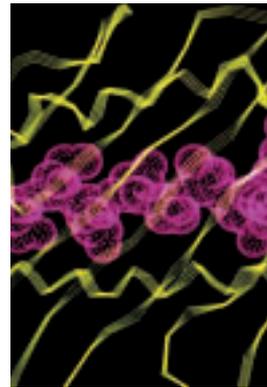


> La caractérisation moléculaire des déficits immunitaires contribue à une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques du système immunitaire. Le récepteur T de l'antigène est constitué d'un hétérodimère (α/β ou γ/δ) associé à 4 protéines transmembranaires : CD3 γ , δ , ϵ , et ζ . Aujourd'hui, des déficits impliquant les quatre chaînes du CD3 ont été identifiés. Nous discutons ici des déficits immunitaires liés à des anomalies génétiques délétères touchant chacune des chaînes du complexe CD3 et nous comparons les phénotypes observés chez ces patients avec les connaissances apportées par les souris dont les gènes sont invalidés. Ces observations permettent d'illustrer la fonction respective de chacune de ces chaînes dans le développement des lymphocytes T et de souligner les différences entre le développement lymphocytaire humain et murin. <

Anomalies d'expression du complexe récepteur T de l'antigène/CD3 et déficits immunitaires

Françoise Le Deist, Geneviève de Saint Basile, Frédéric Rieux-Laucat, Claire Hivroz, Alain Fischer



F. Le Deist : Département de microbiologie et d'immunologie, Université de Montréal, CHU Sainte-Justine, 3175, chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5 Canada.

Francoise.le.deist@umontreal.ca

G. de Saint Basile, F. Rieux-Laucat, A. Fischer : Inserm U768, Hôpital Necker, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

C. Hivroz : Inserm U653, Institut Curie, pavillon Pasteur, section Recherche, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 15, France.

gènes codant les chaînes du complexe CD3 δ , ϵ et ζ ont été observées et illustrent aussi ce dernier mécanisme [9, 10]. Au contraire, le phénotype modéré du déficit immunitaire associé à des mutations de CD3 γ démontre une hétérogénéité fonctionnelle des chaînes du CD3 au sein du complexe TCR/CD3.

Le complexe TCR/CD3

Contrairement aux récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur de l'insuline qui présente la double fonction de reconnaissance et de transduction de signal, le complexe TCR/CD3 dissocie ces deux fonctions. La reconnaissance de l'antigène est assurée par le récepteur T de l'antigène (TCR), hétérodimère $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, alors que le complexe CD3 en recrutant des tyrosine kinases de la famille Src et Syk [11] transmet un signal intracytoplasmique.

Les déficits immunitaires combinés sévères (DICS) constituent un groupe de maladies rares caractérisées par un arrêt de la différenciation des lymphocytes T. L'identification des causes moléculaires de cet arrêt permet de mieux comprendre les mécanismes de développement des lymphocytes T chez l'homme. Actuellement, les défauts génétiques à l'origine des DICS permettent de distinguer au moins quatre types de mécanismes conduisant à l'arrêt du développement des lymphocytes T [1]. (1) La mort des thymocytes est en partie responsable de la lymphopénie T observée dans le cas du déficit en adénosine désaminase [2]. (2) Les mutations de la chaîne $\gamma\epsilon$ [3] ou de la tyrosine kinase JAK-3 associée à $\gamma\epsilon$ [4] et de la chaîne α du récepteur de l'interleukine-7 [5] entraînent un défaut de transduction de signal dépendant de certaines interleukines. (3) Les anomalies génétiques de RAG-1, de RAG-2 [6] et d'Artémis [7] expliquent le défaut de réarrangement des gènes codant les chaînes du récepteur de l'antigène. (4) À un déficit de la phosphatase CD45 est attribuable un défaut de transduction de signal par le pré-TCR [8]. Plus récemment, des mutations dans les

