

**EFFETS DIFFERENTIELS DE LA CYTOKINE LYMPHOPOIETINE STROMALE
THYMIQUE SUR LES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES DENDRITIQUES
HUMAINES**

Carolina Martinez Cingolani

Résumé en français

INTRODUCTION

Les cellules dendritiques

La première évidence de l'existence des cellules dendritiques (DCs) date de 1868, quand Paul Langerhans signala l'existence d'un nouveau type de cellule dans des coupes tissulaires d'épiderme humaine [1]. Ces cellules, possédant de longues prolongations cytoplasmiques, furent dès lors appelées cellules de Langerhans (LCs) et furent associées pendant longtemps au système nerveux. Vers 1966, des études suggérèrent une relation entre les LCs et d'autres types cellulaires de la peau comme les keratinocytes et les histiocytes [2-4]. Petit à petit elles furent associées aux cellules phagocytaires du système immunitaire. Cependant la découverte réelle des DCs fut attribuée à Zanvil Cohn et Ralph Steinman [5]. En 1973 ils identifièrent des DCs dans la rate murine, quelques années après ils définirent les DCs comme les principaux stimulateurs des lymphocytes T [6]. En 1985 ce même groupe décrit les LCs comme des DCs spécialisées de la peau et donc comme le premier sous-type de DCs [7]. Aujourd'hui on sait que la population de DCs est hétérogène et composée de différents sous-groupes. Depuis leur découverte, les études sur leur biologie n'ont cessé de se multiplier et continuent à nous aider à comprendre leur fonction et relevance physiopathologique.

Les DCs sont essentielles pour induire une réponse immunitaire adéquate. Ces cellules sont présentes dans les tissus périphériques comme la peau et les muqueuses et elles s'activent

suite à la reconnaissance de microbes, signaux de danger et/ou facteurs issus de l'environnement inflammatoire. Lorsqu'elles sont activées, les DCs secrètent des chimiokines et des cytokines qui sont responsables du recrutement et de l'activation d'autres acteurs de la réponse immunitaire innée, comme les éosinophiles, basophiles et mastocytes. Ensuite, elles rentrent dans les vaisseaux lymphatiques afférents et migrent des distances considérables pour atteindre les ganglions lymphatiques où elles vont rencontrer les lymphocytes T [8]. En effet les DCs se caractérisent par leur capacité exclusive à stimuler la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T auxiliaires de différents types; ces derniers sont à leur tour recrutés dans les tissus enflammés pour éliminer le microbe ou la menace. Ainsi, les DCs associent les réponses immunitaires innée et adaptative et contribuent à la génération de mémoire immunitaire spécifique des antigènes.

Les DCs couplent le type de réponse T aux différents types d'inflammation. Ceci est assuré par la plasticité des DCs; elles ont la capacité d'intégrer différents types de signaux et de stimulus afin d'induire un type de cellules T adapté à un environnement inflammatoire déterminé.

Les DCs constituent une population hétérogène [9]. En effet de différentes sous-populations sont présentes dans différents endroits du corps humain. Ces différentes sous-populations sont étudiées pour leurs possibles spécialisations fonctionnelles. Dans le cas des souris, il a été prouvé que les sous-populations de DCs possèdent différentes fonctions dans la réponse immunitaire [10-13]. Cependant, chez l'humain, les différentes sous-populations de DCs semblent requérir des conditions spécifiques d'activation tout en possédant des rôles qui se superposent [14].

La Lymphopoïétine Stromale Thymique

La Lymphopoïétine Stromale Thymique (TSLP) est une cytokine pro-inflammatoire qui active fortement les DCs [15]. Chez l'être humain la TSLP est sécrétée par les cellules épithéliales de surfaces dites barrières épithéliales, comme la peau et les différentes muqueuses [16]. Le récepteur pour la TSLP est constitué de deux chaînes, la chaîne TSLPR et la chaîne IL-7R alfa [17]; il est exprimé majoritairement par les DCs primaires incluant les LCs [17, 18]. Des études *in vitro* ont montré que les DCs activées par la TSLP (TSLP-DCs) présentent une augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation telles que CD80, CD83, CD86 et CD40 [19]. La stimulation par la TSLP induit une augmentation dans la survie des DCs ainsi que la sécrétion des chimiokines CCL17, CCL22 et CXCL8 [16] qui régulent le recrutement de lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2), de basophiles et d'éosinophiles sur le site de l'inflammation.

