

La cellule dendritique du thymus humain

Les cellules dendritiques expriment très fortement les antigènes d'histocompatibilité de classe II et sont très actives dans l'axe afférent de la réponse immunitaire dépendante des lymphocytes T. Elles jouent en effet un rôle majeur de cellules présentatrices d'antigènes et de cellules accessoires de la prolifération lymphocytaire. Les cellules dendritiques du thymus, localisées dans les régions médullaires et corticomédullaire, font partie de cette grande famille de cellules dendritiques. De plus, leur localisation et leurs caractéristiques fonctionnelles spécifiques confèrent aux cellules dendritiques thymiques une place centrale dans les mécanismes immunologiques responsables de la maturation des thymocytes.

Marielle Lafontaine
Diane Landry
Micheline Pelletier
Serge Montplaisir

Depuis 1970, l'importance du rôle des cellules dendritiques (CDe) au sein de divers processus immunologiques a particulièrement retenu l'attention. Ces cellules originaires de la moelle osseuse sont principalement localisées dans les régions riches en lymphocytes T des organes lymphoïdes. Elles se trouvent également dans des organes non lymphoïdes, en particulier la peau ; elles circulent enfin dans le sang et la lymphe. Elles ont en commun un certain nombre de traits morphologiques, phénotypiques et fonctionnels, auxquels s'ajoutent des caractéristiques particulières reliées à leur localisation ou à leur degré de maturation.

Les travaux de Steinman et Cohn [1] sur les CDe de la rate de souris et ceux de Fritsch *et al* [2] sur la cellule de Langerhans (CL) (CDe de l'épiderme et des muqueuses) ont ouvert la voie aux études fonctionnelles. Ainsi, en disposant de différentes populations cellulaires purifiées (CDe,

macrophages,...) il a été possible de leur attribuer un rôle spécifique. Enfin, leur faible proportion (0,5 à 2 %) observée dans tous les tissus où elles sont localisées explique, au moins partiellement, pourquoi les CDe ne se sont que tardivement imposées à titre de famille cellulaire distincte.

Fonctions générales des cellules dendritiques

Des tests fonctionnels *in vivo* [3, 4, 5] et *in vitro* [6] ont permis de mettre en évidence la pluralité fonctionnelle des CDe. On a établi que les CDe assument comme principale fonction celle de cellules présentatrices d'antigènes (CPAg). Cette propriété a été évaluée avec plusieurs systèmes antigéniques : antigènes exogènes solubles (toxine tétanique), PPD (protéine purifiée dérivée de la tuberculine) ou antigènes polypeptidiques (ovalbumine, hémocyanine). Les CDe possèdent d'autres propriétés importantes. Ainsi, elles seraient essentielles au

ADRESSE

S. Montplaisir : *Directeur*. Département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal.

RÉFÉRENCES

1. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973 ; 137 : 1142-62.
2. Fritsch P, Diem E, Hönigsmann H. Langerhans cells in cell culture. Survival and identification. *Arch Dermatol Forsch* 1973 ; 248 : 123-9.
3. Knight SC. Veiled cells-« dendritic cells » of the peripheral lymph. *Immunobiol* 1984 ; 168 : 349-61.
4. Hanau D, Stampf JC, Fabre M, Grosshans E, Benez C. Induction of tolerance to urushiol by epicutaneous application of this hapten on dinitrofluorobenzene-treated skin. *J Invest Dermatol* 1985 ; 85 : 9-11.
5. Schmitt D. Données récentes sur la cellule de Langerhans. *Ann Dermatol Venerol* 1986 ; 113 : 1155-9.
6. Metlay JP, Puré E, Steinman RM. Control of the immune response at the level of antigen-presenting cells : a comparison of the function of dendritic cells and B lymphocytes. *Adv Immunol* 1989 ; 47 : 45-116.
7. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991 ; 9 : 271-96.
8. Fowlkes BJ, Pardoll DM. Molecular and cellular events of T cell development. *Adv Immunol* 1989 ; 44 : 207-64.
9. Pelletier M, Tautu C, Landry D, Montplaisir S, Chartrand C, Perreault C. Characterization of human thymic dendritic cells in culture. *Immunology* 1986 ; 58 : 263-70.
10. Barthélémy H, Pelletier M, Landry D, Lafontaine M, Perreault C, Tautu C, Montplaisir S. Demonstration of OKT6 antigen on human thymic dendritic cells in culture. *Lab Invest* 1986 ; 55 : 540-5.
11. Landry D, Lafontaine M, Barthélémy H, Paquette N, Chartrand C, Pelletier M, Montplaisir S. Human thymic dendritic cell-thymocyte association : ultrastructural cell phenotype analysis. *Eur J Immunol* 1989 ; 19 : 1855-60.
12. Schmitt D, Dezutter-Dambuyant C, Staquet MJ, Thivolet J. La cellule de Langerhans. *médecine/science* 1989 ; 5 : 103-11.
13. Landry D, Lafontaine M, Cossette M, Barthélémy H, Chartrand C, Montplaisir S, Pelletier M. Human thymic dendritic cells. Characterization, isolation and functional assays. *Immunology* 1988 ; 65 : 135-42.

développement de la réponse humorale primaire dépendante des lymphocytes T. En outre, elles constituent de puissants stimulateurs de la réaction lymphocytaire mixte (RLM) allogénique et de la génération de lymphocytes T cytotoxiques. Ces deux réactions obtenues *in vitro* en réponse à une stimulation primaire allogénique peuvent être considérées comme l'équivalent *in vivo* de la phase de sensibilisation et de la phase effectrice d'un rejet de greffe comme l'ont confirmé des résultats obtenus chez la souris et le rat.

Un autre modèle *in vivo*, celui de l'eczéma de contact a permis de préciser le rôle immunologique des CL. Les résultats obtenus indiquent que les CL forment, dans la peau, un réseau cellulaire dont la fonction est de recevoir et de présenter les Ag afin de déclencher une réponse immunitaire. De plus, les CDe prélevées dans les ganglions situés près de la zone d'application de l'allergène peuvent susciter la prolifération des lymphocytes T *in vitro* ; cette réaction laisse supposer que certaines CDe dérivent des CL qui migrent via la lymphe vers les ganglions où elles peuvent présenter l'Ag.