Article reçu le 28 mars 2006, accepté le 16 juin 2006.

que. Les chaînes CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ et CD3 ζ forment le complexe CD3 sous forme de modules dimériques, $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ et $\zeta\zeta$ (Figure 1). Selon ce modèle de stochiométrie [12], le complexe CD3 contient au total dans sa partie intracytoplasmique, dix motifs nommés ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), contenant chacun deux résidus tyrosine séparés par 9 à 12 acides aminés. Trois sont portés par CD3 ζ , et un par chacune des autres chaînes : CD3 γ , CD3 δ et CD3 ϵ . La phosphorylation de ces motifs par des protéine kinases de la famille Src conduit au recrutement de la tyrosine kinase appartenant à la famille Syk, ZAP70 (*zeta associated kinase*), qui associée à CD3 ζ , amorce l'activation des lymphocytes T.

Le développement intrathymique

L'expression des molécules CD4 et CD8 définit trois stades de maturation des thymocytes. Les thymocytes « double négatif » CD4⁻CD8⁻ progressent vers le stade « double positif » CD4⁺CD8⁺ avant de se différencier en thymocytes simple positif CD4⁺ ou CD8⁺ qui quittent le thymus sous forme de lymphocytes T matures. Le réarrangement des gènes codant la chaîne β du TCR se produit au stade « double négatif » et précède le réarrangement des gènes codant la chaîne α . La transition du stade « double négatif » au stade « double positif » nécessite l'expression membranaire du pré-TCR, constitué de la chaîne TCR β associée à la chaîne invariante pré-T α , auquel est associé le complexe CD3. La transition des thymocytes « double positif » en thymocytes « simple positif » CD4⁺ ou CD8⁺ dépend de l'expression du TCR α/β .

L'expression successive du pré-TCR puis du TCR induit des signaux intenses de division cellulaire. L'expression du TCR par les thymocytes « double positif » permet la sélection positive des thymocytes. Les souris dont les différentes chaînes du complexe CD3 sont invalidées illustrent le rôle respectif de ces protéines au cours de la différenciation. Ainsi l'absence de la chaîne CD3 ϵ ou CD3 γ [13] conduit à un arrêt de maturation des thymocytes au stade « double négatif » tandis que l'inactivation du gène CD3 δ conduit à un arrêt au stade double positif et épargne les thymocytes portant un TCR $\gamma\delta$ [14]. Cela démontre que le module dimérique $\gamma\epsilon$ est essentiel à un stade plus précoce que le module $\delta\epsilon$ dans le développement des thymocytes. La chaîne CD3 ζ est indispensable à la transition du stade « double négatif »-« simple positif » [15]. Cependant, le phénotype des déficits immunitaires liés à une anomalie d'une de ces chaînes montre clairement que leur rôle respectif dans la différenciation intrathymique chez l'homme est différent de celui observé chez la souris.

Déficit de la chaîne CD3 δ

Des mutations du gène *CD3D* ont été détectées chez 8 enfants de 4 familles présentant un DICS avec absence totale de lymphocytes T et présence normale de lymphocytes B et NK (DICS T⁻ B⁺ NK⁺) [9, 10, 16]. Dans une famille, le diagnostic de DICS porté chez deux fœtus a conduit à des interruptions de grossesse [10]. Dans tous ces cas, les mutations décrites ont été observées à l'état homozygote, conséquence de la consanguinité des parents clairement démontrée dans au moins 3 familles [9, 10]. Une mutation identique a été retrouvée dans deux familles d'origine différente (marocaine dans un cas et mennonite dans l'autre) [9, 10].

