

ETUDE DU PHENOTYPE CD4 DE LA CELLULE DENDRITIQUE SPLENIQUE DU RAT SAIN EN FONCTION DE L'AGE

DASSE S. R.³, N'GUESSAN K.³, AKRE D.P.³, SOMBO M. F.¹, JAMAL K.²

RESUME

La cellule dendritique, clé de l'induction de l'immunité adaptative, est identifiée chez le rat par l' α -intégrine CD103 reconnu par l'anticorps OX62. Selon l'expression du marqueur CD4, on lui décrit deux sous populations cellulaires dont les fonctions dans la régulation des réponses immunes sont diversement rapportées.

Afin d'étudier le rôle de ces cellules dans le mécanisme d'induction de la susceptibilité ou de la résistance vis à vis du paludisme, nous avons comparé chez le rat sain adulte et jeune son expression du phénotype CD4.

De deux lots de 6 rats Fischer F344 repartis en deux groupes de trois rats jeunes (4 semaines), et trois rats adultes (8 semaines), les cellules dendritiques spléniques ont été extraites par la méthode de double sélection basée d'une part sur la densité, d'autre part sur l'expression de l' α - intégrine CD103.

Après analyse au cytomètre en flux (Facs calibur) selon l'expression du CD103 et le CD4, deux sous populations de cellules dendritiques ont été identifiées. Chez le jeune rat, 64,51% de cellules dendritiques sont de phénotype OX62+CD4+, alors que 31,27% sont OX62+CD4-. Chez l'adulte, 66,07% sont de phénotype OX62+CD4+ et 29,09% sont OX62+CD4-. Dans les deux cas les cellules OX62+CD4+ représentent 2/3 alors que celles de phénotype OX62+CD4- constituent 1/3 de ces cellules. En fonction de l'âge, il n'y a pas de différence significative entre les cellules de même phénotype ($\alpha > 0,05$).

L'étude de la sécrétion des cytokines de ces deux types cellulaires chez les deux rats sains mais aussi infectés par le *Plasmodium berghei* pourra permettre de comprendre les bases de la résistance ou de la susceptibilité au paludisme.

MOT-CLÉS : SOUS POPULATION CELLULES DENDRITQUES, CD4, AGE.

SUMMARY

Dendritic cell, key of specific immunity is identified in rat by CD103 α integrin expression. Two phenotypically and functionally subsets of spleen dendritic cells according to CD4 expression are known.

As their role in immune responses regulation is variously reported, here we compared their CD4 expression in adult and young rat in order to study how they intervene in susceptibility or resistance mechanisms in malaria.

Spleen dendritic cells have been extracted from 6 F344 Fischer rats pooled into 2 groups of young and

adult, by double selection method using DC specific OX62 mAb and magnetic beads.

Cytofluorimetric analysis showed respectively in young and old rats 64,51% and 66,07% expressed OX62 and CD4 phenotype; 31,27% and 29,09% were OX62+CD4-.

Any difference in these percentage was observed according to the age. In both rats 2/3 of dendritic cells expressed CD4.

KEY WORDS : SUBSETS OF DENDRITIC CELLS, CD4, AGE

1 : Chef de Service d'Immunologie et Hématologie du CHU de Cocody-Abidjan

2 : INSERM U547 Institut Pasteur de Lille, France

3 : Laboratoire d'Immunologie du CHU de Cocody-Abidjan.

Correspondance : Mr DASSE SERY ROMUALD

BP V13 Service d'Immunologie et Hématologie CHU Cocody
Abidjan, Côte d'Ivoire

Tél : 00(225) 08 98 44 68

E-mail: serydasse@yahoo.fr

INTRODUCTION

La cellule dendritique (DC ou dendritic cell) fait partie de la famille des cellules de l'immunité. Son rôle principal est non seulement de préparer et présenter les peptides antigéniques aux cellules T mais d'initier la réponse spécifique (12).

