

EVALUATION DE LA THYMOPOÏÈSE : applications cliniques

E. CASTERMANS (1), G. MORRHAYE (1), S. MARCHAND (2), H. MARTENS (3), M. MOUTSCHEN (4), V. GEENEN (5)
Y. BEGUIN (6), F. BARON (7)

RÉSUMÉ : Dans un article précédent, nous avons décrit comment la formation de lymphocytes T dans le thymus (thymopoïèse) peut être estimée par la quantification par PCR des cercles d'excision (TREC) produits au cours du réarrangement intrathymique des segments de gène codant pour les parties variables des chaînes du récepteur T à l'antigène (TCR). L'emploi de cette méthode en hématologie a permis de mieux comprendre le profil de la reconstitution immunitaire après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : on observe d'abord une prolifération des cellules T matures qui sont présentes dans le greffon, puis une différenciation de lymphocytes T naïfs. En gériatrie, il semble que le maintien du répertoire périphérique de cellules T (homéostasie T) chez les seniors est davantage lié à une prolifération des cellules T périphériques qu'à une génération intrathymique de cellules T naïves. Enfin, la quantification des TREC permet aujourd'hui d'étudier le contrôle de la thymopoïèse par le système neuroendocrine.
MOTS-CLÉS : *Thymus - Thymopoïèse - Allogreffe - Cellules souches hématopoïétiques*

INTRODUCTION

Dans un article précédent (1), nous avons brièvement décrit comment la mesure du taux des TREC (cercles d'excision du récepteur à l'antigène des cellules T) permet une évaluation assez précise de la thymopoïèse ou génération intrathymique des lymphocytes T. Nous aborderons maintenant quelques applications de cette méthodologie en hématologie, en gériatrie et dans l'étude physiologique de la régulation neuroendocrine de la fonction thymique.

APPLICATION EN HÉMATOLOGIE

La méthodologie des TREC permet aujourd'hui un suivi beaucoup plus précis de la reconstitution immunitaire T, notamment après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

(1) Doctorant en Sciences biomédicales, CHU Sart Tilman, Liège.

(2) Etudiante en Médecine, Université de Liège.

(3) Chargé de Recherches, DGTRE/Région Wallonne, Liège.

(4) Chef de Service, Service de Médecine Interne, Immunodéficiences et Maladies Infectieuses, CHU Sart Tilman, Liège.

(5) Directeur de Recherches, FNRS, Professeur d'Embryologie, Centre d'Immunologie ULg (CIL), Liège.

(6) Directeur de Recherches, (7) Chercheur Qualifié, FNRS, Service d'Hématologie, CHU Sart Tilman, Liège.

EVALUATION OF THYMOPOIESIS : CLINICAL APPLICATIONS

SUMMARY : In the precedent article, we have described how T-cell generation in the thymus (thymopoiesis) may be currently evaluated through quantification by PCR of T-cell receptor excision circles (TREC) generated by intrathymic random recombination of the gene segments coding for variable parts of T-cell receptor for antigen (TCR). In hematology, TREC methodology helps in a better understanding of immune reconstitution after graft of hematopoietic stem cells: first there is a proliferation of mature T cells present in the graft, then a differentiation of naive T cells. In geriatrics, the homeostasis of the peripheral T-cell repertoire is maintained through proliferation of peripheral memory T cells rather than through thymic generation of naive T cells. In addition, TREC quantification constitutes a novel major tool for deciphering the tight control of thymopoiesis by the neuroendocrine system.

KEYWORDS : *Thymus - Thymopoiesis - Allograft - Hematopoietic stem cells*

VOIES DE LA RECONSTITUTION IMMUNE APRÈS ALLOGREFFE (FIG. 1)

Les allogreffes de CSH sont utilisées dans le traitement de certains cancers hématologiques, comme les leucémies ou les lymphomes, et chez certains enfants atteints d'hémopathies génétiques (2). Le greffon est composé d'un mélange de cellules souches, de progéniteurs hématopoïétiques, et de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les cellules souches sont responsables de la reconstitution hématologique et de la reconstitution immunologique à long terme (> 6 mois) chez le receveur (voie thymo-dépendante) (3). Par contre, les lymphocytes T matures présents dans la greffe assurent la reconstitution immunologique précoce (voie thymo-indépendante) (3), et peut-être l'effet de la greffe contre la tumeur (GvT). Ceci désigne la destruction immunologique des cellules tumorales du receveur par les cellules immunitaires du donneur présentes dans le greffon (4, 5). Ils sont néanmoins responsables de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), une complication redoutable des allogreffes consistant en la destruction des organes sains du receveur par les cellules immunitaires du donneur (6).

