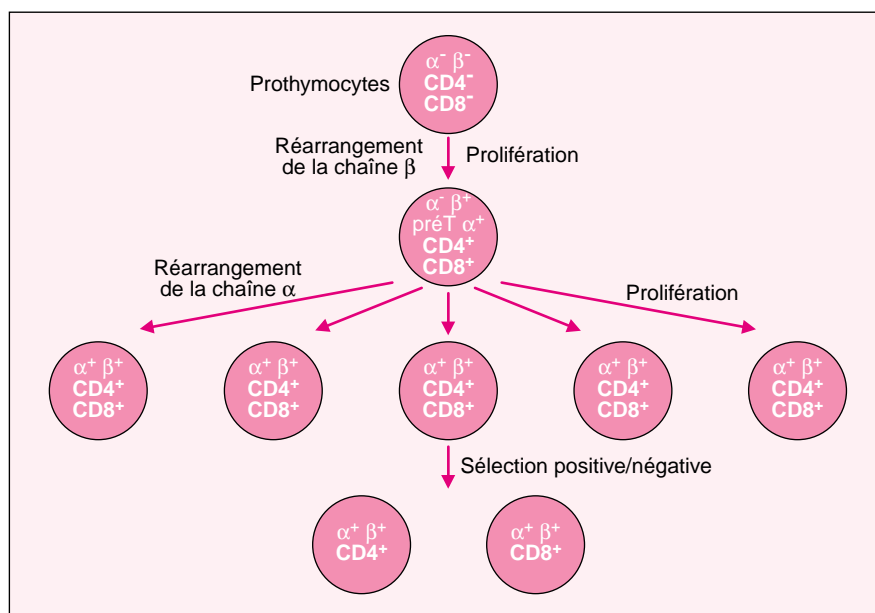


Figure 2. **Développement des cellules T dans le thymus.** Après une phase de prolifération des thymocytes, les chaînes β sont réarrangées les premières. Chaque cellule exprimant une chaîne β donnée associée à la chaîne préT α se multiplie ensuite et la chaîne α de chaque cellule fille subit à son tour un réarrangement pour donner naissance à un TCR fonctionnel. Ces cellules subissent ensuite les sélections positive et négative et plus de 90 % d'entre elles meurent au cours des étapes de sélection thymique. Au cours de leur développement, les cellules T sont d'abord $CD4^-$ et $CD8^-$ puis $CD4^+$ et $CD8^+$. La majorité des cellules qui achèvent leur maturation sont simple positives $CD4^+$ ou $CD8^+$ à leur sortie du thymus.

Le répertoire des cellules mémoire

Les lymphocytes T circulant dans le sang périphérique comprennent en fait les cellules T naïves et les cellules T mémoire. Les cellules T naïves ont une durée de vie longue, elles se divisent lentement et sont renouvelées par un apport thymique constant qui diminue considérablement avec l'âge à partir de la puberté [10]. Quand ces cellules sont activées par un antigène, elles se multiplient de façon considérable et, dans certaines circonstances, un clone de cellules spécifique d'un seul épitope peut représenter jusqu'à la moitié des cellules T circulantes [11]. La grande majorité de ces cellules meurent une fois que l'agent infectieux est éliminé, mais certaines survivent comme cellules mémoire pouvant probablement perdurer pendant toute la vie. On a pensé pendant longtemps que les cellules T mémoire exprimaient à nouveau un phénotype de cellules au repos assez proche de celui des cellules naïves, mais des données récentes montrent que certaines cellules T mémoire peuvent garder des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cellules effectrices [12]. Nous avons utilisé l'approche déjà décrite pour analyser la diversité du compartiment mémoire défini par le marqueur CD45RO. Nos résultats montrent que si les cellules mémoire peuvent représenter jusqu'à 30 % de la population totale T présente dans le sang périphérique, le répertoire de mémoire est en revanche beaucoup plus restreint puisqu'il ne contient que 10^5 chaînes β de cette population différentes, ce qui correspond à environ 1% de la diversité totale des cellules T. La différence la plus marquante est qu'en moyenne chaque chaîne β n'est appariée qu'à une seule chaîne α [3].