Les CDe jouent aussi un rôle très efficace en tant que cellules accessoires (CA) de la prolifération polyclonale des lymphocytes T en réponse à différents agents mitogènes comme la Concanavaline A (Con A) et la phytohémagglutinine (PHA), ainsi qu'en réponse à des substances oxydantes comme le périodate de sodium.

Par ailleurs, les résultats de diverses expériences menées sur des chimères de moelle osseuse de souris, sur des souris thymectomisées, sur des cultures d'organe thymique et, plus récemment, sur des souris transgéniques supportent l'hypothèse selon laquelle le processus de maturation des lymphocytes T et notamment l'acquisition de la tolérance aux antigènes du soi bénéficient d'une contribution importante des CDe du thymus [8].

Les cellules dendritiques et le thymus

Le thymus est un organe lymphoïde central bilobé, divisé en lobules orga-

nisés en un cortex externe et une médulla centrale. Il est composé principalement de thymocytes c'est-à-dire de lymphocytes T non encore parvenus à maturité qui forment le compartiment lymphoïde. Cellules épithéliales, macrophages et CDe constituent le compartiment non lymphoïde qui, on le reconnaît aujourd'hui, offre le microenvironnement spécifique nécessaire à la différenciation des lymphocytes T.

Le développement des lymphocytes T est resté pendant longtemps l'une des plus grandes énigmes de l'immunologie. Depuis quelques années, la compréhension des phénomènes d'interactions cellulaires et moléculaires qui conduisent à la génération des lymphocytes T « matures » a considérablement progressé [Revu dans 8]. Les précurseurs des cellules T, en provenance de la moelle osseuse, subissent une maturation intrathymique de trois ordres : 1. l'acquisition d'un phénotype « mature », 2. la sélection cellulaire qui comprend deux modes d'action : l'un, positif, l'autre négatif, 3. l'acquisition de fonctions effectrices.

On peut définir la sélection positive comme la suite des mécanismes qui conduit à ne retenir que les seuls thymocytes capables de reconnaître les formes alléliques des produits du complexe majeur d'histocompatibilité [CMH], de classe I ou de classe II, exprimés dans le thymus.

La notion de sélection négative a été proposée pour expliquer comment le système immunitaire en développement apprend à distinguer le soi du non-soi, c'est-à-dire à réagir aux Ag étrangers tout en étant tolérant à l'égard de ses propres Ag. Trois mécanismes généraux d'induction de la tolérance sont connus : la suppression, l'inactivation fonctionnelle (ou anergie) et la délétion proprement dite des clones autoréactionnels. Dans le thymus, des données de plus en plus nombreuses étayent l'hypothèse que la délétion clonale est le principal mécanisme responsable de l'induction de la tolérance.

Au terme de ces observations, la question se pose alors de savoir quelles sont les cellules thymiques exprimant les molécules du CMH susceptibles d'entrer en contact avec les thymocytes afin de leur apporter un

signal qui aurait pour effet leur sélection positive ou négative. Bien qu'elle ne fasse pas l'unanimité, l'hypothèse la plus admise à l'heure actuelle consiste à considérer que les CDe, ou à tout le moins, les cellules non lymphoïdes originaires de la moelle osseuse, seraient responsables de la sélection négative et que, pour leur part, les cellules épithéliales coordonneraient la sélection positive.

Les cellules dendritiques du thymus humain

C'est donc leur nature et leur localisation qui fondent l'intérêt que l'on porte aux CDe du thymus humain. Les CDe du thymus ont fait l'objet de peu d'études. Chez l'animal elles ont été isolées à partir des thymus de souris et de rats, mais souvent divergents, les résultats obtenus n'ont qu'une valeur limitée. Nous présentons ici les travaux de notre groupe sur les CDe du thymus humain. Nous avons utilisé des biopsies thymiques provenant d'enfants qui ont subi une intervention chirurgicale cardiovasculaire à l'Hôpital Sainte-Justine (Montréal).

Dans le thymus, les CDe sont localisées dans la région médullaire ainsi qu'à la jonction corticomédullaire. Il s'agit de cellules de grande taille (20 à 30 μm), avec un cytoplasme clair dont les nombreuses invaginations s'enroulent souvent autour d'autres cellules, en particulier autour des thymocytes. Leur cytoplasme contient des granules denses entourés d'une membrane et un complexe de Golgi bien développé. Le noyau très irrégulier et souvent excentrique présente une euchromatine claire et diffuse, une hétérochromatine à distribution périnucléaire caractéristique et un nucléole bien visible [9]. Leur morphologie particulière et l'absence de lysosomes et de phagolysosomes les distinguent des macrophages.

La mise en culture des suspensions cellulaires obtenues par broyage mécanique des spécimens thymiques a permis de mieux caractériser les CDe. Avec la technique que nous employons, les cellules adhèrent au flacon de culture au bout d'environ 7 jours. Elles présentent alors (microscopie optique) un cytoplasme très ramifié formé de nombreux pro-