Voie thymo-dépendante

Dans la voie thymo-dépendante, les CSH et les précurseurs lymphoïdes du donneur colonisent la moelle du receveur et donnent naissance à des pré-lymphocytes T qui migrent ensuite

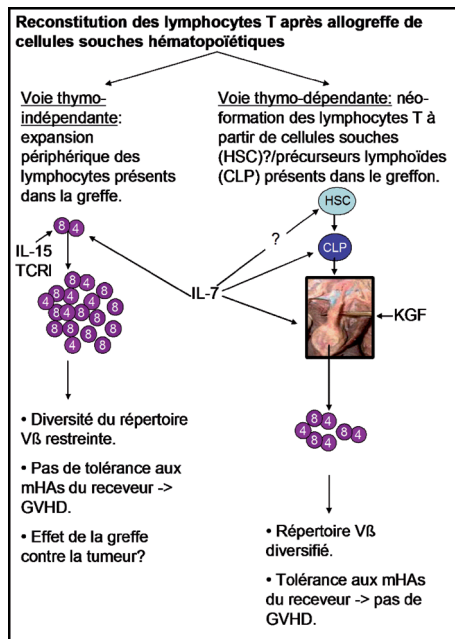


Figure 1. Mécanismes de la reconstitution immunitaire après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

IL-7, interleukine 7; IL-15, interleukine 15; TCR1, ligand du récepteur du lymphocyte T; 8, lymphocyte T CD8; 4, lymphocyte T CD4; GVHD, maladie du greffon contre l'hôte; HSC, cellules souches hématopoïétiques; CLP, progéniteur lymphoïde commun; KGF, facteur de croissance des kératinocytes; mHA, antigène mineur d'histocompatibilité.

vers le thymus (3). La maturation intrathymique de ces précurseurs produit des lymphocytes T matures, portant des TCR diversifiés. La qualité de ce processus présente un impact clinique car une certaine immunodéficience peut persister malgré un nombre de lymphocytes T normaux après allogreffe de CSH si un répertoire important de TCR n'est pas généré. Par conséquent, la reconstitution thymo-dépendante génère des lymphocytes T tolérants envers les antigènes du receveur, et ne produit pas de GVHD.

Voie thymo-indépendante

Cette voie consiste en l'expansion polyclonale périphérique des lymphocytes T matures présents dans le greffon, et assure la reconstitution immunitaire précoce (les 6 premiers mois après la greffe) (3, 7, 8). Les lymphocytes T ainsi produits n'ont pas subi la sélection négative dans le thymus du receveur, et peuvent donc provoquer une GVHD. Cette voie périphérique est généralement plus efficace pour la reconstitution des lymphocytes T CD8⁺ que pour celle des lymphocytes T CD4⁺, et aboutit fréquemment à la formation d'un répertoire restreint. Bien que les lymphocytes T CD4 naïfs peuvent également subir une certaine expansion périphérique tout en gardant leur phénotype naïf, le phénotype des lymphocytes T générés par expansion périphérique est généralement de type mémoire, et ils

n'expriment pas la molécule de costimulation CD28 (8).

ENJEU DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE APRÈS ALLOGREFFE

Le système immunitaire (et donc sa reconstitution) est directement impliqué dans les trois principales complications des allogreffes: la rechute, la GVHD et les infections.

La rechute

L'effet GvT est une composante importante de l'efficacité des allogreffes de CSH, et est même le seul mécanisme anti-tumoral dans le cas des minigreffes de CSH. Ces dernières consistent en l'administration d'un régime de conditionnement d'intensité minimale ne détruisant pas la moelle osseuse du receveur, mais produisant une immunosuppression suffisante pour permettre aux CSH du donneur de ne pas être rejetées (4, 5, 9). L'effet GvT est assuré par les cellules immunitaires du donneur (et principalement les lymphocytes T) présents dans le greffon. Ces lymphocytes T du donneur reconnaissent des allo-antigènes mineurs d'histocompatibilité exprimés à la surface des cellules du receveur (dont les cellules tumorales), et peut-être également des antigènes tumoraux. Puisqu'une déplétion en lymphocytes T matures du greffon réduit fortement l'effet GvT (et augmente donc fortement le risque de rechute), il est généralement admis que l'effet GvT dépend principalement de l'expansion périphérique des lymphocytes T présents dans la greffe.