C'est une population cellulaire retrouvée dans presque tous les tissus (peau, muqueuse, foie etc.) avec en forte proportion dans les zones T dépendantes des organes lymphoïdes où le contact avec le lymphocyte T est indispensable pour le développement et la suite de la réponse immune (3). Cette cellule présente beaucoup de controverses. Au plan phénotypique et fonctionnel, la DC présente une hétérogénéité puisque d'une espèce à l'autre, mais surtout d'un site à l'autre au sein de la même espèce, elle exprimerait différents phénotypes qui lui permettent d'initier la réponse adaptative en fonction du type d'agression (13). Entre autres marqueurs liés à la fonction, c'est le CD4 qui est souvent rapporté (7; 4).

Pour certains comme Cécile Voisine les cellules dendritiques CD4+ est faiblement impliqué dans l'activation des cellules T par l'IL-12 alors que les DC de phénotype CD4- sont plus impliquées dans l'activation des lymphocytes T (5). Par contre d'autres auteurs comme ULF

Yrliid et Gordon MacPherson les cellules dendritiques CD4+ sont plus stimulatrices que leurs homologues CD4- (13).

Connaître dans les organes lymphoïdes la répartition en fonction de l'âge de ces phénotypes de cellules dendritiques pourrait apporter un élément de réponse à la susceptibilité ou à la résistance du sujet jeune ou adulte vis à vis du paludisme.

C'est pourquoi l'objectif général de ce travail est de comparer le taux de répartition du phénotype CD4 de la cellule dendritique splénique du jeune rat sain celui du rat adulte sain.

Ce modèle animal servira alors de base d'application chez l'homme où les études épidémiologiques ont montré une plus forte morbidité et mortalité infantile par rapport à l'adulte (1;9), parce que selon les études expérimentales, l'immunité protectrice vis à vis du paludisme se développe plus vite chez l'adulte que chez l'enfant (2). Les objectifs spécifiques sont :

*Purifier les cellules dendritiques du rat jeune et adulte sains.

*Caractériser le phénotype CD4 de ces cellules.

*Comparer en fonction de ce phénotype et de l'âge le nombre de ces cellules.

MATERIEL ET METHODES

Les animaux

Ce sont 6 rats Fischer F344 de 4 à 8 semaines repartis en deux groupes. Ils ont été achetés au centre d'élevage HARLAN en Hollande, transportés et élevés dans le service d'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille selon les modalités en la matière :

Un groupe de 3 rats jeunes âgés de 4 semaines.

Un groupe de 3 rats adultes âgés de 8 semaines.

Matériel et réactifs :

Communs

Des boîtes de pétri ; Une passoire à mailles de 100 μ de diamètre ; La glace ; Des portoirs ;

Des pipettes et micro pipettes graduées ; Des tubes coniques de 15 ml, 45 ml ; Des filtres Type Bultex ; Une centrifugeuse réfrigérée programmable avec frein = 0 ; Des lames de bistouri ; Des seringues de 2ml ; Du bleu Trypan ; Un agitateur à aimant ; Une chambre d'incubation à température réglable ; Une Cellule de MALASSEZ ; De l'Eosine-thiazine ; du méthanol ; Le PAF 4%. Un dispositif MACS (Magnetic Cell Sorting) de tri cellulaire du laboratoire Miltenyi Biotec composé de :

Des colonnes : LS Columns d'une capacité de 108 cellules marquées maximum sur un total de 2 109 cellules pouvant contenir dans la colonne.

Un aimant: MidiMACS avec adaptateur de colonne Vario MACS.

Un microscope binoculaire de marque LEITZ avec objectif x100.

Une solution de tampon composée de PBS (Phosphate Buffered Salin) enrichi au SVF (Sérum de Veau Foetal) + EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid). Ce milieu complet (Tampon PBS/SVF/EDTA) est préparé en ajoutant à 1 litre de PBS, 20ml de SVF et 7ml d'EDTA 0,1 M. La solution est ramenée à un pH de 7,4, stérilisée et conservée à 4°C.

Pour la caractérisation du phénotype CD4

Un cytomètre de flux : Un Facscalibur™ de Becton Dickinson avec le logiciel Cell Quest™.

Pour l'isolement des cellules de basse densité OX62+

La Collagenase D (une clostridiopeptidase du laboratoire Roche).

