



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Interactions des cellules du système lymphoïde avec les kératinocytes

Marcoux, Sarah

*Award date:*  
2000

[Link to publication](#)

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

16 JUIN 2000



SECRETARIAT BIOLOGIE  
F.U.N.D.P.  
Rue de Bruxelles, 59  
B 5000 NAMUR (Belgique)  
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Interactions des cellules du système lymphoïde  
avec les kératinocytes**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Sarah MARCOUX

Juin 2000

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## Interactions des cellules du système lymphoïde avec les kératinocytes

MARCOUX Sarah

### Résumé

Le maintien de l'homéostasie cutanée et la régulation des réactions inflammatoires dans la peau sont sous la dépendance d'interactions complexes entre les cellules résidant dans la peau (kératinocytes, cellules dendritiques épidermiques et dermiques) et les cellules circulantes du sang, qui migrent au sein de la peau (lymphocytes T/précurseurs des cellules dendritiques).

Afin d'étudier les interactions existant entre les kératinocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes, nous proposons un modèle de co-culture *in vitro* associant ces trois partenaires cellulaires. L'épiderme, complètement différencié, est reconstitué *in vitro* sur la face de culture d'une membrane poreuse de polycarbonate, tandis que les cellules dendritiques et lymphocytes sont déposés sur l'autre face de la membrane de polycarbonate, par retournement de notre système de co-culture. Dans nos conditions, les cellules dendritiques ne migrent pas au sein de l'épiderme tandis que les lymphocytes le traversent.

En parallèle, nous étudions les capacités de présentation allogénique primaire *in vitro* des kératinocytes par l'IFN $\gamma$  ou le PMA dans un milieu suppléé d'IL-2.

Les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$  et au PMA expriment ICAM-1 de manière différente. Dans nos conditions, une stimulation des kératinocytes à l'IFN $\gamma$  induit une expression périnucléaire de HLA-DR tandis que la stimulation des kératinocytes au PMA n'induit pas l'expression d'HLA-DR.

Nos expériences montrent d'une part l'absence d'allostimulation lymphocytaire primaire face aux kératinocytes traités à l'IFN $\gamma$  et d'autre part une stimulation lymphocytaire primaire par les kératinocytes traités au PMA, celle-ci étant fortement majorée par l'adjonction d'IL-2 recombinante.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2000

**Promoteur:** Y. Poumay

**Co-promoteur:** M. Hérin

## Remerciements.

J'aimerais vivement remercier Monsieur le Professeur Y. Poumay pour m'avoir accueillie et permis de réaliser mon mémoire dans le département d'Histologie-Embryologie. Toute ma gratitude va à Monsieur le Professeur M. Hérin pour sa disponibilité, sa gentillesse et la qualité exceptionnelle de ses conseils.

Je tiens également à exprimer mes remerciements les plus sincères à :

Madame F. de Bosch-Kemper-Herphelin pour son aide dans l'apprentissage des techniques et son assistance permanente.

Monsieur R. Déom pour la qualité de ses marquages et son attention soutenue.

Mademoiselle F. Dumont pour sa collaboration active et le temps qu'elle m'a consacré.

Madame M. Leclercq-Smekens pour ses conseils judicieux.

Madame F. Zune pour son soutien chaleureux et sa bonne humeur.

Mesdames I. De Potter et N. Berna pour leur aide précieuse.

Madame A. Degen pour son enthousiasme communicatif.

Monsieur Pascal Vanbel pour son support informatique.

Monsieur Goldman et en particulier à Madame F. Willems pour m'avoir initiée à la culture des cellules dendritiques.

Messieurs R. Jans et D. Van Vlaender pour leur sympathie.

Monsieur D. Van Acker pour la qualité et la rapidité de son travail photographique.

Monsieur Ph. Sermont pour la réalisation de nos cylindres.

Monsieur P. Staquet pour l'analyse au FACS.

Mesdames N. Ninane et C. Demazy pour leur aide au microscope confocal.

Je souhaite également remercier toutes les personnes ayant participé à l'élaboration de ce travail.

## Liste des abréviations

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
CD	Cellule Dendritique
CD(1a,...)	Cluster of Différenciation (1a,...)
CIITA	Class II Transactivator
CLA	Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CSF	Colony Stimulating Factor
EBV	Epstein Barr Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
FA	Face adhérente de la membrane de polycarbonate
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FNA	Face non adhérente de la membrane de polycarbonate
GM-CSF	Granulocyte/Monocyte-Colony Stimulating Factor
GVHD	Graft Versus Host Disease
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPV	Human Papilloma Virus
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN	Interféron
IL-	Interleukines
KGM-2	Keratinocyte Growth Medium-2
LAK	Lymphokine Activated Killer cells
LCA1	Leucocyte Common Antigen
LFA1	Leucocyte Function Antigen-1
MLKC	Mixed Lymphocyte-Kératinocyte Culture
NK	Natural Killer
PBMC	Peripheal Blood Mononuclear Cells
PHA	Phytohémagglutinine
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
T	Lymphocytes T
TCR	T Cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T helper (auxilliaire)
TNF	Tumor Necrosis Factor

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
AVANT PROPOS.....	2
<b>1. FRONTIERES DE L'ORGANISME: LES INTERFACES INEX</b> .....	<b>2</b>
<b>2. MECANISMES DE DEFENSE DES INTERFACES INEX</b> .....	<b>3</b>
2.1. DEFENSES NON IMMUNITAIRES .....	3
2.1.1. <i>Défenses non immunitaires cutanées</i> .....	3
2.1.2. <i>Défenses non immunitaires muqueuses</i> .....	3
2.2. DEFENSES IMMUNITAIRES DES INTERFACES INEX.....	4
2.2.1. <i>Défenses immunitaires non spécifiques</i> .....	4
2.2.1.1. Défenses immunitaires non spécifiques permanentes.....	4
2.2.1.2. Défenses immunitaires non spécifiques importées .....	4
2.2.2. <i>Défenses immunitaires spécifiques</i> .....	4
2.2.2.1. Cellules présentatrices et cellules effectrices.....	5
2.2.2.1.1. Prototypé des cellules présentatrices d'antigènes: la cellule dendritique tissulaire.....	5
2.2.2.1.2. Interactions cellule dendritique - lymphocytes T lors de la présentation antigénique .....	11
2.2.2.2. Comparaison des arsenaux immunologiques de la peau et des muqueuses .....	14
<b>3. IMMUNOLOGIE DE L'INTERFACE INEX CUTANEE</b> .....	<b>17</b>
3.1. PLACE DE LA CELLULE DE LANGERHANS DANS L'IMMUNITE CUTANEE.....	17
3.2. MODELE ACTUEL ET SYNTHESE DE L'IMMUNITE CUTANEE .....	19
3.3. PLACE DU KERATINOCYTE DANS L'IMMUNITE CUTANEE.....	20
3.3.1. <i>Ligands des intégrines (ICAM-1 / CD54)</i> .....	20
3.3.2. <i>HLA</i> .....	21
3.3.3. <i>Endocytose et processing antigénique (clivage peptidique et association HLA-peptide)</i> .....	21
3.3.4. <i>Molécules de costimulation</i> .....	22
3.3.4.1. CD80 et CD86.....	22
3.3.4.2. CD40.....	23
3.3.5. <i>Cytokines</i> .....	23
3.3.6. <i>Résumé des capacités de présentation antigénique des kératinocytes</i> .....	24
3.4. PATHOLOGIES CUTANEEES A COMPOSANTE IMMUNITAIRE.....	25
3.4.1. <i>Psoriasis</i> .....	25
3.4.2. <i>Dermatite allergique de contact</i> .....	26
3.4.3. <i>GVHD cutanée</i> .....	26
3.4.4. <i>Utilisation d'immunomodulateurs à visées thérapeutiques cutanées</i> .....	27
3.5. NOTES SUR LA CULTURE PRIMAIRE DE KERATINOCYTES IN VITRO .....	27
3.5.1. <i>La culture selon Rheinwald et Green (1975)</i> .....	27
3.5.2. <i>La culture selon Boyce et Ham (1983)</i> .....	27
3.5.3. <i>Divers modèles de reconstruction d'un épiderme in vitro</i> .....	28
3.5.3.1. Matrices cellulaires.....	28
3.5.3.2. Culture sur des dermes .....	28
3.5.3.3. Utilisation de substrats inertes .....	29
3.6. OBJECTIFS DU TRAVAIL .....	29
3.6.1. <i>Modèle immunitaire épidermique in vitro (co-culture)</i> .....	30
3.6.2. <i>Présentation kératinocytaire allogénique in vitro</i> .....	30
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>31</b>
<b>1. CULTURE CELLULAIRE</b> .....	<b>32</b>
1.1. CULTURE DES KERATINOCYTES HUMAINS .....	32
1.1.1. <i>Matériel</i> .....	32
1.1.2. <i>Méthode</i> .....	32
1.1.2.1. Culture primaire et secondaire de kératinocytes à partir de prélèvements cutanés .....	32
1.1.2.2. Cultures tertiaires de kératinocytes.....	33
1.2. CULTURE DE CELLULES MONONUCLEÉES DU SANG PERIPHERIQUE .....	33
1.2.1. <i>Matériel</i> .....	33
1.2.2. <i>Méthode</i> .....	33

1.3. CULTURE DES CELLULES DENDRITIQUES.....	34
1.3.1. Matériel.....	34
1.3.2. Méthode.....	34
1.3.3. Phénotypage des cellules.....	34
1.4. CO-CULTURE DES KERATINOCYTES ET CELLULES MONONUCLEES DU SANG PERIPHERIQUE SUR MEMBRANE POREUSE DE POLYCARBONATE .....	35
1.4.1. Matériel.....	35
1.4.2. Méthode.....	35
1.4.2.1. Culture des cellules 3T3.....	35
1.4.2.2. Culture des kératinocytes.....	36
1.4.2.2.1. Inserts .....	36
1.4.2.2.2. Cylindres.....	37
<b>2. EXTRACTION D'ARN POLYA.....</b>	<b>39</b>
2.1. MATERIEL.....	39
2.2. METHODE .....	39
<b>3. REVERSE TRANSCRIPTION – POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR).....</b>	<b>40</b>
3.1. MATERIEL.....	40
3.2. METHODE .....	41
<b>4. MARQUAGES HISTOCHIMIQUES.....</b>	<b>41</b>
4.1. MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE EN FLUORESCENCE .....	41
4.1.1. Matériel.....	41
4.1.2. Méthode.....	42
4.2. MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE ENZYMATIQUE.....	43
4.2.1. Matériel.....	43
4.2.2. Méthode.....	43
<b>5. MLKC (MIXED LYMPHOCYTE KERATINOCYTE CULTURE).....</b>	<b>44</b>
5.1. MATERIEL.....	44
5.2. METHODE .....	45
5.2.1. Co-culture de kératinocytes et cellules mononucléées du sang périphérique .....	45
5.2.2. Récolte de la radioactivité.....	45
5.2.3. Mesure de la radioactivité $\beta$ par scintillation liquide.....	46
<b>6. COLORATION À L'HES (HÉMALUN-ERYTHROSINE-SAFRAN) .....</b>	<b>46</b>
6.1. MATERIEL.....	46
6.2. METHODE .....	46
6.2.1. Inclusion et enrobage en paraffine.....	46
6.2.2. Coloration .....	47
<b>7. MICROSCOPIE A BALAYAGE.....</b>	<b>47</b>
7.1. MATERIEL.....	47
7.2. METHODE .....	47
<b>RESULTATS.....</b>	<b>49</b>
<b>1. RECONSTRUCTION D'UN EPIDERME IMMUNOCOMPETENT STRATIFIE     ET KERATINISE SUR MEMBRANE DE POLYCARBONATE .....</b>	<b>50</b>
1.1. QUALITE DE LA MEMBRANE DE POLYCARBONATE .....	50
1.2. STRATIFICATION DES KERATINOCYTES .....	50
1.2.1. Influence du calcium sur la cohésion des kératinocytes cultivés en milieu KGM-2.....	50
1.2.2. Stratification des kératinocytes en milieu de Green.....	51
1.2.3. Influence des 3T3 sur la migration des kératinocytes à travers la membrane. ....	52
1.3. KERATINISATION DE L'EPITHELIUM .....	53
1.4. ESTIMATION DE LA MIGRATION CELLULAIRE A TRAVERS LA MEMBRANE DE POLYCARBONATE .....	55
1.5. MIGRATION DES CELLULES DENDRITIQUES AU SEIN DE L'EPIDERME.....	57
1.5.1. Génération, morphologie et phénotype des cellules dendritiques.....	57
1.5.2. Migration des cellules dendritiques .....	58

1.6. MIGRATION DES PBMC À TRAVERS L'ÉPIDERME .....	59
<b>2. MODIFICATIONS POTENTIELLES DES MOLÉCULES INTERVENANT DANS LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE DES KÉRATINOCYTES.....</b>	<b>60</b>
2.1. EXPRESSIONS MOLÉCULAIRES PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE.....	60
2.1.1. <i>Expression phénotypique des molécules ICAM-1 (CD54) et HLA-DR par les kératinocytes stimulés à l'IFN<math>\gamma</math> et détectée par marquage immunofluorescent</i> .....	60
2.1.1.1. Concentration en IFN $\gamma$ .....	60
2.1.1.2. Milieux utilisés .....	61
2.1.1.3. Densité d'ensemencement des kératinocytes.....	62
2.1.1.4. Marquages immunofluorescents réalisés dans différentes conditions.....	62
2.1.1.4.1. Marquage des kératinocytes ensemencés à 3.10 <sup>4</sup> cellules/cm <sup>2</sup> et stimulés à l'IFN $\gamma$ (1000 U/ml).....	62
2.1.1.4.2. Marquage des kératinocytes ensemencés à 10 <sup>4</sup> cellules/cm <sup>2</sup> et stimulés à l'IFN $\gamma$ (150 U/ml) .....	63
2.1.2. <i>Expression phénotypique des molécules ICAM-1 et HLA-DR par les kératinocytes stimulés au PMA</i> .....	63
2.1.2.1. Influence du PMA sur la morphologie des kératinocytes en culture.....	63
2.1.2.2. Marquage en immunofluorescence des kératinocytes stimulés au PMA .....	64
2.1.3. <i>Expression génotypique de HLA-DR par les kératinocytes stimulés à l'IFN<math>\gamma</math> (RT-PCR)</i> .....	65
2.2. EXPRESSION MOLÉCULAIRE FONCTIONNELLE AU TRAVERS D'UNE ALLOSTIMULATION PRIMAIRE IN VITRO .....	66
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>75</b>



# **INTRODUCTION**

### Avant propos.

Des notions théoriques essentielles à la compréhension du texte, mais non indispensables au lecteur averti en immunologie sont ajoutées dans certains paragraphes. Ces notions sont encadrées, permettant ainsi une lecture continue du reste du document.

## 1. Frontières de l'organisme: les interfaces INEX

Tout individu, quel que soit son degré de complexité, évolue en contact permanent et intime avec son environnement immédiat ; il y puise ce qui est nécessaire à sa survie et y rejette ses déchets. Cette histoire pourrait être idyllique (Eden) si l'individu ne devait partager son environnement avec d'autres organismes, et si cet environnement était dénué de tout potentiel d'agression chimique et physique.

Les zones frontières entre l'individu (intérieur = IN) et son environnement (extérieur = EX) peuvent être définies comme des interfaces INEX. Celles-ci sont constituées par des organes dédiés à des fonctions d'**échanges** et de **protection**.

Chez l'être humain (comme dans une large frange du monde animal) les interfaces INEX sont de deux types (Figure I.1).

- l'interface INEX extériorisée représentée par la peau,
- l'interface INEX intériorisée (et qui prolonge en fait la précédente par invagination) représentée par :
  - les voies aéro-digestives supérieures,
  - l'appareil respiratoire,
  - le tube digestif,
  - [le système génito-urinaire].

Au sein de ces organes, certains tissus sont plus directement concernés par l'interface INEX : il s'agit de l'**épiderme** au niveau de la peau et des **muqueuses** au niveau des interfaces INEX intériorisées.

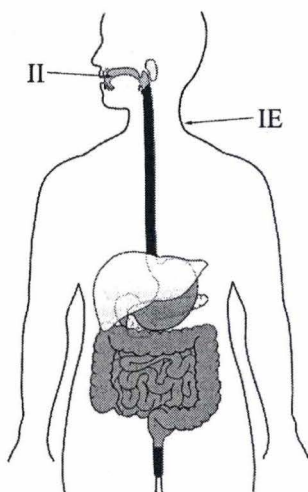


Figure I.1 : Représentation des interfaces INEX. II : INEX interiorisée, IE : INEX extériorisée (A partir d'un schéma modifié de Stevens et Lowe).

## 2. Mécanismes de défense des interfaces INEX

Les agressions subies par l'organisme à ses frontières sont de natures diverses :

- **physiques** : traumatismes, radiations, température, évaporation,...
- **chimiques et biochimiques** : caustiques, carcinogènes, agents irritants, antigènes organiques ...
- **biologiques** : agents infectieux.

Les moyens de défense des interfaces INEX sont adaptés aux différents types d'agression. On distingue les défenses de type immunitaire (spécifiques et non spécifiques) des défenses de type non immunitaire. Les trois volets sont abordés mais l'accent est mis sur les défenses immunitaires spécifiques.

### 2.1. Défenses non immunitaires

Les systèmes de défense non immunitaires sont essentiellement développés au niveau de la peau par rapport aux muqueuses. Il est évident que la peau est exposée au plus grand nombre d'agressions dont la nature est éminemment variable. La conception et la philosophie même de la peau est tournée vers la défense, excluant pratiquement tout échange si ce n'est dans la régulation thermique de l'organisme. Par contre, les muqueuses sont partiellement protégées par leur enfouissement dans l'organisme et représentent avant tout des zones d'échanges très perméables au milieu extérieur ce qui ne peut se concevoir dans un contexte de défense maximale d'où une relative pauvreté en moyens de défense non immunitaires.

#### 2.1.1. Défenses non immunitaires cutanées

- La **mélanine** produite par les mélanocytes et chargée par les kératinocytes forme un écran solaire chargé de protéger l'ADN des cellules exposées aux UV.
- La **densité conjonctive** du derme (cuir) ainsi que les systèmes de jonction intercellulaires (**desmosomes**) démultipliés des kératinocytes assurent une résistance physique aux différentes forces de traction, compression, cisaillement... .
- La richesse en **terminaisons nerveuses** à la jonction dermo-épidermique rend compte d'une transmission rapide des signaux nociceptifs.
- La constitution de la couche cornée, véritable **barrière lipido-protidique** constituée de cellules cimentées les unes aux autres, permet une imperméabilité cutanée. Cette propriété explique la difficulté de pénétration de molécules hydrophiles mais permet également d'éviter la perte des liquides intra- et extra-cellulaires de l'organisme par évaporation (apparition de cette barrière lipido-protidique lors du passage de la vie aquatique à la vie en milieu aérien).

#### 2.1.2. Défenses non immunitaires muqueuses

L'**acidité vaginale** entretenue par une bactérie saprophyte (*bacille de Döderlein*) est une barrière à l'implantation d'autres bactéries ou de mycoses. Cette acidité vaginale, en dehors du contexte de protection du risque infectieux, n'offre par ailleurs aucun avantage de survie, que du contraire si l'on considère l'effet délétère d'un pH bas sur la survie des spermatozoïdes. Ceci est à l'opposé de l'acidité gastrique, souvent prise, de manière erronée, comme exemple de moyen de défense anti-bactérien. L'acidité gastrique offre un avantage de survie et ceci est évident lorsqu'on considère son rôle dans la digestion alimentaire. Par ailleurs, l'acidité gastrique est une agression pour la muqueuse qui s'en défend par une couverture physico-chimique de mucus et par un turnover cellulaire majoré. De plus, depuis 1981, la découverte d'*Helicobacter Pylori* et de son rôle joué dans le développement des ulcères gastro-duodénaux a démontré l'effet bactéricide tout à fait relatif de l'acidité gastrique.

L'**escalator muco-ciliaire** de l'arbre respiratoire met en jeu une couche épithéliale dont la composante cellulaire ciliée brasse, de manière directionnelle (à savoir vers le pharynx et donc la sortie) un tapis de mucus dans lequel sont emprisonnées des particules étrangères de différentes natures qui, après avoir été emportées par l'air inspiré, se sont engluées dans le mucus (principe de l'attrape-mouche).

## **2.2. Défenses immunitaires des interfaces INEX**

Il est nécessaire à ce niveau de faire trois commentaires.

- Ce travail s'adresse aux défenses immunitaires spécifiques et ne s'attarde pas sur les défenses immunitaires non spécifiques.
- Il n'est pas possible de détailler tout le système immunitaire dans cette introduction et seuls les points présentant un intérêt pour l'immunité cutanée sont envisagés et détaillés.
- Il est indispensable de faire la distinction, quel que soit le système considéré, entre les défenses immunitaires permanentes (ou résidentes) et les défenses immunitaires occasionnelles (ou importées). Les premières sont décrites comme des composants cellulaires normaux du tissu considéré et les secondes ne seront observées qu'en conditions pathologiques dans le cadre du développement d'un tissu de granulation inflammatoire. Ces dernières disparaissent avec la résolution de la pathologie causale.

### **2.2.1. Défenses immunitaires non spécifiques**

Le système immunitaire non spécifique met en jeu des protéines préformées, des signaux cellulaires d'activation et des médiateurs solubles de communication intercellulaire (lysosyme, lactoperoxydase, interférons ...) ainsi que des cellules douées de capacité cytolytique non discriminante (cellules NK pour *Natural Killers*) ou de phagocytose (macrophagocytose: macrophages et microphagocytose: leucocytes polynucléaires neutrophiles). Le système immunitaire non spécifique n'est pas doué de reconnaissance antigénique spécifique ni de mémoire: il n'est pas détaillé.

#### **2.2.1.1. Défenses immunitaires non spécifiques permanentes**

Les sécrétions muqueuses (salive, larmes, mucus) contiennent une enzyme dénommée **lysosyme** capable de rompre certaines liaisons chimiques de la paroi de nombreuses bactéries et de les détruire.

La **lactoperoxydase** capte le fer nécessaire à la multiplication de nombreuses bactéries (compétition).

#### **2.2.1.2. Défenses immunitaires non spécifiques importées**

Celles-ci ne sont pas réservées aux interfaces INEX; elles seront mises en jeu lors de l'agression de n'importe quel tissu. La destruction cellulaire, résultant d'une agression, s'accompagne de la libération et de la production de molécules signaux (chimiokines) qui vont enclencher la phase initiale de la réaction inflammatoire caractérisée par une exsudation liquidienne à partir des veinules post-capillaires ainsi que la transmigration (diapédèse) de cellules de l'immunité non spécifique: monocytes-macrophages et leucocytes polynucléaires. Il s'agit d'une première ligne de défense urgente dans l'attente de l'intervention plus lente du système immunitaire spécifique.

### **2.2.2. Défenses immunitaires spécifiques**

Ce travail s'adresse aux capacités de présentation antigénique de cellules non professionnelles (cellules épithéliales, en l'occurrence les kératinocytes) en comparaison des capacités de présentation antigénique de cellules professionnelles (cellules

dendritiques auxquelles appartiennent les cellules de Langerhans). Il s'adresse également aux effecteurs cellulaires répondant à la présentation antigénique et donc principalement aux lymphocytes T. Seuls ces types cellulaires - *cellules présentatrices d'antigènes et lymphocytes T* - sont abordés de manière détaillée. L'immunité spécifique humorale, qui met en jeu les lymphocytes B, n'est pas envisagée.

### 2.2.2.1. Cellules présentatrices et cellules effectrices

#### 2.2.2.1.1. Prototype des cellules présentatrices d'antigènes: la cellule dendritique tissulaire

##### **Cellules présentatrices d'Ag autres que la cellule dendritique**

Diverses cellules, autres que les cellules dendritiques tissulaires, sont impliquées de manière usuelle dans la présentation des antigènes (Ag). Ces cellules ne faisant l'objet de cette étude, elles sont abordées brièvement.

Les **cellules dendritiques folliculaires** fixent un Ag sur leurs récepteurs membranaires et l'exposent de manière prolongée aux lymphocytes B dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes des ganglions lymphatiques. Les cellules dendritiques folliculaires n'internalisent pas l'Ag ni ne le dégradent en peptides. Elles ne sont pas d'origine hématopoïétique au contraire des autres cellules présentatrices d'Ag.

Les **lymphocytes B** (origine hématopoïétique) présentent l'Ag aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 pour le développement d'une réponse humorale (anticorps) dépendant des lymphocytes T. Les lymphocytes B fixent l'Ag par leurs immunoglobulines (Ig) membranaires, internalisent le complexe et le dégradent en peptides par la voie des endosomes. Ces peptides sont associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité HLA (*Human Leukocytes Antigens*) de classe II et exprimés, sous la forme de complexes HLA-peptide antigénique, à la membrane cellulaire où ils activent, via leurs récepteurs, les lymphocytes T qui produisent des cytokines stimulant les lymphocytes B.

Les **monocytes** et **macrophages** (origine hématopoïétique) sont capables d'internaliser les Ag et de les présenter sous la forme de complexes HLA-peptide. Leur localisation extra-ganglionnaire et leur absence de migration après leur charge antigénique limitent leur intervention dans les réactions immunitaires.

D'autres cellules, non hématopoïétiques, comme les **cellules endothéliales** et certaines **cellules épithéliales** sont capables, dans des conditions particulières, de présenter des Ag. Le cas particulier des kératinocytes fait l'objet d'un développement extensif au long de ce travail.

Les **cellules dendritiques tissulaires** (reprises sous le vocable **cellules dendritiques**) internalisent l'Ag, le dégradent en multiples peptides qu'elles présentent - associés aux molécules HLA de classe I et de classe II - aux récepteurs des lymphocytes T. Cette présentation se produit le plus souvent dans les zones paracorticales des ganglions lymphatiques après migration des cellules dendritiques tissulaires chargées d'Ag drainés dans les divers tissus. Ces cellules dendritiques sont retrouvées dans le tissu conjonctif de divers organes ou sous la forme de cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme.

Les voies de différenciation et de maturation des cellules dendritiques tissulaires ont été étudiées *in vitro* à partir de précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>. Quatre stades de développement sont reconnus aux cellules dendritiques (Figure I.2).

- progéniteur médullaire,
- précurseur circulant,
- cellule dendritique immature CD1a<sup>+</sup> (*immature Ag-capturing*),
- cellule dendritique mature CD1a<sup>-</sup> après captation d'antigène et migration dans les ganglions lymphatiques (*mature Ag-presenting = cellule interdigitée*).

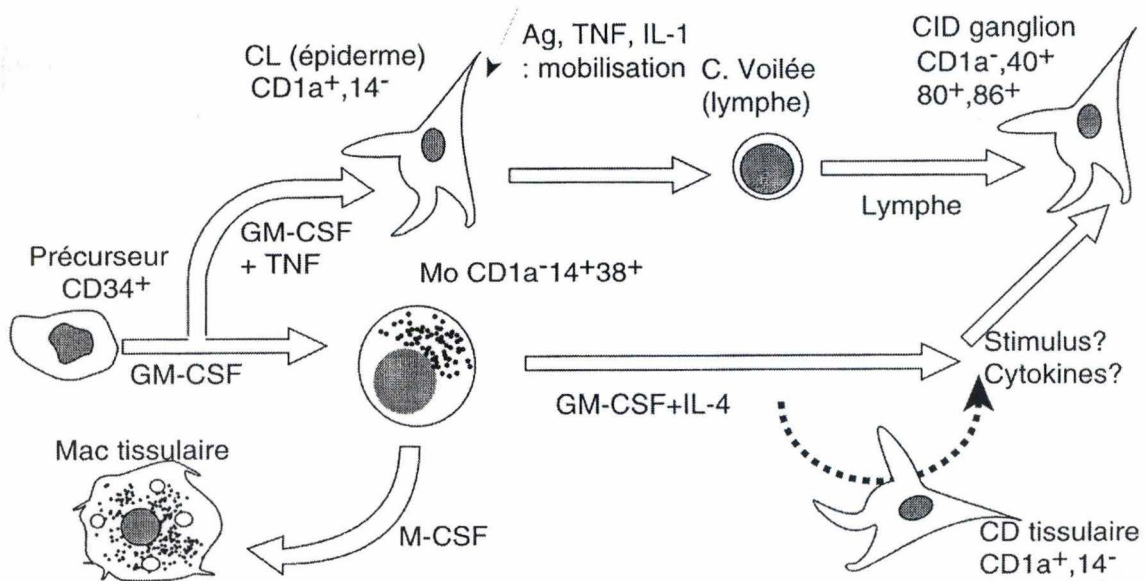


Figure I.2 : Voies de différenciation et de maturation des cellules dendritiques.  
 CL : Cellule de Langerhans, CID : Cellule interdigitée, CD : Cellule dendritique. (In Revillard)

La stimulation de précurseurs  $CD34^+$  par le GM-CSF (*Granulocyte/Monocyte - Colony Stimulating Factor*) conduit à la production de monocytes  $CD1a^-/CD14^+$ . Stimulés par le M-CSF (*Monocyte - Colony Stimulating Factor*), les monocytes se différencient en macrophages tissulaires. Stimulés par le GM-CSF combiné à l'IL-4 (*Interleukine 4*), les monocytes  $CD1a^-/CD14^+$  se différencient en cellules dendritiques tissulaires  $CD1a^+/CD14^-$ . Les cellules dendritiques  $CD1a^+/CD14^-$ , sous l'action d'un stimulus antigénique migrent dans les zones paracorticales des ganglions lymphatiques pour se différencier en cellules interdigitées  $CD1a^-$ .

La stimulation de précurseurs  $CD34^+$  par le GM-CSF combiné au  $TNF\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) conduit à la production de cellules de Langerhans  $CD1a^+/CD14^-$  qui migrent dans l'épiderme.

Les cellules dendritiques sont les seules capables d'induire une réponse immune primaire. Elles dérivent de progéniteurs hématopoïétiques et circulent dans le sang sous la forme de précurseurs qui s'installent dans les tissus en tant que cellules dendritiques immatures  $CD1a^+$  flanquées de capacité de phagocytose.

En cas d'agression tissulaire, les cellules dendritiques immatures internalisent les antigènes et migrent, dans les capillaires lymphatiques sous la forme de cellules voilées, vers les zones parafolliculaires T des ganglions lymphoïdes où elles deviennent matures, sous la forme de cellules interdigitées  $CD1a^-$ . Elles y présentent, aux lymphocytes T  $CD4^+$  helper, les antigènes sous forme de peptides associés aux molécules HLA. Les lymphocytes T  $CD4^+$  helper, à leur tour, régulent la réponse des effecteurs immunitaires à savoir: les lymphocytes T  $CD8^+$  cytotoxiques, les lymphocytes B mais également les effecteurs non spécifiques comme les macrophages, les cellules NK et les éosinophiles. De plus, les cellules dendritiques matures éduquent les cellules effectrices immunes à rejoindre le tissu agressé (homing) (Figure I.3).

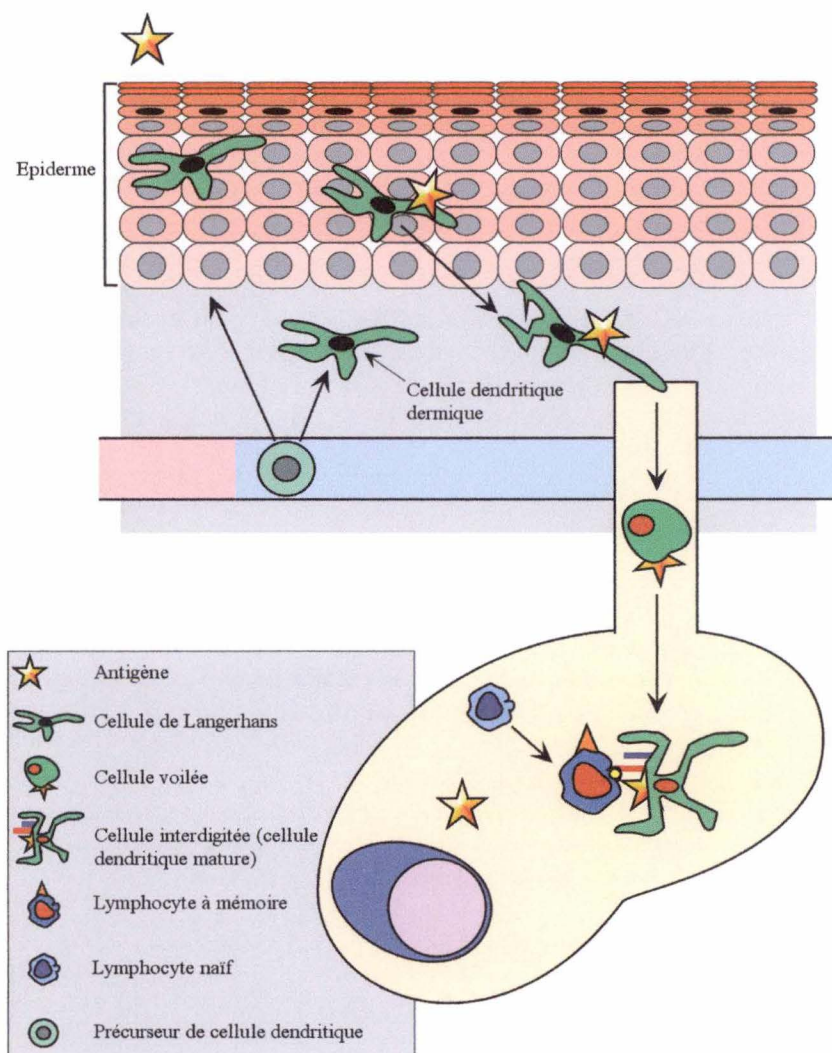


Figure 1.3 : Stimulation allogénique primaire des lymphocytes par les cellules dendritiques au sein d'un ganglion lymphoïde.

### Les cytokines

Le terme cytokine désigne un ensemble de molécules impliquées dans la signalisation intercellulaire durant la réponse immunitaire. Toutes sont des polypeptides glycosylés ou non. On distingue trois grandes catégories de cytokines.

**Interférons (IFN) :** Les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  sont produits par des cellules infectées par un virus, tandis que l'interféron  $\gamma$  est sécrété par certaines cellules T activées.

**Interleukines (IL) :** Les interleukines (IL-1 à IL-15) sont un vaste groupe de cytokines produites principalement par les cellules lymphoïdes, bien que certaines peuvent être produites par des phagocytes mononucléés ou par d'autres cellules. La plupart des interleukines contrôlent la différenciation et la prolifération cellulaire. Chaque interleukine agit spécifiquement sur les cellules exprimant le récepteur correspondant.

**Facteurs stimulant les colonies (CSF) :** Les CSF contrôlent la division et la prolifération des cellules souches et des précurseurs hématopoïétiques.

### **Interleukine-2**

L'IL-2 est produite par les lymphocytes T activés (surtout les lymphocytes CD4+) et les cellules tueuses naturelles NK.

Elle intervient comme facteur de croissance des cellules T, induisant un signal de progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.

Après l'activation du lymphocyte suite à la présentation d'un Ag par une CPA, la cellule passe en phase G1. Pendant cette phase, il y a activation d'un grand nombre de gènes cellulaires, en particulier des gènes de l'IL-2 et de CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2).

Le récepteur à l'IL-2 est constitué de 3 chaînes,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , chacune pouvant lier l'IL-2 avec une faible affinité. Après activation de la cellule, une grande quantité de chaînes  $\alpha$  est produite dont une partie s'associe avec les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  d'expression constitutive afin de former un récepteur de haute affinité. L'autre partie est libérée sous forme soluble. La liaison de l'IL-2 à son récepteur induit un signal de progression permettant à la cellule de passer en phase S et de répliquer son ADN. En outre, l'IL-2 active les cellules NK en cellules LAK (Lymphokine activated killer cells) et stimule la prolifération des lymphocytes B.