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)

La GVHD est une complication majeure des allogreffes. Elle consiste en une réaction de rejet des organes du receveur par les cellules immunitaires (et principalement les lymphocytes T) du donneur qui reconnaissent des allo-antigènes à la surface des cellules du receveur (antigènes majeurs d'histocompatibilité en cas de greffe non HLA-identique, ou antigènes mineurs d'histocompatibilité en cas de greffe HLA-identique) (6). La GVHD aiguë survient généralement durant les cent premiers jours suivant la greffe, et peut se manifester sous la forme d'une éruption cutanée, d'une hépatite et/ou d'une atteinte intestinale (diarrhées, iléus, ou perforation intestinale). La GVHD chronique survient généralement plus de 3 mois après la greffe, et présente des caractères cliniques proches de certaines maladies auto-immunes.

On pense généralement que la GVHD aiguë est la conséquence de l'expansion périphérique

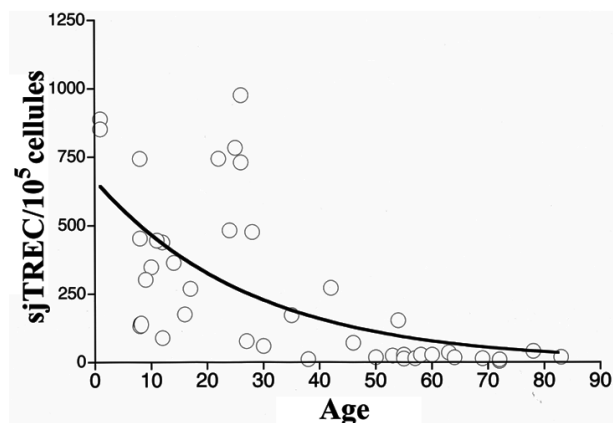


Figure 2. Décours avec l'âge du niveau de sjTREC par million de lymphocytes T (repris de la référence 17 avec la permission d'Elsevier)

des lymphocytes T présents dans le greffon (voie thymo-indépendante) et plus particulièrement de l'expansion périphérique des lymphocytes T CD4 naïfs du donneur. En accord avec ce modèle, la déplétion en lymphocytes T de la greffe est un moyen extrêmement efficace de prévention de la GvHD aiguë. Par contre, la physiopathologie de la GvHD chronique reste mal connue.

Les infections opportunistes

Les infections opportunistes sont une conséquence directe du délai de la reconstitution immunitaire après greffe, bien que l'immunosuppression médicamenteuse donnée comme prophylaxie de la GvHD puisse également jouer un rôle. Elles sont causées soit par des virus (par exemple, l'infection par le cytomegalovirus (CMV) peut entraîner des pneumopathies mortelles), des bactéries, des protozoaires, ou des champignons. Plusieurs études ont corrélé la reconstitution immunitaire globale ou spécifique d'un agent infectieux (par exemple du CMV) avec le risque d'infection après la greffe (10).

LES TREC, UN OUTIL IMPORTANT D'AIDE À L'ANALYSE DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE APRÈS GREFFE (TABLEAU I)

L'analyse des TREC a permis de mieux comprendre la cinétique de reconstitution des populations T après allogreffe de CSH (11). Ainsi, on constate une augmentation des lymphocytes T matures (augmentation des lymphocytes T sans augmentation -ou même avec diminution- parallèle du nombre de TREC) pendant les trois premiers mois après la greffe, confirmant ainsi que la phase initiale de la reconstitution immunitaire est bien due à la prolifération des lymphocytes T matures contenus dans le greffon (12). La néogenèse T (mise en évidence par une augmentation du nombre de TREC concomitante de l'augmen-

TABLEAU I. TREC ET RECONSTITUTION IMMUNITAIRE APRÈS GREFFE DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

<p>Facteurs influençant les taux de TREC postgreffe</p> <ul style="list-style-type: none"> - Age du receveur/donneur - Taux de TREC prégreffe du receveur - Composition du greffon (déplétion des lymphocytes T) - GvHD aiguë ou chronique - Infection à CMV
<p>Facteurs corrélés aux taux de TREC</p> <ul style="list-style-type: none"> - Taux de lymphocytes CD4+ naïfs postgreffe (TREC postgreffe) - Reconstitution immunitaire (TREC prégreffe) - Infections opportunistes (TREC postgreffe, corrélation inverse) - Survie (TREC prégreffe)

tation du nombre de lymphocytes T) ne devient significative qu'après 6 mois suivant la greffe chez les jeunes adultes (12). Elle est plus précoce chez les enfants, et nettement plus tardive (voire absente) chez les adultes plus âgés.