100mg de Collagenase D lyophilisée ont été dissoutes dans 50ml de milieu complet stérile et filtrée à l'aide de la seringue sur membrane millipore puis conserver à 4°C.

La Solution de NYCODENZ 16%

Dans 100ml de milieu complet stérile, 16g de Nycodenz AG ont été dissous puis porter en agitation électromagnétique et conserver à 4°C.

L'Anti-Rat DC anti OX62 MicroBeads est un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope de la sous unité α E2 de l'intégrine CD103 caractéristique de la cellule dendritique du rat. Il est d'isotype IgG1 et de clone OX62. Cet anticorps est fixé sur des microbilles magnétiques et gardé en suspension dans 0,1% de gélatine et 0,05% d'azide de sodium et conserver à 4°C.

Les anticorps

L'Anti-Rat DC anti OX62 Il est d'isotype IgG1 et de clone OX62 fourni par le laboratoire de Culture Cellulaire de l'U547. Il est biotinylé.

Marqueurs de lymphocytes T :

Anti CD4 conjugué à la PE (phycoérythrine) de clone OX38. Il reconnaît la molécule CD4 portée par les lymphocytes T et certaines cellules dendritiques. Utilisé en dilution finale de 1/1000.

Anti TcR α / γ conjugué au FITC (Isothiocyanate de fluorescéine) de clone R 7.3 sort en FL1. Il est utilisé en dilution finale de 1/800.

Anti CD8 biotinylé (clone OX8) produit à l'Unité 547 par technique d'hybridome. Il est utilisé en dilution finale de 1/600. Il sort en FL3.

Marqueurs de lymphocytes NK :

Anti NKR-Pla biotinylé. Clone 3.2.3 de Nantes utilise en dilution finale de 1/400. Il sort en FL3.

Autre marqueur de cellule dendritique et macrophage :

Anticorps OX6: il reconnaît les molécules de classe II du CMH. Il sort en FL1 et utilisé à la dilution finale de 1/800

Pour le marquage des anticorps à la biotine

La Biotine succinimide de CALBIOCHEM (Réf. Biotim-N-Hydroxysuccinimide Ester N° 203112).

Le DMSO.

Dissoudre la biotine succinimide dans le DMSO de sorte à avoir une concentration de 1mg/ml et aliquoter la solution à 200 μ l/tube et conserver à -70°C.

Révéléateur de marqueurs biotinylés

La streptavidine cychrome pour la révélation en cytométrie de flux :

Anticorps anti Souris

Méthodologie

C'est une méthode expérimentale qui a permis d'extraire la cellule dendritique splénique du rat et de rechercher son expression du CD4. Cette méthodologie comprend les étapes de :

La digestion de la rate

Le rat a été endormi à l'éther puis sacrifié ; la rate extraite en évitant d'emporter la graisse a été conservée et transportée dans un tube de 10 ml sur glace en milieu complet PBS+SVF+EDTA.

L'organe a été transféré et incubé dans une boîte de Pétri contenant 4 ml de Collagenase D pendant 5 minutes.

A l'aide de la seringue, l'injection lente de toute la rate avec 2 ml de Collagenase D prélevée dans la boîte de Pétri a été effectuée.

Elle a été découpée en petits morceaux à la lame de bistouri et incubée à 37°C à l'étuve pendant 25 minutes.

Après avoir bien homogénéisé dans la Collagenase les morceaux, 400µl d'EDTA 0,1 M à pH 7,4 ont été ajoutés (soit 1/10 du volume de la Collagenase) et incubés pendant 5 mn à la température du laboratoire. Après écrasement la suspension obtenue a été lavée 2 fois en milieu complet à 200g pendant 10mn à 4°C puis les globules rouges du culot ont été lyse avec 10ml de solution de lyse. Reprises et homogénéisées dans 50ml de tampon PBS/SVF/EDTA, les cellules de lignée blanche ont subi l'étape suivante.