Deux mutations entraînent des codons *stop* prématurés et donc des protéines tronquées dans leur partie extracellulaire [9, 10]. La troisième mutation touche le site accepteur d'épissage de l'intron 2 et conduit à une anomalie d'épissage caractérisée par un ARN dépourvu de l'exon 3 codant principalement la partie transmembranaire de la protéine [16] (Figure 2A). Ainsi, les mutations de *CD3D* décrites chez des patients atteints de DICS T⁻ B⁺ NK⁺ entraînent la synthèse de protéines sans région transmembranaire donc incapables de s'associer avec CD3 ϵ

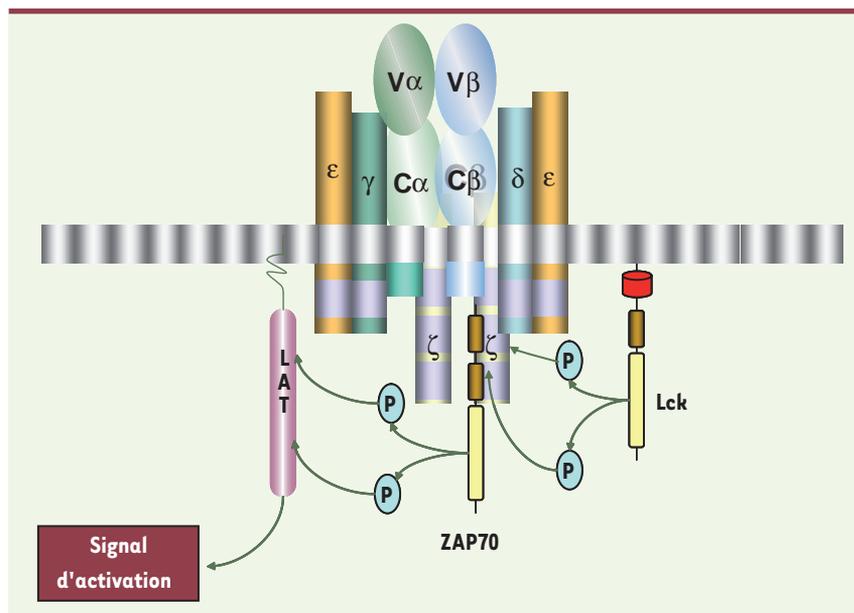


Figure 1. Le complexe TCR/CD3. Le récepteur T de l'antigène est constitué d'un hétérodimère (α/β ou γ/δ) associé à 4 protéines transmembranaires : CD3 γ , δ , ϵ , et ζ . Les chaînes CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ et CD3 ζ forment des modules dimériques $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ et $\zeta\zeta$. Chaque chaîne γ , δ , ϵ , et ζ présente dans sa partie intracytoplasmique des motifs ITAM (en violet) qui sont phosphorylés sur les résidus tyrosine par la tyrosine kinase Lck. La phosphorylation des ITAM de ζ permet l'association de ZAP70 à cette chaîne par l'intermédiaire des 2 domaines SH2 (en marron) portés par cette kinase et secondairement sa phosphorylation par Lck. ZAP70 ainsi activée phosphoryle à son tour l'adaptateur LAT.

et, de ce fait, non exprimées au niveau de la membrane. L'absence de lymphocytes T est totale chez ces patients et est associée à la survenue d'infections graves dès les premiers mois de la vie. L'absence de lymphocytes T est confirmée dans les ganglions lymphatiques fœtaux.

L'analyse de biopsies thymiques d'un patient par étude d'expression de transcrits et de protéines [9] ou, chez des fœtus, par étude immuno-histochimique [10], apporte des informations sur le stade d'arrêt de la différenciation des thymocytes. Dans le thymus du patient, la faible expression de CD4 et de CD8 (chaînes α et β) et des chaînes TCR α et TCR β suggèrent un blocage de différenciation au stade double négatif. Les thymus fœtaux sont caractérisés par une faible cellularité, une faible prolifération des thymocytes et par la présence de thymocytes ISP (*intermediate single positive*), qui correspondent à un stade intermédiaire entre le stade « double négatif » et « double positif » caractérisé par l'expression de CD45RO et de

CD4, ainsi que la perte d'expression de CD34 [17]. Ces deux études démontrent un arrêt précoce dans la différenciation des thymocytes avec un blocage de la différenciation au moment de la transition entre stade « double négatif » et stade « double positif ».