De façon très intéressante, l'analyse du taux de TREC chez le receveur avant la greffe est un très bon marqueur prédictif de la reconstitution immunitaire postgreffe, suggérant que la vitesse de reconstitution immunitaire après greffe dépendrait fortement de l'activité thymique prégreffe chez le receveur (13).

Il existe une forte corrélation entre le taux de lymphocytes T CD4 naïfs et le taux de TREC après la greffe (11, 14). D'ailleurs, les principaux facteurs associés à une fonction thymique faible (taux de TREC bas) sont les mêmes que ceux qui avaient préalablement été associés à des taux bas de lymphocytes T CD4 naïfs. Parmi ceux-ci : un âge avancé du receveur, un âge avancé du donneur, la survenue d'une GvHD aiguë ou chronique, et une déplétion en lymphocytes T du greffon (11). De plus, des niveaux de TREC bas en postgreffe ont été associés à une augmentation du risque d'infections opportunistes (15). Enfin, une étude a suggéré que le taux de TREC chez le patient avant la greffe serait associé à la survie après allogreffe, un taux élevé de TREC conduirait ainsi à une meilleure survie (16).

APPLICATION EN GÉRIATRIE (FIG. 2)

Pendant longtemps, on a pensé que la fonction thymique diminuait après la puberté parallèlement à l'enrichissement progressif du stroma thymique en cellules adipeuses. Ce phénomène était appelé «involution adipeuse du thymus». Selon cette conception, après la puberté, un répertoire T complet était constitué en périphérie et le thymus devenait alors inutile. Ces dernières années, de nombreuses observations ont conduit à une révision complète de cette conception. En effet, le thymus reste actif tard dans la vie adulte et continue à générer des cellules T pour

alimenter le répertoire T périphérique, même si la thymopoïèse commence à décliner après l'âge de 30 ans (Fig. 2). Un certain nombre de TREC peut être mesuré chez des patients âgés de 80 ans (17).

Le vieillissement du thymus (avec diminution de la thymopoïèse et de la génération de nouveaux TCR) a toutefois des implications importantes dans le problème de l'immunosénescence. Durant la vie adulte, le répertoire T est maintenu par un jeu dynamique entre la thymopoïèse et l'expansion post-thymique des cellules T périphériques. L'hypothèse actuelle soutient que la thymopoïèse contribue davantage au pool périphérique de cellules T chez l'individu jeune et en bonne santé, tandis que la prolifération des cellules T périphériques post-thymiques intervient pour maintenir le pool périphérique chez l'individu plus âgé. Ainsi, chez les individus âgés, la diminution du taux des TREC au niveau des cellules T périphériques reflète la diminution de la thymopoïèse du fait de l'expansion périphérique des cellules T. La diminution de la diversité du répertoire T expliquerait la sensibilité des personnes âgées aux maladies infectieuses, voire aux cancers. De nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer l'atrophie du thymus avec l'âge, mais aucune n'a pu être définitivement établie. Des recherches visent aujourd'hui à régénérer la fonction thymique afin de restaurer la diversité du répertoire T.

APPLICATION EN ENDOCRINOLOGIE : INFLUENCES NEUROENDOCRINES SUR LA THYMOPOÏÈSE

Le thymus fut longtemps considéré comme un organe endocrine. Le modèle de communication «endocrine» implique qu'une hormone est sécrétée dans le sang par une glande, est véhiculée via la circulation sanguine, et agit à distance du site de production. Ce modèle ne s'applique pas du tout pour décrire les interactions entre thymocytes et stroma thymique. Néanmoins, le fonctionnement du système immunitaire est sous l'influence du système endocrine et le tissu thymique exprime des récepteurs pour de nombreuses hormones. Cette notion fut d'abord développée par Smith en 1930 suite à l'observation qu'une involution thymique résultait d'une hypophysectomie.

Une involution thymique est également observée dans l'hypothyroïdie induite expérimentalement. Inversement, une hyperplasie thymique (ainsi que l'expression intra-thymique du récepteur à la TSH) a été observée chez des patients

atteints d'une thyroïdite auto-immune de type 3 (maladie de Graves-Basedow) (18).