La sélection des cellules de basse densité

La suspension a été centrifugée à 4°C pendant 10mn à 200g et le culot repris en milieu complet (150.106 cellules pour 1 ml de tampon). Ensuite à raison de volume pour volume la suspension cellulaire a été délicatement versée sur le nycodenz le long de la paroi du tube et centrifugée pendant 15mn à 4°C à 1800g en programme sans frein

La couche de cellules de basse densité comprend outre les dendritiques, les monocytes/macrophages et quelques lymphocytes activés de grande taille.

Cette couche recueillie dans un tube conique en verre a été lavée une fois en PBS/SVF/EDTA pendant 5 mn à 4°C en programme sans frein.

Le culot a été repris dans 20ml du tampon
La sélection positive des cellules OX62+

La suspension cellulaire a été complétée à 50ml avec du tampon et centrifugée pendant 10mn à 200g à 4°C une fois.

Le culot a été repris à raison de 80µl de tampon PBS/SVF/EDTA pour 107 de cellules. Puis ces cellules ont été incubées avec les microbilles marquées à l'anticorps OX62, à raison de 20µl de microbilles pour 107 de cellules pendant 15 mn sur la glace après avoir bien homogénéisé.

Un lavage a été fait à 200g pendant 10 mn à 4°C après avoir complété la suspension à 10ml avec du tampon.

Le culot a été ensuite repris dans 500µl de tampon et bien homogénéisé.

Le tri cellulaire au MACS

Après l'équilibrage de la colonne LS et sans attendre l'assèchement complet, les 500µl de suspension microbillesOX62/cellulesCD103+ ont été versés dans le fond de la colonne. Après écoulement total, la colonne a été lavée 3 fois avec 500µl de tampon.

La suspension cellulaire recueillie dans le tube est la Fraction OX62-.

La colonne a été retirée du dispositif et montée sur un tube en verre puis 1ml de tampon y a été versé. A l'aide d'un coup de piston, le liquide chassé a permis de décrocher tous les complexes qui ont ainsi été recueillis dans le tube de verre. C'est la Fraction OX62+ . Phénotypage cellulaire au FACS.

Tableau I : Schéma de la plaque de l'immuno phénotypage cellule dendritique après son isolement.

	Témoin		CD8/Biot	OX62/Biot	CD4/PE	CD4/PE						
Cellules	Cychrome	Tcr/FITC	CD4/PE	Tcr/FITC	OX62/Biot	OX62/Biot						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												

Cent microlitres de suspension contenant 5.105 cellules dendritiques OX62+ ont été distribués dans les puits suivants: A2, A4, A6, A8, A10, A12.

La plaque a été portée à centrifuger à 1600t/mn pendant 5mn à 4°C. Après avoir rejeté le surnageant par simple retournement

de la plaque, les cellules ont été remises en suspension en tapotant légèrement la plaque.

Les anticorps dilués ont été ajoutés dans chaque puits selon la procédure suivante:

Puits 2 et 4: 150 µl/puits de tampon PBS/SVF 2%.

Puits 6, 8, 10, 12: 50 μ l/puits d'anticorps marqué dilué comme indiqué.

Puits 10 et 12: Compléter avec 50 μ l/puits de tampon PBS/SVF 2%.

La plaque a été incubée à 4°C pendant 30mn à l'abri de la lumière.

Puis après deux lavages dans 150 μ l/puits de tampon PBS/SVF 2% à 1600t/mn pendant 5mn à 4°C, les cellules ont été remises en suspension par tapotement et nous avons ajouté aux puits 4, 6, 8, 10, 12, 100 μ l de Streptavidine Cychrome diluée au 1/1000.

La plaque a été ensuite incubée à 4°C à l'abri de la lumière pendant 10 mn.

Après deux lavages et la remise en suspension des cellules, 150 μ l de tampon PBS/SVF 2% ont été ajoutés à chaque puits.

Le contenu de chaque puits a été ensuite transféré dans chaque tube de FACS dans lequel le PAF 4% (un fixateur conservateur) a été préalablement déposé à raison de 50 μ l/tube. La lecture a été faite au FACS calibur. L'analyse statistique de comparaison du nombre de cellules a été effectuée par le test t de Student.