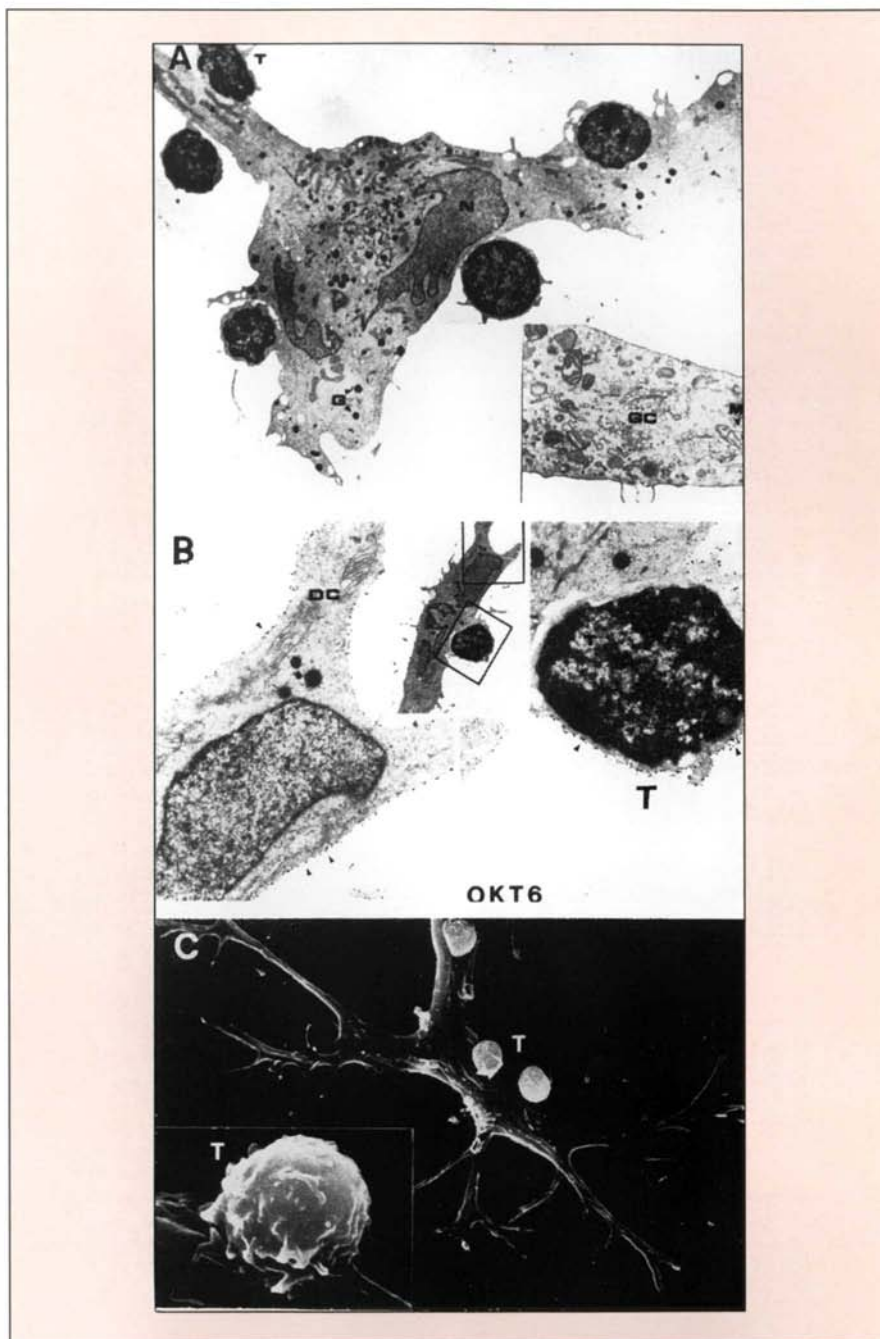


Figure 1. **Illustration d'une cellule dendritique du thymus en microscopie électronique à transmission (A et B) et à balayage (C).** A. Les CDe en culture sont souvent en contact étroit avec plusieurs thymocytes (T). Notez le noyau (N) irrégulier et les granules denses (G) ($\times 15,600$). Encart = agrandissement d'un prolongement du cytoplasme de la CDe montrant l'abondance des mitochondries (M) et un complexe de Golgi (GC) ($\times 43,400$). B. La présence de la molécule CD1 à la surface de la CDe en culture a été montrée avec l'Ac OKT6 à l'aide de la technique de protéine A - or. Les têtes de flèches indiquent les grains d'or colloïdal de 15 nm à la surface des cellules. La molécule CD1 se retrouve aussi sur tous les thymocytes (T) ($\times 25,500$). Encart = faible grossissement de la CDe représentant les deux zones choisies pour l'étude de la molécule CD1 ($\times 8,300$). C. La microscopie à balayage permet l'observation de l'ultrastructure de surface de la CDe en contact avec les thymocytes (T) $\times 8,500$. Encart = Détail du contact entre un thymocyte (T) et une CDe ($\times 22,200$).

longements longs et effilés. L'étude ultrastructurale révèle que les CDe obtenues en culture ont la même morphologie que les cellules observées *in situ* [9] (figure 1a).

Avec les techniques d'immunomarquage à l'or colloïdal nous avons observé qu'elles expriment très fortement les antigènes de classe II du CMH, qualité commune à toutes les CDe. Elles expriment également le CD1 (figure 1b) et très faiblement le CD4, phénotype qu'elles partagent avec les CL [10, 11, 12]. Cette propriété conforte l'hypothèse selon laquelle ces deux populations appartiendraient à la même famille cellulaire.

Les CDe du thymus ne présentent aucune activité estérasiq

miale. De plus, les tests de phagocytose immune et non immune révèlent que les CDe en culture sont dépourvues d'activité phagocytaire et qu'elles n'expriment pas le récepteur Fc des immunoglobulines [13].

Nous avons également observé, dans ces cultures, la formation d'associations très étroites entre les CDe et les thymocytes [11] (figure 1c). Ces formations cellulaires se rapprochent de celles observées *in situ* chez l'humain [9] et la souris [14]. L'analyse phénotypique des thymocytes accolés aux CDe en culture révèle que la majorité d'entre eux expriment les molécules CD2, CD1, CD4 et CD8 et, dans une moindre proportion, la molécule CD3. Par contre, ils n'expriment pas le IL-2R excluant

ainsi l'idée qu'ils soient très « immatures » ou qu'ils aient été activés. Le phénotype des thymocytes accolés aux CDe correspond à celui de la population de thymocytes double positifs CD4⁺ CD8⁺ (DP) en transition vers un stade de simple positif CD4⁺ ou CD8⁺ avec une augmentation de l'expression du récepteur T/CD3. Cette population de thymocytes serait présente dans la région corticomédullaire du thymus, région correspondant à la localisation des CDe. La signification de ces interactions n'est toujours pas connue, cependant, elles viennent consolider l'hypothèse selon laquelle des interactions avec des cellules originaires de la moelle osseuse, situées dans la région corticomédullaire, seraient responsables de la dél

RÉFÉRENCES

14. Kyewski BA, Momburg F, Schirrmacher V. Phenotype of stromal cell-associated thymocytes *in situ* is compatible with selection of the T cell repertoire at an « immature » stage of thymic T cell differentiation. *Eur J Immunol* 1987 ; 17 : 961-7.
15. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979 ; 282 : 324-6.
16. Barclay AN, Mayrhofer G. Bone marrow origin of Ia-positive cells in the medulla of rat thymus. *J Exp Med* 1981 ; 153 : 1666-71.
17. Pelletier M, Perreault C, Landry D, David M, Montplaisir S. Ontogeny of human epidermal Langerhans cells. *Transplantation* 1984 ; 38 : 544-6.
18. Lafontaine M, Landry D, Montplaisir S. The human thymic dendritic cell phenotype and its modification in culture. *Cell Immunology* 1992 ; 142 : 238-51.