Les hormones stéroïdiennes ont également un impact sur la fonction thymique. Les récepteurs aux glucocorticoïdes, aux stéroïdes gonadiques et à la vitamine D sont exprimés au niveau du tissu épithélial thymique et au niveau des thymocytes. Une fluctuation de taux d'androgènes induit des changements de poids, de la cellularité et de la composition cellulaire du thymus. Chez le rat, le thymus est hypertrophié après orchidectomie. Les glucocorticoïdes exercent un rôle pro-apoptotique sur les thymocytes, et le rôle de l'axe corticotrope sur la régulation thymique a été mis en évidence dans des désordres inflammatoires divers. Enfin, l'hormone de croissance (GH) et l'induction par la GH du facteur de croissance apparenté à l'insuline de type 1 (IGF-1) sont de plus en plus impliqués dans le contrôle du développement et de la fonction des lymphocytes T. Nous étudions actuellement la thymopoïèse évaluée par la technologie des TREC chez des adultes présentant une déficience en GH qui sont traités par une injection sous-cutanée quotidienne de GH.

CONCLUSION

Comme l'exposé de ces quelques applications a tenté de le montrer, l'analyse des TREC est devenu un outil extrêmement utile pour une estimation fiable (mais non parfaite) de la génération intrathymique des lymphocytes T.

REMERCIEMENTS

Ces travaux sont soutenus en partie par le FNRS et par la Région wallonne (DGTRE, projet Réseaux 2 Senegene).

BIBLIOGRAPHIE

1. Castermans E, Morrhaye G, Marchand S, et al.— Méthodes actuelles d'évaluation de la fonction du thymus. *Rev Méd Liège*, 2007, **62**, 675-678.
2. Baron F, Storb R.— Allogeneic hematopoietic cell transplantation as treatment for hematological malignancies: a review. *Springer Semin Immunopathol*, 2004, **26**, 71-94.
3. Storek J, Witherspoon RP.— Immunological reconstitution after hemopoietic stem cell transplantation. In Atkinson K, Champlin R, Ritz J, Fibbe WE, Ljungman P, Brenner MK Eds., *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 194.
4. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al.— Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *New Engl J Med*, 1979, **300**, 1068-1073.

5. Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, et al.— Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol*, 2005, **23**, 1993-2003.
6. Sullivan KM.— Graft-vs.-host disease, in Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR Eds., Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation, Blackwell, Oxford, 2004, p. 635.
7. Baron F, Schaaf-Lafontaine N, Humblet-Baron S, et al.— T-cell reconstitution after unmanipulated, CD8-depleted or CD34-selected nonmyeloablative peripheral blood stem-cell transplantation. *Transplantation*, 2003, **76**, 1705-1713.
8. Baron F, Storer B, Maris MB, et al.— Unrelated donor status and high donor age independently affect immunologic recovery after nonmyeloablative conditioning. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2006, sous presse.
9. Baron F, Sandmaier BM.— Current status of hematopoietic stem cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Curr Opin Hematol*, 2005, **12**, 435-443.
10. Hakki M, Riddell SR, Storek J, et al.— Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood*, 2003, **102**, 3060-3067.
11. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al.— Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*, 2000, **355**, 1875-1881.
12. Hochberg EP, Chillemi AC, Wu CJ, et al.— Quantitation of T-cell neogenesis in vivo after allogeneic bone marrow transplantation in adults. *Blood*, 2001, **98**, 1116-1121.
13. Chen X, Barfield R, Benaim E, et al.— Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood*, 2005, **105**, 886-893.
14. Storek J, Joseph A, Dawson MA, et al.— Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation*, 2002, **73**, 1154-1158.
15. Lewin SR, Heller G, Zhang L, et al.— Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood*, 2002, **100**, 2235-2242.
16. Clave E, Rocha V, Talvensari K, et al.— Prognostic value of pretransplantation host thymic function in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2005, **105**, 2608-2613.
17. Geenen V, Poulin JF, Dion ML, et al.— Quantification of T-cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J Endocrinol*, 2003, **176**, 305-311.
18. Murakami M, Hosoi Y, Negishi T, et al.— Thymic hyperplasia in patients with Graves' disease. *J Clin Invest*, 1996, **98**, 2228-2234.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. V. Geenen, Centre d'Immunologie ULg (CIL), CHU Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.