RESULTATS

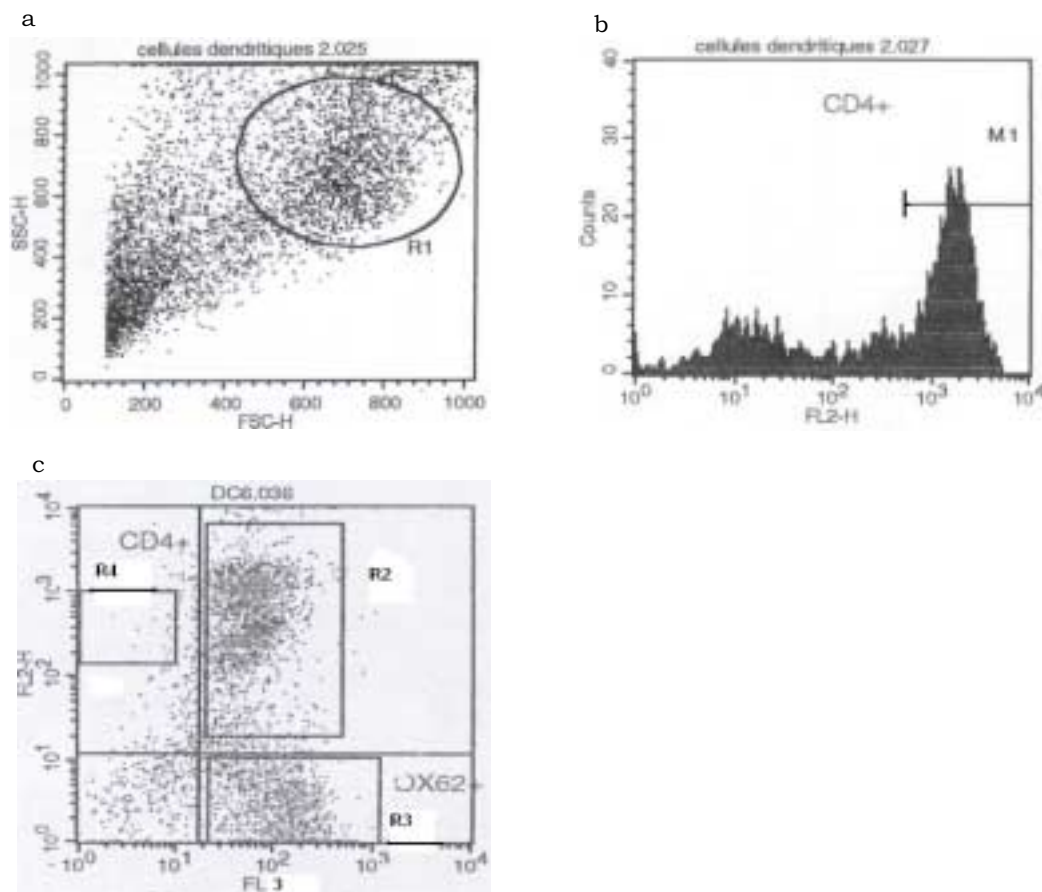


Figure 1 : Cytogramme exprimant les cellules de grande taille et fortement granuleuses (R1-a); parmi ces cellules une forte proportion exprime le marqueur CD4 comme le montre l'histogramme b. Après le double marquage CD4/OX62 des cellules de R1, le cytogramme C montre les deux populations de ce cellules OX62+CD4+ (R2) et OX62+CD4- (R3) . Ces images sont représentatives des trois expériences d'un rat par expérience chez le rat jeune et adulte.

Tableau II : Etude comparative du nombre absolu moyen (en $\times 10^6$ cellules) des cellules OX62+ étudiées des rats jeune et adulte sains.