### **Molécules HLA**

Le complexe HLA ou complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un ensemble de gènes localisés sur un segment du bras court du chromosome 6. Ces loci sont regroupés en deux classes, la classe I qui inclut les gènes HLA-A, B et C, et la classe II ou région HLA-D. La fonction principale des molécules HLA (Human Leucocyte Antigens) est de présenter les antigènes peptidiques aux lymphocytes T

*Les gènes HLA de classe I* sont formés par l'association non covalente d'une chaîne  $\beta_2m$  et d'une chaîne  $\alpha$  polymorphique. La chaîne  $\alpha$  comprend 3 domaines extracellulaires ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ ), une région transmembranaire et une région cytoplasmique. Les molécules de classe I sont exprimées sur la plupart des cellules de l'organisme et particulièrement sur les lymphocytes, les cellules dendritiques et les macrophages.

*Les gènes HLA de classe II* (région HLA-D) sont regroupés en 3 sous-régions DR, DP et DQ.

Les molécules HLA de classe II sont formées de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  comportant chacune deux domaines extra-membranaires ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) associés par une courte séquence à une région transmembranaire et à un domaine cytoplasmique. Les molécules de classe II sont restreintes à certaines cellules de l'organisme. Leur densité est élevée,  $10^5$  molécules /cellule, sur les cellules spécialisées dans la présentation de l'Ag aux lymphocytes T comme les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, l'épithélium des voies respiratoires, les entérocytes des villosités, les précurseurs hématopoïétiques et après activation, l'endothélium vasculaire et les lymphocytes T.

### **Compartiment des classes II**

Les molécules de classe II sont associées dans le réticulum endoplasmique avec des protéines chaperones puis avec la chaîne invariante Ii (CD74) sous forme de nanomères ( $\alpha\beta Ii$ )<sub>3</sub>.

Ces molécules sont glycosylées dans le Golgi puis transportées dans le compartiment des molécules de classe II (Class II vesicles). Ce compartiment fusionne alors avec des endosomes ou des lysosomes, où, sous l'influence du pH acide et des protéases comme les cathepsines B, D et S, la chaîne Ii se dissocie et subit une protéolyse laissant un peptide CLIP (class II invariant chain associated peptide) dans le réceptacle du peptide Ag. Les molécules HLA-DM au contact des molécules de classe II catalysent la dissociation de CLIP et sa substitution par un peptide issu de l'endosome. Ce peptide provient, par protéolyse à pH acide, de protéines endocytées à partir de la surface cellulaire.

L'ensemble de ces événements est, entre autres, sous le contrôle du CIITA (*Class II TransActivator*) (Figure I.4).



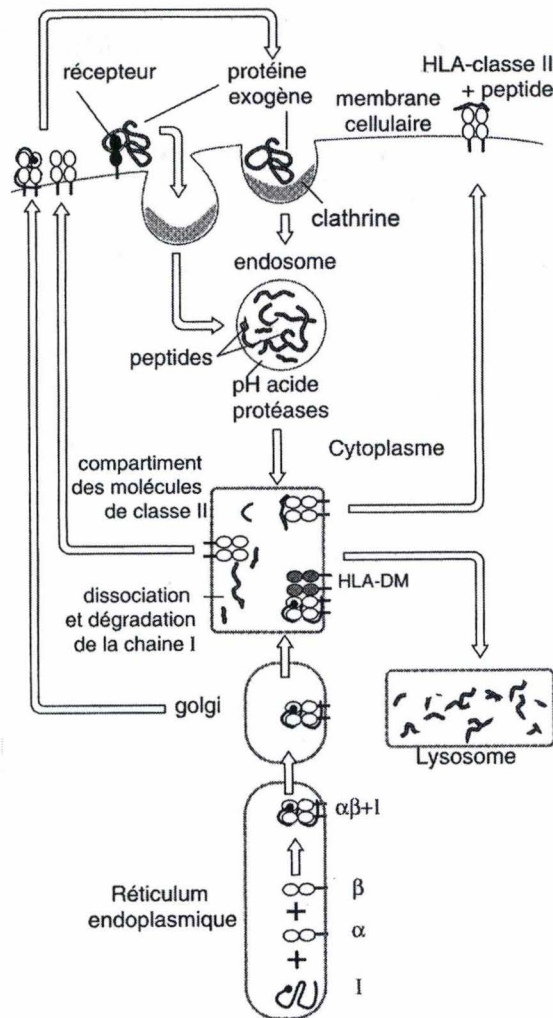


Figure 14 : Association de peptides aux molécules de classe II du HLA. (In Revillard).

#### Molécules d'adhésion.

Pour modifier leurs interactions avec d'autres types cellulaires, les leucocytes peuvent augmenter le nombre de molécules d'adhérence sur leur surface ou bien modifier leur affinité. L'augmentation du nombre des molécules d'adhérence à la surface cellulaire peut ne prendre que quelques minutes après l'activation de la cellule, par mobilisation d'un pool intracellulaire de molécules préformées stockées dans des vésicules. Le processus peut prendre plusieurs heures si les molécules sont synthétisées et transportées à la surface.

Les *intégrines* constituent une famille de glycoprotéines membranaires hétérodimériques, dont les fonctions essentielles sont l'adhérence intercellulaire et l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire. Les intégrines sont formées de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  associées de façon non covalente et sont groupées en 3 classes selon qu'elles comportent la sous-unité  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  ou  $\beta 3$ . Un exemple d'intégrines de la classe  $\beta 2$  est le CD11a/CD18, appelé LFA1 (*Leucocyte Function Antigen-1*) qui peut se lier à CD54 (ICAM-1), CD11a étant exprimé en forte densité sur tous les leucocytes et les plaquettes.

Des molécules, comme ICAM-1, appartiennent à la *superfamille des immunoglobulines*, caractérisée par la présence de boucles stabilisées par un pont disulfure. Ces molécules peuvent s'associer de façon homophile (N-CAM, N-CAM) ou hétérophile (ICAM-1, LFA-1) et sont indépendantes du calcium.

Les *sélectines* jouent un rôle important dans l'adhérence des cellules à l'endothélium vasculaire, cette famille comportant 3 membres : sélectine E, L et P. La sélectine E est exprimée sur toutes les cellules endothéliales dans les sites de l'inflammation, après activation notamment par l'IL-1.

La sélectine L est une lectine dépendante du  $Ca^{2+}$  exprimée sur tous les leucocytes. Elle intervient dans l'adhérence des leucocytes à l'endothélium des veinules post-capillaires. La sélectine P est exprimée sur les plaquettes, les cellules endothéliales et les mégacaryocytes.

Les *cadhérines* forment une famille de molécules d'adhérence intercellulaire dépendant du calcium, importantes pour la différenciation et pour la structure tissulaire. La cadhérine E est le ciment intercellulaire qui consolide les couches épithéliales, son action est dépendante du calcium car l'élimination du calcium induit la désagrégation des amas cellulaires.

### Récepteurs T.

Les récepteurs T (TCR pour *T Cell Receptor*) sont des hétérodimères formés par l'association de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  ou  $\gamma$  et  $\delta$ . Chaque chaîne comporte un domaine N-terminal et un domaine C prolongé par une séquence hydrophobe d'une vingtaine d'acides aminés assurant son ancrage dans la double couche lipidique et par un très court segment intracytoplasmique. Environ 90% des lymphocytes T du sang circulant portent des récepteurs  $T\alpha\beta$ ; 1 à 10%, des récepteurs  $T\gamma\delta$ . Le pourcentage des lymphocytes  $T\gamma\delta$  est plus élevé dans les tissus, en particulier dans les muqueuses. Les récepteurs  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  sont associés sur la membrane des lymphocytes T au complexe moléculaire CD3. Ce complexe est nécessaire à l'expression des TCR en surface. Il assure la transduction des signaux provoqués par l'interaction des TCR avec l'Ag.

### Activation des lymphocytes T in vitro

L'activation des cellules T  $CD4+$  et  $CD8+$  peut être induite par des antigènes spécifiques présentés par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) sous forme de peptide en association avec les molécules de classe I ou II (voir 2.2.2.1.2).

L'activation des cellules T alloréactives est mise en évidence par la réaction lymphocytaire mixte primaire, pour laquelle la reconnaissance des cellules stimulantes (allogéniques ou hétérologues) et des cellules  $CD4+$  répondeuses se fait via les molécules de classe II. Cette reconnaissance s'accompagne d'une sécrétion d'IL-2 par ces  $CD4+$ , l'IL-2 agissant de façon autocrine et paracrine. Les cellules  $CD8+$  répondeuses peuvent aussi sécréter de l'IL-2 et d'autres cytokines permettant leur différenciation de cellules pré-cytotoxiques en cellules T cytotoxiques matures. L'activation nécessite un ensemble de signaux additionnels. La deuxième étape est celle de l'expansion clonale qui peut être mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée. La dernière étape correspond à l'arrêt de prolifération par destruction des cellules stimulantes (Figure I.5).

L'activation polyclonale peut être réalisée par des lectines, qui sont des glycoprotéines polymériques d'origine végétale ou animale se fixant de façon spécifique à des oligosaccharides, Une lectine végétale couramment utilisée est la PHA (phytohémagglutinine).

Les superantigènes sont susceptibles d'activer les lymphocytes, en reconnaissant d'une part la chaîne  $\beta$  des molécules de classe II et d'autre part le TCR, en dehors de la zone de contact peptide-molécule de classe II (Figure I.6).

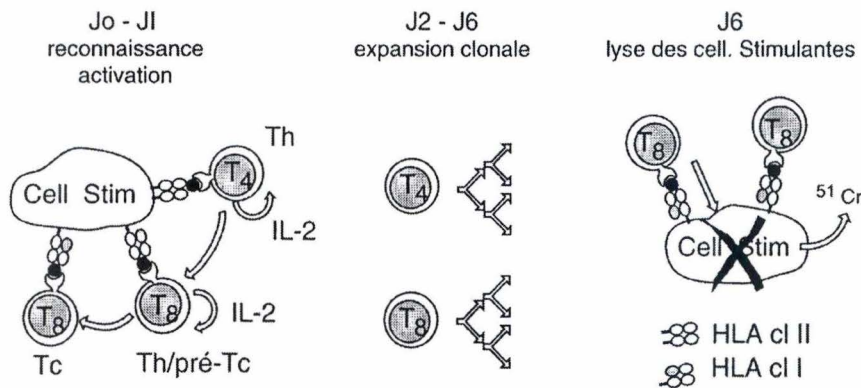


Figure I.5 : Etapes de la MLR (Mixed Lymphocyte Reaction). Tc : cellules cytotoxiques, Th : Cellule T helper  $CD4+$ , pré-Tc : Cellules pré-cytotoxiques (In Revillard).



Figure I.6 : Stimulation des lymphocytes par interaction entre les TCR/peptide/HLA II (A) et par interaction entre les TCR/superantigène/HLA (B) (In Revillard)

### 2.2.2.1.2. Interactions cellule dendritique - lymphocytes T lors de la présentation antigénique

L'activation classique d'un lymphocyte T débute par un engagement de son récepteur par un peptide antigénique spécifique associé à une molécule HLA (*complexe HLA-peptide*) exprimée en surface d'une cellule dendritique (après internalisation de l'antigène, clivage peptidique dans le compartiment endosomal et liaison à une molécule HLA, le plus souvent de classe II, dans le compartiment des molécules de classe II). Il s'agit de la situation autologue - ou *syngénique* - où la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T répondeur appartiennent au même individu. En situation allogénique (cellule dendritique et lymphocyte T d'individus différents, donc porteurs de HLA discordants), les molécules HLA étrangères jouent le rôle du complexe HLA-peptide des situations autologues en engageant les récepteurs T (Figure I.7).

#### **Stimulation lymphocytaire allogénique**

L'activation de lymphocytes T alloréactifs (reconnaissant des molécules HLA hétérologues) peut se faire sur deux modes: la reconnaissance directe et la reconnaissance indirecte.

La reconnaissance directe implique l'interaction des lymphocytes T et des HLA portés par les cellules présentatrices hétérologues.

La reconnaissance indirecte nécessite une internalisation des HLA de cellules hétérologues par des cellules présentatrices autologues, ces dernières clivant les HLA hétérologues en peptides présentés en association HLA autologue-peptide HLA hétérologue.

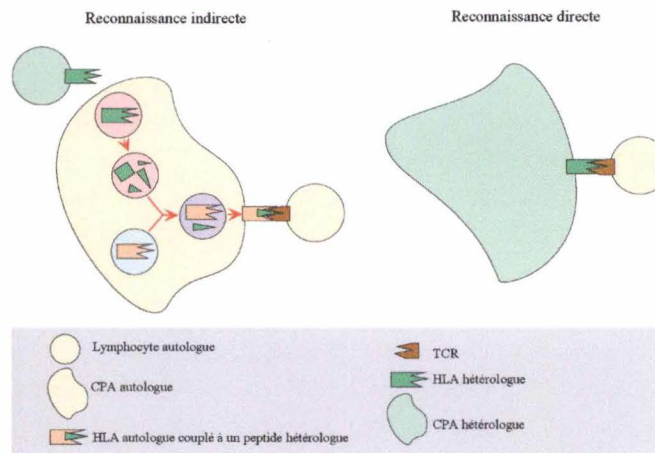


Figure I7 : Alloréactivité : reconnaissance indirecte et directe.

La présentation antigénique par les cellules dendritiques caractérise leur état mature qui se différencie de leur état immature par les caractéristiques suivantes:

- perte de leur capacité d'endocytose,
- perte d'expression du CD1a,
- augmentation de l'expression des molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86),
- transformation morphologique (dendritiques à arrondies), acquisition d'une motilité accrue et perte d'ancrage (diminution de l'expression de la cadhérine E),
- modification des compartiments lysosomiaux (désactivation du CD68 et activation des DC-LAMP),
- activation du compartiment HLA II,
- co-concentration des complexes HLA-peptides et des molécules costimulantes CD80 et CD86 (*Turley et al, 2000*).

L'engagement du récepteur du lymphocyte T (*TCR*) par la cellule dendritique déclenche une série d'événements conduisant à la prolifération clonale du lymphocyte T spécifique de l'antigène (Figure I.8). Cette **séquence événementielle** est similaire en situation allogénique ou autologue, et identique dans la stimulation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (situation la plus fréquente, complexe HLA\_II-peptide) ou de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (complexe HLA\_I-peptide).

- Rapprochement cellulaire et amarrage par liaison de CD11a/CD18 (LFA1) du lymphocyte T à CD54 (ICAM-1) de la cellule dendritique. Outre le renforcement cohésif entre les deux cellules, l'engagement de CD11a/CD18 induit une signalisation au niveau du lymphocyte T avec pour conséquences la production de cytokines (IL-2, IL-4 et IFN $\gamma$ ) ainsi qu'une accentuation de la réponse à l'engagement de CD28.
- Induction de l'expression de CD154 (CD40 ligand ou CD40L) qui en se liant à CD40 sur la cellule dendritique:
  - induit ou majore l'expression de CD80 (*B7-1*) et CD86 (*B7-2*), molécules de costimulation de la cellule dendritique. La liaison de CD80 et de CD86 au ligand lymphocytaire CD28 stimule la transcription du gène lymphocytaire de l'IL-2 et stabilise l'ARNm de l'IL-2. L'IL-2 en se liant à son récepteur, en boucle autocrine (mais également sur le mode paracrine), déclenche la mitose et augmente l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25). L'ensemble de ces phénomènes résulte en une prolifération clonale lymphocytaire T, mais il semble qu'en plus, l'engagement de CD28 ait un effet anti-apoptotique sur le lymphocyte (*Lenschow et al, 1996*). **En l'absence de ce cosignal (CD80/CD86-CD28), le lymphocyte T devient anergique.** CD80 et CD86 se lient également à la molécule membranaire lymphocytaire CD152 (*CTLA-4*) et délivrent un signal d'arrêt de prolifération nécessaire à partir d'un certain point pour éviter une expansion clonale illimitée des lymphocytes T activés.
  - majore l'expression des molécules HLA de classes I et II par la cellule dendritique (*Turley et al (2000)* viennent de démontrer le co-transport des molécules HLA et des molécules CD80/CD86 au sein de la cellule dendritique),
  - induit ou majore la production par la cellule dendritique d'IL-12 qui provoque la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T et surtout par les cellules NK (Natural Killers / CD4<sup>+</sup>NK1.1) et joue un rôle essentiel dans l'induction des réponses Th1 (voir encadré ci-dessous),

- protège la cellule dendritique de l'apoptose médiée par Fas en surexprimant la protéine Bcl-2.
- Glissement du phénotype CD45RA (caractéristique des lymphocytes T naïfs) au phénotype CD45RO (caractéristique des lymphocytes T activés). Cette modification résulte d'un épissage alternatif de l'ARNm de CD45.

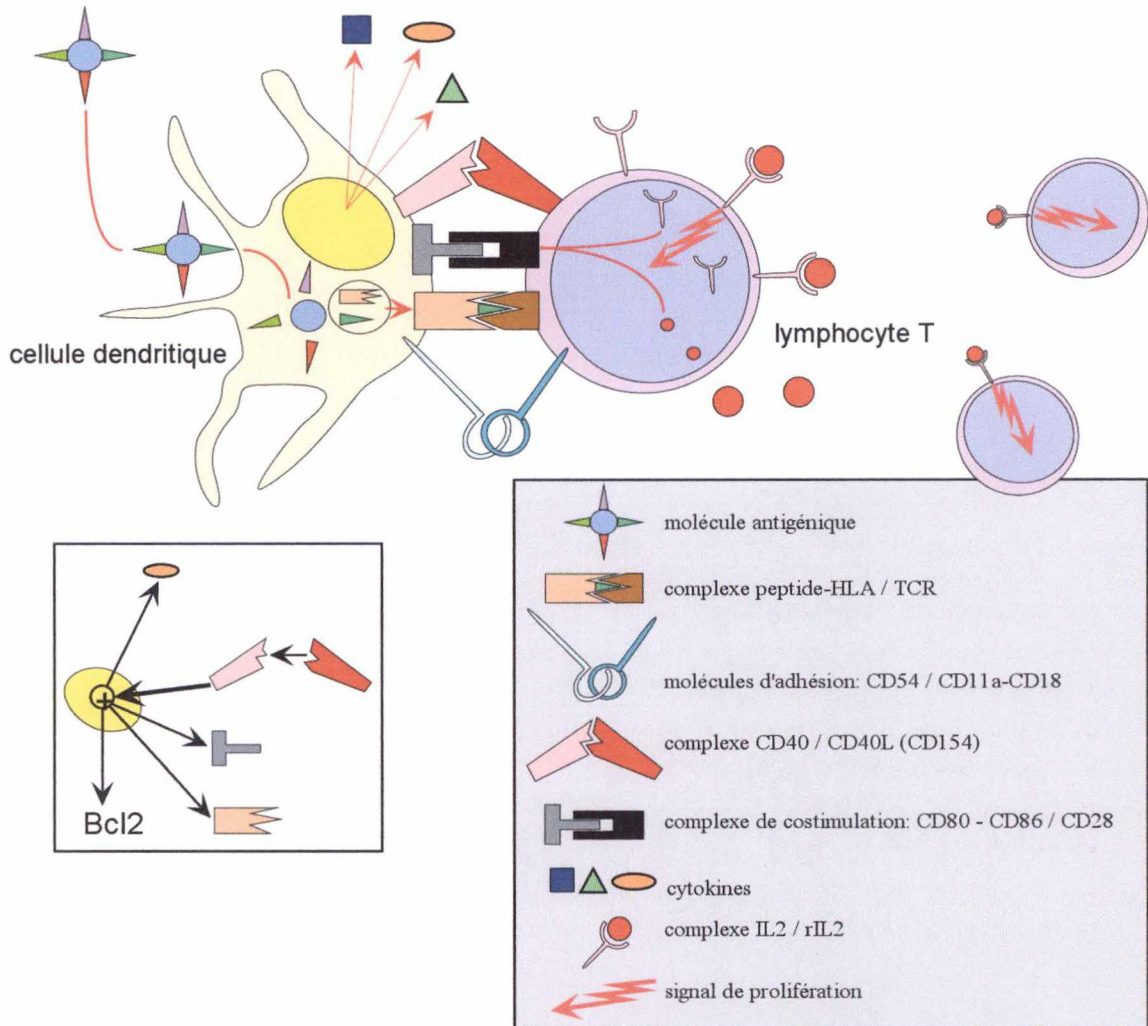


Figure I.8 : Stimulation primaire d'un lymphocyte T par une cellule dendritique.

### Réponses immunitaires Th1 et Th2

Le type de réponse immunitaire enclenchée par ce processus dépend de l'environnement en cytokines particulières dont la production est liée à la nature de l'agression.

Si le lymphocyte T engagé dans ces premières étapes est de type helper  $CD4^+ CD8^-$  (le cas de figure le plus fréquent), la réaction immunitaire peut s'engager dans deux voies différentes dites **Th1** et **Th2** selon le type de cytokines produites par le lymphocyte T helper (Figure I.9)

Les cytokines IL-12 et  $IFN\gamma$  produites par des cellules adjacentes telles les NK ( $CD4^+ NK1.1$ ) et les lymphocytes T  $CD8^+$  conduisent le lymphocyte T helper  $CD4^+ CD8^-$  engagé à la production d'IL-2, de TNF et d' $IFN\gamma$ , ces cytokines favorisant une **réponse immunitaire de type cellulaire (réactions d'hypersensibilité retardée et/ou activation des lymphocytes T cytotoxiques)** appelée Th1. Il est à noter que l' $IFN\gamma$  ambiant inhibe de manière croisée la réaction Th2. La cytokine IL-4 produite par les macrophages éventuellement présents conduisent le lymphocyte T helper  $CD4^+ CD8^-$  engagé à la production d'IL-10, d'IL-6 et d'IL-4, ces cytokines favorisent une **réponse immunitaire de type humorale**

appelée Th2. Cette déviation Th2 peut voir également la production d'IL-5 qui enclenche une éosinophilie. Il est à noter que l'IL-10 ambiante inhibe de manière croisée la réaction Th1 (par diminution de la synthèse d'IL-12 par les cellules dendritiques, la diminution d'expression du CD86 et des molécules HLA-DR à la surface des cellules dendritiques et l'inhibition de la synthèse d'IFN $\gamma$  par les CD4<sup>+</sup>NK1.1). L'IL-10 peut globalement être considérée comme une interleukine anti-inflammatoire.

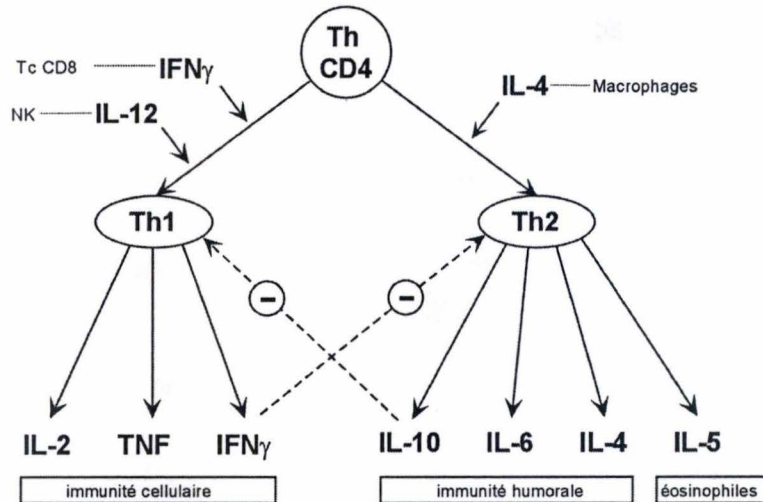


Figure 1.9 : Orientation de la réponse immunitaire vers le type Th1 ou Th2.

La présentation antigénique doit être considérée dans deux contextes différents:

- **la stimulation primaire** au cours de laquelle les lymphocytes T naïfs spécifiques de l'antigène vont être recrutés, activés et différenciés:
  - d'une part en cellules effectrices qui élimineront l'agresseur et les cellules touchées par celui-ci,
  - et d'autre part en lymphocytes T à mémoire.
- **la stimulation secondaire** au cours de laquelle les lymphocytes T à mémoire reconnaîtront immédiatement l'antigène avec pour conséquence une activation et une prolifération très rapide.

La stimulation primaire nécessite la séquence événementielle (décrite ci-dessus) de présentation antigénique par des cellules dendritiques (ou par des lymphocytes dans le cas de réaction allogénique directe). Par contre, la stimulation secondaire présente moins d'exigences car elle peut être déclenchée par l'antigène porté par des cellules non professionnelles et partiellement dépourvues des protéines membranaires spécifiques des cellules présentatrices professionnelles (CD80, CD86, CD40, ...) hormis les molécules HLA.

#### 2.2.2.2. Comparaison des arsenaux immunologiques de la peau et des muqueuses

##### Rappel synthétique de l'histologie de la peau.

La peau est composée de 3 couches tissulaires correspondant, de la profondeur vers la surface, à l'hypoderme, le derme et l'épiderme.

L'**hypoderme** est constitué de tissu adipeux cloisonné par des travées conjonctivo-vasculaires. Il joue un rôle dans l'isolation thermique et dans le stockage des lipides.

Le **derme** est constitué de tissu conjonctif dense occupé par des réseaux vasculaire et nerveux particulièrement développés. Il comporte également les unités sécrétrices des glandes sudoripares ainsi que les matrices pilaires. Le réseau vasculaire joue un rôle important dans la thermorégulation, épaulé

par les glandes sudoripares (et le système pileux, de manière vestigiale chez l'homme) ainsi que dans la nutrition des tissus cutanés. Le réseau nerveux est impliqué dans la perception et la transmission des informations sensorielles (tactiles et nociceptives). La composante conjonctive dense assure une résistance mécanique élevée à la peau. Le derme ne comporte pas de tissu lymphoïde résident mais est occupé par des cellules dendritiques immatures.

L'**épiderme** (Figure I.10).est constitué d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé, reposant sur une membrane basale, et où prédominent les cellules constitutives: les kératinocytes. Ceux-ci, en mûrissant de la profondeur vers la surface en formant une couche basale, une couche épineuse, une couche granuleuse et une couche cornée, créent une interface de protection kératinisée, hydrophobe et barrant la route à la plupart des agressions microorganismes. Les kératinocytes sont les cellules résidentes de l'épiderme et les plus représentées dans celui-ci qui comporte en outre des cellules importées: les *cellules de Merkel* (impliquées dans les perceptions sensorielles et originaires de la crête neurale ou d'une métaplasie kératinocytaire ?), les *mélanocytes* (qui, au travers de la production de mélanine, assument un certain degré de protection contre les rayons ultraviolets; les mélanocytes sont originaires de la crête neurale) et les *cellules de Langerhans* (qui sont des cellules présentatrices d'antigènes dendritiques d'origine hématopoïétique).

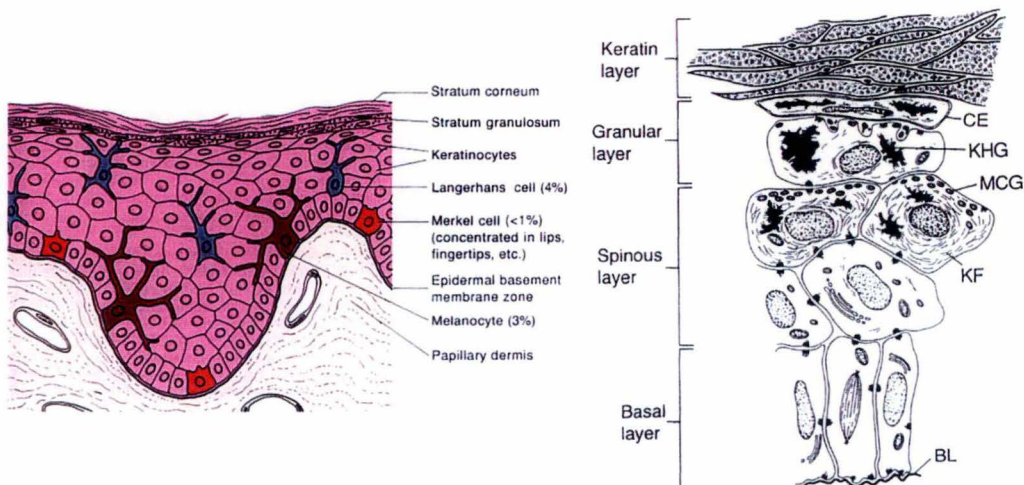


Figure I.10 : Représentation d'un épiderme in vivo (A) (In Rubin E. and Farber J.L.) et de la différenciation des kératinocytes (B). EC : enveloppe cornée, KHG : granules de kératohyaline, MCG : corps d'Odland, KF : filaments de kératine, BL : lame basale.(d'après Montagna et Parakkal).

#### Rappel synthétique de l'histologie des muqueuses. Exemple de la muqueuse intestinale grêle.

La muqueuse intestinale grêle (Figure I.11) est délimitée dans sa profondeur par une couche musculaire lisse discrète appelée musculaire muqueuse. Elle est couverte en surface par un **épithélium** monostratifié cylindrique où s'observe une majorité de cellules épithéliales différenciées et spécialisées soit dans l'absorption (microvillosités) soit dans la production de mucus et de substances bactéricides (cellules caliciformes et cellules de Paneth). Entre les cellules épithéliales sont dispersées des cellules du système neuroendocrinien diffus ainsi que des lymphocytes T (caractérisés par un TCR  $\gamma\delta$ ). Il faut ajouter les cellules M intercalées entre les cellules épithéliales de régions spécifiques comme les plaques de Peyer de l'iléon terminal. Le **chorion** muqueux occupe l'espace compris entre l'épithélium et la musculaire muqueuse; il est constitué d'un tissu conjonctif lâche occupé par de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques impliqués dans l'absorption et par des lymphocytes essentiellement d'origine B ainsi que des plasmocytes impliqués dans la défense immunitaire humorale de l'interface (essentiellement via les IgA). Le chorion des plaques de Peyer est rempli d'un tissu lymphoïde riche semblable à celui des ganglions lymphatiques (follicules lymphoïdes B, cellules présentatrices d'antigènes, tissu lymphoïde T interfolliculaire).

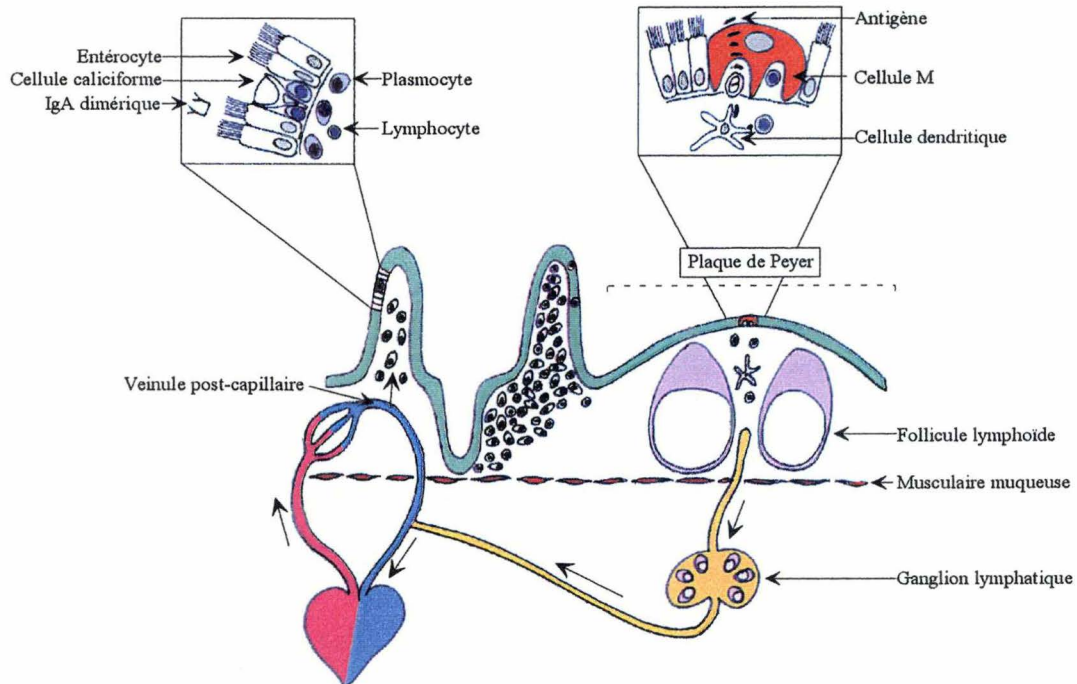


Figure 1.11 : Schéma de la muqueuse intestinale grêle dans le contexte du tissu lymphoïde associé aux muqueuses.

L'analyse morphologique comparative des muqueuses et de la peau traduit les finalités différentes et même antinomiques de ces deux tissus. La peau vise à l'imperméabilité vis-à-vis du monde extérieur alors que les muqueuses présentent une perméabilité importante permettant les échanges avec le monde extérieur (absorption de nutriments et d'oxygène, élimination de déchets). Dans ce contexte, il n'apparaît guère étonnant que l'implication du système immunitaire spécifique soit beaucoup plus importante, et omniprésente, dans les muqueuses. La peau ne bénéficie que d'un système de surveillance permanent (cellules de Langerhans et cellules dendritiques dermiques) qui alerte et déclenche l'importation des effecteurs lymphoïdes uniquement en cas d'agression (ces mécanismes sont développés de manière extensive au point 3: *Immunologie de l'interface INEX cutanée*). Par contre, les muqueuses, beaucoup plus ouvertes à la pénétration d'agents agresseurs, sont équipées non seulement d'un système d'immunosurveillance (par exemple: les plaques de Peyer) mais également d'effecteurs lymphoïdes disséminés tout au long de leurs surfaces. Ces effecteurs appartiennent à la lignée lymphoïde B et sécrètent des IgA spécifiques, multiples et variées qui sont déversées en surface de l'épithélium (effet préventif). Ils consistent également en lymphocytes T spécifiques (caractérisés par un TCR  $\gamma\delta$ ) nichés à l'affût entre les cellules épithéliales. Tous ces effecteurs lymphoïdes sont éduqués (primés) au niveau du tissu lymphoïde muqueux (plaques de Peyer, amygdales) et des ganglions de drainage, renvoyés dans la circulation générale munis de récepteurs capables de reconnaître des portes de sortie les conduisant vers une résidence muqueuse indiquée par des adressines endothéliales présentes uniquement dans les veinules post-capillaires des muqueuses. Ce phénomène porte le nom de *homing* (que l'on observe également dans le contexte cutané). L'ensemble de ce système immunitaire associé aux muqueuses porte le nom de MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*); il n'est pas détaillé plus avant contrairement au système immunitaire associé à la peau (chapitre suivant).



### 3. Immunologie de l'interface INEX cutanée

#### 3.1. Place de la cellule de Langerhans dans l'immunité cutanée

Même si les cellules de Langerhans sont connues de longue date (1868), la compréhension de leur biologie est récente et parallèle à celle des cellules dendritiques tissulaires, qu'elles représentent au niveau de l'épiderme. L'immunobiologie détaillée de la cellule de Langerhans est discuté ci-dessus dans le cadre des cellules dendritiques (2.2.2.1.1 et 2.2.2.1.2). Une des spécificités de la cellule de Langerhans est, lors de la stimulation des lymphocytes T (passage de l'état naïf à l'état mémoire), de leur conférer une spécificité d'organe (homing): ces lymphocytes T expriment le CLA (*Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen*) qui est une molécule d'adhésion dont le ligand est le CD62E (sélectine E) exprimé de manière préférentielle au niveau des cellules endothéliales des veinules post-capillaires de la peau .