Cette observation montre le caractère indispensable de CD3 δ dans la signalisation par le pré-TCR chez l'homme. En revanche, l'inactivation du gène *CD3 δ* chez la souris entraîne un blocage au stade « double positif » [14]. À ce stade, CD3 δ pourrait induire l'activation, lors de la sélection positive, de la voie d'activation dépendante des kinases ERK [18]. Cet arrêt de la différenciation est donc plus tardif que chez l'homme. Il n'est, de plus, pas complet puisque l'on détecte dans la rate de ces souris des lymphocytes T matures CD4⁺ et CD8⁺ exprimant un nombre réduit de complexes CD3/TCR au niveau de la membrane. En outre, la différenciation des lymphocytes portant un TCR $\gamma\delta$ qui sont en quantité normale est épargnée. Cela contraste avec l'absence totale de lymphocytes TCR α/β et γ/δ chez les patients (Figure 3). Il n'y a pas, à ce jour, d'explication satisfaisante qui permet de comprendre les fonctions distinctes de CD3 δ chez l'homme et la souris, bien que la structure de CD3 δ soit très conservée.

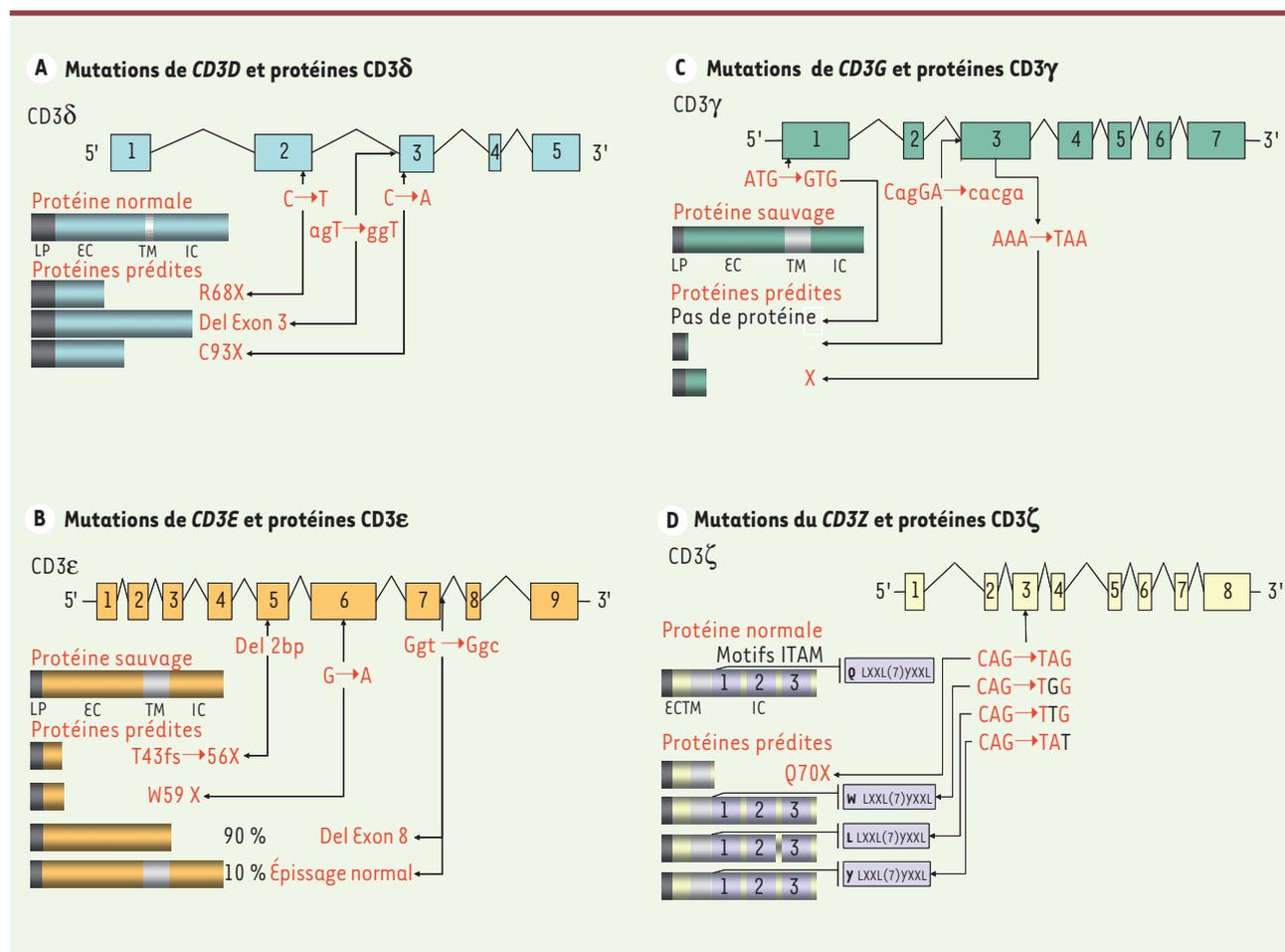


Figure 2. Mutations des gènes codant les différentes chaînes du CD3 et protéines produites. Les mutations touchant les gènes des différentes chaînes du CD3 γ , δ , ϵ , et ζ actuellement décrites sont visualisées. Les protéines produites sont comparées aux protéines normales. EC : extracellulaire ; IC : intracellulaire ; TM : transmembranaire.

souris dont le gène *CD3G* a été invalidé (Figure 3). Chez la souris, il n'existe aucune possibilité d'expression d'un complexe TCR/CD3 en l'absence de CD3 γ contrairement à l'homme [25]. Cela suggère que le remplacement de la chaîne CD3 γ par la chaîne CD3 δ qui corrige la fonction du complexe TCR/CD3 dans des cellules humaines [25], ne se fait pas chez la souris.

Déficit de la chaîne CD3 ζ