Marqueur	CDe du thymus [18]	CDe du sang [19]	CL [20]
HLA-ABC	+	+	+
HLA-DR	+	+	+
CD45	+	+	+
CD75RA	+	+	+
CD11a	+ (65 %)	+	- / +
CD11b	-	+	+
CD11c	-	+	- / +
CD54	+ (35 %)	+	-
CD58	+ ^a	+	nd
CD25	-	+	-
CD1	- ^b	-	+
CD4	- ^c	-	+

- a Le CD58 est positif sur les cellules dendritiques en association avec les thymocytes.
 b Le CD1 est acquis en cours de culture.
 c Le CD4 est exprimé faiblement sur les cellules dendritiques adhérentes en culture de 5 à 6 jours.
 nd non déterminé.

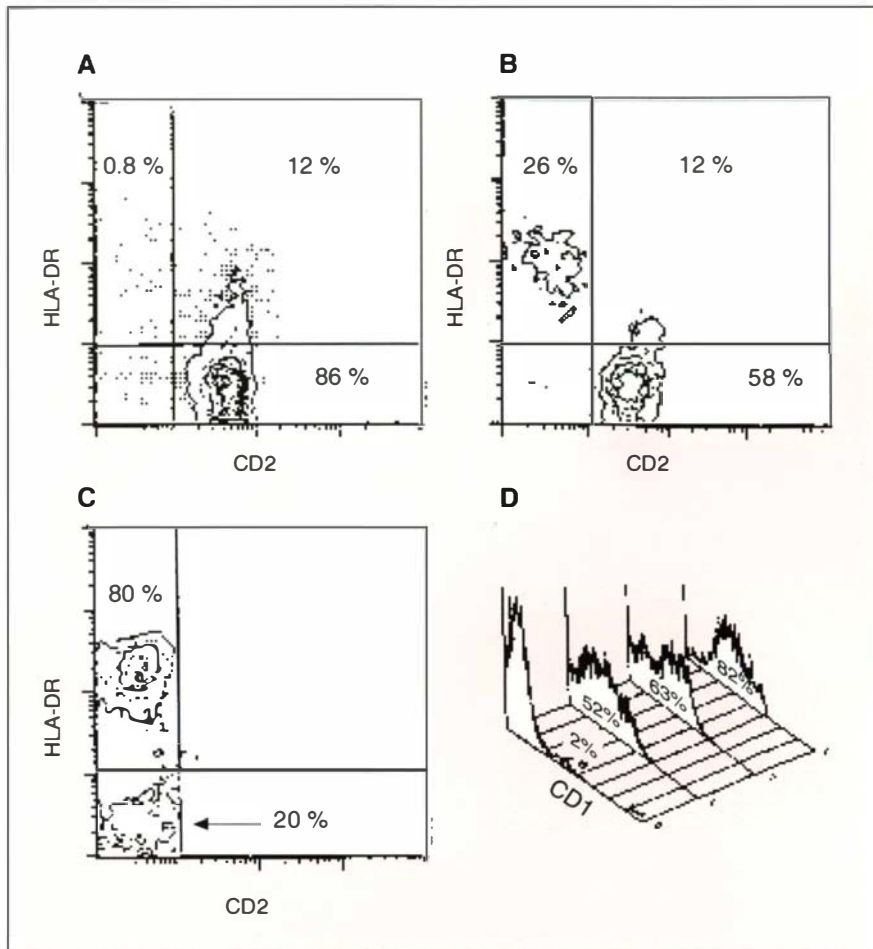


Figure 2. Analyse cytofluorométrique des cellules dendritiques thymiques. Les suspensions cellulaires thymiques non fractionnées (A), enrichies en CDe par gradient de densité (B) et purifiées en CDe par immuno-adhérence (C) sont analysées sous forme de cytogramme après un double immunomarquage en fluorescence avec les anticorps anti-HLA-DR (axe des y) et CD2 (axe des x). On note une augmentation du nombre de cellules qui expriment fortement les Ag HLA-DR à chaque étape de purification. En (D) un histogramme biparamétrique en 3 dimensions montre l'acquisition progressive de la molécule CD1 par les cellules dendritiques, au jour 0, 1, 2 et 5 de culture.

tion, au stade DP, des clones de thymocytes auto-réactifs [8]. Chez l'animal, les résultats obtenus lors de greffes de moelle osseuse allogéniques ont démontré l'origine médullaire des CDe [15, 16]. Chez l'humain, nos travaux ont confirmé l'origine médullaire des CL lors de transplantations de moelle osseuse entre un donneur et un receveur de sexes différents [17]. Cependant, le précurseur médullaire est encore mal connu. Par une méthode de mise en culture de la moelle osseuse humaine, inspirée de celle utilisée pour le thymus, nous avons mis en

évidence une cellule qui présente les caractéristiques des CDe thymiques ; cependant, elles n'expriment pas la molécule CD1 [résultats non publiés]. Ainsi, on ne peut affirmer qu'une CDe « mature » existe dans la moelle osseuse mais, il n'est pas exclu qu'à l'instar de la lignée lymphocytaire T, le précurseur hématopoïétique après migration se différencie dans d'autres tissus. Aujourd'hui, le meilleur argument en faveur d'une origine hématopoïétique des CDe demeure, du moins chez l'humain, l'expression de l'Ag membranaire CD45.

Isolement des cellules dendritiques

Idéalement seule une suspension suffisamment homogène de CDe permet l'étude fonctionnelle de ces cellules. Pour obtenir une telle suspension, nous avons mis en œuvre une série d'opérations de purification. En voici les principales étapes : les suspensions cellulaires obtenues par broyage mécanique sont centrifugées sur un gradient de densité de Percoll auto-généré ; les cellules de faible densité sont ensuite traitées avec un mélange d'anticorps monoclonaux (CD2, CD7 et CD11b), procédé qui permet d'éliminer les thymocytes et les rares macrophages présents dans la suspension par une technique d'immuno-adhérence indirecte sur billes magnétiques. Le résultat : une population contenant de 65 à 75 % de CDe. La figure 2 donne un aperçu de la composition cellulaire obtenue après chaque étape de purification.