Ainsi, le répertoire T peut être subdivisé en deux parties très différentes (figure 3). Le répertoire naïf, avec 10^7 - 10^8 TCR différents, reflète la nécessité de l'organisme de pouvoir faire face à un univers de pathogènes très divers. En revanche, les quelques 10^5 TCR du répertoire mémoire correspondent à une population restreinte très spécialisée, capable de répondre

de façon rapide et efficace aux antigènes des pathogènes les plus communs. Plusieurs études ont montré que le renouvellement de ces deux sous-populations obéit à des voies de régulation très différentes [13]. Étant donné la grande différence des répertoires naïf et mémoire, cette régulation indépendante est nécessaire pour éviter le développement excessif de la diversité des cellules naïves aux dépens de celle des cellules mémoire très focalisée et réciproquement. Les données obtenues chez l'homme peuvent être comparées à celles obtenues chez la souris dont la taille du répertoire $\alpha\beta$ est certes plus réduite [14], mais proportionnellement à la différence des volumes corporels et du nombre total de cellules T. Ces observations suggèrent qu'il existe une taille optimale pour un répertoire T, compromis entre une diversité suffisante et une réponse efficace. Ainsi, indépendamment du nombre absolu des cellules, les tailles des répertoires de la souris, de l'homme et probablement aussi de l'éléphant se trouvent dans cette zone relativement étroite.

Il faut souligner que l'ensemble de ces résultats ont été obtenus à partir de cellules issues du sang périphérique à un moment donné de la vie d'un individu. Il est clair que le répertoire peut varier dans le temps et que la diversité totale au cours de la vie pourrait être nettement plus importante. Des répertoires peuvent beaucoup varier selon la localisation des cellules, soit à la suite d'une réponse immunitaire locale, soit parce que les profils de recirculation et de rétention sont différents. Par exemple, les très nombreuses cellules T associées à l'épithélium intestinal sont oligoclonales et présentent un répertoire restreint qui peut se développer, du moins chez la souris, en dehors du thymus [15]. De plus, les récepteurs d'adressage différents des cellules naïves et mémoire entraînent une répartition tissulaire différente des cellules (*m/s 2000, n° 6, p. ???*). L'ensemble des résultats étant obtenus par extrapolation à partir d'une fraction de cellules prélevées à un moment donné et à un endroit donné, il paraît donc indispensable de tenir compte de tels facteurs. Par

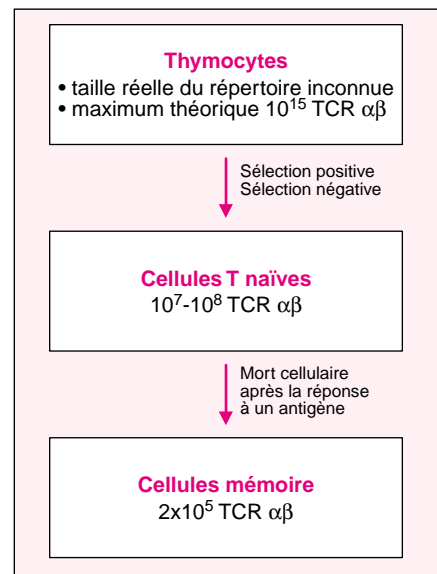


Figure 3. **Diversité des populations T au cours de la différenciation.**

ailleurs, si on sait que la diversité du répertoire varie avec l'âge, l'ampleur de cette diminution chez l'individu âgé n'est pas encore connue. Elle pourrait cependant contribuer au relatif déficit immunitaire des personnes âgées qui répondent mal à des vaccins comme celui de la grippe et peuvent être très sensibles à certaines infections. En plus de leur intérêt fondamental, ces résultats fournissent pour la première fois une base quantitative indispensable aux nouvelles études du suivi de la reconstitution de répertoire après greffe de moelle, traitement par des agents immunosuppresseurs ou traitement de patients HIV⁺ par multithérapies ■

T. Petteri Arstila

Inserm U. 277, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France; Department of Virology, Haartman Institute, University of Helsinki, Haartmaninkatu 3, FIN-00014 Helsinki, Finlande.

Jos Even

Inserm U. 277, Immunologie fondamentale et appliquée, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

RÉFÉRENCES

1. Alt FW, Oltz EM, Young F, *et al.* VDJ recombination. *Immunol Today* 1992; 13: 306-14.
2. Davis MM, Bjorkman PJ. T cell antigen receptor genes and T cell recognition. *Nature* 1988; 334: 395-401.
3. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, *et al.* A direct estimate of the human $\alpha\beta$ T cell receptor diversity. *Science* 1999; 286: 958-61.
4. Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 1995; 16: 176-81.
5. von Boehmer H, Fehling HJ. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 433-52.
6. Sebзда, E, Mariathasan S, Ohteki T, *et al.* Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 829-74.
7. Trigueros C, Ramiro AR, Carrasco YR, *et al.* Identification of a late stage of small noncycling pT α -pre-T cells as immediate precursors of T cell receptor α/β + thymocytes. *J Exp Med* 1998; 188: 1401-12.
8. Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 1999; 402: 255-62.
9. Laouir Y, Viret C. Développement intrathymique des lymphocytes T: rôle des peptides du soi dans le processus de sélection positive. *Med Sci* 1999; 15: 1401-10.
10. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998; 396: 690-5.
11. Callan MF, Tan L, Annel N, *et al.* Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *in vivo*. *J Exp Med* 1998; 187: 1395-402.
12. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401: 708-12.
13. Tanchot C, Rocha B. The organization of mature T-cell pools. *Immunol Today* 1998; 19: 575-9.
14. Casrouge A, Beaudoin E, Dalle S, Pannetier C, Kanelopoulos J, Kourilsky P. Size estimate of the $\alpha\beta$ TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol* 2000; 164: 5782-7.
15. Rocha B, Guy-Grand D, Vassalli P. Extrathymic T cell development. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 235-42.