Les cellules de Langerhans ne sont pas les seules cellules présentatrices d'antigènes de la peau: les cellules dendritiques du derme leur sont semblables, tant au point de vue de l'origine que de leur biologie; il serait d'ailleurs plus cohérent de ne plus utiliser le nom propre qualificatif (Langerhans) et de les dénommer cellules dendritiques épidermiques. La cellule de Langerhans est le seul effecteur immunitaire permanent de la peau. D'un point de vue morphologique, les cellules de Langerhans sont observables au niveau de la couche épineuse de l'épiderme. Aux colorations usuelles, elles apparaissent comme des cellules à cytoplasme plus clair que celui des kératinocytes. Leurs expansions cytoplasmiques dendritiques sont seulement reconnues après coloration aux sels d'or ou lors de la mise en évidence d'ATPase, ou lors de marquages immunohistochimiques pour le CD1a ou HLA-DR (Figure I.12). La microscopie électronique révèle qu'elles ne contractent pas de jonctions de type desmosomes avec les kératinocytes et que leur cytoplasme contient des structures originales et distinctives: les granules de Birbeck.

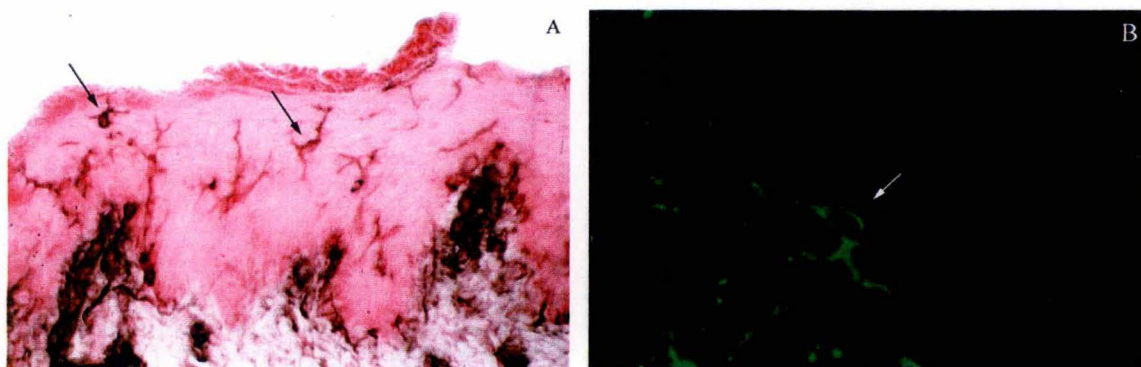


Figure I. 12 : Mise en évidence de cellules dendritiques *in vivo* par technique histochemique (ATPase) (A), ou par marquage immunohistochemique (CD1a) (B).

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques immatures résultant de la migration de précurseurs circulant sanguins. Elles sont ancrées dans l'épiderme par interaction homotypique de la cadhérine E qu'elles expriment au même titre que les kératinocytes (*Tang et al, 1993*). La phagocytose de particules antigéniques par les cellules de Langerhans résultent en une diminution de l'expression de la cadhérine E ce qui les libèrent de leur ancrage aux kératinocytes et permet leur migration vers les ganglions lymphatiques suite à une augmentation de motilité grâce, entre autres, à un remaniement de leur cytosquelette (*Banchereau et al, 2000*). Leur passage au travers de la membrane basale, tant à l'entrée dans l'épiderme qu'à leur sortie, est possible grâce à

leur production de collagénase de type IV (Figure I.13). La migration des cellules de Langerhans, de l'épiderme vers les ganglions lymphatiques a été bien documentée tant in vivo (Macatonia et al, 1987; Suzuki et al, 2000) qu'in vitro (Lukas et al, 1996). Cette migration vers les ganglions lymphatiques peut être modulée par certaines substances comme l'Imiquimod, un xénobiotique topique dont l'utilisation, dans le traitement de certaines affections virales ou tumorales cutanées, vise à majorer ou induire une réponse immunitaire locale par le biais d'un recrutement des cellules de Langerhans (Suzuki et al, 2000).

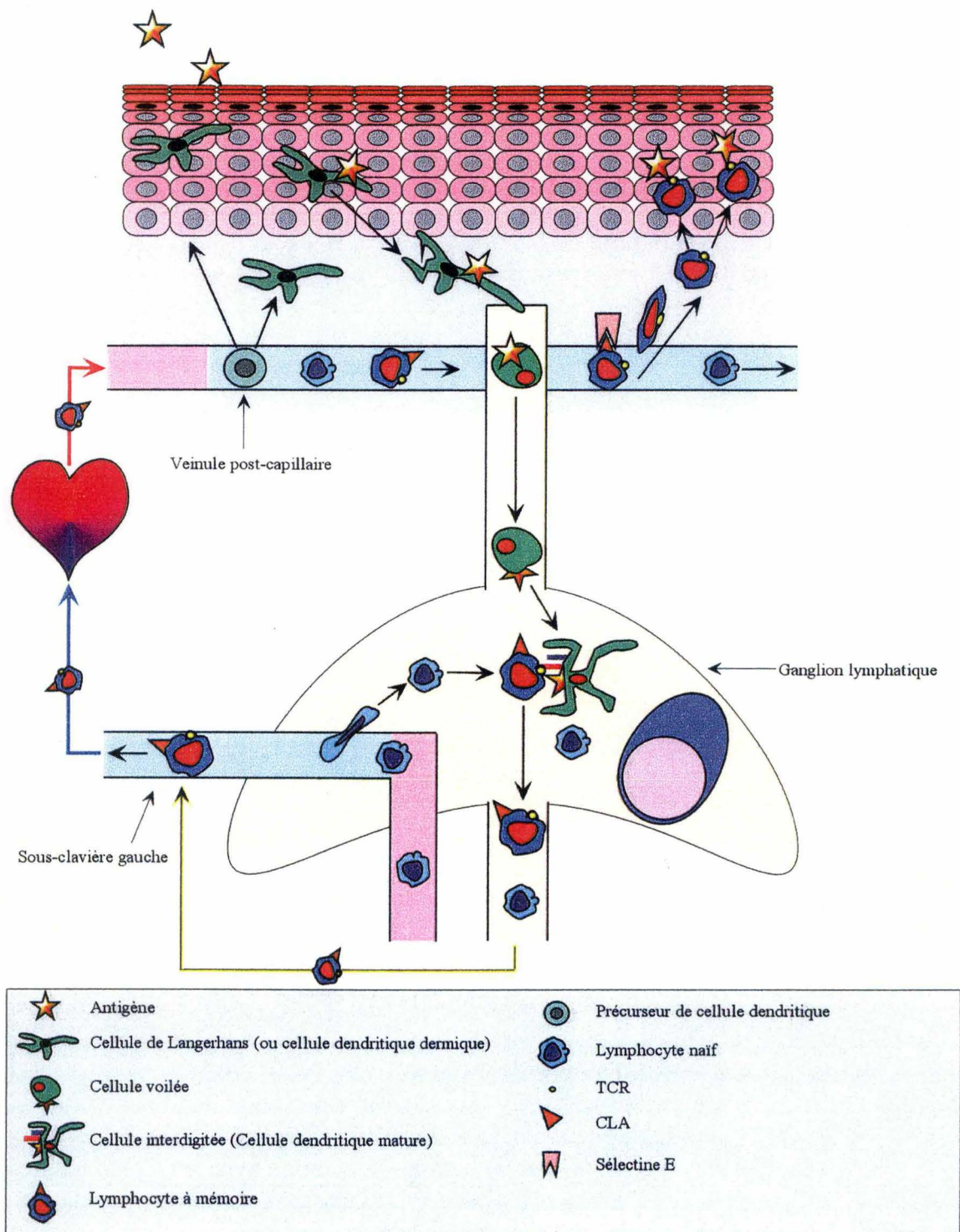


Figure I.13 : Migration des cellules dendritiques.

Il existe donc un renouvellement permanent, mais lent, des cellules de Langerhans (cycles d'entrée et sortie). Ceci a été particulièrement démontré *in vivo* chez des patients ayant subi une greffe allogénique de moelle hématopoïétique. Ces patients montrent, même des années après la greffe, un chimérisme au niveau de leur cellules de Langerhans épidermiques qui apparaissent tantôt autologues, tantôt hétérologues (Hessel *et al*, 1996). Par ailleurs, la peau humaine greffée à une souris nue athymique, se voit progressivement colonisée par des cellules de Langerhans murines (Démarchez *et al*, 1993).

### 3.2. Modèle actuel et synthèse de l'immunité cutanée

Les cellules dendritiques cutanées immatures  $CD1a^+$  dérivent de précurseurs hématopoïétiques circulants ayant quitté le courant sanguin et migré dans l'épiderme (cellules de Langerhans) et le derme. Lors d'une agression cutanée, les molécules antigéniques sont endocytées par les cellules dendritiques cutanées. Cette étape déclenche un processus de maturation (avec entre autres perte de l'expression du  $CD1a$ ) et de migration (après disparition de l'ancrage aux cadhérines E et modification de leur cytosquelette) des cellules dendritiques vers les capillaires lymphatiques en direction des ganglions lymphoïdes de drainage régional. Durant ce trajet, les cellules dendritiques adoptent une morphologie sphérique (cellules voilées). Les molécules antigéniques endocytées sont soumises à la dégradation enzymatique endosomiale, clivées en peptides qui sont associés aux molécules HLA pour former des complexes HLA-peptide transportés à la membrane des cellules dendritiques qui aboutissent, au terme de leur migration dans les régions paracorticales ganglionnaires où elles portent le nom de cellules interdigitées (cellules dendritiques matures  $CD1a^+$ ). La région paracorticale ganglionnaire est riche en veinules post-capillaires épithélioïdes à travers lesquelles transmigrent en permanence des lymphocytes T naïfs qui viennent tester leur TCR aux peptides antigéniques présentés par les cellules interdigitées (Figure I.14).

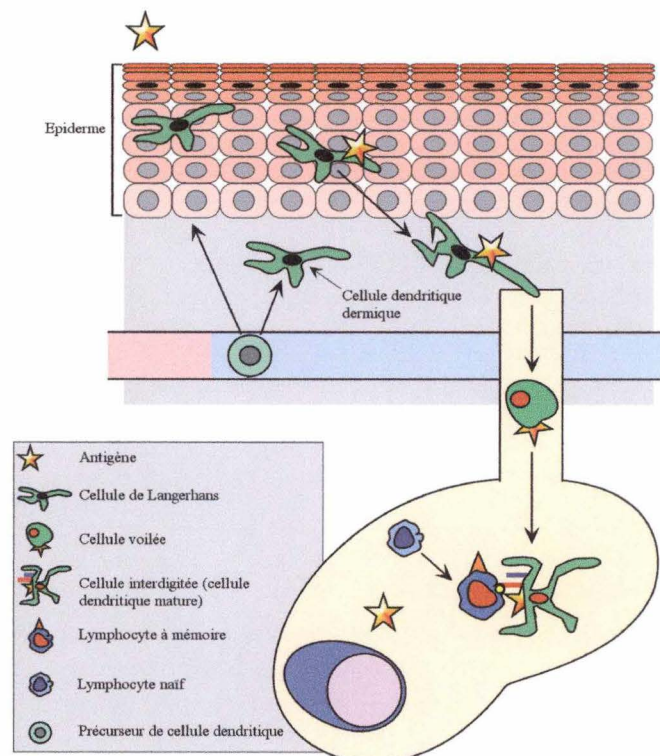


Figure I.14 : Cycle de migration des cellules dendritiques.

Lors de la reconnaissance et l'engagement du TCR d'un lymphocyte T naïf avec le complexe HLA-peptide d'une cellule interdigitée, se produit l'activation de celle-ci (engagement du CD40, surexpression CD80/CD86, surexpression HLA, surexpression ICAM-1 et ancrage LFA-1, production de cytokines, ...). Lorsque le lymphocyte T est engagé par une cellule interdigitée d'origine cutanée, celui-ci exprime un marqueur membranaire dénommé CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen) qui est une molécule d'adhésion dont le ligand, la sélectine-E, est exprimée préférentiellement au niveau des cellules endothéliales des veinules post-capillaires cutanées. Après cette phase, le lymphocyte T naïf, devenu effecteur ou mémoire, quitte le ganglion par les vaisseaux lymphatiques efférents et rejoint la circulation sanguine par déversement de la lymphe dans la veine sous-clavière gauche. Lors d'une agression cutanée, les kératinocytes épidermiques sécrètent de grandes quantités d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$ . Ces cytokines, en se liant à leurs récepteurs soit sur les kératinocytes, soit sur d'autres cellules comme les cellules endothéliales activent de nombreuses voies de signalisation et notamment celle du NF- $\kappa$ B qui active les gènes impliqués dans l'inflammation (chémokines, cytokines, défensines) mais également les gènes de l'ICAM-1, du VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) et de la sélectine-E. Ces conditions favorisent l'extravasation locale d'effecteurs immunitaires spécifiques et non spécifiques, la surexpression endothéliale de sélectine-E recrutant de manière sélective les lymphocytes T porteurs du CLA (Robert et al, 1999).

### 3.3. Place du kératinocyte dans l'immunité cutanée

La question de la capacité de présentation antigénique des kératinocytes est posée de longue date. L'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans la présentation antigénique par les cellules dendritiques a permis de cibler, pour le kératinocyte, les axes de recherche au niveau des processus et des molécules impliquées dans la séquence événementielle de présentation à savoir: les capacités d'**internalisation** et de clivage peptidique des antigènes, l'expression des molécules **HLA**, l'expression des **ligands des intégrines**, l'expression des **molécules de costimulation** et la production de **cytokines**.

*Sauf indication contraire, dans ce chapitre 2.3, le terme "kératinocyte" sous-entend "kératinocyte humain".*

#### **IFN $\gamma$**

L'IFN $\gamma$  est produit par les cellules T activées et les cellules NK. Une stimulation du système immunitaire permet, par la production d'IFN $\gamma$ , d'augmenter la fonction de présentation d'Ag des CPA, en augmentant leur expression de molécules de classe II et leur potentiel d'activation des cellules T.

#### **PMA (phorbol myristyl acétate)**

Les esters de phorbol activent la protéine kinase C (PKC) de façon artificielle. L'association d'un ester de phorbol avec un ionophore calcique provoque l'entrée de calcium extracellulaire dans la cellule.

#### 3.3.1. Ligands des intégrines (ICAM-1 / CD54)

ICAM-1 est exprimé par les kératinocytes in vivo de manière constitutionnelle mais à une très faible densité membranaire ne permettant de l'observer que par une approche immunohistochimique en microscopie électronique (Lonati et al, 1996). Toute situation inflammatoire de l'épiderme, quelle que soit son étiologie, et à fortiori si elle s'accompagne d'une migration lymphocytaire trans-épidermique, permet d'observer en

approche immunohistochimique optique conventionnelle, une expression membranaire d'ICAM-1 par les kératinocytes (ainsi que de VCAM-1). Cette constatation n'est pas propre aux kératinocytes, pratiquement toute cellule épithéliale dans ces conditions, expriment ICAM-1, ceci pouvant être interprété comme la mise en place d'un système d'ancrage pour le déplacement des lymphocytes en terrain inflammatoire, mais également comme la possibilité pour les cellules épithéliales de s'ancrer aux lymphocytes T pour une hypothétique présentation antigénique.

In vitro, l'expression d'ICAM-1 par les kératinocytes peut être induite par:

- le traitement à l'IFN $\gamma$  (*Griffiths et al, 1989*), la voie d'activation de l'ICAM-1 sous IFN $\gamma$  étant différente de celle des molécules HLA-DR (*Saitoh et al, 1994*),
- le traitement au PMA (*Simon et al, 1991*),
- l'engagement du CD40 kératinocytaire (*Grousson et al, 1998*).

### 3.3.2. HLA

Les molécules HLA de classe I sont exprimées de manière constitutionnelle par les kératinocytes, ce qui n'est pas le cas pour les molécules HLA de classe II, en particulier HLA-DR (*Niederwieser et al, 1988*).

*Albanesi et al (1998)* ont démontré l'expression, par les kératinocytes traités à l'IFN $\gamma$ , des gènes nécessaires à la production de molécules HLA de classe II associées aux peptides et exprimées à la membrane cellulaire.

La stimulation des kératinocytes in vitro par l'IFN $\gamma$  (dose optimale: 100 UI/ml pendant 48 heures), mais également in vivo (en cas d'inflammation cutanée sans spécificité étiologique particulière), augmente leur expression des molécules HLA de classe I et induit leur expression des molécules HLA de classe II HLA-DR (*Basham et al, 1984; Niederwieser et al, 1988*), mais également HLA-DP et HLA-DQ (*Morhenn et al, 1988*).

L'expression phénotypique du HLA-DR des kératinocytes traités à l' IFN $\gamma$  s'observe en immunofluorescence par un marquage périmoléculaire et membranaire (*Griffiths et al, 1989*).

L'expression ou la surexpression des molécules HLA-II et HLA-I par les kératinocytes traités à l' IFN $\gamma$  n'est pas suffisante pour induire une allostimulation lymphocytaire in vitro et ceci est compréhensible car les molécules de costimulation CD80 et CD86 ne sont pas exprimées par le kératinocyte. Par contre, l'expression ou la surexpression des molécules HLA-II et HLA-I par les kératinocytes traités à l' IFN $\gamma$  permet d'induire in vitro une allostimulation secondaire entraînant la prolifération de clones T helper CD4<sup>+</sup> et rend susceptibles les kératinocytes traités à la lyse par des clones T hétérologues cytolytiques CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> (*Niederwieser et al, 1988; De Bueger et al, 1990; Symington et al, 1990; Mutis et al, 1993*).

L'IFN $\gamma$  permet l'expression des HLA-II par activation du CIITA (*Class II Transactivator*) peut-être par l'intermédiaire de jak1/jak2 et stat91 (*Chang et al, 1994*).

La voie d'activation des HLA-II par l'IFN $\gamma$  est différente de celle empruntée pour ICAM-1 (*Saitoh et al, 1994*).

### 3.3.3. Endocytose et processing antigénique (clivage peptidique et association HLA-peptide)

La fonction première des kératinocytes épidermiques est la constitution, au travers d'une maturation cellulaire complexe, d'une couche kératinisée (couche cornée) protectrice. Les processus conduisant à cette différenciation ont été étudiés de manière extensive ce

qui n'est pas le cas de propriétés à priori irrelevantes comme l'endocytose et le processing antigénique.

Les données expérimentales concernant les capacités d'endocytose (indistinctement phagocytose et pinocytose), et plus encore de processing antigénique, apparaissent de manière sporadique dans la littérature. En dehors de la phagocytose usuelle de mélanine produite localement par les mélanocytes, les kératinocytes semblent capables d'endocytose (phagocytose et pinocytose), voire de processing antigénique, in vitro. Il n'est cependant pas certain qu'ils exercent de manière fonctionnelle cette capacité in vivo (en dehors de la captation de la mélanine), pas plus que n'est connue la relation entre ces capacités et leur degré de différenciation.

*Csato et al (1986)* décrivent la phagocytose in vitro, suivie de destruction intracellulaire, de *Candida albicans*. *Schaller et al (1996)* relatent l'endocytose de liposomes par des kératinocytes in vitro. Ces deux approches se font sur le mode morphologique (microscopie électronique) et ne précisent pas le devenir des organismes ou particules phagocytées. Il faut considérer les travaux de *Mutis et al (1993)* pour entrevoir les capacités de processing antigénique réel: des kératinocytes sont capables, in vitro, d'endocyter des antigènes de *Mycobacterium leprae*, de les cliver en peptides et de les présenter associés aux molécules HLA-II à des clones lymphocytaires T CD4<sup>+</sup>, DR restreints, spécifiques de certains peptides de *Mycobacterium leprae*. Cette publication de *Mutis et al* trouve un écho particulièrement significatif dans les travaux de *Albanesi et al (1998)* démontrant l'expression, par les kératinocytes traités à l'IFN $\gamma$ , des gènes nécessaires à la production de molécules HLA de classe II associées aux peptides et exprimées à la membrane cellulaire. Les expériences de *Mutis et al* et *Albanesi et al* témoignent d'un processing antigénique réel différent des conditions de présentation des superantigènes qui lient (*cross-link*) sans spécificité certains domaines particuliers, à la fois des molécules HLA et des récepteurs des lymphocytes T, l'ensemble conduisant à une activation majeure et polyclonale des lymphocytes T. Ce processus d'activation lymphocytaire T superantigénique est décrit pour les kératinocytes et particulièrement étudié pour ses implications potentielles dans certaines pathologies cutanées comme le psoriasis et la dermatite atopique, aggravées par les entérotoxines B de *Staphylococcus aureus* (*Skov et al, 2000; Leung et al, 1998*).

### 3.3.4. Molécules de costimulation

#### 3.3.4.1. CD80 et CD86

CD80 et CD86 furent dans un premier temps dénommées B7 (premier ligand de CD28 découvert) puis B7-1 et B7-2 lorsque l'activité B7 se révéla correspondre à deux molécules distinctes. CD80 et CD86 sont considérées comme des molécules costimulantes majeures, leur absence lors de l'engagement TCR / HLA-peptide conduisant à une anergie du lymphocyte T impliqué (*Otten et al, 1996*).

L'expression par les kératinocytes de CD80 et CD86 n'a jusqu'à présent pas été démontrée (*Nickoloff et al, 1995; Nickoloff et al, 1996*) ni obtenue, même après traitement par IFN $\gamma$  ou engagement du CD40 kératinocytaire (*Grousson et al, 1998*).

L'existence d'un troisième ligand de CD28 (hypothétique B7-3) et exprimé par les kératinocytes stimulés par le PMA fut suspectée (*Augustin et al, 1993*) mais finalement amendée par *Freeman et al (1998)* qui démontrèrent un épitope partagé par CD74 (hypothétique B7-3) et CD80 détecté par le même anticorps (BB1) que l'on croyait reconnaître exclusivement CD80.

Des kératinocytes transfectés par CD80 ou CD86, et stimulés par l'IFN $\gamma$  sont capables d'induire une allostimulation lymphocytaire primaire *in vitro* (Gaspari *et al*, 1993; van Dijk *et al*, 1996). Ceci démontre que si les kératinocytes expriment de manière synchrone les molécules HLA et les molécules de costimulation CD80/CD86, ils sont capables de se comporter en cellules présentatrices d'antigènes. L'expression *in vivo* de CD86 (mais pas de CD80) par les kératinocytes épidermiques de souris transgéniques provoque des réactions immunitaires cutanées plus importantes que chez les souris non transgéniques lors d'infection cutanée par *Candida albicans* (Gaspari *et al*, 1998).

#### 3.3.4.2. CD40

CD40 est exprimé de manière constitutionnelle par les kératinocytes de la couche basale (Denfeld *et al*, 1996), et surexprimé par stimulation à l'IFN $\gamma$ , mais les conséquences de son engagement par le CD154 diffèrent de la cellule dendritique et ne sont pas encore totalement élucidées. Parmi celles-ci, il faut noter:

- l'expression d'ICAM-1 par le kératinocyte (stimulé ou non par l'IFN $\gamma$ ), favorisant le recrutement des lymphocytes circulants (Grousson *et al*, 1998),
- contrairement à la cellule dendritique, l'absence d'expression de CD80 et CD86 par le kératinocyte (Grousson *et al*, 1998),
- l'absence d'effet sur l'expression de HLA-DR par le kératinocyte, stimulé ou non par l'IFN $\gamma$  (Grousson *et al*, 1998),
- la sécrétion de TNF- $\alpha$  par le kératinocyte,
- la sécrétion d'IL-8 par le kératinocyte,
- l'inhibition de la croissance cellulaire (arrêt en phase G2/M) et la différenciation des kératinocytes (Grousson *et al*, 2000).

#### 3.3.5. Cytokines

Les kératinocytes épidermiques constituent un véritable stock permanent d'IL-1 $\alpha$  et en conditions inflammatoires, ils secrètent de grandes quantités d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$ . Ces cytokines, en se liant à leurs récepteurs, soit sur les kératinocytes, soit sur d'autres cellules comme les cellules endothéliales activent de nombreuses voies de signalisation et notamment celle du NF- $\kappa$ B qui active les gènes impliqués dans l'inflammation (chémokines, cytokines, défensines) mais également les gènes de l'ICAM-1, du VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) et de la sélectine-E (ligand endothélial du CLA lymphocytaire; adressine cutanée).

Si la production d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  par les kératinocytes épidermiques est bien démontrée et ses effets globalement acceptés, il n'en est pas de même pour l'IL-10 et l'IL-12. Ces deux cytokines possèdent une activité contraire sur les mécanismes immunitaires comme cela a été discuté au *point 2.2.2.1.1*; en résumé, l'IL-12 enclenche la réponse Th1 alors que l'IL-10 l'inhibe.

L'IL-10 peut être sécrétée par les kératinocytes humains et murins (Enk *et al*, 1992).

Nickoloff (1994; 1995; 1996) défend l'hypothèse suivante. Les kératinocytes sont incapables de produire de l'IL-12 sous sa forme active hétérodimérique (p35-S-S-p40) bien que p35 soit exprimé de manière constitutionnelle. Dans les situations où les kératinocytes sont impliqués dans la présentation antigénique, l'absence de sécrétion d'IL-12 kératinocytaire couplée à la production d'IL-10 kératinocytaire et à la production d'IL-2, d'IL-4 mais pas d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T engagés (Goodman *et*

al, 1994), conduit à une déviation Th2 voire à une extinction des phénomènes immunitaires. Nickoloff (1996) parle de déviation immunitaire (Th1 vers Th2) là où d'autres auteurs parlent de tolérance immunitaire ou d'anergie induite par l'absence d'expression de molécules costimulatrices CD80/CD86 (Otten et al, 1996).

L'hypothèse de Nickoloff est à amender par les constatations suivantes:

- Laning et al (1997) ont démontré que ce n'est pas l'IL-10 qui, à tout le moins en partie, entraîne l'anergie des lymphocytes T, comme le soutient Nickoloff mais bien le TGFβ et la PGE2. L'adjonction d'un anti-PGE2 (Indométhacine) et d'un anticorps anti-TGFβ lève l'inhibition lymphocytaire T liée à la présence de kératinocytes.
- Yawalkar et al (1996) ont démontré que les protéines constitutives de l'IL-12, p35 et p40, sont synthétisées de manière constitutive par le kératinocyte mais qu'il est nécessaire de le stimuler par le phorbol-12, 13 dibutyrate pour qu'il sécrète la forme active hétérodimérique de l'IL-12.

### 3.3.6. Résumé des capacités de présentation antigénique des kératinocytes

*Le kératinocyte épidermique humain possède, à priori, toutes les qualités d'une cellule présentatrice d'antigènes sauf une...(Figure I.15).*

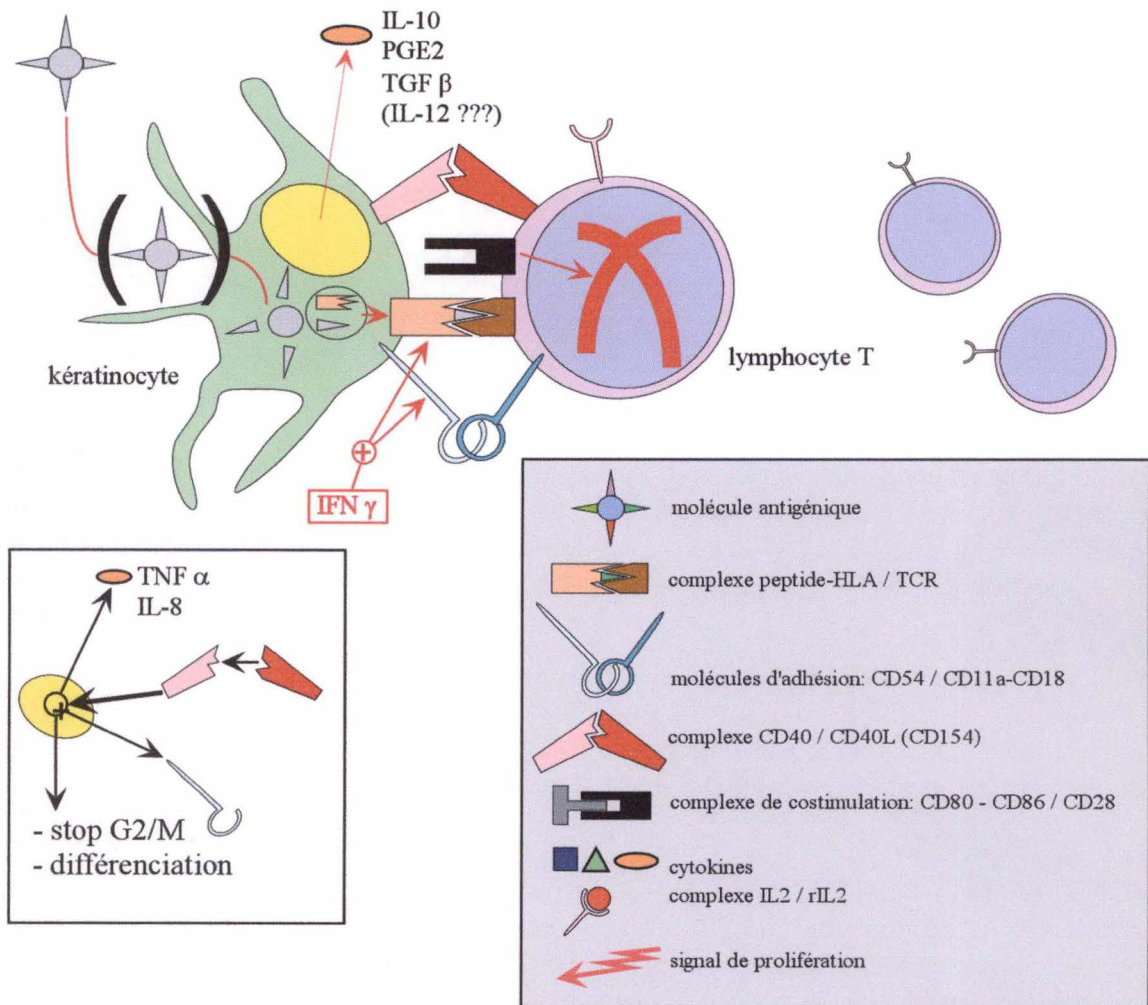


Figure I.15 : Capacité de présentation antigénique d'un kératinocyte.



- Dans des conditions de stimulation particulières, mais rencontrées dans un contexte inflammatoire *in vivo* (présence par exemple d'IFN $\gamma$ ), le kératinocyte possède pratiquement tous les attributs d'une cellule présentatrice d'antigènes, à savoir:
  - l'endocytose et le processing antigénique,
  - l'expression des molécules HLA de classe I et de classe II,
  - l'expression d'ICAM-1,
  - la sécrétion d'interleukines (y compris peut-être l'IL-12).
- Quelles que soient les conditions de son environnement, le kératinocyte n'exprime pas les molécules de costimulation CD80 et CD86.

Même si ce point n'a pas été envisagé, il faut ajouter que le kératinocyte, contrairement à la cellule dendritique (ou à la cellule de Langerhans) n'est pas doué d'un potentiel de migration vers les aires ganglionnaires T dépendantes.

Sur base de ces constatations, il pourrait être postulé que, par la seule absence de CD80/CD86, le kératinocyte n'est pas capable de présentation et de stimulation antigénique primaire de lymphocytes T naïfs, mais que ceci ne l'empêche pas de constituer un potentiel de stimulation antigénique secondaire vis-à-vis de lymphocytes T compétents (CD4<sup>+</sup>) ou de constituer la cible de la cytolyse lymphocytaire T (CD8<sup>+</sup>). Le dernier point est une évidence pathologique clinique (voir chapitre suivant 3.4.3).

Ce postulat rencontre peut-être un impératif de survie pour l'organisme: faire le moins de vagues possible à ses frontières ou en clair, confier la surveillance immunitaire épidermique à des cellules hautement spécialisées mais peu nombreuses (cellules de Langerhans) afin d'éviter que la masse épidermique kératinocytaire, soumise à des micro-agressions permanentes n'enflamme et fragilise en permanence, pour un oui ou pour un non, notre interface avec le milieu extérieur, réduisant par là même ses capacités de protection. Les souris transgéniques CD86+, comme cité plus haut, sont sujettes à des réactions immunitaires cutanées majorées. Certaines pathologies cutanées inflammatoires résultent très vraisemblablement d'une déviation de l'immunité épidermique telle qu'envisagée dans cette introduction.

### ***3.4. Pathologies cutanées à composante immunitaire***

En cas d'agression, la peau enclenche une réaction immunitaire appropriée si cela s'avère nécessaire. Il existe cependant des pathologies cutanées caractérisées par le déclenchement intempestif de réactions immunitaires inappropriées (psoriasis, dermatite allergique de contact, dermatite atopique, ...) ou apparaissant comme un effet secondaire iatrogène (GVHD cutanée). Parfois, l'immunité cutanée est prise en défaut (infections cutanéomuqueuses à papillomavirus HPV). Quelques-uns de ces points sont rapidement abordés ci-dessous.

#### **3.4.1. Psoriasis**

Le psoriasis touche plus de 2% de la population mondiale. Il se manifeste par la présence de plaques cutanées rougeâtres caractérisées par un infiltrat inflammatoire et par une hyperplasie épidermique conduisant à l'hyperkératose (enduit blanchâtre). La sensibilité de l'affection au traitement par la Cyclosporine ou à la destruction des cellules T activées par un complexe [toxine diphtérique - ligand du récepteur à l'IL-2] suggère le rôle joué par l'immunité spécifique dans le psoriasis. Les effecteurs impliqués sont des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>/CLA<sup>+</sup> produisant des cytokines Th1. L'exacerbation des lésions psoriasitiques suite à un traumatisme cutané local (phénomène de Koebner) ou à

une infection locale (superantigènes de staphylococcus aureus) ainsi que la prédominance des lésions dans des régions perpétuellement soumises à des microtraumatismes (coudes, genoux) témoigne d'un recrutement instantané des lymphocytes T  $CD8^+/CLA^+$  suite à une libération même minime d'IL1 $\alpha$ . L'effet bénéfique des UVA est un peu paradoxal (synthèse du p40 de l'IL-12 ...) mais celui bénéfique des UVB est peut-être à relier à la synthèse kératinocytaire accrue d'IL-10 connue pour ses effets anti-inflammatoires (Kondo et al, 1998).

### 3.4.2. Dermatite allergique de contact

Communément dénommée eczéma, la dermatite allergique de contact est de loin plus fréquente que le psoriasis. Cette affection est une hypersensibilité retardée médiée par les lymphocytes T (DTH). La raison pour laquelle certaines personnes la développe et d'autres pas n'est pas encore résolue. Les antigènes sensibilisants (potentiellement très nombreux et variables d'un individu à l'autre) sont généralement des molécules instables qui se complexent, après pénétration épidermique, à des protéines endogènes, l'ensemble constituant un néo-antigène responsable, au premier contact, de la génération de lymphocytes T mémoire circulants  $CLA^+$ . Ces derniers sont appelés sur le site d'un contact épidermique subséquent avec la molécule incriminée entraînant le développement d'une réponse immunitaire Th1.

### 3.4.3. GVHD cutanée

Dans le cadre des greffes hétérologues, il faut distinguer deux situations différentes.