L'étude ultrastructurale révèle que les cellules qui expriment fortement les antigènes de classe II du CMH présentent la morphologie des CDe observées *in situ* et en culture (figure 3a et b).

Les résultats de l'étude phénotypique au cytofluoromètre [18] indiquent que les CDe sont vraiment distinctes des monocytes/macrophages et que, si elles proviennent de la même cellule souche, elles doivent se différencier très tôt au cours de leur ontogénie. Les CDe du thymus humain n'expriment aucun des marqueurs communs aux monocytes/macrophages tels le CD14, le CD16 et le CD11b. De plus, les CDe fraîchement isolées n'expriment aucun des marqueurs spécifiques aux lymphocytes T et B. Elles sont aussi CD57⁻ et CD56⁻, marqueurs des cellules NK, CD25⁻ et CD71⁻. La caractéristique majeure des CDe du thymus humain est leur haut taux d'expression des Ag de classe I et de classe II du CMH. Cette caractéristique est compatible avec les exigences requises par une cellule pouvant induire la tolérance aux Ag du soi pendant la maturation thymique. Le Tableau I présente un résumé comparatif du phénotype des différentes cellules dendritiques isolées chez l'humain. Comme nous l'avons déjà mentionné, les variations obser-

RÉFÉRENCES

19. Freudenthal PS, Steinman RM. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 7698-702.
20. Romani N, Lenz A, Glassel H, Stössel H, Stanzl U, Majdic O, Fritsch P, Schuler G. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 1989 ; 93 : 600-9.
21. Landry D, Doyon L, Poudrier J, Lafontaine M, Montplaisir S. Accessory function of human thymic dendritic cells in Con A induced proliferation of autologous thymocyte subsets. *J Immunol* 1990 ; 144 : 836-43.
22. Lafontaine M, Landry D, Blanc-Brunât N, Pelletier M, Montplaisir S. IL-1 production by human thymic dendritic cells. Studies on the interrelation with DC accessory function. *Cell Immunology* 1991 ; 135 : 431-44.
23. DeLuca D, Mizel SB. I-A-positive nonlymphoid cells and T cell development in murine fetal thymus organ cultures : interleukin 1 circumvents the bloc in T cell differentiation induced by monoclonal anti-I-A antibodies. *J Immunol* 1986 ; 137 : 1435-41.