Récemment, nous avons décrit chez un patient présentant une susceptibilité accrue aux infections bactériennes, virales et fongiques, un déficit de CD3 ζ lié à une mutation homozygote du gène *CD3Z* [26]. Chez ce patient, l'analyse phénotypique est très particulière : elle montre l'existence de deux populations lymphocytaires T, l'une (90 % des lymphocytes T) exprime faiblement le complexe TCR/CD3 à la membrane, l'autre l'exprime normalement. Dans la première population, l'expression résiduelle est très faible, environ 100 fois moins que la normale et le complexe exprimé est dépourvu de chaîne CD3 ζ . Cependant, cette population se répartit normalement en lymphocytes T CD4 $^+$ et CD8 $^+$ mais est principalement de phénotype mémoire CD45RO. Cela montre qu'en l'absence de chaîne CD3 ζ , l'expression du complexe TCR/CD3 n'est pas complètement abolie. Cette expression résiduelle permet une différenciation des lymphocytes T. Cette population lymphocytaire présente une mutation homozygote du gène *CD3Z* en position 207 (C \rightarrow T) avec pour conséquence un codon *stop* en position 70, c'est-à-dire 2 acides aminés avant le premier résidu tyrosine du premier motif ITAM (Figure 2D). Cette mutation induit la synthèse d'une protéine dépourvue des trois motifs ITAM, et cette protéine n'est pas exprimée à la membrane (Figure 2D). La souris dont la chaîne CD3 ζ est invalidée présente un phénotype analogue. Le blocage de la différenciation thymocytaire entre le stade « double négatif » et le stade « double positif » n'est pas total puisque des lymphocytes T matures sont détectés en périphérie et s'accumulent au cours du temps (Figure 3) [15, 27]. Ces lymphocytes expriment faiblement le complexe TCR/CD3 et présentent un défaut de l'activation dépendante du TCR. Leur activité potentiellement auto-réactive démontre le rôle primordial de l'homodimère $\zeta\zeta$ au cours de la sélection négative [28].