- Les greffes organiques (foie, rein, cœur, ...). Dans ce contexte, le système immunitaire du receveur agresse et tente de rejeter l'organe greffé.
- Les greffes de moelle hématopoïétique hétérologue en remplacement de la moelle hématopoïétique du receveur après sa destruction thérapeutique ou pathologique. Dans ce cas, le receveur hérite d'un système immunitaire hétérologue qui considère le patient comme étranger et va tenter de le rejeter (avec atteinte préférentielle de la peau, du tractus digestif, du foie et des poumons). Il se développe alors ce que l'on appelle une GVHD (Graft Versus Host Disease) ou réaction du greffon (la moelle hétérologue) contre l'hôte (le receveur). (Figure I.16)

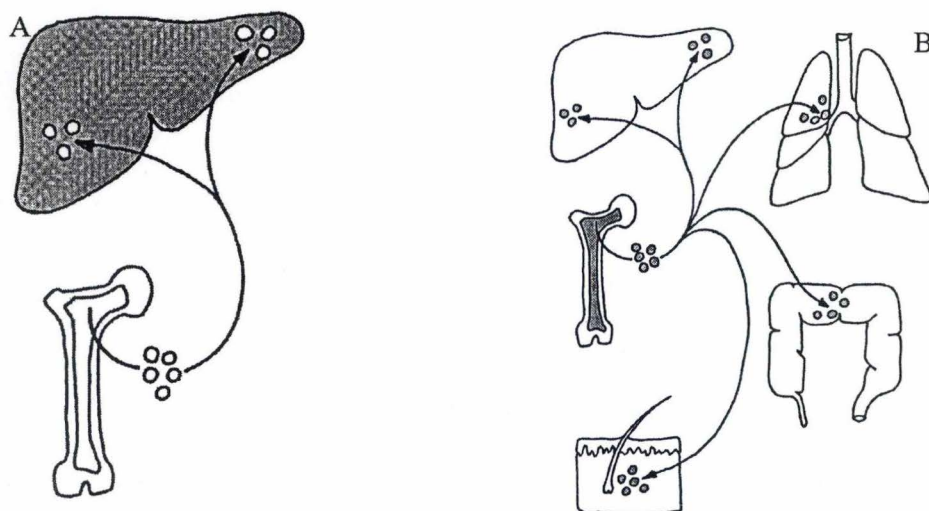


Figure I. 16 : Rejet de greffe (A) versus GVHD (B). Les éléments colorés en gris appartiennent au donneur alors que les éléments colorés en blanc appartiennent au receveur.

Dans la GVHD cutanée, la cible primaire est clairement le kératinocyte autologue et l'effecteur le lymphocyte T cytolytique CLA<sup>+</sup> hétérologue (*Gilliam et al, 1996; Jerome et al, 1998; Aractingi et al, 1998*). Comme il est tenté de ne greffer que des moelles hétérologues compatibles (HLA semblables), les antigènes reconnus appartiennent le plus souvent au complexe mineur d'histocompatibilité. Ceci confirme la capacité de présentation antigénique secondaire des kératinocytes. De nombreuses tactiques thérapeutiques complexes, et sortant du cadre de cette introduction, sont tentées pour éviter le développement de la GVHD. Epinglons seulement la déplétion pré-greffe des lymphocytes T de la moelle à greffer.

#### **3.4.4. Utilisation d'immunomodulateurs à visées thérapeutiques cutanées**

Parmi les immunomodulateurs à visées thérapeutiques cutanées, il faut distinguer:

- les immunosuppresseurs dont le plus ancien et le mieux connu est la cortisone (et ses dérivés) mais également ceux utilisés dans des approches plus sélectives et plus récentes comme la Cyclosporine ou les complexes de type [toxine diphtérique - ligand du récepteur à l'IL-2],
- les immunostimulants comme l'Imiquimod dans le traitement d'affections comme celles résultant de l'infection des kératinocytes par le virus HPV contre lequel ne s'observe pas de réaction immunitaire significative peut-être suite à un problème de mobilisation des cellules de Langherans (*Hubert et al, 1999*).

L'apparition de combinaisons immunosuppressives et antibiotiques dans le traitement de déviations immunitaires pathologiques cutanées ne doit pas surprendre quand on comprend le rôle de potentialisation joué par certains superantigènes bactériens.

### **3.5. Notes sur la culture primaire de kératinocytes in vitro**

#### **3.5.1. La culture selon Rheinwald et Green (1975)**

Cette méthode a été la première à permettre l'amplification des kératinocytes. Elle repose sur l'utilisation d'un lit nourricier de fibroblastes murins 3T3 irradiés. Les 3T3 sécrètent des facteurs de croissance ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire qui favorisent l'attachement et la prolifération des kératinocytes.

Les cellules épidermiques sont cultivées sur une monocouche de 3T3 irradiés et prolifèrent en formant des colonies qui s'étendent, repoussant les 3T3 en périphérie. Les fibroblastes murins 3T3 sont plus enclins à induire une croissance des kératinocytes que des fibroblastes humains irradiés. En effet, les kératinocytes cultivés sur un lit nourricier de fibroblastes humains forment des colonies dont la croissance est plus lente et dont la stratification est moindre que pour les fibroblastes murins.

#### **3.5.2. La culture selon Boyce et Ham (1983)**

La culture selon *Rheinwald et Green* nécessite l'apport de sérum de veau fœtal et d'un lit nourricier de 3T3. Or, ceux-ci contiennent et produisent des facteurs qui ne sont pas tous décrits, voire non identifiés. Il est donc difficile d'étudier les facteurs de croissance influençant la culture des kératinocytes.

*Boyce et Ham* ont donc développé un milieu de culture sans sérum permettant la croissance des kératinocytes en absence d'un lit nourricier de 3T3 : le milieu MCDB 153. Il est suppléé d'EGF, d'insuline, d'hydrocortisone, d'éthanolamine et de

phosphoéthanolamine. Une faible quantité d'extrait pituitaire bovin est ajoutée au milieu pour initier les cultures primaires.

*Boyce et Ham* ont démontré qu'une faible concentration en calcium dans leur milieu de culture (de 0,03 à 0,3 mM), induit une augmentation du taux de croissance des kératinocytes. Néanmoins, une concentration de 1,0 mM en calcium dans le milieu induit une diminution de la croissance cellulaire et l'initiation de la différenciation terminale.

Le rôle des ions calcium dans le milieu reste cependant controversé. Il est reconnu qu'une augmentation de la concentration en calcium favorise la stratification des kératinocytes, mais leur action sur la prolifération et l'induction de la différenciation terminale l'est moins. En effet, alors que de nombreux auteurs ont constaté qu'une augmentation de calcium initie la différenciation terminale, *Poumay et Pittelkow (1995)* ont montré qu'une augmentation en calcium (de 0,1 à 1,5 mM) ne diminue pas le potentiel clonogénique des kératinocytes.

Il est probable que les conditions de culture et la composition exacte du milieu de culture influencent les effets du calcium sur la prolifération et la différenciation des kératinocytes.

### **3.5.3. Divers modèles de reconstruction d'un épiderme in vitro**

#### **3.5.3.1. Matrices cellulaires**

La matrice cellulaire la plus connue est celle développée par *Rheinwald et Green* en 1975, constituée d'un lit nourricier de 3T3 sur lequel sont cultivés les kératinocytes.

Ce type de culture montre une différenciation incomplète des kératinocytes caractérisée par une absence des couches granuleuses et cornées (*Rheinwald et al., 1975*).

La culture des kératinocytes en immersion dans le milieu de culture empêche l'apparition des dernières phases de différenciation comme la formation des couches granuleuses et cornées. Cependant, les kératinocytes cultivés en interface air-liquide montrent une différenciation complète représentée par la production de granules de kératohyaline et d'une couche cornée faite de cellules anucléées (*Pruniéras et al., 1983*).

#### **3.5.3.2. Culture sur des dermes**

Les dermes utilisés comme substrat sont soit directement prélevés chez l'animal ou chez l'homme, soit reconstitués de façon artificielle.

Les dermes artificiels, appelés dermes équivalents, résultent de l'association spatiale de fibroblastes et de fibres de collagène en présence d'un milieu nutritif. En bref, des fibroblastes sont ajoutés à une solution de collagène, la préparation se gélifiant et épousant les formes du récipient dans lequel elle a été déposée. Il s'ensuit une contraction du gel, résultant de l'organisation des fibres de collagène initialement réparties au hasard. Les fibroblastes collectent et rassemblent les fibres de collagène en faisceaux parallèles par émission et rétraction de pseudopodes.

Une biopsie cutanée est déposée au centre du gel ainsi formé, la biopsie servant de source de cellules épidermiques. Il s'en suit une croissance circulaire des cellules épidermiques autour de la biopsie implantée et une différenciation similaire à celle observée *in vivo* (*Coulomb et al., 1986*).

### 3.5.3.3. Utilisation de substrats inertes

*Rosdy et al.*(1990) ont comparé la reconstruction d'un épiderme obtenu in vitro par culture de kératinocytes sur des substrats inertes, tels qu'une membrane de polycarbonate et un filtre d'acétate de cellulose, et sur derme équivalent. La culture est menée pendant 14 jours en milieu riche en calcium (1,15 mM) et en interface air-liquide. Aucune différence dans le nombre de couches, dans l'expression qualitative et quantitative des marqueurs de différenciation n'est observée entre les kératinocytes cultivés sur substrats inertes ou derme équivalent. Un recouvrement des substrats inertes par de la fibronectine ou par un gel de collagène ne stimule pas l'attachement, la croissance et la différenciation des kératinocytes. De plus, la présence de sérum de veau fœtal n'influence ni la croissance, ni la différenciation des kératinocytes (*Rosdy et al.*, 1990).

*Boyera et al.* (1993) ont étudié les interactions entre kératinocytes et lymphocytes, médiées par des facteurs solubles. Dans leur modèle, les kératinocytes sont cultivés sur une membrane de polycarbonate tandis que les lymphocytes reposent, à distance, sur le fond d'un puits de culture accueillant l'insert (Figure I.17).

*Katz et al.* (1994) ont étudié l'activité sécrétoire des kératinocytes cultivés sur une membrane de polycarbonate en milieu de Green et en présence d'un lit nourricier de 3T3 dans le fond du puits accueillant l'insert (Figure I.17).

*Coquette et al.* (1999) ont étudié la synthèse de cytokines par un épiderme reconstitué in vitro après exposition à des irritants cutanés et des agents chimiques sensibilisants. Il est à noter qu'ils ont utilisé des épidermes reconstitués d'origine commerciale (SkinEthic).

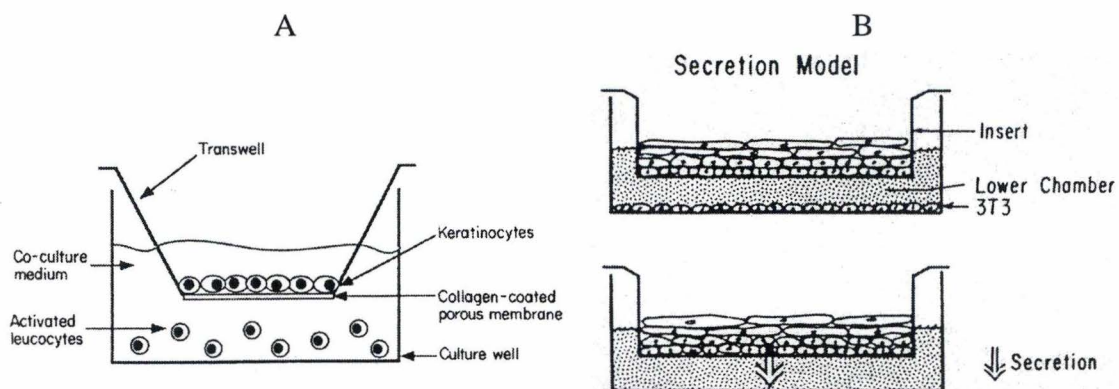


Figure I. 17 : Modèles de culture des kératinocytes sur membrane de polycarbonate selon Boyera (A) et Katz (B).

### 3.6. Objectifs du travail

Ce travail basé sur les relations lympho-épithéliales s'adresse à l'immunité cutanée et plus particulièrement à son implication épidermique au travers de deux objectifs: d'une part l'établissement d'un **modèle de co-culture in vitro** associant les kératinocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes et d'autre part l'étude des capacités de **présentation allogénique primaire in vitro de kératinocytes** traités par l'IFN $\gamma$  ou le PMA dans un milieu suppléé d'IL-2.

### 3.6.1. Modèle immunitaire épidermique in vitro (co-culture)

Le but est de reconstituer, in vitro, un épiderme immunocompétent, stratifié et kératinisé, chargé ou non de cellules dendritiques (cellules de Langerhans). Cet épiderme reconstitué doit être accessible tant par sa face basale (mouvements migratoires des cellules dendritiques et des lymphocytes) que par sa face superficielle (contact avec le monde extérieur). L'environnement de culture doit s'avérer le moins immunogène possible afin de ne pas interférer avec les études immunologiques potentielles adressées au modèle (GVHD, dermatite allergique de contact).(Figure I.18).

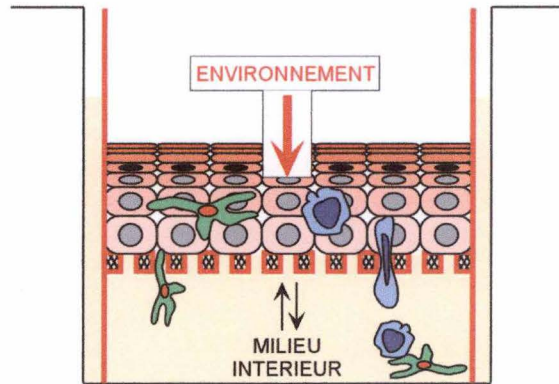


Figure I.18 : Caractéristiques souhaitées du modèle de co-culture.

### 3.6.2. Présentation kératinocytaire allogénique in vitro

Comme longuement discuté ci-dessus, le kératinocyte n'apparaît pas capable de présenter des antigènes à des lymphocytes T naïfs (stimulation antigénique primaire), en tout cas in vitro. Ceci est à priori la conséquence d'une incapacité d'exprimer les molécules costimulatrices CD80/CD86 qui engagent CD28. L'hypothèse à tester est la suivante: n'est-il pas possible de contourner l'absence d'engagement du CD28 par l'apport d'IL-2 recombinant exogène afin de permettre le développement d'une allostimulation primaire in vitro? (Figure I.19). Cette approche nécessite, avant la MLKC (Mixed Lymphocyte Keratinocyte Culture), l'expression phénotypique de molécules comme HLA-DR et ICAM-1 par stimulation à l'IFN- $\gamma$  ou au PMA.

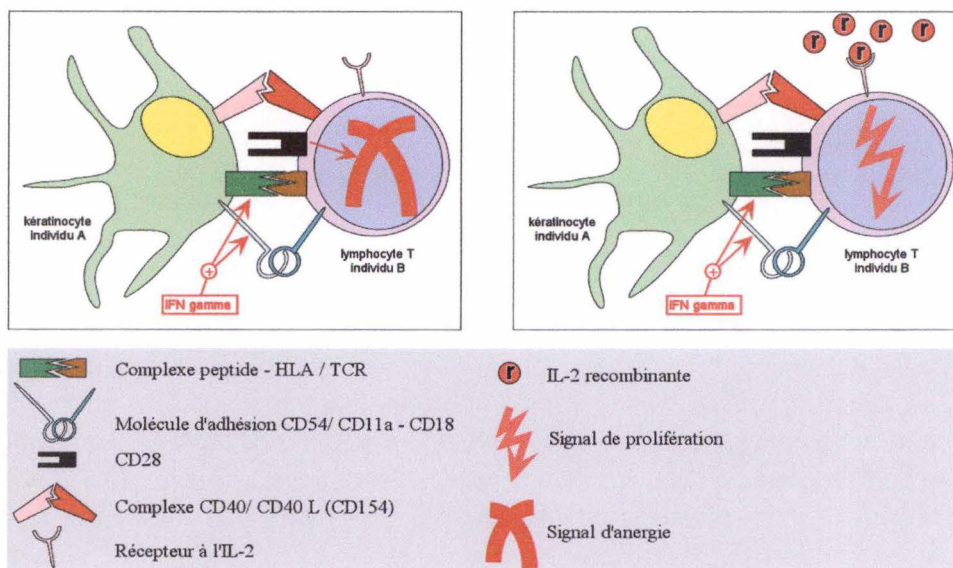


Figure I.19 : Stimulation d'un lymphocyte hétérologue par apport d'IL-2 recombinante.

# **MATERIEL ET METHODES**

# 1. Culture cellulaire

## 1.1. Culture des kératinocytes humains

### 1.1.1. Matériel

#### Milieu complet Kératinocyte Growth Medium KGM-2

Kératinocyte Basal medium KBM-2 suppléé de :

- EGF recombinant à 5 ng/ml
- Extrait de glande pituitaire bovine (BPE) à 50 µg/ml
- Insuline à 5 µg/ml
- Transferrine recombinante à 5 µg/ml
- Hydrocortisone  $5 \cdot 10^{-7}$  M
- Pénicilline G à 50 U/ml
- Streptomycine à 50 µg/ml

#### Trypsine T 25

- Solution A
- Trypsine à 0,025 %
- Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA) 0,01M

#### Trypsine T 17

- Solution A
- Trypsine à 0,17 %

#### Solution A

- Glucose 10 mM
  - KCl 3 mM
  - NaCl 130 mM
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 mM
  - Rouge Phénol 0,0033 mM
  - HEPES 30 mM
  - pH 7,4
- stérilisée par filtration sur Stérivex GV 0,22 µm

#### Solution dFCS 2%

- Solution A
- Sérum de veau fœtal dialysé à 2%

### 1.1.2. Méthode

#### 1.1.2.1. Culture primaire et secondaire de kératinocytes à partir de prélèvements cutanés

Les prélèvements cutanés proviennent d'abdominoplasties et sont aimablement fournis par le Dr B. Bienfait de la clinique Saint-Luc à Bouge. La couche superficielle de la peau a été prélevée à l'aide d'un dermatome et stockée dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) à 4 °C.

Toutes les manipulations ultérieures se font stérilement sous hotte à flux laminaire et les récipients sont maintenus sur glace. Les morceaux de peau sont déposés, épiderme vers le haut, dans une boîte de Pétri contenant de la solution A et sont découpés en petits carrés d'1 cm de côté. Ils sont ensuite transférés dans une boîte de Pétri pour flotter sur de la trypsine T17 et incubés pendant une nuit à 4°C.

Le lendemain, le derme est détaché de l'épiderme par simple traction mécanique à l'aide de pinces. Les cellules épidermiques sont dissociées par plusieurs passages à travers une pipette et filtrées sur un treillis en nylon (Cell strainer 70 µm Nylon, Falcon). Ce filtre possède des pores de 70 µm de diamètre permettant la rétention d'agrégats cellulaires et de cornéocytes. Le filtrat est ensuite centrifugé à  $10^3$  RPM pendant 10 minutes à 4°C (Heraeus Minifuge 2). Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans du milieu complet KGM-2.



Les cellules sont ensemencées en culture primaire dans des boîtes de culture de 175 cm<sup>2</sup> (Falcon, 3028) dans du milieu complet KGM-2 contenant 0,1 % de FCS sans calcium pour favoriser l'adhésion cellulaire. Ce milieu permet aux kératinocytes de proliférer grâce aux hormones et facteurs de croissance qu'il contient. Les cellules sont incubées dans une étuve humide à 37 °C sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé tous les deux jours.

Quand les kératinocytes ont atteint la sous-confluence, c'est à dire quant ils occupent environ 80% de la surface de la boîte, ils sont détachés de leur support par action de trypsine T25 . Une fois les cellules mises en suspension, l'action de l'enzyme est inhibée par ajout de solution A contenant 2 % de FCS dialysé. Le FCS est dialysé contre un tampon PBS ne contenant pas de calcium, permettant au FCS d'être exempt de calcium. Après centrifugation et comptage des cellules, celles-ci sont réensemencées à une densité de 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> dans des boîtes 175 cm<sup>2</sup> contenant 25 ml de KGM-2.

Lorsque cette culture secondaire atteint 80 % de confluence, les cellules sont détachées, par action de la trypsine T25 comme décrit ci-dessus, centrifugées, comptées et remises en suspension dans le milieu de congélation à raison de 10<sup>6</sup> cellules/ml. Les cellules sont réparties dans des cryotubes (Nunc) et congelées une nuit à -80 °C, puis transférées dans de l'azote liquide à -192°C.

#### ***1.1.2.2. Cultures tertiaires de kératinocytes***

Les cellules sont décongelées rapidement, lavées avec du KGM-2 et centrifugées à 1000 RPM pendant 10 minutes à 4°C. Elles sont ensuite réensemencées à une densité de 6.10<sup>3</sup> cellules/cm<sup>2</sup> dans du KGM-2.

### ***1.2. Culture de cellules mononucléées du sang périphérique***

#### **1.2.1. Matériel**

##### RPMI complet

- RPMI 1640
- FCS 10%
- Pénicilline à 50 U/ml
- Streptomycine à 50 µg/ml

#### **1.2.2. Méthode**

Le sang est prélevé dans une seringue contenant 100 µl de Liquémine (Roche). Il est dilué deux fois par ajout de RPMI complet et ensuite déposé délicatement sur un gradient de sucrose d'une densité de 1,077 (Histopaque 1,077, Sigma). Le tout est centrifugé à 400 g pendant 30 min à 20°C. Au terme de la centrifugation, la couche lympho-monocytaire (anneau) est récupérée à l'aide d'une pipette pasteur (figure M.1).

Les cellules sont lavées avec du RPMI complet et centrifugées à 300 g pendant 10 min à 20 °C. Le culot est remis en suspension dans du RPMI complet et les cellules sont comptées. Elles sont de nouveau lavées et centrifugées à 300 g pendant 10 min à 20°C.

Les cellules sont conservées congelées. Pour cela, le culot est remis en suspension (2.10<sup>6</sup> cellules par ml) dans un volume de FCS contenant 10% de DMSO. Les cellules sont congelées une nuit à -80°C, puis transférées dans de l'azote liquide.

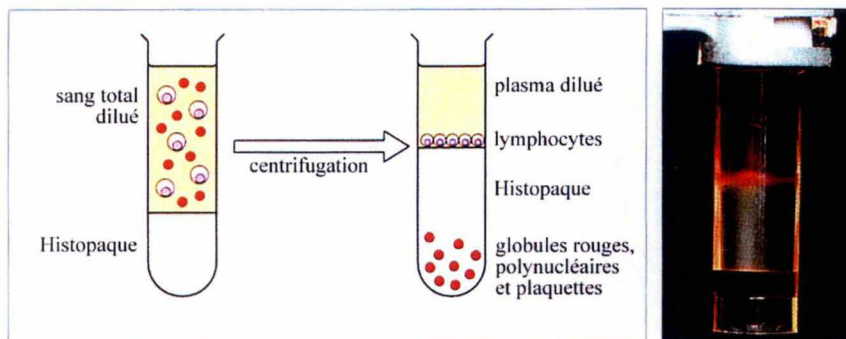


Figure M.1: Séparation des PBMC sur gradient de sucrose (Histopaque).

### 1.3. Culture des cellules dendritiques

#### 1.3.1. Matériel

##### Milieu de culture DC.

- RPMI 1640
- FCS 10%
- Mercaptoéthanol  $5.10^{-5}$  M
- Acides aminés non essentiels 1%
- Glutamine 2 mM
- Pénicilline à 50 U/ml
- Streptomycine à 50  $\mu$ g/ml

##### Anticorps utilisés pour l'analyse au FACS

- CD1a : Ac monoclonal de souris anti-humain couplé à la rhodamine (Immunotech)
- CD14 : Ac monoclonal de souris anti-humain couplé à la FITC (Becton Dickinson)

#### 1.3.2. Méthode

L'étape préliminaire de récupération de la couche lympho-monocytaire est la même que pour les cellules mononucléées du sang périphérique. Une fois l'anneau récupéré, les cellules sont lavées avec du RPMI 1640 et centrifugées à 300 g pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture DC et comptées. Entre 10 et  $15.10^6$  cellules sont déposées dans les puits d'une plaque à 6 puits. Les cellules sont incubées pendant 2h à 37°C afin que les monocytes puissent adhérer au substrat. Après l'incubation, les cellules non adhérentes sont récupérées et comptées. Elles sont alors congelées dans du FCS contenant 10% de DMSO.

Les cellules adhérentes sont incubées en présence d'interleukine-4 (200U/ml, Biosource Europe, PHC0044) et de GM-CSF (800 U/ml, Novartis) afin de les différencier en cellules dendritiques. Deux jours après, de l'IL-4 et du GM-CSF sont de nouveau ajoutés au milieu de culture. Les macrophages adhèrent au substrat tandis que les cellules dendritiques passent en suspension. Au bout de 6 jours, les cellules dendritiques sont récupérées par aspiration du surnageant et conservées dans l'azote liquide en les congelant dans du FCS contenant 10% de DMSO.

#### 1.3.3. Phénotypage des cellules

Les cellules dendritiques sont ensuite analysées en cytométrie de flux, par un double marquage CD1a/CD14. Les cellules récupérées après 6 jours de culture sont marquées avec des anticorps couplés à une molécule fluorescente (CD14-FITC, CD1a-Rhodamine,) détectant les marqueurs de différenciation. Ces cellules sont introduites dans l'appareil, sont incluses dans des gouttes de liquide et passent à la file indienne devant un faisceau laser. Par un jeu de miroirs et de détecteurs, différents paramètres

peuvent être mesurés sur chaque cellule comme la taille et la granulosité de la cellule. En outre, l'intensité de la fluorescence, rouge et verte, est mesurée, permettant d'analyser le double marquage (Figure M.2).

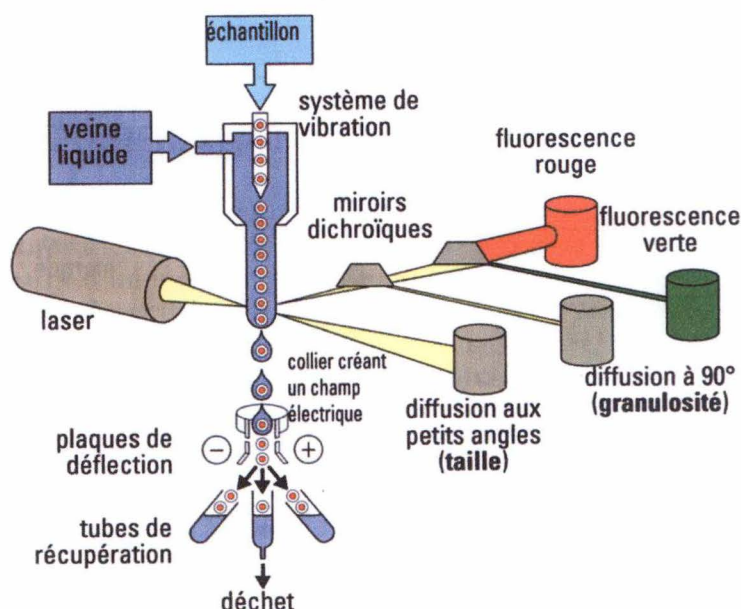


Figure M.2 : Principe de la cytométrie en flux ou FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

### 1.4. Co-culture des kératinocytes et cellules mononuclées du sang périphérique sur membrane poreuse de polycarbonate

#### 1.4.1. Matériel

##### Milieu de Rheinwald et Green

- DMEM (3 volumes)
- HAM'S F 12 (1 volume)
- FCS 10 %
- Adénine 0,18 mM
- Insuline 5 µg/ml
- Hydrocortisone 0,4 µg/ml
- Toxine cholérique 0,1 nM
- Transferrine 5 µg/ml
- Triiodotyronine 2 nM
- EGF recombinant 5 ng/ml
- Pénicilline 50 U/ml
- Streptomycine 50 µg/ml

##### DMEM complet

- Eagle modifié par Dulbecco (DMEM)
- FCS à 10%
- Pénicilline à 50 U/ml
- Streptomycine à 50 µg/ml

#### 1.4.2. Méthode

##### 1.4.2.1. Culture des cellules 3T3

Les fibroblastes 3T3 sont cultivés pour être utilisés en tant que lit nourricier pour les kératinocytes.

Les 3T3 sont ensemencés à une densité de  $10^6$  cellules par boîte de  $75 \text{ cm}^2$  contenant 10 ml de DMEM complet, le milieu étant changé tous les deux ou trois jours.

Lorsque les cellules 3T3 arrivent à confluence, elles sont rincées trois fois avec du DMEM sans sérum et détachées de leur substrat par action de la trypsine T25. L'action de celle-ci est ensuite inhibée par addition de DMEM complet, les cellules sont alors centrifugées, comptées et réensemencées comme décrit ci-dessus.

Afin de constituer un lit nourricier pour les kératinocytes, les cellules 3T3 arrivées à confluence sont incubées deux heures avec 0,4mg/ml de mitomycine C (Kiowa) avant d'être détachées de leur substrat par action de la trypsine T25 comme décrit ci-dessus, puis ensemencées à une densité de  $10^6$  cellules par puits d'une plaque de six puits.

#### 1.4.2.2. Culture des kératinocytes

##### 1.4.2.2.1. Inserts

Les inserts (Nunc 10mm Tissue Culture Inserts, Cat. N° 137370, Whatman Anocell P10 Cat. N° 68403018) se composent d'une cupule conique tronquée de plastique à l'extrémité de laquelle est tendue une membrane de polycarbonate. Cette membrane est criblée de pores d'un diamètre de  $3 \mu\text{m}$  et possède une superficie de  $0,5 \text{ cm}^2$ .

Dans notre modèle, les kératinocytes sont cultivés dans le fond de la cupule, sur la membrane de polycarbonate à laquelle ils adhèrent. L'insert est déposé au fond d'un puits d'une plaque à 6 puits (Falcon, 3046) contenant du milieu. Une fois que les kératinocytes se sont accrochés à la membrane de polycarbonate, l'insert peut être retourné et accueillir des cellules non adhérentes (PBMC ou cellules dendritiques) de l'autre côté de cette membrane. Nous appelons face adhérente (FA), le côté de la membrane accueillant les kératinocytes, tandis que le terme de face non adhérente (FNA) est utilisé pour désigner le côté de la membrane recevant les cellules non adhérentes (Figure M.3).

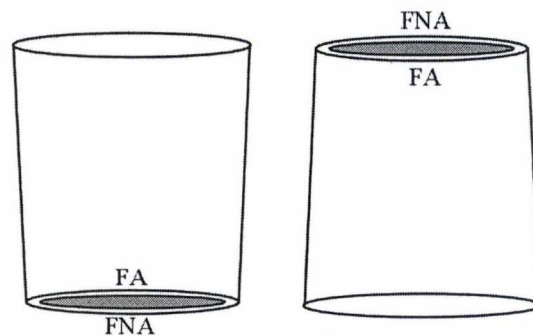


Figure M.3: Schéma de l'insert avec repère des faces adhérentes (FA) ou non adhérentes (FNA).

Dans ces conditions, la majorité des cellules non adhérentes ne restent pas sur la membrane et glissent le long de l'insert. Nous avons donc élaboré un système, sur base des inserts commerciaux, contenant deux chambres séparées par la membrane de polycarbonate, de façon à obliger les cellules non adhérentes à rester sur la membrane. En outre, le système doit conférer une stabilité à l'insert, de sorte que celui-ci ne puisse pas se retourner dans le puits ni flotter lors de la culture en immersion.

#### 1.4.2.2.2. Cylindres

Les matériaux utilisés sont reçus sous forme de cylindres pleins.

L'usinage commence par la découpe des barres en cylindres de 2 cm de haut, suivi d'un alésage. Ce perçage est tel que le diamètre de l'alésage est réduit à l'une des extrémités de manière à obtenir un rebord sur lequel l'insert est posé. Les bords supérieur et inférieur de ces tubes sont ensuite découpés de manière à obtenir quatre encoches crénelées. Le cylindre est alors prêt.

Le cylindre, constitué dans un premier temps d'inox 18/10, s'est oxydé dans le milieu de culture. L'inox 18/10 est constitué de 18 parts de nickel et de 10 parts de chrome, le chrome rendant le matériau inoxydable tandis que le nickel lui confère sa rigidité.

D'autres matériaux ont été testés comme le teflon et le PEEK (Poly Ester Ether Kéto). Ces matériaux sont inertes dans le milieu de culture, indéformables lors de la stérilisation et sont suffisamment lourds pour stabiliser l'insert. La stérilisation des cylindres s'effectue à 180 °C pendant 2 heures ; la température de fusion du PEEK est de 323 °C tandis que celle du Teflon est de 313 °C. Les résultats de culture étant équivalents pour les deux matériaux, nous avons choisi le teflon pour une raison de moindre coût.

Le cylindre est crénelé à ses extrémités afin de permettre le passage du milieu à l'intérieur des deux chambres lors de la culture en immersion (figure M.4). L'insert portant la membrane poreuse de polycarbonate est positionné dans ce cylindre formant ainsi deux chambres séparées par la membrane de polycarbonate. L'insert étant légèrement évasé en son sommet, un joint d'agar est coulé entre celui-ci et le cylindre qui l'accueille afin d'assurer une étanchéité à l'échelon cellulaire entre les deux chambres, en dehors de la membrane de polycarbonate. Le système ainsi formé est déposé dans une plaque à 6 puits (Falcon, 3046) contenant dans le fond du puits un lit nourricier de cellules 3T3, de sorte que les kératinocytes ne soient pas en contact direct avec les cellules 3T3.

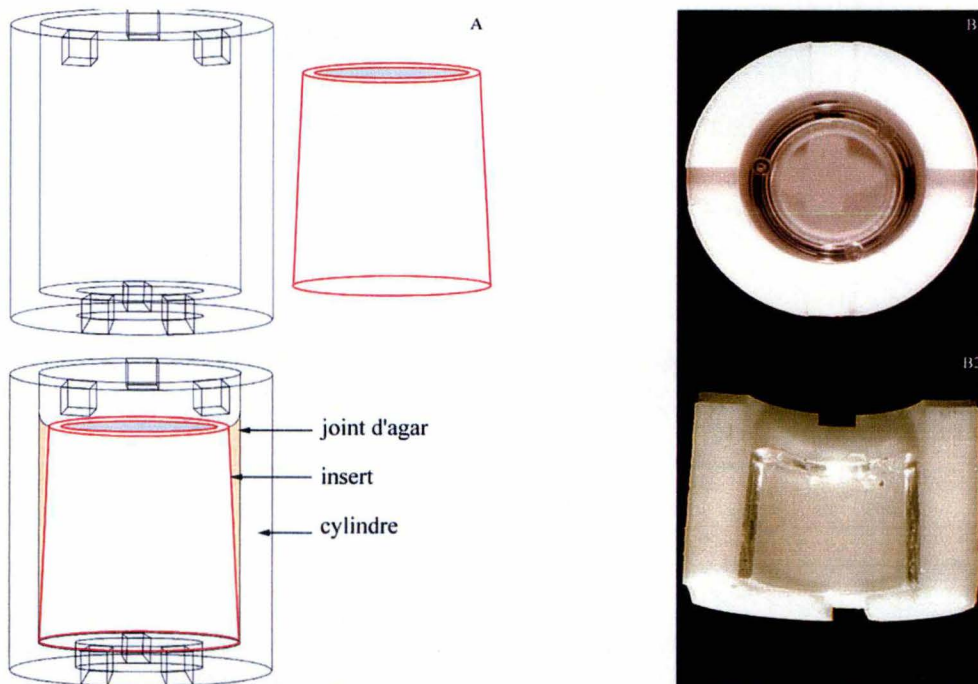


Figure M.4: Illustration du système de co-culture. A : vue schématique, B : photographie en vue du dessus (B1) et en coupe longitudinale (B2).