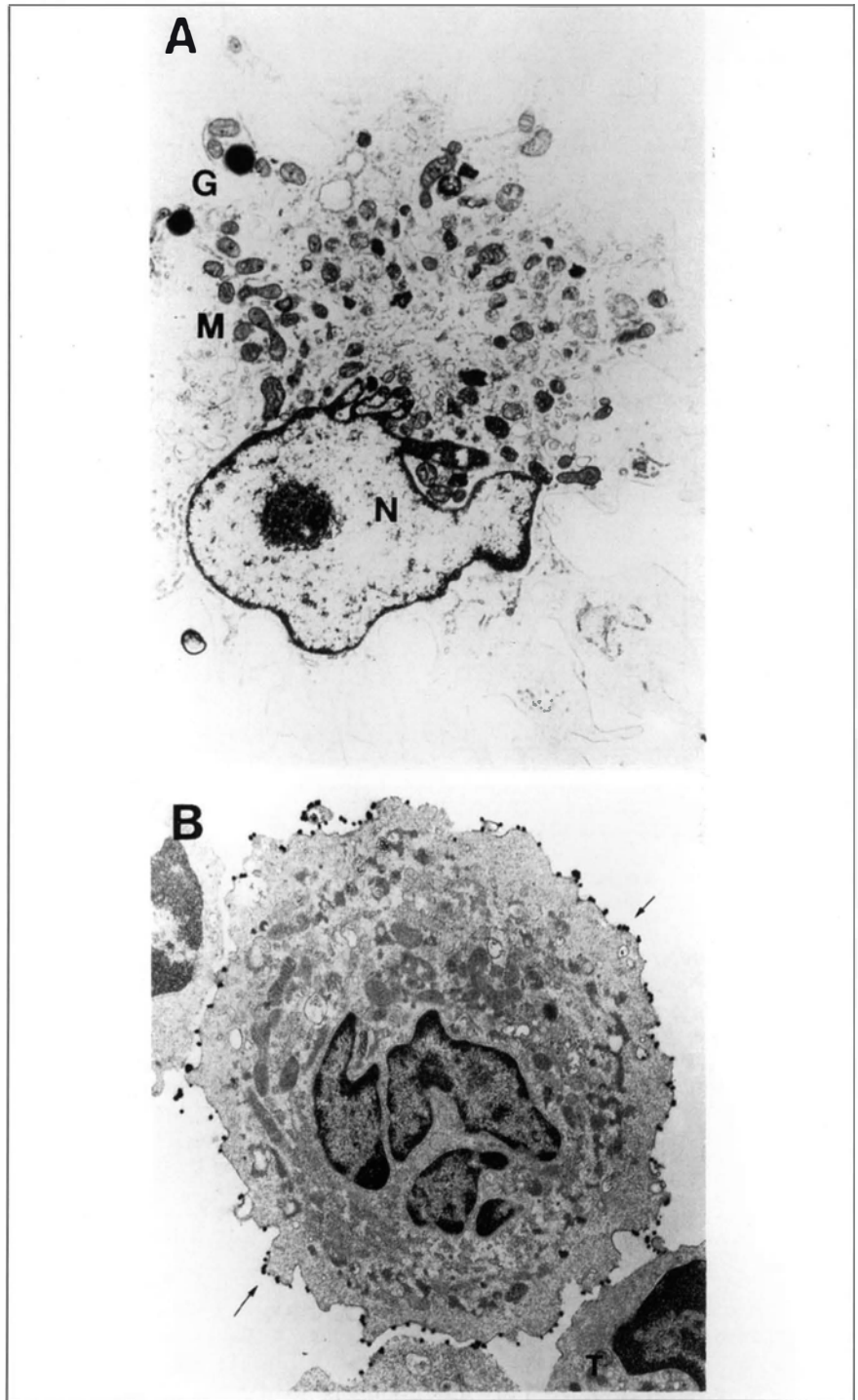


Figure 3. **Étude ultrastructurale de la cellule dendritique après isolement.** (A) Les CDe isolées présentent les caractéristiques morphologiques de la CDe in situ : noyau irrégulier (N) avec un anneau d'hétérochromatine périnucléaire, cytoplasme clair, mitochondries (M) abondantes, granules (G) denses et contour irrégulier ($\times 12,500$). Notez cependant que le cytoplasme est plus rétracté que lorsque les cellules sont obtenues par culture adhérente (voir figure 1a). (B) Les molécules HLA-DR sont identifiées grâce à un immunomarquage à l'or colloïdal (grains d'or de 30 nm). Les molécules HLA-DR sont distribuées de façon régulière sur la membrane cytoplasmique de la CDe tandis qu'elles sont absentes sur les thymocytes (T) avoisinants ($\times 15,500$).

vées peuvent soit dépendre des méthodes d'isolement, soit être reliées à la localisation des CDe ou à leur degré de maturation. Ainsi, nous avons observé que la molécule CD1 est absente des cellules fraîchement isolées, et que son expression augmente régulièrement en cours de culture (figure 2d). Ce phénomène demeure inexpliqué, mais les résultats obtenus entrent en corrélation avec ceux obtenus avec les cellules adhérentes après 7 à 12 jours de culture [11].

Certes l'étude des CDe thymiques n'en est encore qu'à ses débuts. C'est pourquoi, pour le moment, leur singularité phénotypique semble, à première vue, étonnante. Il est, en effet, difficile d'obtenir et d'identifier un AcM spécifique pour un type de cellules si les préparations immunogéniques qui servent au criblage de l'Ac sont dépourvues ou ne contiennent que très peu de cellules à identifier. Cependant nous avons pu tirer parti de l'absence de la plupart des marqueurs communs aux autres lignées cellulaires et de la forte expression des Ag de classe II du CMH pour obtenir des suspensions contenant plus de 95 % de CDe, grâce à une méthode de tri au cytofluoromètre [18].

Étude fonctionnelle des cellules dendritiques

Une des principales propriétés des CDe tient à leur capacité de stimuler une réaction lymphocytaire mixte. Les CDe du thymus humain ne font pas exception [13]. Elles stimulent la prolifération de lymphocytes T allogéniques plus efficacement que les monocytes circulants ; cette activité est bloquée par un anticorps spécifique aux Ag de classe II du CMH. Les CDe du thymus humain sont aussi très actives comme cellules accessoires de la prolifération des lymphocytes T autologues stimulés par la Con A [21]. Des suspensions contenant 20 % de CDe se révèlent plus efficaces que des populations comportant plus de 85 % de monocytes. Cette qualité est aussi commune aux autres CDe.

Dans le thymus, les CDe sont en contact avec des thymocytes et non pas avec des lymphocytes parvenus à