TIRÉS À PART

J. Even.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Les signaux de la mémoire immunitaire.** L'homéostasie du système immunitaire périphérique, comme celle de tout système vivant, est indispensable pour maintenir à tout moment la présence de cellules effectrices capables de proliférer et de se différencier en réponse aux stimulus extérieurs. Pour les populations lymphoïdes, cet équilibre est maintenu en partie grâce à l'engagement du récepteur des cellules T (TCR), qui déclenche une série de signaux intracellulaires spécifiques. Le système immunitaire est composé de lymphocytes T naïfs, prêts à répondre à de nouveaux antigènes, et de lymphocytes mémoires, spécifiques d'antigènes déjà rencontrés par l'organisme. Or, ces deux populations semblent bien se comporter de manière différente, tant sur le plan des conditions requises pour leur survie que de leurs réponses fonctionnelles. Deux équipes françaises se sont récemment attelées à

l'étude de ces différences, en utilisant des modèles de conception similaire [1, 2]. Dans les deux cas, les chercheurs ont utilisé des souris *RAG-2^{-/-}*, transgéniques pour un TCR particulier, qui produisent une population monoclonale de lymphocytes T spécifiques de l'antigène mâle HY. Le premier travail compare les propriétés des cellules naïves et mémoires *in vivo*, et montre qu'après leur rencontre avec l'antigène spécifique, les secondes sont capables de se diviser et de se différencier beaucoup plus rapidement. Selon ces résultats, les cellules mémoires au repos contiendraient plus d'ARN que leurs consœurs naïves, et seraient maintenues en phase G1 du cycle cellulaire, prêtes à se diviser à tout moment pour répondre aux réinfections. Dans le second travail, c'est le rôle des cytokines utilisant des récepteurs qui partagent la chaîne commune $\gamma\epsilon$ des récepteurs (IL-2, -4, -7, -9 et -15) dans la survie

des populations naïve et mémoire que les auteurs ont analysé, en croisant les animaux transgéniques avec des souris $\gamma\epsilon^{-/-}$. De nouveau, la distinction s'impose: les cellules naïves requièrent les cytokines précitées, alors que celles-ci ne se révèlent pas indispensables au maintien des cellules mémoire. En revanche, il est frappant de noter que les deux populations sont capables de proliférer en l'absence des cytokines dépendantes de la chaîne des récepteurs $\gamma\epsilon$. Ces observations remettent donc en question le rôle physiologique de certaines cytokines, tel qu'il a été établi *in vitro*. Les travaux rapportés dans ces deux articles permettent d'envisager la dissection fine des mécanismes qui maintiennent le fonctionnement du système immunitaire *in vivo*.

[1. Veiga-Fernandes H, *et al.* *Nat Immunol* 2000; 1: 47-53.]

[2. Lantz O, *et al.* *Nat Immunol* 2000; 1: 54-7.]

11^e Cours Francophone de Biologie de la peau Structures et fonctions. Acquisitions récentes Les cours auront lieu du mercredi 14 mars 2001 au vendredi 16 mars 2001

Auditorium du Centre International de Recherche sur le Cancer 150, cours Albert-Thomas, 69008 Lyon (métro: Grange-Blanche)
Le COBIP est un cours francophone de biologie de la peau visant à diffuser régulièrement les acquisitions récentes sur les structures et fonctions de la peau humaine. Il s'adresse aux médecins, pharmaciens, biologistes de toutes spécialités, du secteur public ou privé, aux étudiants.
Contact: Mme Nathalie Jacquet: Dermatologie U. 346 - Pavillon R. - Hôpital Édouard-Herriot, 69437 Lyon Cedex 03. Tél.: 04 72 11 02 93 - Télécopie: 04 72 11 02 90 - Adresse électronique: jacquet@lyon151.inserm.fr