Les kératinocytes sont ensemencés sur la FA de la membrane de polycarbonate à une densité de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules par insert. Ils sont cultivés en milieu KGM<sub>2</sub> contenant du CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM pendant une semaine, le milieu étant changé tous les deux jours.

Au terme de ces 7 jours, l'insert est vidé de son milieu et les kératinocytes sont cultivés en interface air-liquide. Les kératinocytes sont toujours en contact avec le milieu du côté de la couche basale, de sorte que les kératinocytes reçoivent les facteurs dont ils ont besoin pour proliférer. L'interface air-liquide permet la kératinisation des couches supérieures (Figure M.5).

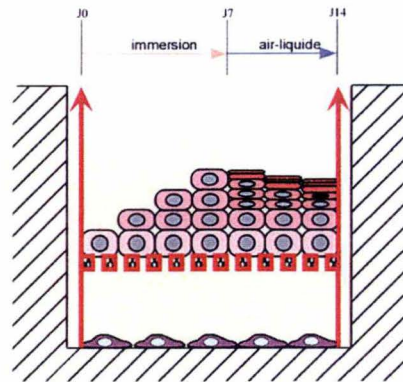


Figure M.5: Schéma de la kératinisation des kératinocytes cultivés sur membrane de polycarbonate en interface air-liquide.

Au bout de 14 jours totaux de culture, l'insert est retourné et se trouve en immersion complète dans le milieu. La face non adhérente de la membrane de polycarbonate peut alors accueillir des cellules dendritiques ( $2,2 \cdot 10^5$  cellules/insert) ou des PBMC ( $7,5 \cdot 10^5$  cellules/insert) préalablement stimulés à la PHA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) ou à l'IL-2 ( $30 \text{ U/ml}$ ) pendant 48 heures (Figure M.6).

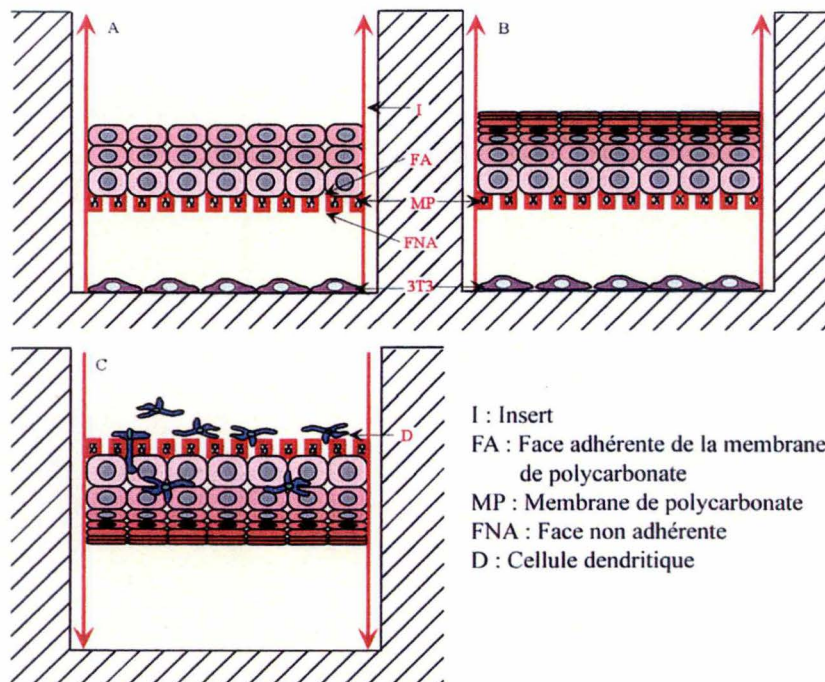


Figure M.6: Schéma du système de co-culture des kératinocytes et cellules dendritiques. A : Culture des kératinocytes pendant 7 jours en immersion, B : Culture des kératinocytes pendant 7 jours en interface air-liquide, C : Retournement de l'insert et dépôt de cellules dendritiques sur la FNA de la membrane de polycarbonate.

Il faut noter que la même procédure peut être utilisée pour cultiver les kératinocytes sur la membrane poreuse de polycarbonate en utilisant le milieu de Rheinwald et Green.

## 2. Extraction d'ARN polyA

### 2.1. Matériel

#### Tampon de lyse

- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,1 M
- EDTA 0,002 M
- SDS 10%
- Traité DEPC 0,1%

#### Tampon à haute concentration en sels

- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,5 M
- EDTA 0,001 M
- SDS 0,2 %
- Traité DEPC 0,1%

#### Tampon à faible concentration en sels

- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,1 M
- EDTA 0,001M
- SDS 0,2 %
- Traité DEPC 0,1%

#### Tampon sans sels

- Tris-HCl 0,005 M
- EDTA 0,001 M
- SDS 0,2 %
- Traité DEPC 0,1%

#### Tampon TE

- Tris Base 9 mM
- EDTA 2H<sub>2</sub>O 0,9 mM
- pH 8

#### Eau Traitée DEPC

- 500 ml d'eau
- 0,1 % DEPC

Les solutions traitées au DEPC (diéthylpyrocarbonate) sont ensuite autoclavées.

### 2.2. Méthode

La première étape de cette technique consiste à préparer les oligo-dT-cellulose. Ce sont des longues chaînes de 30 bases thymidine (poly-T) qui vont servir à accrocher la queue poly-A de l'ARNm. Ces chaînes sont liées de façon covalente, par leur extrémité 5', aux fibres de cellulose. L'ARNm est extrait de cellules en culture contenues dans des boîtes de 175 cm<sup>2</sup>.

Les oligo-dT-cellulose se présentent sous forme de poudre, stockée à -20°C. La quantité utilisée pour une boîte de 175 cm<sup>2</sup> est de 0,05 g. Les oligo-dT-cellulose sont lavés deux fois dans du NaOH 0,1 M, puis rincés dans de l'eau distillée. Ils sont alors incubés pendant 30 minutes dans de l'eau distillée contenant 0,1 % de DEPC. Ils sont de nouveau lavés trois fois avec de l'eau traitée au DEPC, puis une fois avec le tampon à haute concentration en sels. Ils sont alors stockés dans 2 ml de tampon pour 0,05g d'oligo-dT-cellulose. La concentration riche en sels permet l'appariement des bases thymidine et adénosine par formation de ponts hydrogène.

L'extraction débute par la lyse des cellules contenues dans les boîtes de culture. Pour ce faire, le milieu est rapidement ôté et remplacé par du tampon de lyse contenant 25 µg/ml de protéinase K (protéase résistante au SDS servant à inactiver les nucléases endogènes telles que les ARNases ou ADNases). Lorsque le lysat devient très visqueux, il est récupéré dans une seringue et passé 8 fois à travers une aiguille 21G afin de casser l'ADN et par conséquent fluidifier le lysat. La concentration en protéinase K

est ajustée afin d'avoir une concentration finale de 75 µg/ml, et le lysat est incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes. Au terme de cette incubation, la concentration en sels, de 0,1 M, est ajustée par ajout de NaCl 5 M pour avoir une concentration finale de 0,5 M. Cette haute concentration saline permettra aux oligo-dT-cellulose de s'accrocher aux ARNm. Les oligo-dT-cellulose sont alors ajoutés au lysat pour une incubation à température ambiante sous agitation constante pendant 2 heures minimum.

Après cette incubation, les oligo-dT-cellulose couplés aux ARNm sont centrifugés puis lavés avec le tampon riche en sels, centrifugés à nouveau puis resuspendus dans le même tampon et déposés sur une colonne (poly-prep chromatography column, Bio-Rad). Les colonnes sont traitées au préalable avec le DEPC et contiennent un filtre poreux retenant la cellulose. Le contenu de la colonne est lavé avec le tampon riche en sels, puis avec le tampon à faible concentration saline afin de permettre aux hybridations non spécifiques de se décrocher. Les ARNm sont enfin élués par passage dans la colonne d'un tampon sans sels à 55°C, ne permettant plus l'adhésion des bases thymidine et adénosine par les ponts hydrogènes. La concentration en sels de l'éluat est alors ajustée à 0,5 M et un volume d'éthanol, stocké à -20°C, correspondant au double du volume de l'éluat est ajouté pour précipiter les ARN. La précipitation se fait pendant une nuit à -20 °C. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 12000 RPM pendant 15 minutes à 4°C, les culots, constitués d'ARN poly A, sont séchés et remis en suspension dans 25 µl de tampon TE contenant 1µg/ml de protéinase K.

La concentration de l'ARN est quantifiée par mesure à 280 nm par un spectrophotomètre Genequant (Pharmacia) de la densité optique de l'échantillon dilué 35 fois. Une mesure peut également être réalisée à 260 nm afin d'évaluer les contaminations protéiques. Les ARNpoly A sont alors stockés à -80°C.

### 3. Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

#### 3.1. Matériel

MuLV Reverse transcriptase ( Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), 50 U/µl

Oligo (dT)<sub>12-18</sub>, (0,5 mg/ml)

Taq DNA Polymerase, recombinant 5 U/µl

dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM

MgCl<sub>2</sub> solution 50 mM

DTT 0,1 M

10 x PCR Buffer (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM pH 8,4)

5 x PCR Buffer (MgCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 375 mM, Tris-HCl 250 mM, pH 8,3)

Les réactifs sont fournis par Gibco.

<u>Réactifs pour la RT</u>	(20 µl final)	<u>Réactifs pour la PCR</u>	(25 µl final)
ARN polyA	0,1 µg		
PCR Buffer 5x	1 x	MgCl <sub>2</sub> solution	1,5 mM
Chaque dNTP	0,2 mM	PCR Buffer 10x	1 x
Oligo d(T) <sub>16</sub>	0,5 µg	Chaque dNTP	0,2 mM
Eau traitée DEPC	-	Primers sens et anti-sens	0,4 µM
MuLVReverse transcriptase	50 U	Eau traitée DEPC	-
DTT	0,01 M	Taq DNA Polymerase	2,5 U



### 3.2. Méthode

La transcription reverse permet la transformation de l'ARNm en cDNA simple brin, l'ARNm servant de matrice. Les oligo-dT s'accrochent à la queue poly-A de l'ARNm servant ainsi d'amorce pour la MuLV Reverse transcriptase. Celle-ci ajoute les dNTP un à un, formant ainsi le brin de cDNA. Le PCR Buffer fournit une concentration en sels optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme.

Les échantillons sont placés dans une machine à PCR (Perkin Elmer 2400). La reverse transcription comporte deux températures :

- 60 minutes à 37 °C qui est la température optimale de l'enzyme,
- 5 minutes à 4°C qui est nécessaire au refroidissement des échantillons.

L'amplification du cDNA simple brin permet d'obtenir plus d'un million de copies d'ADN double brins. Un premier chauffage à 94°C permet le désappariement de l'hybride ARN-cDNA. Une série de cycles (entre 25 et 35 cycles selon le but recherché) est alors suivie.

Un cycle comporte 3 températures :

- 1 minute à 94°C (température de dénaturation) permettant le désappariement des doubles brins complémentaires formés,
- 1 minute à 55°C (température d'annealing) permet l'hybridation entre les amorces et la séquence cible spécifique,
- 1 minute à 72°C (température d'élongation) qui est la température optimale pour l'enzyme.

Pour terminer un cycle, une température supplémentaire de 7 minutes à 72 °C permet aux brins éventuellement incomplets d'être achevés.

Les échantillons sont analysés sur un banc d'UV après migration dans un gel d'agarose 2% en présence de 0,5 µg/µl de bromure d'éthidium. Le poids moléculaire des échantillons est déterminé grâce à un marqueur de poids moléculaire ayant migré en même temps que les échantillons.

## 4. Marquages histochimiques

### 4.1. Marquage immunohistochimique en fluorescence

#### 4.1.1. Matériel

##### Tampon PBS/ABC

- 0,9 mM de CaCl<sub>2</sub> anhydre
- 2,7 mM de KCl
- 15 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,49 mM de MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O
- 140 mM de NaCl
- 8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O
- pH 7,2

##### Solution de PBS/BSA

- PBS/ABC
- BSA (fraction V) 0,1%
- Triton X-100 0,02 %

#### 4.1.2. Méthode

La technique est appliquée sur des cellules cultivées en adhésion sur des lamelles carrées de verre de 16 mm de côté, de type couvre-objet.

Les kératinocytes sont ensemencés à raison de  $30 \cdot 10^3$  cellules par  $\text{cm}^2$ . Elles sont fixées à sous-confluence dans une solution formaldéhyde 3,7 % dans du PBS/ABC pendant 30 minutes à température ambiante, puis rincées trois fois dans du tampon PBS/ABC. Les groupements aldéhydes libres sont neutralisés par trois lavages successifs dans de la glycine 0,1 M dans du PBS/ABC.

Les sites non spécifiques sont saturés par trois passages dans du PBS/BSA. Les coupes sont alors incubées pendant 1 heure en chambre humide à température ambiante, en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS/BSA (Tableau M1).

Au terme de cette incubation, les cellules sont rincées 3 fois 5 minutes dans du PBS/BSA puis sont ensuite incubées pendant une heure en chambre humide avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à la FITC (Fuorescéine-iso-thiocyanate), puis rincées trois fois dans du PBS/BSA. Les couvre-objets sont alors montés avec du glycergel sur une lame porte-objet en plaçant les cellules face à cette lame.

L'observation des cellules se fait au microscope à balayage confocal (Leica, laser Argon). L'objet est éclairé par un faisceau laser finement focalisé qui le balaie rapidement à un seul niveau, n'éclairant ainsi qu'un plan mince de l'objet (figure M.7).

Tableau M. 1 : Liste des différents anticorps utilisés lors des marquages immunohistochimiques

Anticorps	Isotype / source	Dilution	Spécificité
CD1a Clone NA1/34	IgG2a monoclonal de souris / Dako	1/100	CD1a humain
Kératine K 14	IgG1 monoclonal de souris / ICN	1/10	kératine humaine
ICAM-1 Clone 6.5B5	IgG1 monoclonal de souris / Dako	1/25	Domaine N-terminal de la molécule
HLA-DR Clone TAL.1B5	IgG1 monoclonal de souris / Dako	1/50	Queue intra-cytoplasmique de la chaîne alpha.
LCA (CD 45) Clones 2B11 + PD7/26	IgG1 monoclonal de souris / Dako	1/100	CD45 humaine
Ac secondaire Alexa 488	Ac de chèvre anti IgG de souris / Molecular Probe	1/1000	Anticorps de souris
Ac secondaire couplé à la FITC	Ac de lapin anti-IgG de souris	1/50	Anticorps de souris

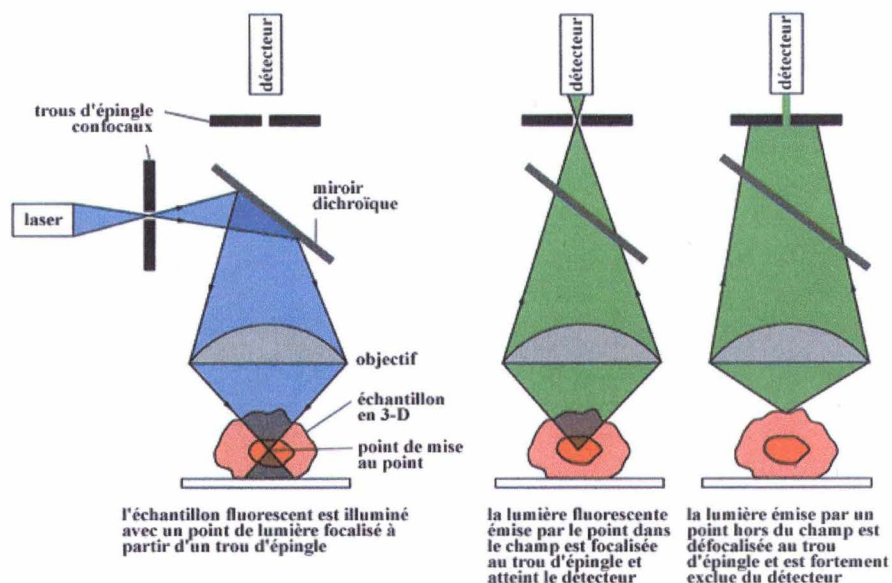


Figure M.7 : Principe du microscope à fluorescence confocal à balayage.

## 4.2. Marquage immunohistochimique enzymatique

### 4.2.1. Matériel

Les solutions utilisées sont les mêmes que celles utilisées pour le marquage en immunofluorescence (voir ci-dessus).

### 4.2.2. Méthode

Cette technique est utilisée pour les cellules cultivées sur membrane poreuse de polycarbonate. Après stratification et kératinisation des cellules, les membranes de polycarbonate portant les kératinocytes sont découpées à l'aide d'un scalpel et l'ensemble est congelé dans un milieu d'enrobage (Tissue Tek). Des coupes à congélation d'une épaisseur de 9  $\mu\text{m}$  sont effectuées à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans un cryostat (Microm HM-500-OM) et récupérées sur des lames Superfrost traitées à l'aminosilane.

Ces coupes sont fixées pendant 30 minutes dans une solution de formaldéhyde 3,7 % dans du PBS/ABC, puis rincées trois fois dans du tampon PBS/ABC. Les groupements aldéhydes libres sont neutralisés par trois lavages successifs dans de la glycine 0,1 M dans du PBS/ABC. Afin de préparer les cellules pour la suite du marquage, les peroxydases endogènes sont inhibées par incubation pendant 10 minutes à température ambiante dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3%. L'excès de peroxyde d'hydrogène est enlevé par trois rinçages dans du tampon PBS/ABC.

Les sites non spécifiques sont alors saturés par trois passages dans du PBS/BSA puis, les coupes sont incubées, pendant 1 heure en chambre humide à température ambiante, en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS/BSA.

Un système de visualisation nommé LSAB (labelled streptavidine biotine), se réalise en trois étapes (Figure M.8). Entre chaque incubation, les coupes sont rincées par passage dans trois bains de PBS/BSA

1. Les coupes sont d'abord incubées avec un anticorps secondaire couplé à de la biotine (pendant 45 minutes à température ambiante et en chambre humide), cet anticorps secondaire se liant spécifiquement au fragment constant de l'anticorps primaire.

2. La biotine est ensuite reconnue spécifiquement par de la streptavidine sur laquelle sont couplées des peroxydases. L'incubation avec la streptavidine se fait également en chambre humide pendant 45 minutes à température ambiante.
3. La révélation s'effectue par incubation pendant 45 secondes avec de la diaminobenzidine (DAB) contenue dans une solution de peroxyde d'hydrogène. La DAB, en présence de peroxyde d'hydrogène et de peroxydase, s'oxyde et polymérise en un précipité brun à proximité de la peroxydase, et donc de l'antigène reconnu.

Une contre-coloration est effectuée après le marquage afin de visualiser les kératinocytes. Dans ce but, les coupes sont plongées dans une solution d'hémalum pendant 10 secondes, puis sont rincées à l'eau courante pendant 5 minutes. Les cellules sont alors déshydratées par simple passage dans de l'alcool isopropanique, et sont préparées au montage par passage dans trois bains de toluol. Les coupes peuvent alors être montées au DPX et visualisées en microscopie optique à fond clair.

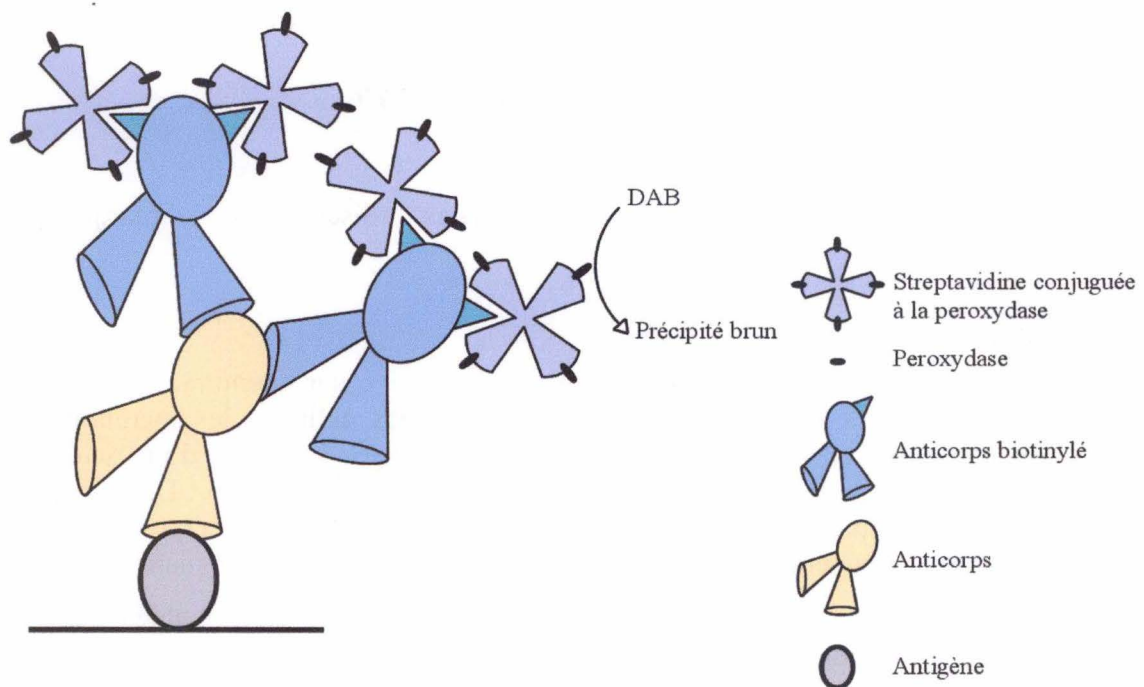


Figure M.8 : Représentation des couches utilisées pour l'amplification du signal.

## 5. MLKC (Mixed Lymphocyte Keratinocyte Culture)

### 5.1. Matériel

- Milieu KGM-2
- RPMI complet
- IFN $\gamma$  (R & D)
- PMA : Myristyl Acétate de Phorbol (Sigma)

## 5.2. Méthode

Cette technique vise à estimer la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique en réponse à une stimulation. Pour cela, l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules est mesuré.

### 5.2.1. Co-culture de kératinocytes et cellules mononucléées du sang périphérique

Les kératinocytes sont ensemencés à une densité de  $3.10^3$  ou de  $9.10^3$  cellules/puits dans une plaque 96 puits à fond plat (Costar, 3596) en milieu KGM-2 ou KGM-2 sans EGF + 10% FCS. Les kératinocytes, à sous-confluence sont stimulés avec de l' $INF\gamma$  (150 U/ml), du PMA (25 ng/ml) ou par les deux composés à ces mêmes concentrations pendant 48 heures. Les cellules sont alors lavées plusieurs fois avant de recevoir les cellules mononucléées du sang périphérique à une densité de  $10^5$  cellules/puits. La co-culture se réalise en milieu RPMI complet.

Des concentrations croissantes d'IL-2 sont ajoutées à la co-culture à raison de 1, 3 et 10 U/ml. Au terme de 5 jours de co-culture, les cellules sont incubées pendant 18 heures avec 1  $\mu$ Ci de thymidine tritiée (Amersham Pharmacia Biotech)

### 5.2.2. Récolte de la radioactivité

Les cellules mononucléées sont lysées et leur contenu est récupéré sur un filtre en fibres de verre (Titertek) par l'utilisation de l'appareil Titertek Cell Harvester (Figure M.9). En bref, l'appareil est constitué d'un « injecteur » formé de conduits en plastiques terminés par un embout métallique. Cet embout est positionné dans le puits et projette de l'eau afin de lyser les cellules. En outre, l'injecteur comporte une deuxième série d'embouts métalliques plus courts qui se positionnent également dans le puits et qui aspirent le contenu de celui-ci. Ces embouts métalliques sont prolongés par des conduits de plastique menant le contenu du puits au filtre de fibres de verre qui en retient l'ADN. Chaque puits est rincé 7 fois par projection d'eau et aspiration de celle-ci. Le filtre est séché pendant 1 heure à  $80^{\circ}C$ , scellé dans un sac de plastique contenant 8 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac LSC.BV).

La radioactivité de l'ADN fixé sur le filtre est mesurée par un compteur  $\beta$  (Pharmacia).

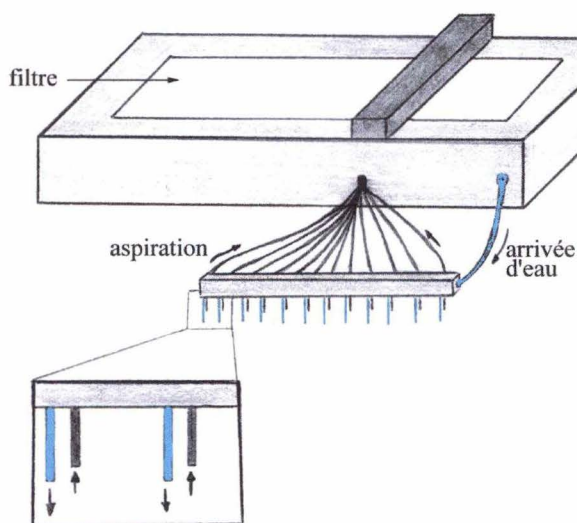


Figure M.9 : Schéma représentant le Cell Harvester.

### 5.2.3. Mesure de la radioactivité $\beta$ par scintillation liquide

Le principe du comptage à scintillation liquide est basé sur la mesure de la lumière émise par des photons provenant d'atomes excités par des rayonnements  $\beta$ , c'est-à-dire des électrons. Une partie de l'énergie des électrons est absorbée par les molécules de scintillant. Celles-ci émettent des photons en retournant à leur état initial. L'énergie cinétique des électrons émis par l'isotope  $\beta$  est ainsi convertie en une énergie lumineuse détectable par un photomultiplicateur. Dans ce cas, les résultats seront donnés en dpm (désintégrations par minute).

## 6. Coloration à l'HES (hémalun-erythrosine-safran)

### 6.1. Matériel

#### Hémalun

- 3 g d'hématéine standard (Fluka) dissous dans 1L de solution saturée d'alun de potasse (Merck)
- 20 ml d'acide acétique glacial.

#### Erythrosine

- 2 g d'érythrosine (Merck)
- 10 gouttes de formol (Merck)
- 1L d'eau courante

#### Safran

- 5 g de Safran du Gatinais (Chroma) dissous dans 1L d'alcool éthylique absolu
- Dilution v/v avec alcool absolu

#### Alcool-HCl

- 100 ml d'alcool éthylique 95° dénaturé à l'éther
- 4 ml d'HCl fumant

### 6.2. Méthode

La technique est utilisée pour visualiser la stratification et la kératinisation des kératinocytes cultivés sur les membranes poreuse de polycarbonate à l'interface air-liquide.

#### 6.2.1. Inclusion et enrobage en paraffine

La première étape consiste à inclure et enrober les membranes de polycarbonate et les cellules qu'elle supporte dans de la paraffine pour en faire des coupes.

Dans ce but, l'insert est ôté de son cylindre et fixé dans une solution de formaldéhyde 3,7 % dans du tampon PBS/ABC pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite déshydratées par 3 incubations de 5 minutes dans du méthanol absolu. L'insert est alors plongé dans un bain de toluol pendant une vingtaine de secondes, temps nécessaire pour désolidariser la membrane de polycarbonate de la paroi de l'insert qui se dissout dans le toluol. La membrane est récupérée et placée dans une cassette de plastique entre deux mousses pour éviter l'enroulement de la membrane. La cassette passe dans 3 bains de 30 minutes de toluol, suivis de 3 bains de 30 minutes dans de la paraffine.

La membrane est retirée de la cassette et déposée dans une cassette métallique contenant de la paraffine, pour être disposée perpendiculairement à l'incidence de coupe. La cassette est placée sur une plaque refroidissante afin de solidifier rapidement la paraffine. Des coupes, d'une épaisseur de 7  $\mu\text{m}$ , sont réalisées à l'aide d'un microtome et récupérées sur des lames Superfrost.

### 6.2.2. Coloration

L'étape suivante consiste à déparaffiner les cellules par deux bains de 3 minutes dans le toluol, puis deux passages de 3 minutes dans le méthanol absolu. Les cellules sont ensuite partiellement réhydratées dans du méthanol 70° pendant 3 minutes.

Une première coloration de 7 minutes dans l'hémalum colore les noyaux, puis les lames sont rincées dans l'eau courante. Un bain de 2 minutes dans l'alcool-HCl permet d'ôter l'hémalum des fibres, tandis qu'un rinçage de 10 minutes dans l'eau courante permet le bleuissement des noyaux.

La deuxième coloration de 6 minutes dans l'érythrosine colore le cytoplasme, puis les lames sont rincées dans l'eau courante. Un bain d'1 minute dans l'alcool éthylique 70° permet d'ôter l'érythrosine des fibres, tandis qu'une déshydratation dans l'alcool isopropylique absolu prépare à la troisième coloration.

La troisième coloration de 7 minutes dans le safran colore les fibres conjonctives. Trois rinçages de 30 secondes sont effectués dans l'alcool isopropylique absolu.

Pour terminer, les coupes sont incubées dans trois bains de toluol afin de les préparer au montage dans le DPX.

## 7. Microscopie à balayage

### 7.1. Matériel

#### Tampon CaCO

- Cacodylate de sodium (Fluka) 0,1M
- Chlorure de calcium 0,1%
- pH 7,4

#### Glutaraldéhyde

- Glutaraldéhyde (Fluka) à 2,5% dans le tampon CaCO

### 7.2. Méthode

L'insert est ôté de son cylindre et les cellules sont fixées 30 minutes sur glace dans la solution de glutaraldéhyde. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec le tampon CaCO.

Une déshydratation progressive des cellules se fait en passant successivement dans 2 bains d'éthanol 34 % pendant 5 minutes, éthanol 50 % (2 fois 5 minutes), éthanol 75 % (2 fois 10 minutes), éthanol 94 % (2 fois 10 minutes), d'éthanol 100 % (3 fois 15 minutes).

Les cellules passent alors une étape appelée *séchage au point critique*, caractérisée par l'existence d'une température et d'une pression critiques pour lesquelles la densité de la vapeur est égale à la densité du liquide. Pratiquement, l'alcool contenu dans les cellules est progressivement remplacé par du dioxyde de carbone sous pression, qui se vaporise par une élévation de température (Bayers, CPD 030). Les membranes de polycarbonate sont ensuite découpées à l'aide d'un scalpel, collées sur un petit support métallique et recouvertes d'une fine pellicule d'or .

Une fois les échantillons recouverts d'or, ils sont placés avec leur support dans l'enceinte du microscope électronique à balayage (MEB) (Figure M.10).

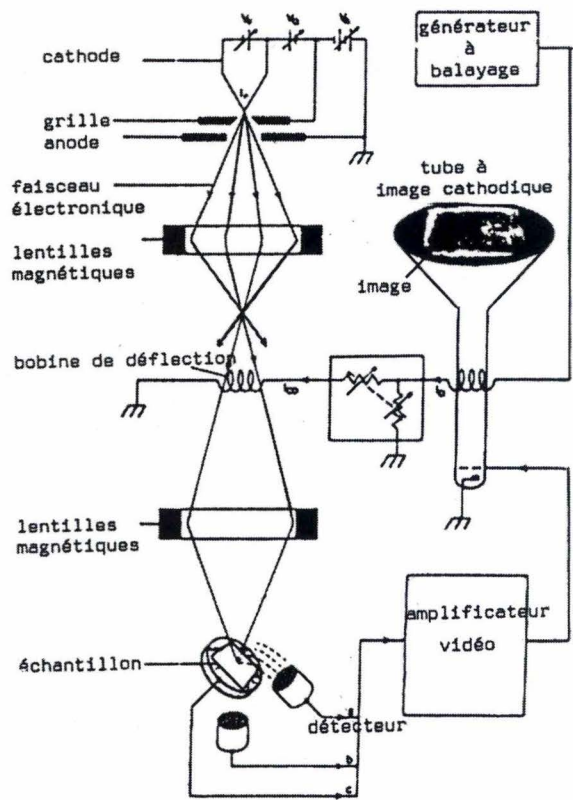


Figure M.10 : Principe du microscope à balayage



# **RESULTATS**

# 1. Reconstruction d'un épiderme immunocompétent stratifié et kératinisé sur membrane de polycarbonate

## 1.1. Qualité de la membrane de polycarbonate

Nous avons testé deux types d'inserts provenant des firmes Whatman et Nunc. La qualité et la régularité des pores sont visualisés par observation en microscopie à balayage de la face non adhérente (FNA) de la membrane (Figure R.1).

Les membranes de polycarbonate Whatman possèdent des pores de diamètres égaux, répartis de façon uniforme sur la surface de la membrane de polycarbonate. Les membranes de polycarbonate Nunc sont criblées de pores non réguliers, fusionnés à certains endroits. De plus, la surface de la membrane de polycarbonate, en FNA, présente un aspect écaillé, contrairement à celle de Whatman.

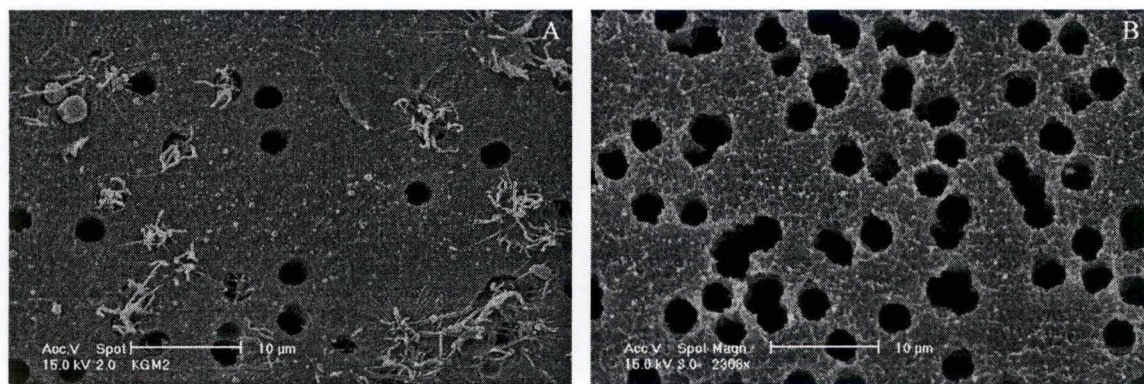


Figure R.1: Observation en microscopie à balayage de la face non adhérente de la membrane de polycarbonate pour des inserts provenant des firmes Whatman (A) ou Nunc (B).

## 1.2. Stratification des kératinocytes

### 1.2.1. Influence du calcium sur la cohésion des kératinocytes cultivés en milieu KGM-2

Afin de rendre cohésifs les kératinocytes, nous avons suppléé de chlorure de calcium le milieu KGM-2 utilisé classiquement pour la culture des kératinocytes. Le milieu KGM-2 possède une concentration usuelle en calcium de 0,15 mM, nous l'avons additionné de  $\text{CaCl}_2$  afin d'obtenir une concentration finale de 1,5 mM, soit dix fois plus.

Des kératinocytes sontensemencés à une densité de  $5 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> sur la face adhérente (FA) des inserts et sont cultivés en milieu KGM-2 ou en milieu KGM-2 riche en calcium pendant 32 heures. Les échantillons sont alors préparés pour l'observation de la face adhérente en microscopie à balayage (figure R.2).

Nous ne pouvons pas juger de la stratification des kératinocytes par l'observation en microscopie à balayage, mais une différence de cohésion entre les cellules est visible. Une concentration élevée en calcium dans le milieu favorise les jonctions cellulaires.

A faible concentration en calcium, les kératinocytes apparaissent disjoints, leurs limites cellulaires étant bien visualisées (R.2.A). A concentration élevée en calcium, les

kératinocytes forment un tapis cellulaire uniforme et plan. Les limites cellulaires sont moins facilement discernées (R.2.B).