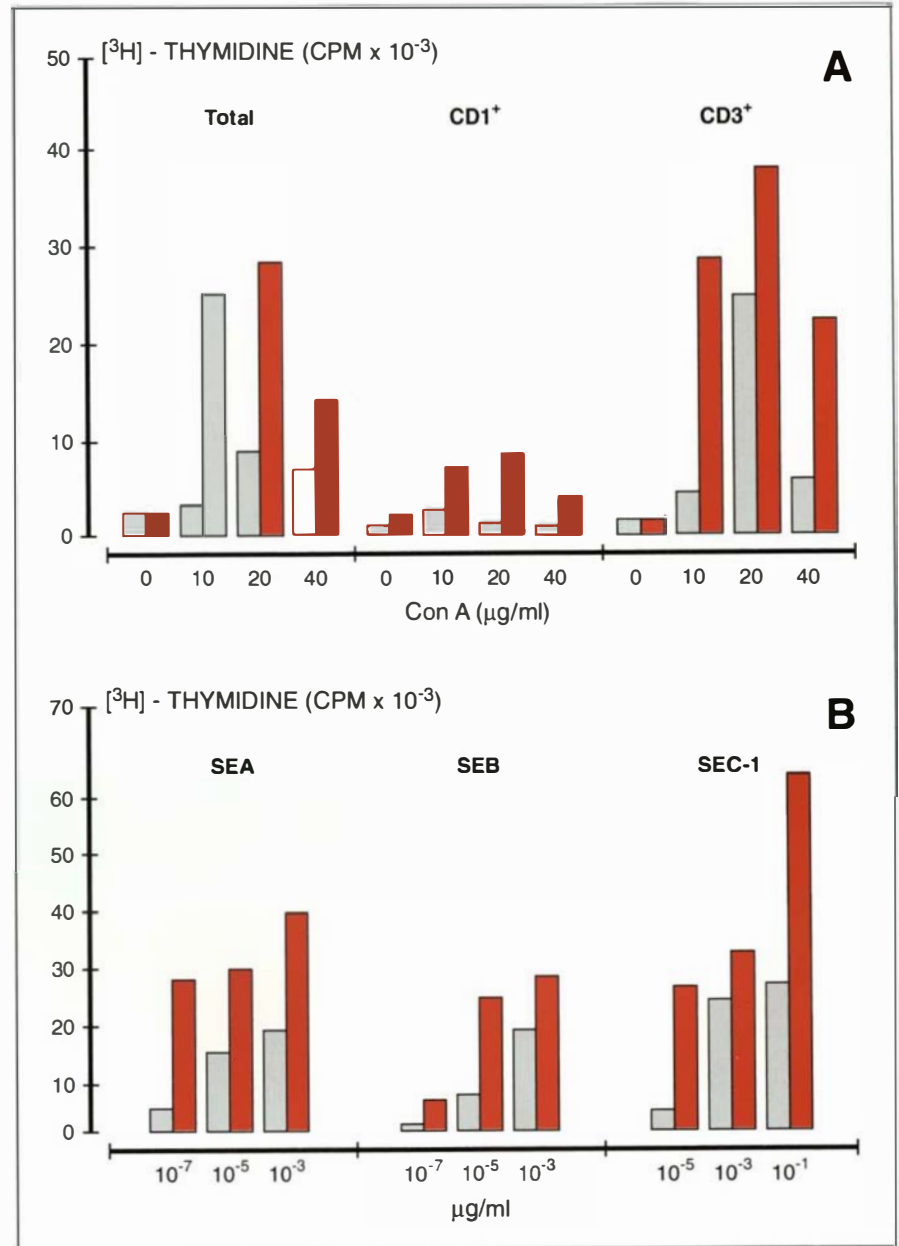


Figure 4. **La cellule dendritique thymique augmente la prolifération des thymocytes activés par la Con A (A) et par les entérotoxines (B).** A. Des tests d'incorporation de 18 heures de thymidine radioactive révèlent que la prolifération des thymocytes non fractionnés (Total) est beaucoup plus importante en présence de CDe (colonne hachurée) qu'en absence de CDe (colonne claire). Après fractionnement des thymocytes, nous montrons que ce sont principalement les thymocytes « matures » CD3⁺ qui réagissent à ce stimulus, alors que la population « immature » CD1⁺ donne une réponse très faible. B. Similairement, la présence des CDe (colonne hachurée) amplifie significativement la prolifération des thymocytes induite par les entérotoxines SEA, SEB et SEC-1. Notez qu'en A et B, chaque valeur en cpm est la moyenne de triplicata dont la déviation standard (non illustrée pour la clarté de la figure) n'excède pas 10 %. Les résultats illustrés sont représentatifs d'au moins 5 expériences distinctes effectuées avec des prélèvements thymiques différents.

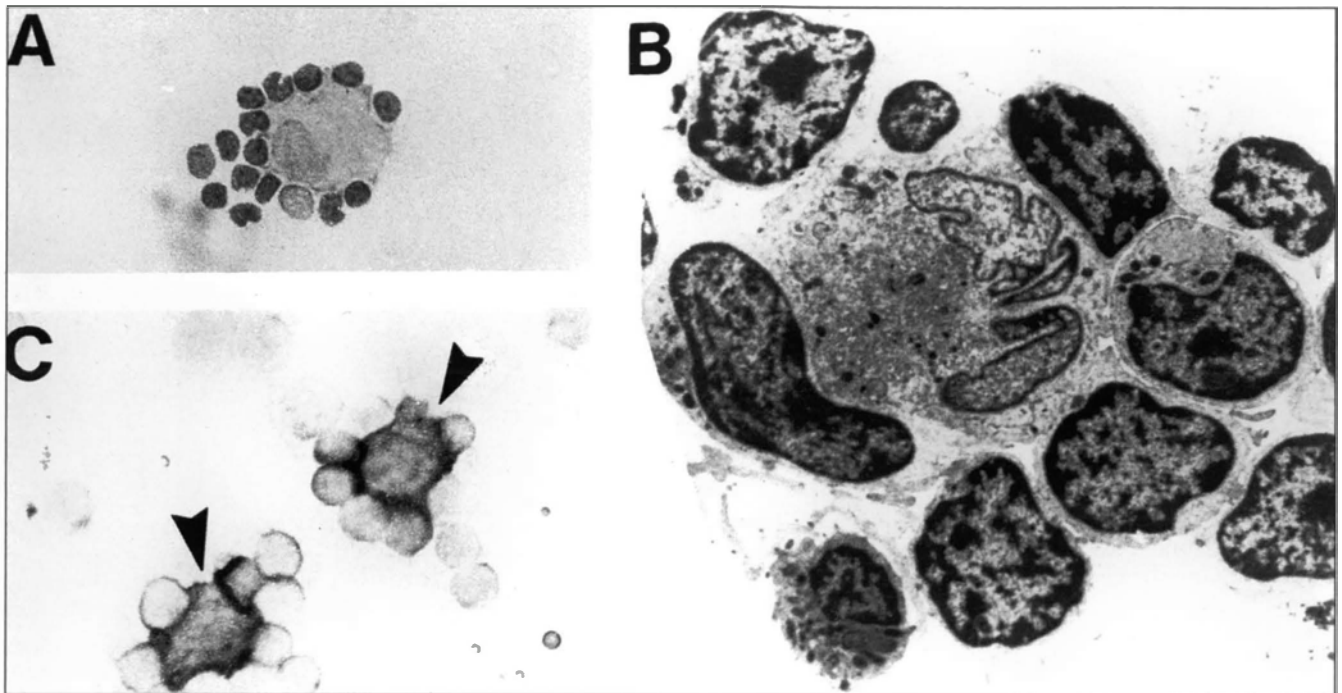


Figure 5. **Caractérisation de l'association spontanée entre les CDe isolées et les thymocytes.** A. Une coloration à l'hématoxyline permet de reconnaître la CDe centrale en contact avec plusieurs thymocytes. B. Microphotographie montrant les détails ultrastructuraux correspondants : la CDe centrale présente un cytoplasme abondant, de nombreuses inclusions, un noyau à apparence polylobée et une hétérochromatine périnucléaire. Les nombreux thymocytes entourant la CDe contiennent un matériel nucléaire important alors que le cytoplasme est très peu abondant. C. La molécule LFA-3 a été mise en évidence sur la membrane de la CDe (flèche) par la technique d'immunoperoxydase.

RÉFÉRENCES

24. McConkey DJ, Hartzell P, Amador-Pérez JF, Orrenius S, Jondal M. Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J Immunol* 1989 ; 143 : 1801-6.
25. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990 ; 248 : 705-11.
26. Langhoff E, Terwilliger EF, Kalland KH, Poznansky MC, Bos H, Bacon OML, Sodroski JS, Haseltine WA. HIV-1 infection of human dendritic cells. In : Haseltine W A, Wong-Staal F, eds. *Genetic structure and regulation of HIV*. New York : Raven Press, 1991 : 511-24.
27. Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4⁺ T cells. *Science* 1992 ; 257 : 383-7.

maturité. Des tests ont démontré que les CDe du thymus humain augmentent la prolifération des thymocytes stimulés par la Con A et que cette activité est dépendante de l'interleukine 2 (IL-2). Dans le but de mieux définir la capacité des CDe à stimuler la prolifération des thymocytes *in vivo*, nous avons déterminé sur quelle sous-population de thymocytes peut s'exercer ce rôle *in vitro*. Ainsi, l'activité accessoire des CDe est principalement dirigée vers les thymocytes CD3⁺ soit les thymocytes « matures » ou simple positifs (SP) (CD4⁺ ou CD8⁺) dont le phénotype est similaire aux lymphocytes T périphériques (figure 4a). On peut supposer que l'activité accessoire des CDe *in vivo* pourrait contribuer à l'expansion clonale des thymocytes médullaires ayant échappé au double processus de

sélection, avant leur distribution en périphérie.