		Jeune	Adulte	Valeur de t calculée
OX62+CD4+	Expérience 1	5,509032	8,981600	0,395
	Expérience 2	8,716855	6,422080	
	Expérience 3	4,013888	6,640020	
	Moyenne	6,879925	7,347900	
OX62+CD4-	Expérience 1	3,788785	4,738000	0,141
	Expérience 2	3,788785	2,264320	
	Expérience 3	1,887888	2,013940	
	Moyenne	2,913406	3,005420	
OX62+	Expérience 1	7,972578	13,719600	0,604
	Expérience 2	12,505640	8,686400	
	Expérience 3	7,901776	8,653960	
	Moyenne	9,459999	10,353320	

Valeur de t lue dans la table pour un ddl = 4 et au risque de 5% est de 2,776; ($\alpha > 0,05$)

Les différences des nombres absolus de cellules OX62+ (qu'elles soient CD4+ ou CD4-) du rat jeune et du rat adulte ne sont pas significatives.

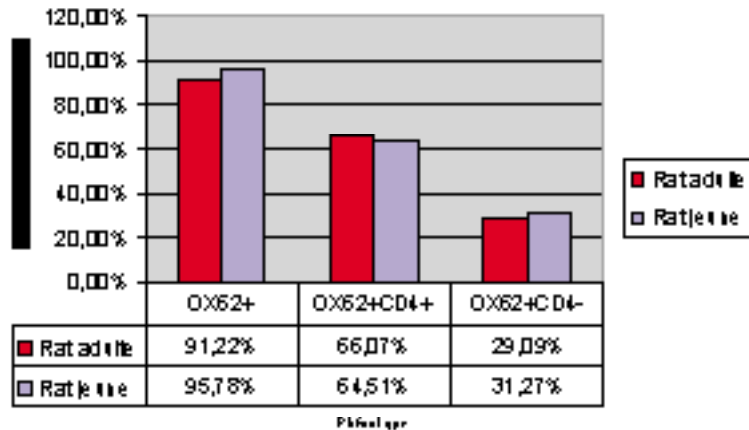


Figure 2 : Comparaison de la distribution du phénotype de la cellule dendritique des rats jeune et adulte

DISCUSSION

Les cellules dendritiques constituent la clé de l'induction de l'immunité adaptative. Cette fonction s'effectue à travers l'activation des cellules régulatrices et effectrices par les cytokines sécrétées par la dendritique dont

plusieurs sous populations sont décrites en fonction de leur phénotype (6;13).

Si plusieurs marqueurs de surface peuvent permettre d'identifier ces sous populations (8), c'est surtout la molécule

CD4 qui est souvent utilisée pour identifier deux sous types fonctionnels de DC selon l'expression ou non de ce marqueur de surface. Ainsi Régis Josien et coll. (10) ont identifié deux sous populations phénotypiquement distinctes de DC du rat sécrétant différentes cytokines dans l'activité stimulatrice des cellules T : à l'opposé des DC CD4-, les DC CD4+ du rat qui expriment les CD5 et CD90 ainsi qu'une protéine alpha intervenant dans le signal de régulation de l'immunité, secrète de faibles taux d'Il-12 et de TNF α , induit des réponses Th1 et Th2 pendant que son homologue CD4- produit fortement des cytokines pro inflammatoires Il-12, TNF α et induit une réponse Th1. Cependant elle a paradoxalement une faible capacité stimulatrice de TCD8+ au contraire de la DC CD4+ (5). Selon David Vremec trois sous populations peuvent être isolées en fonction des marqueurs CD4 et CD8. Ce sont les DC CD4+CD8-DEC205lowCD11bhigh qui constituent avec les DC CD4-CD8-DEC205lowCD11bhigh la majorité des DC du thymus et rate de souris ; et un sous type minoritaire de DC CD4-CD8+DEC205highCD11blow (11).

En nous appuyant sur ces différentes études nous avons défini deux sous populations phénotypiques de DC chez le rat jeune et adulte. Leur action sur les cellules régulatrices et effectrices nous permettra d'éclairer en partie le mécanisme de susceptibilité ou de résistance de l'animal vis à vis du *Plasmodium berghei*.