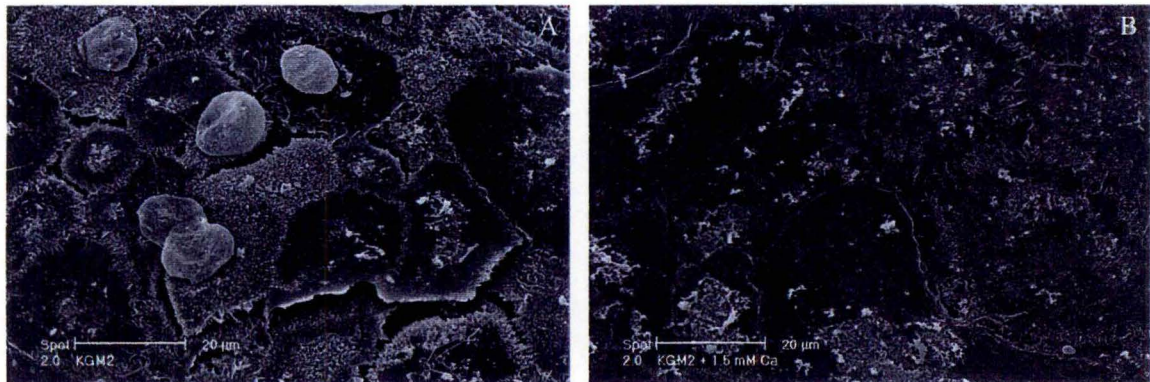


Figure R.2 : Observation en microscopie à balayage des kératinocytes cultivés en milieu KGM-2 contenant 0,15 mM de  $\text{CaCl}_2$  (A) et KGM-2 contenant 1,5 mM de  $\text{CaCl}_2$  (B).

### 1.2.2. Stratification des kératinocytes en milieu de Green

La méthode de Rheinwald et Green permet de stratifier les kératinocytes cultivés sur un lit nourricier de 3T3.

Nous avons comparé les stratifications obtenues en KGM-2 enrichi en calcium et en milieu de Green. Les kératinocytes sont ensemencés à une densité de  $5 \cdot 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> sur la FA et cultivés en milieu de Green ou KGM-2 riche en calcium. Contrairement à la méthode de Rheinwald et Green, les kératinocytes ne sont pas directement en contact avec les 3T3 qui sont cultivés dans le fond du puits, rendant ainsi le système amovible (figure R.3).

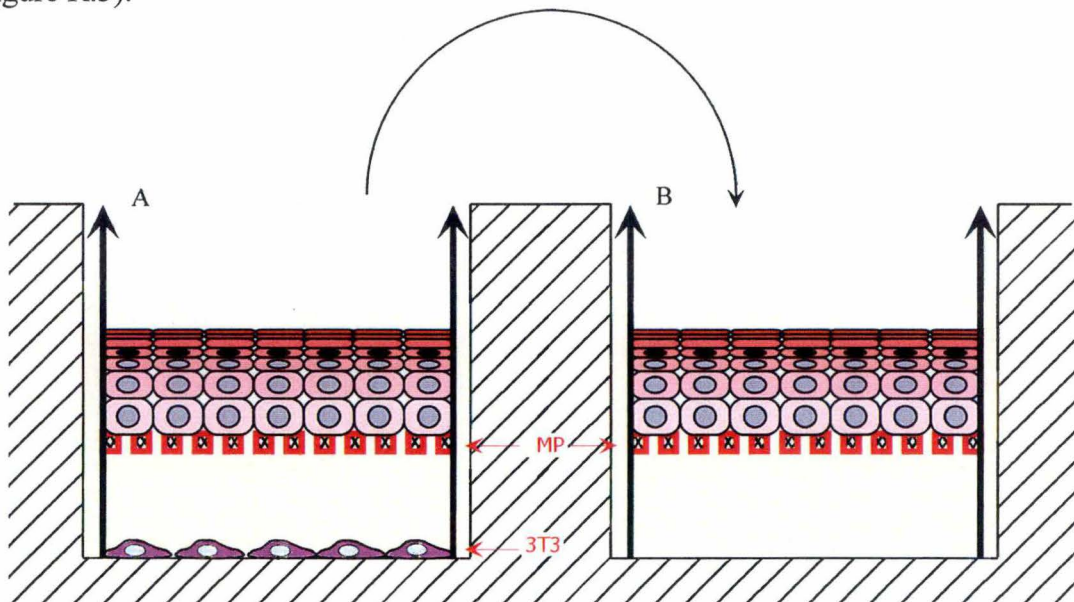


Figure R.3 : Schéma illustrant la culture des kératinocytes sur inserts, contenant des 3T3 dans le fond du puits. (A) : Le système cylindre-insert peut être transféré après stratification dans un puits de culture ne contenant pas de 3T3 (B).

MP : Membrane de polycarbonate.

Les échantillons sont observés en microscopie à balayage (analyse de la surface) et optique (analyse en coupe transversale) après 7 jours de culture (Figure R.4).

Le balayage révèle un tapis cellulaire parfaitement jointif pour les kératinocytes cultivés en milieu de Green. Une cohésion moins nette des cellules de la couche supérieure est visualisée en milieu KGM-2, et ce malgré une augmentation de calcium.

L'observation en microscopie optique ne montre pas une différence flagrante dans le nombre de couches cellulaires obtenues pour les deux milieux testés. Néanmoins, la cohésion cellulaire moins nette de la couche superficielle est confirmée en milieu KGM-2.

Nous notons que les kératinocytes cultivés en milieu de Green traversent les pores de la membrane de polycarbonate et colonisent l'autre côté de la membrane (FNA), ce qui ne se produit pas en milieu KGM-2 suppléé en calcium. La question est de savoir si cette migration, non observée en KGM-2 est liée au milieu de Green ou à la présence de 3T3 dans la méthode de Rheinwald et Green.

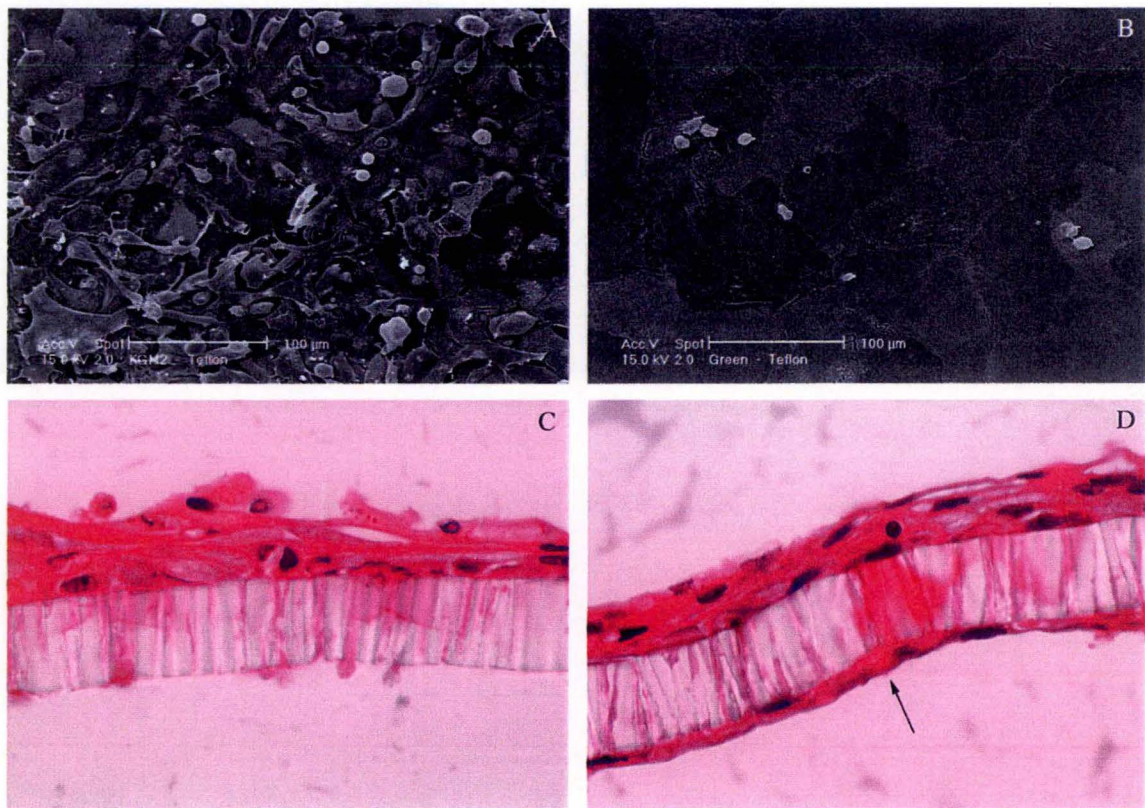


Figure R.4 : Comparaison de la cohésion et de la stratification des kératinocytes en KGM-2 suppléé en calcium (A, C) et en milieu de Green (B,D). Les cultures sont observées après 7 jours en microscopie à balayage (A, B) et optique (C, D). La flèche indique les kératinocytes ayant migré à travers le membrane de polycarbonate.

FA : Face adhérente, MP ; Membrane de polycarbonate, FNA : Face non adhérente.

### 1.2.3. Influence des 3T3 sur la migration des kératinocytes à travers la membrane.

Afin de montrer l'effet potentiellement chémoattractif des 3T3, les kératinocytes sont cultivés sur la FA des membranes de polycarbonate en milieu KGM-2 riche en calcium ou en milieu de Green, en présence ou non de 3T3. Les 3T3 sont cultivés dans le fond du puits ou sur la FA sous les kératinocytes. Les cellules sont observées en microscopie optique après une semaine de culture (Figure R.5).

Les kératinocytes migrent à travers la membrane de polycarbonate en milieu de Green qu'il y ait ou non présence des cellules 3T3 et en KGM-2 en présence des 3T3. Outre l'effet migratoire des kératinocytes mis en évidence lors de la culture en présence de 3T3, les fibroblastes semblent jouer un rôle dans la formation et la maturation de l'épithélium *in vitro*. Ils ont une influence très marquée sur l'organisation des kératinocytes cultivés en milieu KGM-2 : l'absence de 3T3 montre un amoncellement de kératinocytes, non structurés entre eux, tandis que l'ajout de 3T3 dans le milieu régularise le nombre et l'agencement des couches sur toute la surface de l'insert.

L'absence ou la présence de 3T3 au fond du puits n'affecte pas la stratification des kératinocytes en milieu de Green, tandis qu'un contact direct des 3T3 avec les kératinocytes la bouleverse.

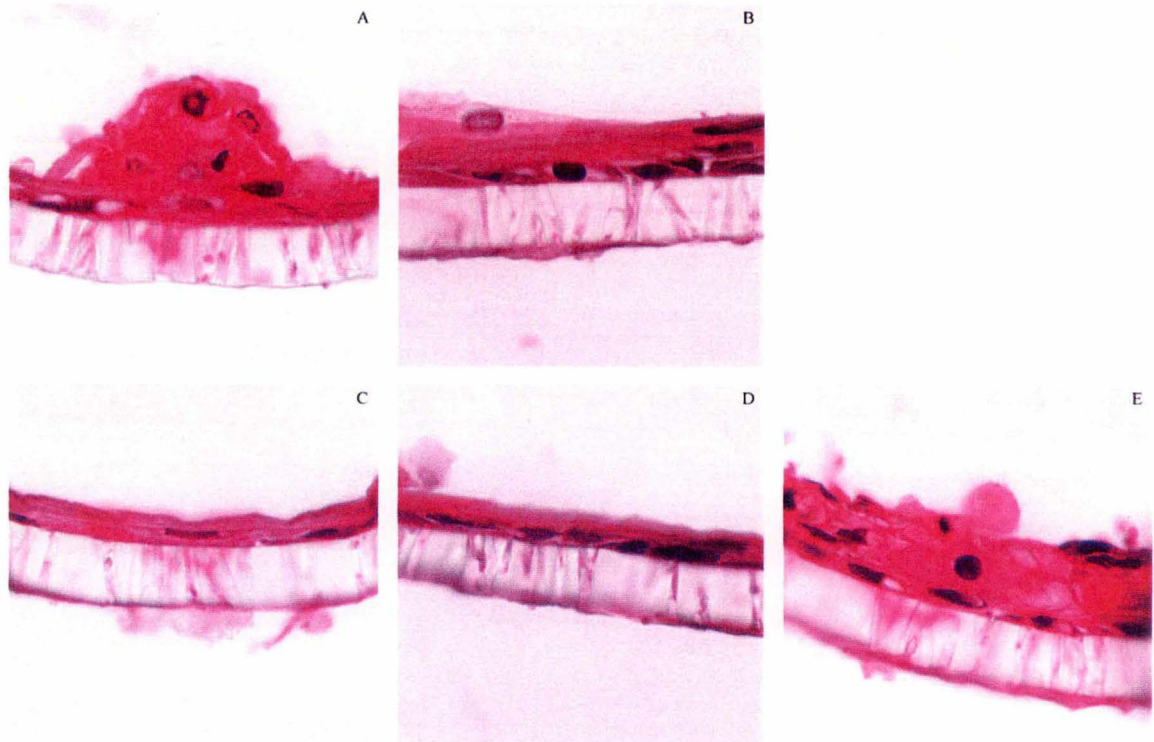


Figure R.5 : Les kératinocytes sont cultivés pendant 7 jours en milieu KGM-2 riche en calcium (A,B) ou en milieu de Green (C,D,E) en présence (B,D,E) ou non (A,C) de 3T3. Les 3T3 sont cultivés en fond de puits (B,D), ou sur la membrane (FA), en contact avec les kératinocytes (E).

### 1.3. Kératinisation de l'épithélium

Afin de rapprocher notre modèle de l'épiderme *in vivo*, une maturation complète de l'épithélium reconstitué *in vitro* avec kératinisation des couches supérieures est souhaitée.

Pour cela, les kératinocytes sont cultivés en KGM-2 enrichi en calcium en présence de 3T3 (KGM-2 / CaCl<sub>2</sub> / 3T3) en immersion pendant 7 jours afin de permettre une stratification suffisante. Au bout des 7 jours, les kératinocytes sont cultivés en interface air-liquide pendant 7 jours. Après 14 jours totaux de culture, la stratification et la kératinisation sont visualisées en microscopie optique.

La figure R.6 révèle que les kératinocytes cultivés en KGM-2 / CaCl<sub>2</sub> / 3T3 présentent les différents stades de maturation : couche basale, couche épineuse, couche granuleuse et couche cornée.

La différenciation obtenue lors de la culture en milieu de Green, en absence de 3T3, montre une organisation moins nette des cellules basales. Les kératinocytes cultivés en milieu de Green en contact direct avec les 3T3 forment des perles de kératinisation témoignant d'une maturation anormale (centripète).

Aucune kératinisation n'est observée lors de la culture en milieu de Green contenant des 3T3 au fond du puits. Cela s'explique par le fait que, dans cette expérience, ces cellules n'ont pas été réellement en interface air-liquide, la cupule se remplissant continuellement de milieu (ceci pouvant s'expliquer par la rupture inopinée de la membrane de polycarbonate).

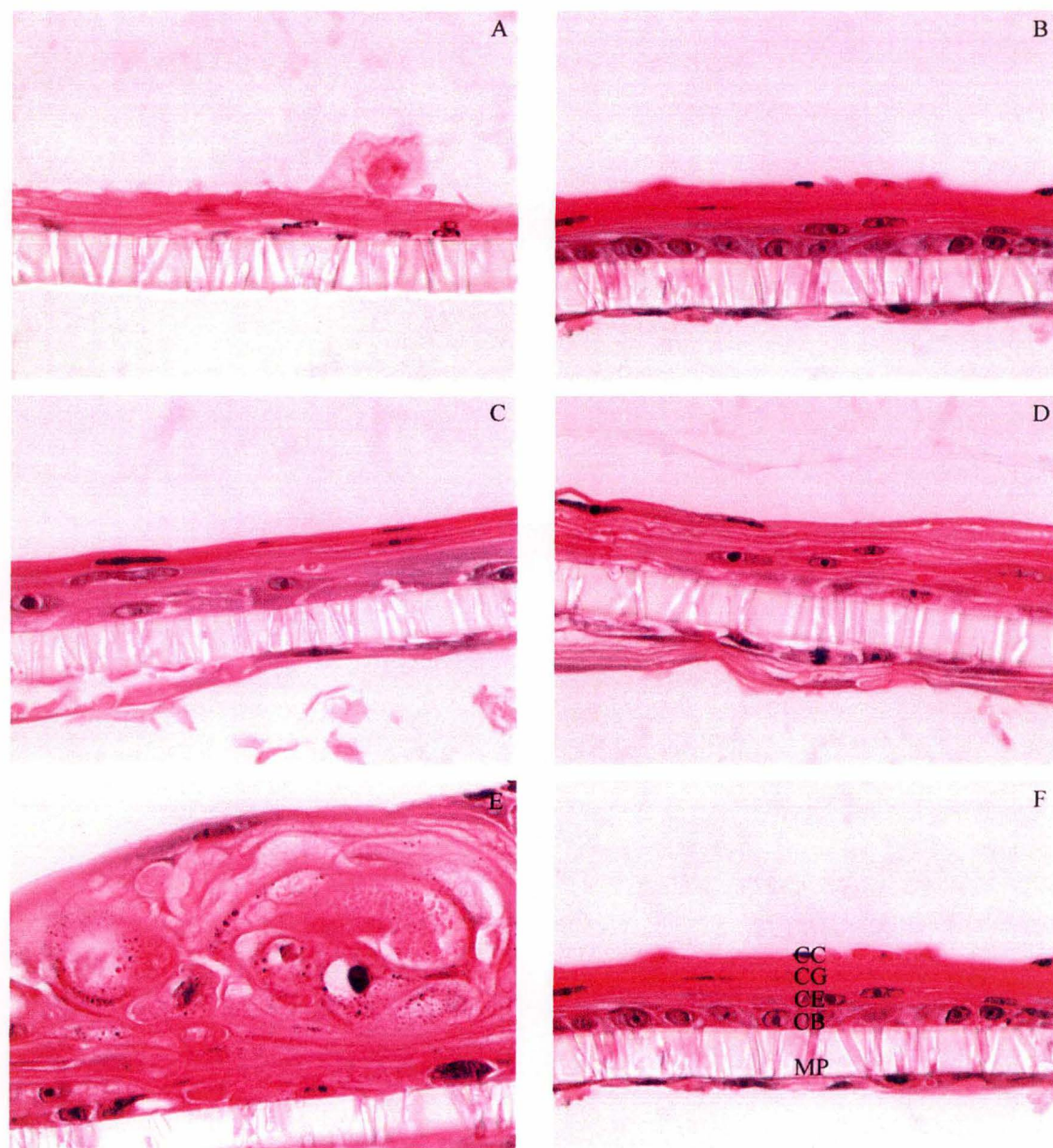


Figure R.6 : Les kératinocytes sont cultivés en milieu KGM-2 riche en calcium (A,B) ou en milieu de Green (C,D,E) en présence (B,D,E) ou non (A,C) de 3T3 pendant 14 jours dont les 7 derniers en interface air-liquide. Les 3T3 sont cultivés au fond du puits (D), ou sur la membrane, en contact avec les kératinocytes (E).

MP : Membrane de polycarbonate, CB : Couche basale, CE : Couche épineuse, CG : Couche granuleuse, CC : Couche cornée (Image F).

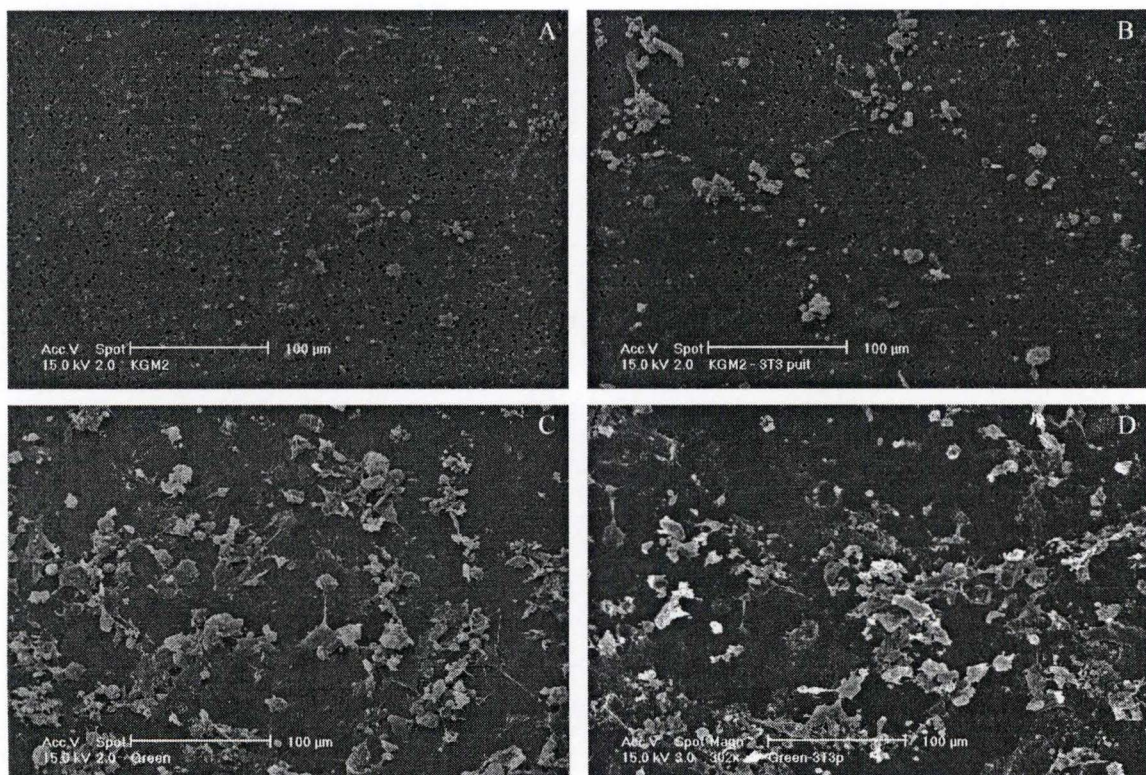
En définitive, nous optons pour le milieu KGM-2 / CaCl<sub>2</sub> / 3T3 comme milieu optimal pour la reconstruction d'un épithélium, le KGM-2 étant un milieu moins immunogène que le milieu de Green, car il ne contient ni sérum, ni toxine cholérique.

#### ***1.4. Estimation de la migration cellulaire à travers la membrane de polycarbonate***

Une analyse en microscopie à balayage de la FNA de la membrane de polycarbonate permet d'estimer la surface de la membrane colonisée par les kératinocytes l'ayant traversé et constitue indirectement une mesure de leur capacité de migration.

La culture sur insert est menée en milieu de Green ou KGM-2 riche en calcium, en présence ou non de 3T3 en fond de puits. La FNA de la membrane de polycarbonate est observée en microscopie à balayage après 7 jours de culture. (figure R.7).

Après 7 jours de culture en l'absence de 3T3, quelques kératinocytes cultivés en milieu KGM-2 colonisent la FNA, tandis que la totalité de la FNA est colonisée par les kératinocytes cultivés en milieu de Green. En milieu KGM-2, en présence de 3T3, les kératinocytes recouvrent une surface plus importante qu'en l'absence de 3T3. Dans le milieu de Green, l'ajout des 3T3 n'influence pas l'image observée en balayage, vu que toute la FNA était déjà recouverte en absence de 3T3.



**Figure R.7 :** Influence des 3T3 sur la migration des kératinocytes à travers la membrane de polycarbonate. Les kératinocytes sont cultivés en milieu KGM-2 (A,B) ou en milieu de Green (C,D) en présence (B,D) ou en l'absence (A,C) de 3T3 cultivés en fond de puits. La FNA est observée au microscope à balayage, après 7 jours de culture.

Un test simple est utilisé pour quantifier la migration cellulaire : un comptage des pores visibles, donc non recouverts par les cellules est réalisé, donnant une idée de la surface de la FNA occupée par les kératinocytes. La mesure est effectuée automatiquement par un programme (analySIS Pro Soft Imaging System GmbH). Sur une image en

microscopie à balayage (et donc en échelle de gris), une sélection des zones les plus noires (comprenant les pores) de l'image est effectuée en déterminant deux seuils de gris. Ces seuils définissent un intervalle de gris que le programme reconnaît comme avant-plan ; tous les niveaux de gris en dehors de ces limites sont identifiés comme arrière-plan. L'avant-plan est constitué de zones dispersées appelées particules par le programme. Le résultat de cette première sélection comprend non seulement les pores non recouverts par les cellules, mais également des zones noires irrelevantes (ombres des cellules, zones libres des pores partiellement occupés par les kératinocytes migrants). Une deuxième sélection est ensuite opérée en définissant les surfaces minimale et maximale des particules à retenir. Le programme réalise alors un comptage des particules ainsi détectées.

L'analyse a été effectuée pour des kératinocytes cultivés en KGM-2/CaCl<sub>2</sub> en présence ou non de 3T3. Cinq photographies sont prises dans la zone centrale de la membrane de polycarbonate et les pores libres sont comptés (tableau R.1). Un test t de Student montre une différence significative ( $p < 0,0005$ ) de migration des kératinocytes en présence ou non de 3T3.

Nombre de pores libres mesuré sur la FNA de la membrane de polycarbonate.

Kératinocytes cultivés	en présence de 3T3	en absence de 3T3
	467	913
	265	819
	313	1109
	440	827
	381	933
Moyenne	373	920
Ecart-type	85	117

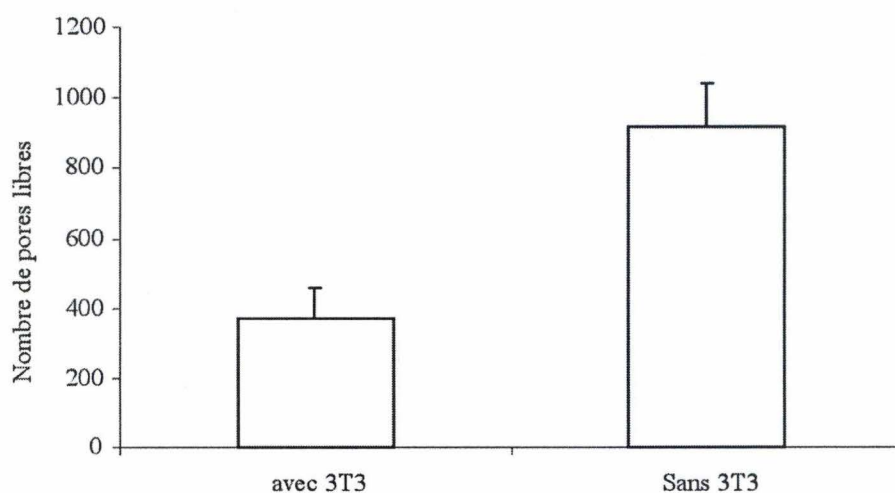


Tableau R.1 : Kératinocytes cultivés pendant 7 jours en milieu KGM-2 contenant ou non des 3T3. Les échantillons sont observés en microscopie à balayage et le nombre de pores non recouverts par les cellules migrantes sont comptés, à 5 endroits différents de la zone centrale de la membrane.



## 1.5. Migration des cellules dendritiques au sein de l'épiderme

### 1.5.1. Génération, morphologie et phénotype des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont obtenues à partir de précurseurs mononucléés du sang périphérique (PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells). Les PBMC adhérents au fond d'un puits sont cultivés pendant 6 jours en présence de GM-CSF (800 U/ml) et d'IL-4 (200 U/ml) en RPMI 1640 contenant 10% de FCS,  $5 \cdot 10^{-5}$  M de mercaptoéthanol, 1% d'acides aminés non essentiels, 2 mM de glutamine, 50 U/ml de pénicilline et de la streptomycine à 50 µg/ml.

Les cellules dendritiques, passées en suspension sous l'effet de la différenciation dans le milieu, obtenues après 6 jours de culture sont observées en microscopie à contraste de phase (contraste d'interférence différentielle : DIC) ou après une coloration au May-Grünwald-Giemsa. Quelque soit le type d'approche morphologique, les cellules dendritiques sont caractérisées par une grande taille et des expansions cytoplasmiques importantes. Un marquage en immunofluorescence du CD1a d'une coupe d'amygdale indique la morphologie in vivo des cellules dendritiques (cellules de Langerhans) dans un épithélium pavimenteux stratifié (Figure R.8).

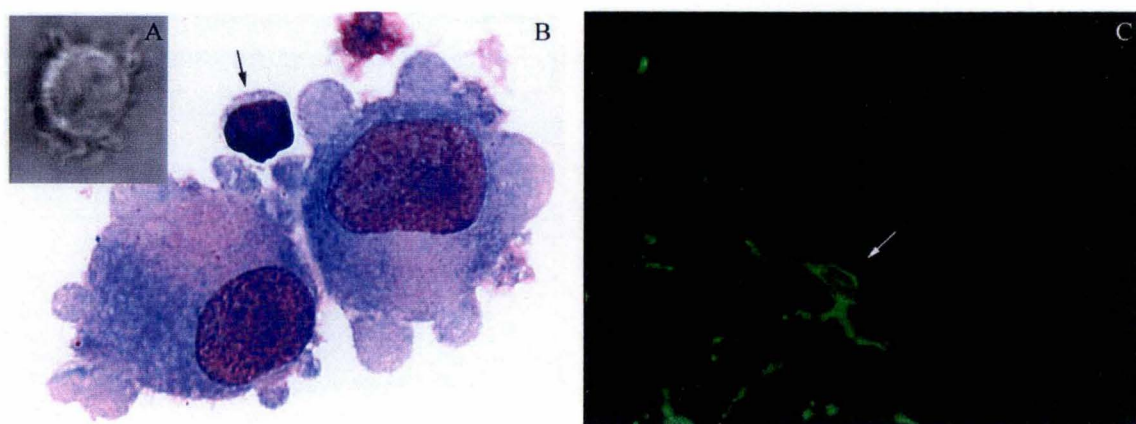


Figure R.8 : Morphologie des cellules dendritiques observée en DIC (A), après coloration au May-Giemsa-Grünwald (B), et après un marquage immunofluorescent du CD1a. La flèche de la figure B indique un lymphocyte résiduel permettant la comparaison morphologique avec les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont observées in vitro (A et B) ou in vivo (C).

Une analyse en cytométrie de flux montre que 70 % de la population obtenue en culture in vitro représente, sur un critère de taille, des cellules dendritiques potentielles tandis que les 30% restant sont vraisemblablement des lymphocytes. Un double marquage CD1a / CD14 indique que 50% de la population sélectionnée est positive pour CD1a et négative pour CD14, ce profil correspondant aux cellules dendritiques immatures (Figure R.9).

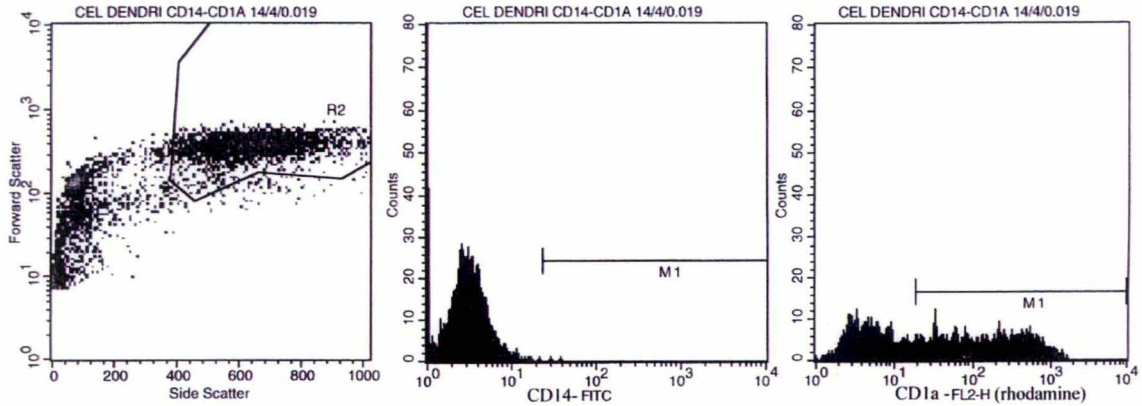


Figure R.9 : Analyse en cytométrie de flux des cellules dendritiques générées à partir de PBMC, après un double marquage CD1a/CD 14.

### 1.5.2. Migration des cellules dendritiques

L'épiderme est reconstitué pendant 14 jours en milieu KGM-2 / CaCl<sub>2</sub> / 3T3. L'insert est retourné et accueille sur la FNA 220.10<sup>3</sup> cellules dendritiques en milieu RPMI 1640 contenant 10% de FCS, 5.10<sup>-5</sup> M de mercaptoéthanol, 1% d'acides aminés non essentiels, 2 mM de glutamine, 50 U/ml de pénicilline et de la streptomycine à 50 µg/ml (Figure R.10).

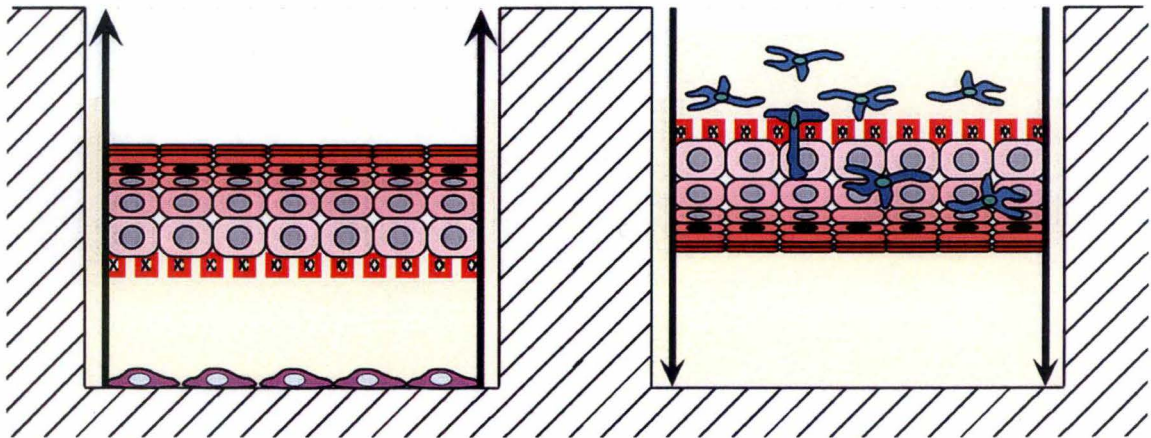


Figure R.10 : Schéma théorique montrant l'objectif à atteindre pour la migration des cellules dendritiques au sein de l'épiderme reconstitué in vitro après retournement de l'insert et transfert dans un puits sans 3T3.

Après 48 h de co-culture, les membranes de polycarbonate sont découpées et congelées dans du Tissue-Tek. Des coupes en congélation des membranes de polycarbonate sont réalisées et un marquage immunohistochimique HLA-DR ou CD1a est effectué (Figure R.11). Une contre-coloration à l'hémalum permet de visualiser les noyaux cellulaires, sans pour autant masquer le marquage.

Les cellules dendritiques, ne semblent pas, dans ces conditions, pénétrer dans l'épiderme, mais adhèrent aux kératinocytes.