Les CDe du thymus humain ont la capacité de produire de l'interleukine-1 (IL-1) sous l'influence des lipopolysaccharides [22]. Cette production est faible comparée à celle des monocytes du sang circulant. Le faible taux de production peut expliquer les résultats négatifs obtenus par d'autres auteurs avec d'autres populations de CDe à l'aide de techniques moins sensibles. La production d'IL-1 a aussi été décelée lorsque les CDe sont mises en présence de thymocytes sans stimulation exogène connue. Il reste à déterminer quel serait le rôle de l'IL-1 produite par les CDe car, d'après nos résultats, elle ne semble pas être reliée à leur activité accessoire. Cependant, il n'est pas exclu qu'une population de thymocy-

tes à un degré de moindre maturité puissent stimuler la production d'IL-1 et bénéficier de l'action de cette interleukine pour soutenir un processus de maturation comme l'ont déjà proposé d'autres auteurs [23, 24].

Plusieurs études ont montré récemment que les entérotoxines de *S. aureus* s'associent directement aux molécules de classe II et stimulent la prolifération des lymphocytes T par réaction avec la chaîne V β du récepteur T clonotypique [25]. Nous avons établi que les glycoprotéines de CMH de classe II fortement exprimées par les CDe du thymus humain peuvent interagir avec les entérotoxines. Cette réaction entraîne une prolifération marquée des thymocytes autologues de phénotype « mature », supérieure à celle obtenue dans des systèmes moins spécifiques ayant recours aux lectines mitogéniques. Non seulement les CDe peuvent lier les entérotoxines, mais encore elles augmentent très fortement la réponse à ce stimulus particulièrement en présence de doses submitogéniques de toxines (figure 4b). Cette action des CDe, composantes cellulaires de nombreux tissus, pourrait expliquer les effets nocifs causés *in vivo* par de faibles quantités de toxines.

D'autre part, nous avons reproduit la formation d'associations spontanées, entre des CDe isolées et des thymocytes en absence de stimulation antigénique ou mitogénique (figure 5) [21]. Les CDe présentes au centre de ces formations expriment les molécules d'adhésion LFA-3 et ICAM-1 reconnues comme étant essentielles dans de nombreux systèmes de liaisons cellulaires hétérotypiques. Ces résultats laissent supposer que ces molécules jouent un rôle dans la formation de ces associations. Si l'on compare les observations faites *in situ* et celles réalisées sur les CDe en culture (figure 1c), il semble de plus en plus probable que ce phénomène soit identique au phénomène décelé *in vivo*.

Conclusion

L'étude des CDe du thymus est loin d'être terminée. D'autres recherches très importantes sont à entreprendre, notamment en ce qui a trait au rôle des CDe dans la maturation des lymphocytes T. Les études chez

l'humain imposent bien sûr certaines contraintes qui ont freiné les investigations portant sur la sélection et la délétion clonales. Cependant, l'utilisation d'anticorps spécifiques à certaines régions variables du récepteur T murin a permis à la recherche de progresser. Des Ac spécifiques à certaines régions variables du récepteur T humain sont maintenant disponibles, ce qui permet d'envisager des études plus précises chez l'humain. Le rôle potentiel des CDe dans la réponse anti-virale et particulièrement dans la réponse anti-VIH retient l'attention des immunologistes. En effet, différentes équipes ont rapporté que les CL et les CDe du sang circulant peuvent être infectées par le VIH [26] et que ces dernières peuvent également potentialiser l'effet cytopathique du VIH sur les lymphocytes T [27]. Notre modèle *in vitro* offre la possibilité d'étudier la perméabilité des CDe du thymus humain au VIH et de déterminer si l'infectivité par VIH peut entraîner une atteinte fonctionnelle des CDe. Des études récentes ont montré l'intérêt de la CDe comme cellule présentatrice d'Ag viral et bactérien. Des chercheurs pourraient mettre à profit cette propriété dans les tests servant à déterminer l'épitope immunodominant d'une bactérie ou d'un virus. Ces résultats seraient applicables dans la préparation de vaccins, une étape cruciale dans le contexte actuel de la lutte contre la maladie ■

Remerciements

Les auteurs désirent remercier le docteur Claude Chartrand, chirurgien à l'Hôpital Sainte-Justine pour sa collaboration soutenue tout au long de ces travaux. Nous aimerions également souligner le soutien financier des organismes suivants : CRM, FCAR, FRSQ, la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine et le Fonds de développement de l'Université de Montréal.

Nos remerciements vont également à madame Nicole Tanguay pour la mise en forme du manuscrit.

Summary

Human dendritic cells of the thymus

Human thymic dendritic cells (DC) represent a member of the family of bone marrow-derived dendritic cells. They have a dendritic shape and are found in small number mainly at the corticomedullary border and in medullary regions of the thymus. Human thymic DC were isolated by density gradient separation followed by treatment with CD2, CD7 and CD11b mAb and antibody-coated immunobeads. The resulting population contains 60 to 75 % of brightly HLA-DR⁺ cells which present morphological characteristics of DC observed *in situ*. An extensive phenotypic analysis has confirmed that they are of mesenchymal origin and revealed that some express CD11a and CD54 molecules. Freshly isolated DC do not stain with a wide variety of anti-T-B and -monocyte or -macrophages mAb, however they acquire the CD1 molecule after a few days culture. It is now possible to obtain 90 to 95 % purified human thymic DC by cell sorting. Functional studies have shown that human thymic DC are potent activators of mixed lymphocyte reaction, act as accessory cells in mitogenic thymocyte proliferation, increase the thymocyte proliferative response to toxin signal and produce IL-1. They also form spontaneous associations with thymocytes : this raises questions about the implication of DC in differentiation and/or maturation of thymocytes.

TIRÉS A PART

S. Montplaisir.