Cette étude menée chez le rat sain, nous montre que 64,51% (soit 6,07 10⁶/ml de cellules) et 66,07% (soit 7,34 10⁶/ml de cellules) de cellules dendritiques

sont de phénotype OX62+CD4+, alors que 31,27% (2,71 10⁶/ml de cellules) et 29,09% (3 10⁶/ml de cellules) sont OX62+CD4- respectivement chez l'animal jeune et adulte. Il n'y a pas de différence entre le nombre des sous populations de DC réparties en fonction du phénotype CD4 aux différents stades d'évolution ontogénique ($\alpha > 0,05$). Aussi quelque soit l'âge de l'animal les DC de phénotype OX62+CD4+ représentent les 2/3 des cellules dendritiques spléniques et la sous population OX62+CD4- représente le 1/3 restant.

Ces proportions vont à l'encontre des répartitions de Benjamin Trinité et coll. (4) qui montrent dans une étude des sous populations spléniques de cellules dendritiques cytolitiques du rat que les DC OX62+CD4+ représentent 10 à 15% alors que les OX62+CD4- qui ont en plus une activité cytotoxique vis à vis de certaines cellules (YAC-1, P815, K562, A20, L929 de European Collection of Cell Culture) sont majoritaires avec une proportion de 80 à 85% des cellules dendritiques totales.

Par contre Li Ming Lin et coll. (7) notent des proportions respectives de 50 à 60% contre 35 à 45% chez l'animal. Par ailleurs au plan fonctionnel, ces auteurs notent que les DC CD4+ sont plus actives dans la présentation de l'antigène en MLR vis à vis des lymphocytes sensibilisés ex vivo et des lymphocytes naïfs in vivo, que leurs homologues CD4-. Cette fonction de présentation serait en rapport avec le niveau d'expression de la molécule B7 (CD80/86) que nous n'avons pas étudiée. Paradoxalement cette molécule est moins exprimée sur les DC CD4+ que sur les DC CD4- et certaines de ces premières citées en sont dépourvues.

CONCLUSION

En situation physiologique (en l'absence de stimulation antigénique), la cellule dendritique splénique du rat étudiée exprime

majoritairement le marqueur CD4 quelque soit l'âge de l'animal dont elle est issue.

BIBLIOGRAPHIE

1. BAIRD J. K. Age dependent characteristics of protection vs susceptibility to plasmodium falciparum. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1998 ; 92 : 367-390.
2. BAIRD J. K. Host age as a determinant of natural acquired immunity to plasmodium falciparum. *Parasitol. Today.* 1995 ; 11:105-111
3. BANCHEREAU J. and STEINMAN R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998 ; 392 : 245.
4. BENJAMIN T., CÉCILE V., HIDEO Y., and RÉGIS J. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol.* 2000 ; 165 : 4202.
5. CÉCILE V., HUBERT F.X., BENJAMIN T., HESLAN M., and RÉGIS J. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002 ; 169 : 2284-2291.
6. KEN S., YONG-JUN L. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews*, 2002 ; 2 : 151-161.
7. LIMING L., MANHUA Z., CHRIS J., MACPHERSON G.G. Dendritic cell heterogeneity in vivo : Two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *The Journal of Immunology*, 1998 ; 161 : 1146-1155.
8. Manuel de la Mata, CLELIA M.R., PABLO I. Identification of CD8 α + dendritic cell subpopulation in rat spleen and evaluation of its OX-62 expression. *Clinical Immunology*, 2001 ; 101 (3) : 371-378.
9. MURPHY S.C., BREMAN J.G Gaps in the childhood burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycaemia and complications of pregnancy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001 ; 64 : 57-67.
10. REGIS Josien. Cellules dendritiques. In *Immunologie de Jean François Bach et Lucienne Chatenoud. 4^{ème} édition. Médecine-Sciences Flammarion ; 2005 : 91-99.*
11. VREMEC D., POOLEY L., WU L., SHORTMAN K., et al. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* 2000 ; 164 : 2978-2986.
12. VREMEC D., ZORBAS M., SCOLLAY R., SAUNDERS D.J., ARDAVIN C., LI C.L., SHORTMAN K. The surface phenotype dendritic cells purified from mouse thymic and spleen : Investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* 1992 ; 176 (1) : 47-58.
13. YRLID U., MACPHERSON G. Phenotype and function of rat dendritic cell subsets. *APMIS* 2003 ; 111 : 00-00.