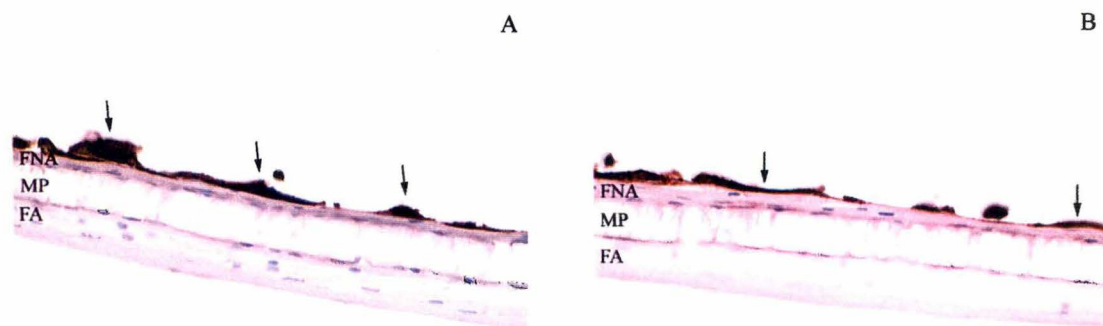


Figure R.11 : Marquage immunohistochimique (révélation à la DAB) du CD1a sur une coupe à congélation d'un épiderme reconstitué pendant 14 jours en milieu KGM-2 / CaCl<sub>2</sub> / 3T3, et ayant accueilli 220.10<sup>3</sup> cellules dendritiques sur la FNA pendant 48 heures. [FA : face adhérente, MP : membrane de polycarbonate, FNA : face non adhérente avec kératinocytes migrants, flèche : cellules dendritiques CD1a positives].

### 1.6. Migration des PBMC à travers l'épiderme

Les PBMC sont isolés du sang périphérique par centrifugation sur un gradient (Histopaque 1,077, Sigma). Ils sont stimulés dans des puits d'une plaque à 12 puits (Falcon, 3043) par de la phytohémagglutinine (PHA, 5 µg/ml) ou par de l'IL-2 (30 U/ml) pendant 48 heures en milieu RPMI 1640 contenant 10% de FCS, 50 U/ml de pénicilline et de la streptomycine à 50 µg/ml.

L'épiderme est reconstitué sur la membrane de polycarbonate pendant 14 jours en milieu [KGM-2 / CaCl<sub>2</sub> / 3T3]. 750.10<sup>3</sup> PBMC stimulés (à la PHA ou à l'IL-2) ou non stimulés sont ajoutés sur la FNA de la membrane de polycarbonate et cultivés en milieu RPMI complet pendant 48 heures (Figure R.12). Un marquage immunohistochimique (révélation à la DAB) du LCA (CD45) est réalisé sur les coupes en congélation (Figure R.13).

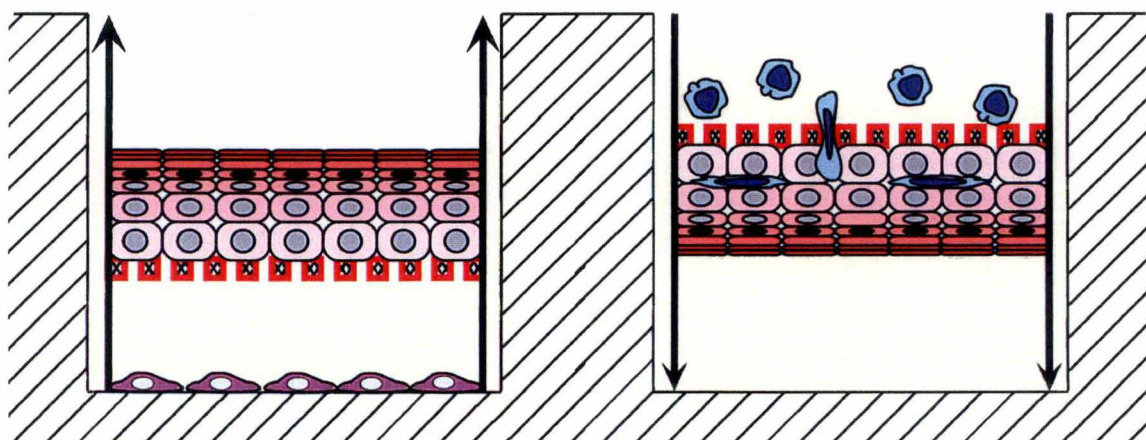


Figure R.12 : Schéma théorique montrant l'objectif à atteindre pour la migration des PBMC au sein de l'épiderme reconstitué in vitro après retournement de l'insert et transfert dans un puits sans 3T3.

La figure R.13 montre des leucocytes de part et d'autre de la membrane de polycarbonate. Dans ces conditions de co-culture, les lymphocytes stimulés à la PHA

(Phytohémagglutinine) ou stimulés à l'IL-2 témoignent d'une migration au travers de la membrane de polycarbonate et de l'épiderme reconstitué.

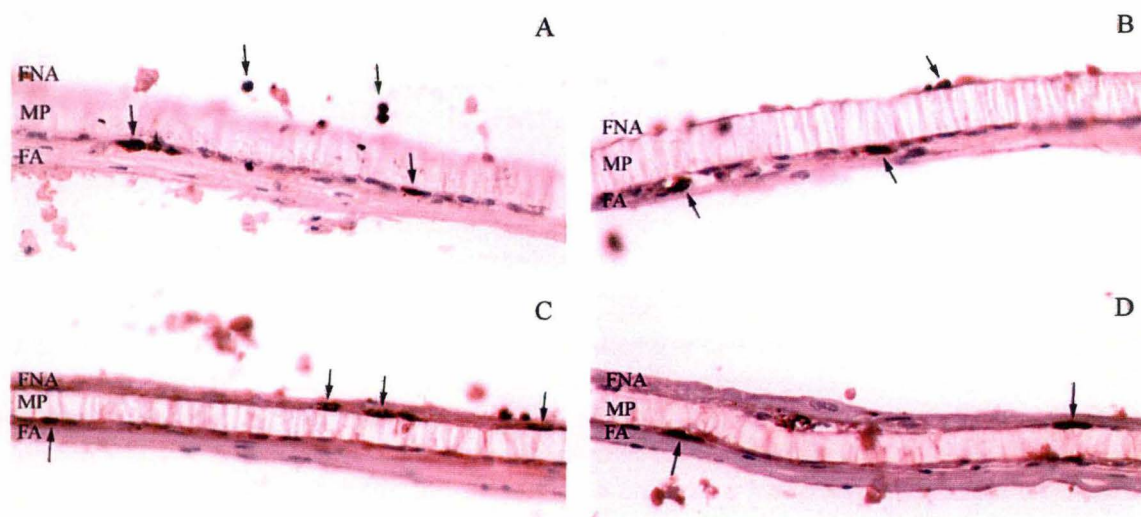


Figure R.13 : Marquage immunohistochimique (révélation à la DAB) du LCA sur une coupe à congélation d'un épiderme reconstitué pendant 14 jours en milieu KGM-2 / CaCl<sub>2</sub> / 3T3, et ayant accueilli sur la FNA de la membrane de polycarbonate pendant 48 heures 750.10<sup>3</sup> PBMC stimulés à l'IL-2 (30 U/ml) (A,B) ou à la PHA (5µg/ml) (C,D).

Il faut noter que dans ces expériences de co-culture, tant les cellules dendritiques que les lymphocytes sont hétérologues aux kératinocytes.

## 2. Modifications potentielles des molécules intervenant dans la présentation antigénique des kératinocytes

### 2.1. Expressions moléculaires phénotypique et génotypique

#### 2.1.1. Expression phénotypique des molécules ICAM-1 (CD54) et HLA-DR par les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$ et détectée par marquage immunofluorescent

La méthode a nécessité une mise au point des paramètres suivants : la concentration en IFN $\gamma$ , la densité de kératinocytes ensemencés sur les lamelles et le milieu utilisé.

##### 2.1.1.1. Concentration en IFN $\gamma$ .

Les kératinocytes sont cultivés en milieu KGM-2 sur des lamelles de verre carrées non traitées de 16 mm de côté déposées dans les puits d'une plaque à 12 puits (Falcon, 3043). Différentes concentrations en IFN $\gamma$  (150, 450 et 1000 U/ml) sont testées, afin d'optimiser la concentration en IFN $\gamma$  à utiliser lors des marquages en immunofluorescence.

La figure R.14 montre un décollement des kératinocytes de leur substrat au terme d'une incubation de 48 heures avec de l'IFN $\gamma$  à 450 U/ml et particulièrement à 10<sup>3</sup> U/ml. La concentration optimale relevée par ces expériences est de 150 U/ml en IFN $\gamma$ . A cette concentration, l'IFN $\gamma$  n'induit pas de changement morphologique des cellules et ne provoque pas leur décollement.

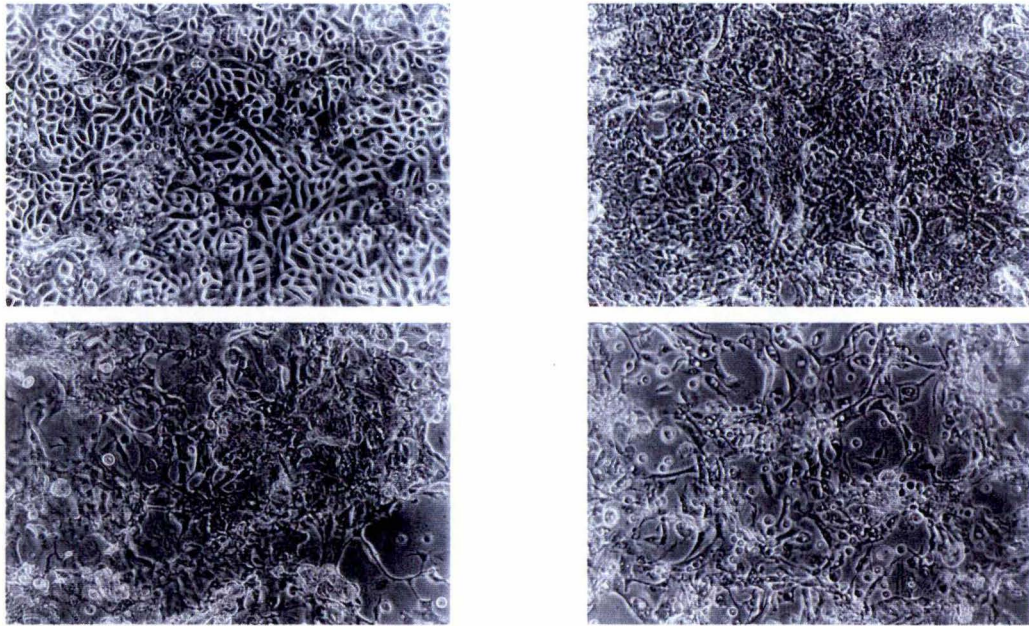


Figure R.14 : Observation de la morphologie des kératinocytes, cultivés en KGM-2, sur lamelles carrées, non stimulés (A) et stimulés pendant 48 heures à l'IFN $\gamma$  150 U/ml (B), 450 U/ml (C) et 10<sup>3</sup> U/ml (D).

#### 2.1.1.2. Milieux utilisés

Les kératinocytes sont cultivés en milieu KGM-2 classique ou en milieu KGM-2 sans EGF contenant 10% de FCS (KGM-2 – EGF + FCS) pendant 24 heures. Après 48 heures de stimulation à l'IFN $\gamma$  (150 U/ml), un marquage en immunofluorescence de la molécule HLA-DR est réalisé (Figure R.15).

Aucune différence flagrante de l'expression et de la localisation de la molécule HLA-DR n'est perçue entre les deux milieux de culture testés. Le marquage d'HLA-DR a une localisation périnucléaire, sans localisation membranaire évidente

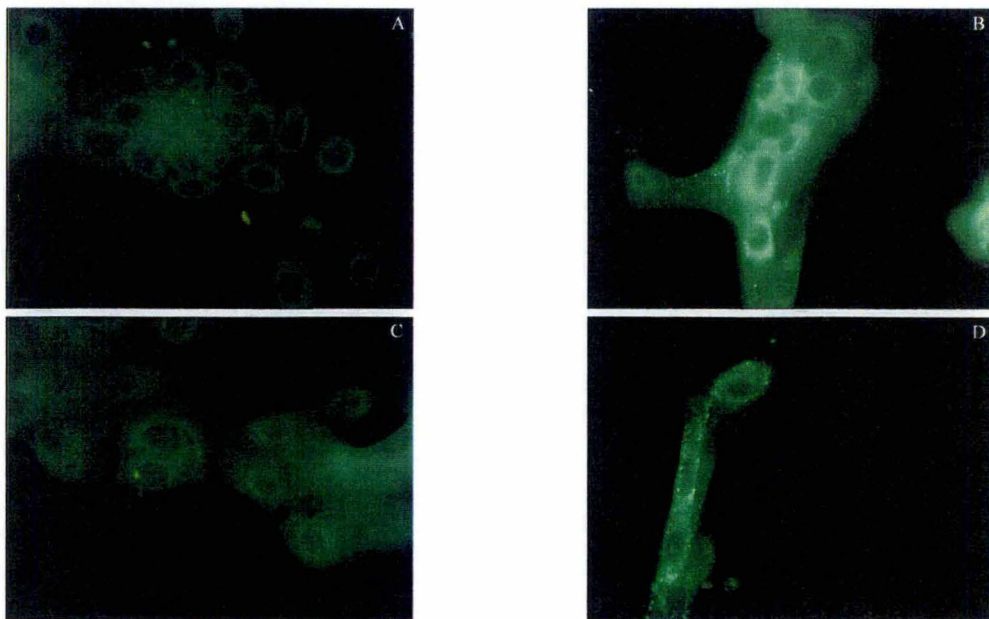


Figure R.15 : Marquage en immunofluorescence de l'antigène HLA-DR sur des kératinocytes stimulés (B,D) ou non (A,C) à l'IFN $\gamma$  (150 U/ml). Les milieux de culture sont le KGM-2 classique (A,B) ou KGM-2 - EGF + FCS (C,D).

### 2.1.1.3. Densité d'ensemencement des kératinocytes

Les kératinocytes sont ensemencés sur lamelles à différentes densités, allant de  $10^4$  à  $3.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. Ensemencés à haute densité ( $3.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>), les kératinocytes sont déjà confluents après 24 heures de culture. Ensemencés à faible densité ( $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>), les kératinocytes sont dispersés équitablement sur toute la surface de la lamelle après 24 heures de culture. A cette concentration, la stimulation à l'IFN $\gamma$  se fait sur des cellules non différenciées et se poursuit pendant 48 heures.

### 2.1.1.4. Marquages immunofluorescents réalisés dans différentes conditions

#### 2.1.1.4.1. Marquage des kératinocytes ensemencés à $3.10^4$ cellules/cm<sup>2</sup> et stimulés à l'IFN $\gamma$ (1000 U/ml)

Un marquage, concernant les molécules HLA-DR, ICAM-1, et la kératine 14 est réalisé sur des kératinocytes stimulés par l'IFN $\gamma$  à raison de 1000 U/ml pendant 48 heures (Figure R.16). Le marquage est observé en microscopie à fluorescence.

Le marquage montre une expression intense de la molécule ICAM-1 à la membrane des kératinocytes après stimulation à l'IFN $\gamma$ . Par contre, le marquage d'HLA-DR est faible et ne semble pas montrer d'expression membranaire de la molécule après stimulation.

Comme attendu, le marquage de la kératine 14 est identique en l'absence et en présence d'IFN $\gamma$ , la kératine 14 étant exprimée de façon constitutive et n'étant pas modulable par l'IFN $\gamma$ .

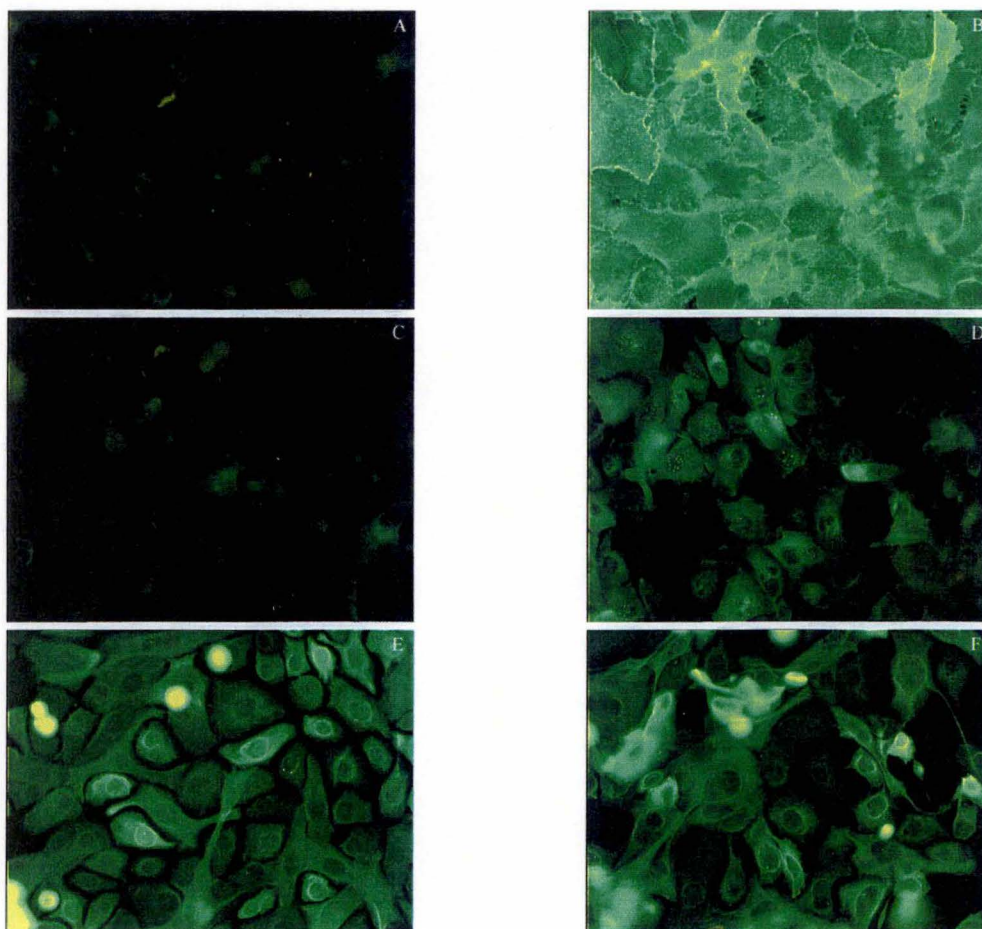


Figure R.16 : Etude en immunofluorescence des kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$  (B,D,F) ou non (A,C,E), marquage effectué pour ICAM-1 (A,B), HLA-DR (C,D) et la kératine 14 (E,F).

#### 2.1.1.4.2. Marquage des kératinocytes ensemencés à $10^4$ cellules/cm<sup>2</sup> et stimulés à l'IFN $\gamma$ (150 U/ml)

Un marquage des molécules HLA-DR et ICAM-1 est effectué après une stimulation des kératinocytes par de l'IFN $\gamma$  (150 U/ml) pendant 48 heures, les kératinocytes étant ensemencés à une densité de  $1.10^4$  cellules /cm<sup>2</sup> et cultivés en milieu KGM-2 (Figure R.17). Le marquage est observé en microscopie confocale.

La figure R.17 montre un marquage membranaire d'ICAM-1 à la surface des kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$ , tandis que le marquage de HLA-DR reste toujours périnucléaire, en l'absence d'expression membranaire évidente.

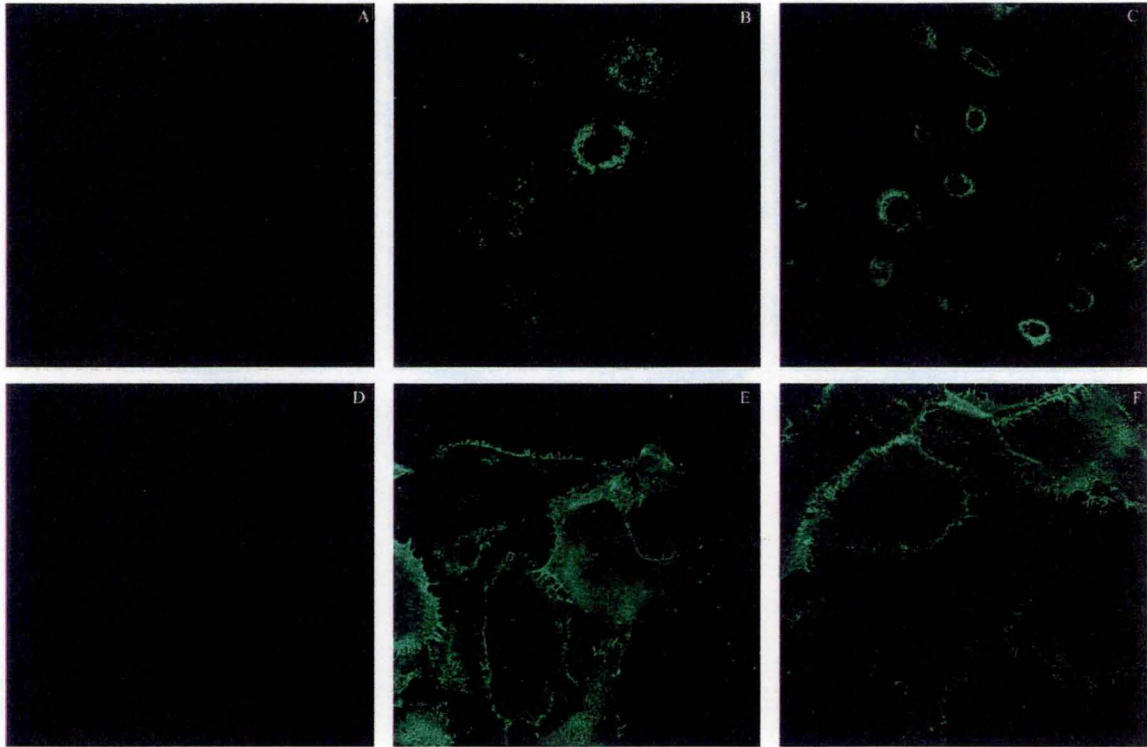


Figure R.17 : Marquage en immunofluorescence d'HLA-DR (A,B,C) et d'ICAM-1 (D,E,F) sur les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$  (150 U/ml) (B,C,E,F) ou non (A,D) pendant 48 heures.

#### 2.1.2. Expression phénotypique des molécules ICAM-1 et HLA-DR par les kératinocytes stimulés au PMA

##### 2.1.2.1. Influence du PMA sur la morphologie des kératinocytes en culture

Les kératinocytes incubés en présence de PMA acquièrent une morphologie distincte. Certains émettent de très longs prolongements formant un réseau, tandis que d'autres s'arrondissent et s'accrochent à ces prolongements. Un grand nombre de cellules se décolle du substrat laissant des plages libres (Figure R.18).

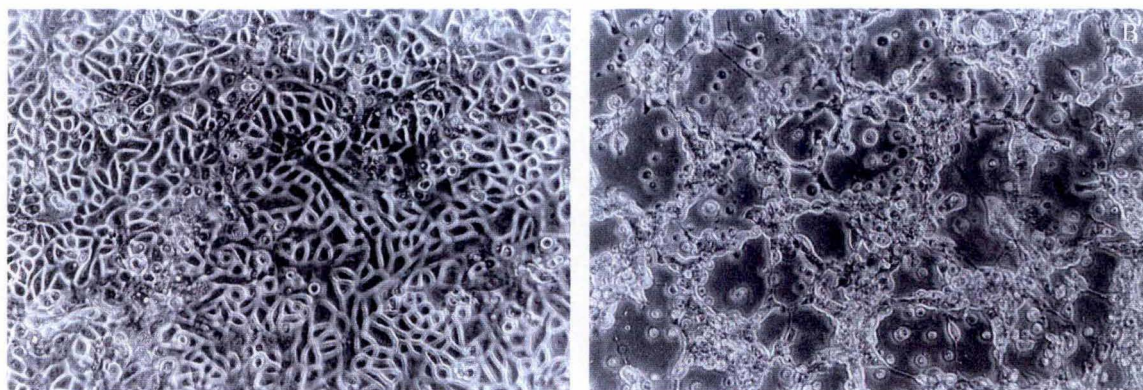


Figure R.18 : Morphologie des kératinocytes en culture incubés pendant 48 heures en présence de PMA (25 ng/ml) (B) ou non (A).

#### 2.1.2.2. Marquage en immunofluorescence des kératinocytes stimulés au PMA

Les kératinocytes sont ensemencés à faible densité ( $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) sur des lamelles en verre et cultivés en milieu KGM-2 pendant 24 heures. Les kératinocytes, à sous-confluence, sont stimulés au PMA (25 ng/ml) pendant 48 heures, après quoi un marquage en immunofluorescence d'HLA-DR et d'ICAM-1 est réalisé.

Nous obtenons un marquage membranaire de la molécule ICAM-1 après stimulation au PMA tandis que la molécule HLA-DR n'est pas exprimée par les kératinocytes stimulés au PMA (Figure R.19).

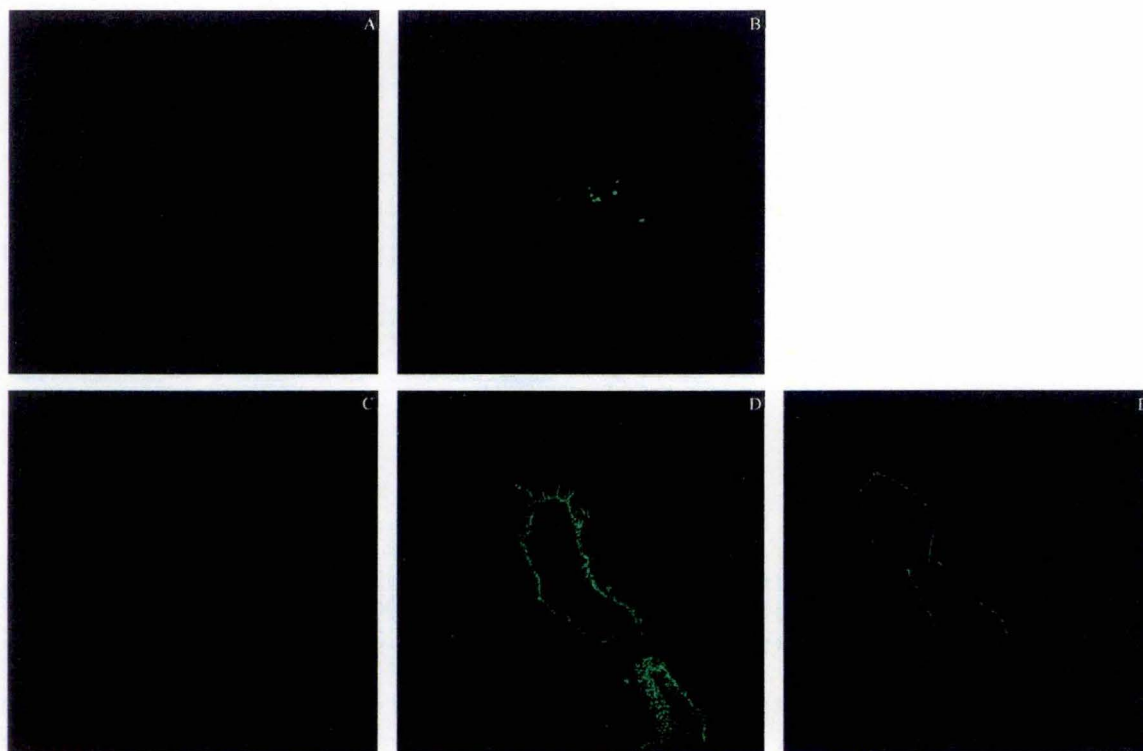


Figure R.19 : Marquage en immunofluorescence des molécules HLA-DR (A,B) et ICAM-1 (C,D,E) au niveau de kératinocytes stimulés (B,D,E) ou non (A,C) au PMA (25 ng/ml).



Ces expériences montrent une différence de localisation cellulaire d'ICAM-1 pour les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$  et au PMA. Les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$  montrent un marquage membranaire et cytoplasmique tandis que les kératinocytes stimulés au PMA montrent un marquage d'ICAM-1 préférentiellement membranaire (Figure R.20).

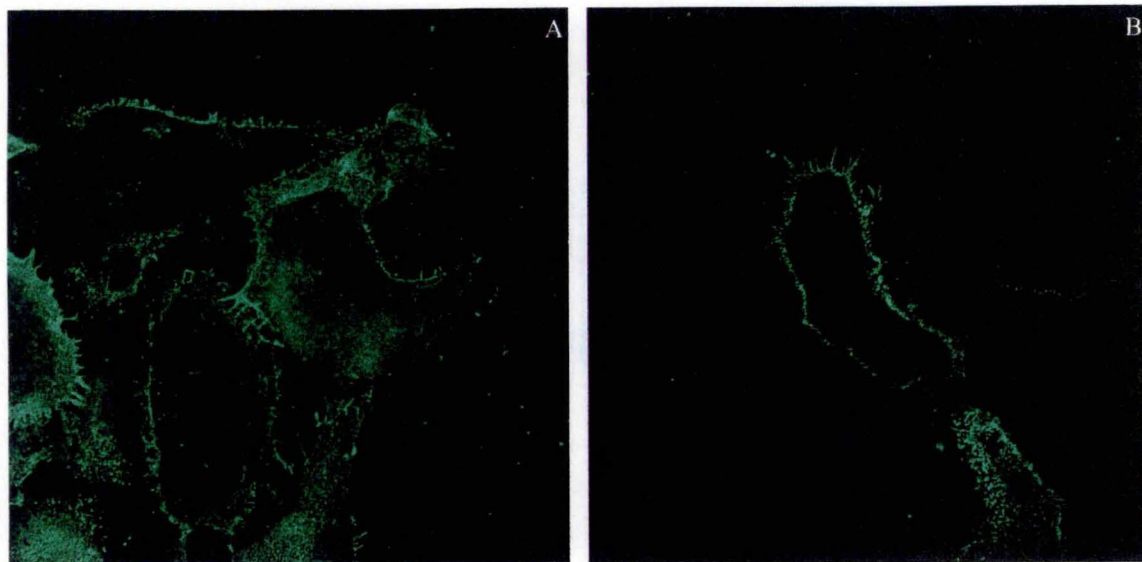


Figure R.20 : Comparaison des marquages en immunofluorescence d'ICAM-1 sur les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$  (A) ou au PMA (B).

### 2.1.3. Expression génotypique de HLA-DR par les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$ (RT-PCR)

Le but de cette expérience est de déterminer si l'ARNm de la molécule HLA-DR est synthétisé en réponse à la stimulation à l'IFN $\gamma$ . Etant donné qu'une quantification des signaux n'est pas nécessaire, vu que HLA-DR n'est pas exprimé de manière constitutionnelle par les kératinocytes, un nombre de cycles élevé (35) est utilisé afin d'obtenir un signal puissant d'ADN.

Les amorces pour la PCR répondent à des critères théoriques spécifiés : la taille de l'amorce doit être de 20 à 30 paires de bases, les nucléotides doivent être en proportion équivalente de A-T et de G-C, et l'amorce ne doit pas contenir de séquences propices à la formation de structures secondaires ou l'hybridation des amorces sens et anti-sens. Les amorces choisies reconnaissent une partie constante de la chaîne  $\alpha$  de l'HLA-DR, elles sont 5'-CGAGTTCTATCTGAATCCTG-3' pour l'amorce sens et 5'-GTTCTGCTGCATTGCTTTTGC-3' pour l'amorce anti-sens (Genosys). La taille de l'amplicon est de 650 bp (Chang *et al*, 1994).

Les kératinocytes sont cultivés en boîte de 175 cm<sup>2</sup> en milieu KGM-2. Une fois arrivés à sous-confluence, ils sont stimulés avec de l'IFN $\gamma$  (150 U/ml). L'ARNm est extrait de ces cellules 24 h, 48 h et 72 heures après stimulation. Une RT-PCR est réalisée sur ces échantillons et sur les contrôles (ARNm extrait de kératinocytes non stimulés) puis, une RT-PCR est réalisée. Les échantillons sont visualisés après électrophorèse en gel d'agarose sur un banc d'U.V. (Figure R.21).

L'analyse du gel confirme l'absence d'ARNm de la chaîne  $\alpha$  de HLA-DR en absence de stimulation par l'IFN $\gamma$  et montre la présence de cet ARNm après stimulation par IFN $\gamma$  (à 24h, 48h et 72h post stimulation).

Une expérience similaire a été réalisée après stimulation des kératinocytes par le PMA. Celle-ci n'a pas mis en évidence d'ARNm pour la chaîne  $\alpha$  de HLA-DR (non illustré), ce qui va dans le sens des tests phénotypiques.

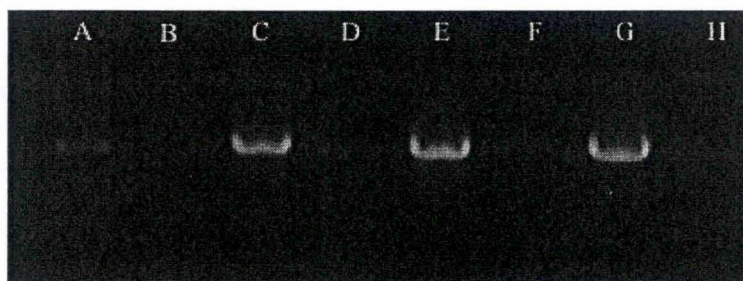


Figure R.21 : Détection de l'ARNm de la chaîne  $\alpha$  de HLA-DR par RT-PCR en réponse à la stimulation des kératinocytes par de l'IFN $\gamma$  (150 U/ml) après une incubation de 24 h (C), 48 h (E), 72 h (G). Les bandes B, D et F représentent des kératinocytes non stimulés et dont l'ARNm est extrait respectivement après 24 h, 48 h et 72 h. Le marqueur de poids moléculaire est donné à la piste A tandis que la piste H représente le contrôle interne de la PCR (sans polymérase).