Chez le patient, dans la population exprimant normalement le complexe TCR/CD3, entièrement constituée de lymphocytes CD4 $^+$, trois séquences différentes de *CD3Z* ont été détectées. Ces séquences sont caractérisées par l'association de la transition du nucléotide 207 à une autre mutation au niveau du nucléotide 208 ou 209 transformant ainsi le codon *stop* en une substitution d'acide aminé en position 70 permettant, de ce fait, l'expression d'une protéine de poids moléculaire normal à la membrane (Figure 2D). Ces trois séquences correspondent à des mutations somatiques qui se sont produites à partir de la mutation germinale

constituée par la transition C \rightarrow T à la position 207. Ce résultat suggère que les mutations somatiques sont beaucoup plus fréquentes que ce que l'on pouvait envisager. Cette observation met en exergue l'avantage sélectif considérable que procure la survenue de mutations partiellement correctrices comme celles déjà observées dans d'autres déficits immunitaires touchant les lymphocytes T [29-32]. Par analogie au défaut de ZAP70 caractérisé chez l'homme par l'absence de CD8 [33], l'absence de lymphocytes T CD8 au sein de cette population reflète probablement le défaut de signalisation dépendante de ZAP70 observé dans ces cellules.

Conclusions

L'identification de défauts dans une des chaînes du CD3 responsables de déficits immunitaires souligne la diversité des causes moléculaires de ce groupe de maladies. Il est probable que ce type de défauts est plus fréquent qu'on ne le pensait et que nous en comprendrons beaucoup mieux les mécanismes par l'examen et la description de nouveaux cas. Les conséquences phénotypiques de ces défauts élucident, au moins en partie, le rôle respectif de chaque chaîne du complexe CD3 dans la différenciation et l'activation des lymphocytes T chez l'homme ; de plus, elles soulignent les différences entre l'homme et les modèles murins. \diamond

SUMMARY

CD3 complex and immunodeficiencies

Molecular characterization of immunodeficiencies contributes to a better understanding of the physiological mechanisms of immune function. The T cell receptor is a heterodimer (α/β or γ/δ) associated with four transmembrane units of the CD3 complex (γ , δ , ϵ and ζ). We herein summarize the immunodeficiency states resulting from defects in genes encoding the CD3 complex. Such analysis highlights the respective role of each of these chains in T lymphocyte development and underscores differences between T lymphocyte development in man and mouse. Currently, there is a growing body of knowledge on immunodeficiencies specifically involving the four chains of the CD3, namely γ , δ , ϵ and ζ . Thus, we can compare the phenotypes observed in these patients with those seen in mice knockout for these genes. The main differences observed involve the respective roles of the CD3 γ chain as well as the CD3 δ , whose functions seem to be reciprocal between the two species. Indeed, in the mouse, knockout of CD3 δ allows some degree of T lymphocyte differentiation since mature CD4 and CD8 as well as TCR $\gamma\delta$ T lymphocytes are observed in the periphery. In contrast, deleterious mutation of the CD3 δ encoding gene in the human leads to a severe combined immunodeficiency characterised by the complete absence of mature T cell subpopulations including TCR α/β and TCR γ/δ . Reciprocally, in the human, mutation of the CD3 γ encoding gene leads to a moderate immunodeficiency which contrasts with the complete block of T cell differentiation observed in mice knockout for this gene. This article brings into focus the knowledge gained through studies of immunodeficiency mouse models with the pathophysiological state observed in human disease. \diamond

RÉFÉRENCES

1. Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al. Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol Rev* 2005 ; 203 : 98-109.