## 2.2. Expression moléculaire fonctionnelle au travers d'une allostimulation primaire *in vitro*

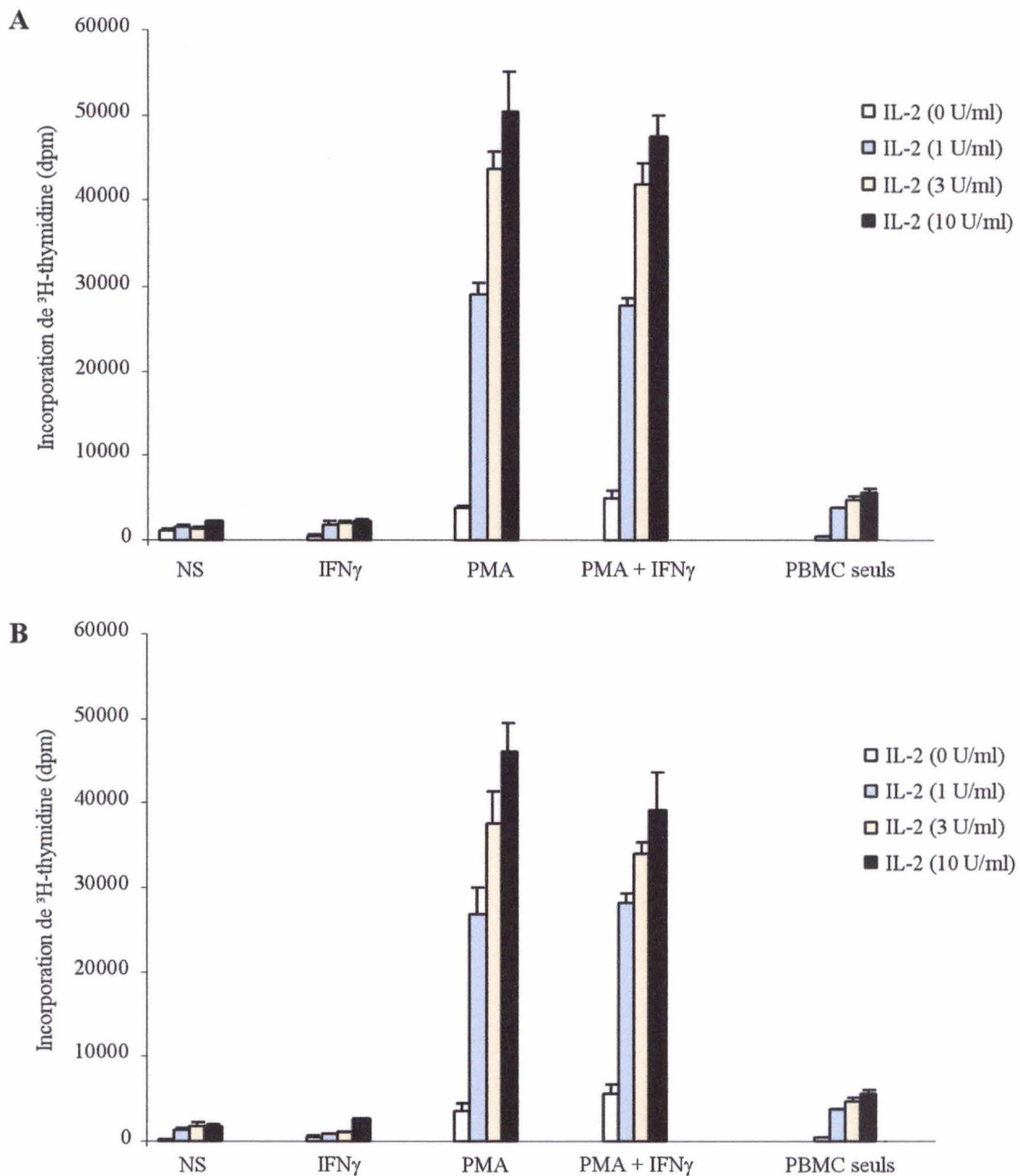
Les kératinocytes sontensemencés à une densité de  $9.10^3$  cellules/puits d'une plaque 96 puits à fond plat (Costar, 3596). Les kératinocytes sont cultivés pendant 5 jours en milieu KGM-2 et [KGM-2 - EGF + FCS]. Ils ne sont pas stimulés (NS) ou sont stimulés par ajout d'IFN $\gamma$  (150 U/ml), ou de PMA (25 ng/ml) ou d'IFN $\gamma$  (150 U/ml) associé au PMA (25 ng/ml) pendant 48 heures.

Les PBMC hétérologues sont isolés du sang périphérique par centrifugation sur gradient de sucrose. Plusieurs combinaisons hétérologues sont testées (co-culture de PBMC d'un donneur avec kératinocytes de plusieurs patients). Les PBMC sont alors déposés dans les puits contenant les kératinocytes rincés cinq fois, à raison de  $75.10^3$  PBMC/puits en milieu RPMI complet. Des concentrations croissantes d'IL-2 (0, 1, 3, 10 U/ml) sont ajoutées à la co-culture et celle-ci est poursuivie pendant 5 jours. Chaque condition expérimentale est menée en pentaplicat, les contrôles consistant en PBMC seuls et kératinocytes seuls (Figure R.22).

	Kératinocytes NS					Kératinocytes + IFN $\gamma$					PBMC seuls				
IL-2 (0 U/ml)	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤
IL-2 (1 U/ml)	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤
IL-2 (3 U/ml)	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤
IL-2 (10 U/ml)	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤
IL-2 (0 U/ml)	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤					
IL-2 (1 U/ml)	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤					
IL-2 (3 U/ml)	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤					
IL-2 (10 U/ml)	①	②	③	④	⑤	①	②	③	④	⑤					
	Kératinocytes + PMA					Kératinocytes + PMA + IFN $\gamma$									

Figure R.22 : Représentation de l'expérience de co-culture kératinocytes-PBMC.

Après 5 jours de co-culture, la thymidine tritiée est ajoutée à raison de  $1\mu\text{Ci}$  /puits et incubée pendant 18 heures. L'incorporation de la thymidine tritiée est mesurée par un compteur à scintillation liquide (Figure R.23).



**Figure R.23** Stimulation des PBMC par les kératinocytes.

Les kératinocytes,ensemencés à une densité de  $9.10^3$  cellules/puits dans une plaque de 96 puits à fond plat, sont non stimulés [NS] ou stimulés par ajout d'IFN $\gamma$  (150 U/ml) [IFN $\gamma$ ], de PMA (25 ng/ml) [PMA], ou d'IFN $\gamma$  (150 U/ml) et de PMA (25 ng/ml) [PMA + IFN $\gamma$ ] pendant 48 heures. Les kératinocytes sont cultivés en milieu [KGM-2 – EGF + FCS] (A) ou en milieu KGM-2 (B). Les kératinocytes sont rincés avant d'accueillir  $75.10^3$  PBMC/puits et des doses croissantes d'IL-2 (0,1,3 ou 10 U/ml). La co-culture est poursuivie pendant 5 jours, et la prolifération des PBMC est mesurée après incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine pendant 18 heures. Des PBMC non co-cultivés avec des kératinocytes sont inclus dans l'expérience [PBMC seuls].

L'étude statistique est réalisée en effectuant une Anova I suivi de Contrastes orthogonaux.

La co-culture de PBMC et de kératinocytes en conditions basales [non stimulés, NS] n'entraîne aucune prolifération des PBMC en allostimulation primaire. Il s'observe même une inhibition de l'effet de prolifération aspécifique lié à l'adjonction d'IL-2 [PBMC seuls] ( $p < 0,0005$  PBMC versus NS). Il n'existe pas de différence significative de prolifération des PBMC pour les kératinocytes non stimulés [NS] et stimulés à l'IFN $\gamma$  [IFN $\gamma$ ] en absence et en présence d'IL-2 à 10 U/ml ( $p < 0,0005$ ).

La co-culture de PBMC et de kératinocytes stimulés au PMA [PMA] et plus encore lorsqu'ils sont stimulés au PMA et à l'IFN $\gamma$  [PMA + IFN $\gamma$ ] montre des signes de stimulation primaire en l'absence d'IL-2 ( $p < 0,0005$  comparé au NS). Par contre, l'ajout d'IFN $\gamma$  ne stimule pas la prolifération des PBMC en présence de PMA.

L'adjonction d'IL-2 augmente de manière drastique la stimulation primaire et la réponse proliférative des PBMC, ne montrant plus, en présence d'IL-2, de différence entre les kératinocytes stimulés au PMA [PMA] ou au PMA associé à l'IFN $\gamma$  [PMA + IFN $\gamma$ ]. Les valeurs atteintes dans ces conditions dépassent de loin l'effet de prolifération aspécifique lié à l'adjonction d'IL-2 observée au niveau des PBMC seuls [PBMC seuls]. Les réponses observées sont similaires, que les kératinocytes aient été cultivés en KGM-2 classique ou en [KGM-2 -EGF + FCS].

Les observations sont identiques quels que soient les couples hétérologues lymphocytes répondeurs - kératinocytes stimulateurs testés (non illustré).

## **Discussion et perspectives**

Ce travail s'articule autour de deux objectifs : d'une part, la mise au point d'un modèle d'épiderme humain immunocompétent reconstitué in vitro et d'autre part, l'étude de la capacité de présentation antigénique des kératinocytes humains.

Le modèle vise à la reconstruction in vitro d'un épiderme immunocompétent stratifié et kératinisé accessible tant par sa face basale que par sa face apicale afin d'étudier les interactions leucocytes – kératinocytes – cellules dendritiques dans certaines conditions pathologiques comme la maladie du greffon contre l'hôte (GVDH) ou la dermatite allergique de contact mais afin également d'étudier la migration des cellules immunitaires entre les kératinocytes.

La littérature comporte plusieurs modèles épidermiques reconstitués in vitro notamment sur une membrane de polycarbonate portée par un insert, ces derniers nous ayant inspirés dans notre approche.

*Boyera et al, (1993)* ont étudié les interactions entre kératinocytes et lymphocytes, médiées par des facteurs solubles. Dans leur modèle, les kératinocytes sont cultivés sur une membrane de polycarbonate tandis que les lymphocytes reposent, à distance, sur le fond d'un puits de culture accueillant l'insert.

*Katz et al (1994)* ont étudié l'activité sécrétoire des kératinocytes cultivés sur une membrane de polycarbonate en milieu de Green et en présence d'un lit nourricier de 3T3 dans le fond du puits accueillant l'insert.

*Coquette et al (1999)* ont étudié la synthèse de cytokines par un épiderme reconstitué in vitro après exposition à des irritants cutanés et des agents chimiques sensibilisants. Il est à noter qu'ils ont utilisé des épidermes reconstitués d'origine commerciale (SkinEthic).

Ces différents modèles ne satisfont pas notre objectif. Il nous est nécessaire, outre l'obtention d'un épiderme reconstitué sur la face adhérente de la membrane de polycarbonate (FA) de pouvoir, d'une part retourner l'insert afin de déposer les cellules immunocompétentes sur la face non adhérente de la membrane de polycarbonate (FNA) et, d'autre part, travailler dans des conditions de culture les moins immunogènes possibles. Nous avons donc développé notre propre modèle de culture pour lequel nous utilisons un cylindre évidé en teflon dans lequel est introduit un insert comprenant une membrane de polycarbonate criblée de pores de 3 µm de diamètre. Les kératinocytes sont cultivés sur la membrane de polycarbonate (FA) en milieu KGM-2 suppléé de calcium, l'insert étant maintenu dans un puits de culture contenant des 3T3. La culture des kératinocytes en immersion pendant 7 jours, suivis de 7 jours de culture en interface air-liquide induit une différenciation complète des kératinocytes qui forment alors un épiderme reconstitué. L'insert est alors transféré dans un puits de culture sans 3T3, est retourné et la FNA accueille les cellules immunocompétentes (cellules dendritiques ou PBMC).

La méthode de Rheinwald et Green (*Rheinwald et al, 1974*), classiquement utilisée pour induire la stratification ne convient pas à notre modèle car le milieu contient du sérum de veau fœtal et de la toxine cholérique. Nous avons opté pour le milieu KGM-2, couramment utilisé pour la culture primaire des kératinocytes mais dans lequel les kératinocytes ne se stratifient pas. *Pittelkow et al (1995)* ont montré qu'un ajout de calcium dans le KGM-2 pour atteindre la concentration de 1,5 mM entraîne une stratification des kératinocytes. Si le milieu de culture KGM-2 est plus "propre" d'un point de vue immunologique (absence de FCS et de toxine cholérique) que le milieu de Green, il contient toutefois de l'extrait de glande pituitaire bovin (BPE) qu'il serait

intéressant, dans le futur, d'éluder. La kératinisation de l'épiderme stratifié est réalisée par passage en interface air-liquide (*Prunérias et al, 1983*).

Les cellules 3T3 accélèrent la croissance des kératinocytes grâce à leur sécrétion de FGF-7 (Fibroblast Growth Factor-7), qui n'est autre que le KGF (Keratinocyte Growth Factor) (*Brauchle et al, 1994*). Les 3T3 sont d'origine murine, xénostimulants pour les lymphocytes humains, et sont donc pour cette raison cultivés dans le fond du puits comme l'ont déjà réalisé *Katz et al (1994)*. Cette approche évite le mélange des 3T3 murins et des kératinocytes humains et permet le transfert de l'épiderme reconstitué dans un puits dépourvu de 3T3. Dans ces conditions, la co-culture kératinocytes-leucocytes-cellules dendritiques peut se dérouler en absence de 3T3.

Nous avons constaté, de manière fortuite, que la présence des 3T3 entraîne la migration des kératinocytes, à travers la membrane de polycarbonate, de la FA vers la FNA. Or, dans notre modèle de co-culture, il est impératif que la FNA soit libre afin que les cellules immunocompétentes déposées sur celles-ci pénètrent l'épiderme par sa couche basale. Pour empêcher la migration des kératinocytes à travers la membrane de polycarbonate, l'emploi d'une membrane de polycarbonate microperforée, dont le diamètre des pores serait moindre (0,4  $\mu\text{m}$ ) est à envisager. Tout en empêchant la migration des kératinocytes, cette membrane microperforée doit cependant permettre le passage des cellules immunocompétentes au travers de ses pores.

La migration des kératinocytes sous l'action d'un facteur soluble sécrété par les 3T3 et la colonisation de la FNA de la membrane de polycarbonate ouvre de nouveaux champs d'étude. Le modèle peut être utilisé pour étudier la motilité des kératinocytes sous l'influence de diverses substances ajoutées au milieu de culture. Le comptage (Logiciel AnalySIS) des pores libres de la FNA, visualisés en microscopie à balayage fournit une bonne estimation de la motilité cellulaire ; la technique est simple. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer quel(s) facteur(s) soluble(s) produit(s) par les 3T3 aurai(en)t des propriétés sur la motilité des kératinocytes. Le FGF-7 est un candidat potentiel. L'ajout d'anticorps dirigés contre le FGF-7 permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Dans la seconde alternative, le facteur de migration serait à mettre en évidence.

Lors d'expériences de co-culture, nous avons obtenu une migration de PBMC stimulés à l'IL-2 ou à la PHA au travers des couches épidermiques de la FNA, de la membrane de polycarbonate et de l'épiderme reconstitué. La migration de PBMC à travers l'épiderme ne semble pas poser de problèmes dans nos conditions de culture. En particulier, cette migration ne semble pas affectée par l'occupation des pores de la membrane de polycarbonate par les kératinocytes migrants de la FA vers la FNA.

Par contre, les cellules dendritiques immatures ( $\text{CD1a}^+/\text{CD14}^-$ ) n'ont pas migré dans nos conditions de culture. La question est de savoir si l'absence de migration des cellules dendritiques est due à la présence des couches cellulaires formées sur la FNA par des kératinocytes migrants ou aux conditions de culture.

Toutefois, l'épiderme peut être chargé de cellules dendritiques in vitro. Des précurseurs  $\text{CD34}^+$  peuvent êtreensemencés et cultivés directement après un mélange avec les kératinocytes (*Régnier et al, 1997*) sur la FA. L'ajout d'IL-4 et de  $\text{TNF}\alpha$  dans le milieu de culture induit une différenciation des précurseurs  $\text{CD34}^+$  en cellules dendritiques. Ce modèle constitue une alternative mais ne reproduit la migration physiologique des cellules dendritiques dans l'épiderme de la couche basale.

Notre modèle de co-culture pourrait permettre l'étude de pathologies cutanées à composante immunitaire (GVHD et dermatite allergique de contact) ainsi que des études plus fondamentales sur les migrations cellulaires. Il associe les trois acteurs présumés de la GVHD : d'une part, un épiderme chargé de cellules dendritiques reconstitué *in vitro* et d'autre part des lymphocytes T hétérologues. Pour reproduire la GVHD *in vitro*, une stimulation préalable des lymphocytes par des cellules autologues aux kératinocytes de l'épiderme reconstitué doit être effectuée. Cette stimulation vise à induire une population de lymphocytes T alloréactifs à mémoire dont nous pourrions étudier le comportement *in vitro*, au contact de l'épiderme reconstitué. L'allostimulation des lymphocytes par des kératinocytes est une alternative sans doute plus complexe que la stimulation par des lymphocytes allogéniques immortalisés par l'EBV.

Notre modèle pourrait être également exploité pour l'étude des mécanismes immunotoxicologiques mis en jeu lors de la dermatite allergique de contact. Un contact de l'agent allergisant avec la couche cornée de l'épiderme déclencherait la capture de l'antigène par la cellule dendritique (et par les kératinocytes?) et la migration de la cellule dendritique en cours de maturation vers les couches inférieures de l'épiderme, voire vers la FNA où l'attendraient des lymphocytes naïfs.

Notre modèle permettrait aussi l'étude de la capacité migratoire des cellules dendritiques et des lymphocytes à travers l'épiderme, avec une attention toute particulière pour le passage des barrières intercellulaires constituées par les desmosomes. Pour progresser au sein de l'épiderme, la cellule dendritique diminue son expression de la cadhérine E afin de libérer son ancrage aux kératinocytes (*Tang et al, 1993*), mais elle doit également dissocier les desmosomes cimentant les kératinocytes les uns aux autres, ce mécanisme n'étant pas encore élucidé.

Le deuxième thème abordé dans ce travail est l'étude de la capacité de présentation antigénique des kératinocytes. Le but poursuivi est l'induction d'une allostimulation primaire des lymphocytes par les kératinocytes *in vitro* (MLKC). Pour ce faire, les kératinocytes doivent exprimer en membrane, au minimum, les molécules de classe II et, de manière plus accessoire ICAM-1 (CD54). Dans l'absolu, il leur est impossible de générer une allostimulation sans l'expression de CD80 ou CD86, molécules qu'ils semblent incapables d'exprimer à leur surface. Nous avons tenté de court-circuiter l'engagement de CD28 (par CD80 et CD86) par l'adjonction d'IL-2 recombinante à la MLKC.

Nous avons étudié d'une part l'expression phénotypique des molécules HLA-DR et ICAM-1 par les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$  et au PMA, et d'autre part, la stimulation primaire des PBMC par les kératinocytes non stimulés ou stimulés à l'IFN $\gamma$  et/ou au PMA (MLKC).

A l'état basal, le kératinocyte n'exprime pas les molécules de classe II indispensables à l'allostimulation primaire de lymphocytes. Une stimulation des kératinocytes par l'IFN $\gamma$  induit l'expression membranaire des molécules de classe II (*Griffith et al, 1989*) et d'ICAM-1 (*Dustin et al, 1988*). Dans nos conditions de culture, l'expression phénotypique de HLA-DR (immunofluorescence) par les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$  est caractérisée par un marquage périmoléculaire, mais apparemment non membranaire. Le marquage en immunofluorescence d'ICAM-1 est quand à lui membranaire, comme l'ont démontré *Dustin et al (1988)*.

La raison pour laquelle HLA-DR n'est pas exprimée à la membrane dans nos conditions n'est pas élucidée. Une étude du compartiment des molécules de classe II au sein des



kératinocytes traités à l'IFN $\gamma$  dans nos conditions de culture offrira peut-être des éléments de réponse.

Le traitement de kératinocytes par le PMA induit, entre autres, l'expression membranaire d' ICAM-1 mais pas des molécules HLA. Cependant, et de manière encore non expliquée, les kératinocytes traités par le PMA s'avèrent capables de stimuler les lymphocytes, autologues ou hétérologues, par un mécanisme dépendant d'ICAM-1 et indépendant des HLA (*Simon et al, 1991*). Dans nos conditions de culture, l'étude en immunofluorescence de HLA-DR et d' ICAM-1 sur les kératinocytes stimulés au PMA montre une expression membranaire d' ICAM-1 mais pas d'expression d'HLA-DR.

Nous constatons une différence de localisation d' ICAM-1 au niveau des kératinocytes stimulés pendant 48 heures à l'IFN $\gamma$  ou au PMA. ICAM-1 est exprimée essentiellement à la membrane des kératinocytes stimulés au PMA, tandis qu'une localisation membranaire et cytoplasmique est observée pour les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$ . Nous n'avons pas encore d'explications à ce sujet. Des expériences préliminaires (dont les résultats n'ont pas été illustrés), montrent un pouvoir d'agglutination lymphocytaire très marqué des kératinocytes traités au PMA mais non rencontré après traitement par l'IFN $\gamma$ . Il serait intéressant d'établir l'éventuelle participation d'ICAM-1 dans ce processus.

Plusieurs études ont montré que les kératinocytes stimulés à l'IFN $\gamma$  sont incapables d'induire in vitro une allostimulation lymphocytaire primaire, mais peuvent induire une allostimulation secondaire (*Niederwieser et al, 1988 ; De Bueger et al, 1990 ; Symington et al, 1990 ; Mutis et al, 1993*). Cette incapacité est classiquement attribuée à l'impossibilité pour les kératinocytes d'exprimer CD80 ou CD86. La liaison des molécules CD80 et CD86 à leur récepteur lymphocytaire CD28 stimule la transcription du gène lymphocytaire de l'IL-2 qui se fixe sur son récepteur de façon paracrine et autocrine et déclenche la prolifération clonale lymphocytaire T. Afin de contourner l'absence des molécules CD80 et CD86, nous avons ajouté de l'IL-2 recombinante à la MLKC. Les résultats obtenus lors de nos MLKC montrent une absence de stimulation primaire lymphocytaire par des kératinocytes en conditions basales ou stimulés à l'IFN $\gamma$ , même lors d'ajout d'IL-2 recombinante. Il faut ajouter que des PBMC cultivés sans kératinocytes, en présence d'IL-2, montrent un certain degré de prolifération aspécifique connu, lié en partie à la réponse de cellules NK et LAK à l'IL-2.

A la lecture de ces trois résultats, deux questions peuvent être posées :

Les kératinocytes exercent-ils un effet inhibiteur sur la réponse proliférative (même aspécifique) des PBMC à l'IL-2? L'induction de l'expression de HLA-DR est-elle suffisante ou optimale dans nos conditions de culture pour induire une allostimulation lymphocytaire?

L'effet inhibiteur des kératinocytes sur la réponse proliférative des PBMC à l'IL-2 pourrait être expliquée par une consommation accrue du milieu en leur présence, ou par la production de cytokines (IL-10 + IL-4) provoquant une déviation Th2 (*Goodman et al, 1994*) voire une extinction de la réponse immunitaire (*Nickoloff et al, 1994*). La production par les kératinocytes de TGF $\beta$  et de PGE2 pourrait également paralyser la réponse immunitaire (*Laning et al, 1997*). Les hypothèses liées à la production de molécules immunosuppressives par les kératinocytes pourraient être testées par l'adjonction à la MLKC, d'anticorps dirigés contre l'IL-10 ou le TGF $\beta$ , ainsi que l'adjonction d' Indométhacine.

Plusieurs hypothèses pourraient être avancées pour expliquer l'absence d'alloréaction lymphocytaire face aux kératinocytes traités par l'IFN $\gamma$ , y compris celles développées ci-dessus. Nous privilégeons cependant celle d'une induction inappropriée de HLA-DR dans nos conditions eu égard à la localisation essentiellement (exclusivement ?) cytoplasmique de la molécule. Il serait nécessaire d'aborder de manière plus fine le degré d'expression membranaire de HLA-DR au niveau des kératinocytes traités à l'IFN $\gamma$ .

La stimulation préalable des kératinocytes par le PMA, en absence d'IL-2, induit une prolifération des PBMC significativement plus élevée que celle obtenue lorsque les kératinocytes ne sont pas stimulés. Cette constatation confirme les observations de *Simon et al (1991)*. L'explication de cette réponse n'est à ce jour pas connue. *Augustin et al (1993)* y ont vu l'expression induite par le PMA d'une molécule apparentée à CD80. Ceci a été clairement infirmé par *Freeman et al (1998)* et par d'autres groupes. Les hypothèses ne manquent pas comme la production par le kératinocyte de cytokines immunostimulantes, une expression particulière d'ICAM-1 par le kératinocyte ou l'expression d'une molécule membranaire encore non connue. Une seule chose est certaine : la stimulation des lymphocytes en présence de kératinocytes stimulés au PMA n'est pas liée à l'expression des molécules HLA de classe II et est partiellement dépendante de l'expression d'ICAM-1, par le kératinocyte (*Simon et al, 1991*). Nos expériences démontrent en outre l'effet de potentialisation majeur de la réponse lymphocytaire proliférative aux kératinocytes traités par la PMA, suite à l'adjonction d'IL-2 recombinante à des doses même très faibles. Cette constatation, encore inexplorée, permettra peut-être de mieux répondre aux questions posées quant à l'effet de potentialisation immunologique du PMA sur les kératinocytes.

# **Bibliographie**

**Albanesi C., Cavani A. and Girolomoni G.** Interferon- $\gamma$ -stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *J. Invest. Dermatol.* 110: 138-142, **1998**

**Aractingi S., Chosidow O.** Cutaneous graft-versus-host disease. *Arch. Dermatol.* 134: 602-612, **1998**

**Augustin M., Dietrich A., Niedner R., Kapp A., Shöpf E., Ledbetter J., Brady W., Linsley P. and Simon J.** Phorbol-12-Myristate-13-acetate-treated human keratinocytes express B7-like molecules that serve a costimulatory role in T-cell activation. *J. Invest. Dermatol.* 100: 275-281, **1993**

**Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B. and Palucka K.** Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811, **2000**

**Basham T., Nickoloff B.J., Merigan T. and Morhenn V.** Recombinant gamma interferon induces HLA-DR expression on cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 83: 88-90, **1984**

**Boyce S.T. and Ham R.G.** Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* 81 : 33s-40s, **1983**

**Boyera N., Cavey D., Delamadeleine F., Bouclier M., Hensby C. and Shroot B.** A novel in vitro model for the study of human keratinocyte/leucocyte interactions under autologous conditions. *Br. J. Dermatol.* 129: 521-529, **1993**

**Brauchle M., Angermeyer K., Hubner G., Werner S.** Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene* 9: 3199-3204, **1994**

**Chang CH., Fontes J., Peterlin M. and Flavell R.** Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J. Exp. Med.* 180: 1367-1374, **1994**

**Coquette A., Berna N., Vandenbosch A., Rosdy M., Poumay Y.** Differential Expression and Release of Cytokines by an *In Vitro* Reconstructed human Epidermis Following Exposure to Skin Irritant and Sensitizing Chemicals. *Toxicology in Vitro* 13 867-877, **1999**

**Coulomb B., Saiag P., Bell E., Breitburd F., Lebreton C., Heslan M. and Dubertret L.** A new method for studying epidermalization *in vitro*. *British Journal of Dermatology* 114, 91-101, **1986**

**Csato M., Bozoky M., Hunyadi J., Dobozy A.** *Candida albicans* phagocytosis by separated human epidermal cells. *Arch. Dermatol. Res.* 279: 136-139, **1986**

**De Bueger M., Van Els C., Kempenaar J., Ponc M. and Goulmy E.** A new sensitive assay for measurement of cell-mediated cytotoxicity to intact layers of cultured human keratinocytes. *J. Immunol. Methods* 127: 117-122, 1990

**Démarchez M., Asselineau D. and Czernielewski J.** Migration of Langerhans cells into human epidermis of "reconstructed" skin, normal skin, or healing skin, after grafting onto the nude mouse. *J. Invest. Dermatol.* 100: 648-652, 1993

**Denfeld R., Hollenbaugh D., Fehrenbach A., Weiss J., von Leoprechting A., Mai B., Voith U., Schöpf E., Aruffo A., and Simon J.** CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. *Eur. J. Immunol.* 26: 2329-2334, 1996

**Dustin M.L., Singer K.H., Tuck D.T., Springer T.A.** Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by intrferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Exp Med*, 167 : 1323-1340, 1988.

**Enk A., Katz S.** Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J. Immunol.* 149: 92-95, 1992

**Freeman G., Cardoso A., Boussiotis V., Anumanthan A., Groves R., Kupper T., Clark E. and Nadler L.** The BB1 monoclonal antibody recognizes both cell surface CD74 (MHC class II-associated invariant chain) as well as B7-1 (CD80), resolving the question regarding a third CD28/CTLA-4 counterreceptor. *J. Immunol.* 161: 2708-2715, 1998

**Gaspari A., Ferbel B., Chen Z., Razvi F. and Polakowska R.** Accessory and alloantigen-presenting cell functions of A431 keratinocytes that stably express the B7 antigen. *Cell. Immunol.* 149: 291-302, 1993

**Gaspari A., Burns R., Nasir A., Ramirez D., Barth R. and Haidaris C.** CD86 (B7-2), but not CD80 (B7-1), expression in the epidermis of transgenic mice enhances the immunogenicity of primary cutaneous candida albicans infections. *Infect. Immun.* 66: 4440-4449, 1998

**Gilliam A., Whitaker-Menezes D., Korngold R. and Murphy G.** Apoptosis is the predominant form of epithelial target cell injury in acute experimental graft-versus-host disease. *J. Invest. Dermatol.* 107: 377-383, 1996

**Goodman R., Nestle F., Naidu Y., Green J., Thompson C., Nickoloff B.J. and Turka L.** Keratinocyte-derived T cell costimulation induces preferential production of IL-2 and IL-4 but not IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 152: 5189-5198, 1994

**Griffiths C., Voorhees J. and Nickoloff B.J.** Gamma interferon induces different keratinocyte cellular patterns of expression of HLA-DR and DQ and intercellular adhesion molecule-I (ICAM-I) antigens. *Br. J. Dermatol.* 120: 1-8, 1989

**Grousson J., Concha M., Schmitt D., Péguet-Navarro J.** Effects of CD40 ligation on human keratinocyte accessory function. *Arch. Dermatol. Res.* 290: 325-330, 1998

**Grousson J., Ffrench M., Concha M., Schmitt D. and Péguet-Navarro J.** CD40 ligation alters the cell cycle of differentiating keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 114: 581-586, **2000**

**Hessel H., Mittermüller J., Zitzelsberger H., Weier H.U., Bauchinger M.** Combined immunophenotyping and FISH with sex chromosome-specific DNA probes for the detection of chimerism in epidermal Langerhans cells after sex-mismatched bone-marrow transplantation. *Histochem. Cell. Biol.* 106: 481-485, **1996**

**Hubert P., van den Brûle F., Giannini S., Franzen-Detrooz E., Boniver J. and Delvenne P.** Colonization of in vitro-formed cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions with dendritic cells. Role of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Am. J. Pathol.* 154: 775-784, **1999**

**Jerome K., Conyers S., Hansen D. and Zebala J.** Keratinocyte apoptosis following bone marrow transplantation: evidence for CTL-dependent and -independent pathways. *Bone Marrow Transplant.* 22: 359-366, **1998**

**Katz A. and Taichman L.** Epidermis as a secretory tissue: an in vitro tissue model to study keratinocyte secretion. *J. Invest. Dermatol.* 102: 55-60, **1994**

**Kondo S., Jimbow K.** Dose-dependant induction of IL-12 but not IL-10 from human keratinocytes after exposure to ultraviolet light A. *J. Cell. Physiol.* 177: 493-498, **1998**

**Laning J., Isaacs C., Hardin-Young J.** Normal human keratinocytes inhibit the proliferation of unprimed T cells by TGFbeta and PGE2, but not IL-10. *Cell. Immunol.* 175: 16-24, **1997**

**Lenschow D., Walunas T. and Bluestone J.** CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 233-258, **1996**

**Leung D., Hauk P., Strickland I., Travers J., Norris D.** The role of superantigens in human diseases: therapeutic implications for the treatment of skin diseases. *Br. J. Dermatol.* 139: S17-S29, **1998**

**Lonati A., Mommaas M., Pasolini G., Lavazza A., Vermeer B., De Panfilis G.** Keratinocytes resident in normal human skin constitutively express, at low levels, the intercellular adhesion molecule-1. An in situ immunoelectronmicroscopy study. *Br. J. Dermatol.* 135: 32-35, **1996**

**Lukas M., Stössel H., Hefel L., Imamura S., Fritsch P., Sepp N., Schuler G. and Romani N.** Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessels in a skin organ culture model. *J. Invest. Dermatol.* 106: 1293-1299, **1996**

**Macatonia S., Knight S., Andrew J., Griffiths S. and Fryer P.** Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J. Exp. Med.* 166: 1654-1667, **1987**

**Morhenn V. and Wood G.** Gamma interferon-induced expression of class II major histocompatibility complex antigens by human keratinocytes. Effects of conditions of culture. *Ann. NY Acad. Sci.* 548: 321-330, **1988**

**Mutis T., De Bueger M., Bakker A. and Ottenhoff T.** HLA class II<sup>+</sup> human keratinocytes present mycobacterium leprae antigens to CD4<sup>+</sup> Th1-like cells. *Scand. J. Immunol.* 37: 43-51, **1993**

**Nickoloff B.J., Turka L.** Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol. Today* 10: 464-469, **1994**

**Nickoloff B.J., Turka L., Mitra R. and Nestle F.** Direct and indirect control of T-cell activation by keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 105: 25S-29S, **1995**

**Nickoloff B.J., Turka L.** Keratinocytes and the danger model. *Science* 273: 1479-1480, **1996**

**Niederwieser D., Auböck J., Troppmair J., Herold M., Shuler G., Boeck G., Lotz J., Fritsch P. and Huber C.** IFN-mediated induction of MHC antigen expression on human keratinocytes and its influence on in vitro alloimmune response. *J. Immunol.* 140: 2556-2564, **1988**

**Otten H., Bor B., Ververs C., Verdonck F., De Boer M. and De Gast G.** Alloantigen-specific T-cell anergy induced by human keratinocytes is abrogated upon loss of cell-cell contact. *Immunology* 88: 214-219, **1996**

**Poumay Y. and Pittelkow M.R.** Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J. Invest. Dermatol.* 104 :271-276, **1995**

**Pruniéras M., Régnier M. and Woodley D.** Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* 81 :28s-33s, **1983**

**Régnier M., Staquet M.J., Schmitt D. and Schmidt R.** Integration of Langerhans cells into pigmented reconstructed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 109: 510-512, **1997**

**Revillard J-P.** Immunologie. *De Boeck & Larcier*, 3<sup>e</sup> édition, **1998**

**Rheinwald J.G. and Green H.** Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, Vol. 6, 331-344, November **1975**

**Robert C. and Kupper T.** Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N. Engl. J. Med.* 341: 1817-1828, **1999**

**Rosdy M. and Clauss L-C.** Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* 95: 409-414, **1990**

**Rubin E., Farber J.L.** Pathology. *J.B.Lippincott Company, 2<sup>e</sup> édition, 1994*

**Saitoh A., Osada A., Kitajima Y., Furue M. and Tamaki K.** Interferon- $\gamma$ -induced HLA-DR, but not ICAM-1, expression of human keratinocytes is down-regulated by calmodulin antagonist. *J. Dermatol. 21: 716-719, 1994*

**Schaller M., Korting H., Schmid M.** Interaction of cultured human keratinocytes with liposomes encapsulating silver sulphadiazine: proof of the uptake of intact vesicles. *Br. J. Dermatol. 134: 445-450, 1996*

**Simon J., Cruz P., Bergstresser P., Davis L. and Tigelaar R.** Phorbol myristate acetate-activated keratinocytes stimulate proliferation of resting peripheral blood mononuclear lymphocytes via a MHC-independent, but protein kinase C- and intercellular adhesion molecule-1-dependent, mechanism. *J. Immunol. 146: 476-484, 1991*

**Skov L., Baadsgaard O.** Bacterial superantigens and inflammatory skin diseases. *Clin. Exp. Dermatol. 25: 57-61, 2000*

**Suzuki H., Wang B., Shivji G., Toto P., Amerio P., Tomai M., Miller R. and Sauder D.** Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol. 114: 135-141, 2000*

**Stevens A. and Lowe J.** Human histology. *Mosby, 2<sup>e</sup> édition 1997*

**Symington F. and Santos E.** Recognition of keratinocytes by cytotoxic T cells specific for conventional HLA class-I alloantigen. *J. Invest. Dermatol. 95: 224-228, 1990*

**Tang A., Amagai M., Granger L., Stanley J. and Udey M.** Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature 361: 82-85, 1993*

**Turley S., Inaba K., Garrett W., Ebersold M., Unternaehrer J., Steinman R., Mellman I.** Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science 288: 522-527, 2000*

**van Dijk A., Otten H., Vercauteren S., Kessler F., de Boer M., Verdonck L. and de Gast G.** Human B7-1 is more efficient than B7-2 in providing co-stimulation for alloantigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol. 26: 2275-2278, 1996*

**Yawalkar N., Limat A., Brand C., Braathen L.** Constitutive expression of both subunits of interleukin-12 in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol. 106: 80-83, 1996*