Les TSLP-DCs induisent une réponse auxiliaire de type Th2 chez les lymphocytes T naïfs, caractérisée classiquement par la sécrétion des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. Cependant dans le cas de la différenciation T induite par les TSLP-DCs ce profil est dit Th2 inflammatoire puisqu'il est caractérisé par une sécrétion importante de TNF- α et par l'absence de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [16].

La TSLP est exprimée chez l'être humain, dans les tissus sains, au niveau des corpuscules de Hassal du thymus et l'épithélium tonsillaire [20]. Dans ces cas, la TSLP semble avoir un rôle dans l'induction de lymphocytes T régulateurs et de tolérance immunitaire. Cependant la TSLP est plutôt associée à des conditions pathologiques de type allergique [16, 19]. Ainsi, la TSLP est fortement exprimée au niveau de la membrane basale de l'épiderme de la peau lésionnelle de patients atteints de dermatite atopique [16]. La TSLP est aussi détectée dans les lavages broncoalvéolaires dans les cas d'asthme [21], rhinite [22] et dans la cornée dans les

cas de kératoconjonctivite atopique [23]. Dans le cas de pathologies non-allergiques, la TSLP est présente dans la peau psoriasique (nos observations non-publiées), la peau lésée mécaniquement [24] et certains types de cancer (nos observations non-publiées).

OBJECTIFS

Pour que les TSLP-DCs puissent induire la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes auxiliaires Th2, elles doivent atteindre les ganglions lymphatiques. Cependant aucune étude n'avait adressé la capacité de la TSLP à induire la migration des DCs. Ainsi, mon premier objectif pendant ma thèse fut de déterminer si la TSLP pouvait induire la migration des DCs. J'ai donc participé à une étude en cours dans notre laboratoire autour de ce sujet.

Dans un deuxième temps, j'ai décidé de déterminer quels étaient les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de la migration des DCs par la TSLP. En particulier j'ai étudié l'implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans ce processus.

Finalement, les données préliminaires suggéraient que la TSLP induisait sur les DCs du sang un phénotype caractéristique des DCs de la peau. Par la suite, j'ai vérifié si la TSLP pouvait être impliquée dans l'ontogenèse des DCs épidermiques, les LCs, chez l'homme.

Ces études furent réalisées en prenant en compte la diversité des DCs, et en recherchant les effets différentiels de la TSLP dans différents sous-types de DCs chez l'homme.

RESULTATS

1/ La TSLP induit la migration des cellules dendritiques

Jusqu'à présent, il n'y avait que deux études suggérant que la TSLP pouvait avoir un rôle dans l'induction de la migration des DCs. Premièrement, Soumelis et al, avait observé que l'expression de la TSLP dans la peau de dermatite atopique était corrélée avec la présence de LCs au niveau du derme [16]. Or cette population réside dans l'épiderme ce qui suggérait que ces cellules, en présence de TSLP, avaient migré de l'épiderme au derme. La deuxième observation fut réalisée par Ebner et al [18]. Ils ont vu que lorsque des explants cutanés étaient cultivés en présence de TSLP, la quantité de DCs collectée en suspension (fraction émigrante) était supérieure que dans le cas contrôle, en absence de TSLP.

Cependant aucune de ces études n'avait adressé directement si la TSLP induisait la migration des DCs. Nous avons testé cette hypothèse en utilisant des cellules de migration cellulaire. Dans ce système, les cellules peuvent être semées dans un compartiment supérieur, et recueillies dans un compartiment inférieur après avoir migré à travers un filtre intermédiaire (Figure 1A panel du haut). Des DCs humaines isolées du sang, ont été stimulées avec différents facteurs activateurs sur la nuit, et ont migré dans ce système pendant 6 heures. Ces expériences ont mis en évidence que la TSLP induit la migration (chimiokinèse) des DCs ce qui n'est pas le cas d'autres facteurs activateurs (Figure 1A). Ce résultat fut reproduit dans un deuxième type de système constitué par des microcanaux (Figure 1B panel du haut). Ce système à été spécifiquement dessiné par Mattieu Piel à l'Institut Curie, pour imiter le confinement auquel les cellules sont confrontées lorsqu'elles migrent dans les tissus. On a pu mettre en évidence que les DCs humaines issues du sang, traitées avec de la TSLP entraient plus fréquemment dans les canaux (Figure 1B panel du milieu) et migraient d'une façon plus persistante que les cellules contrôle (en absence de TSLP) (Figure 1B kymographe du bas).

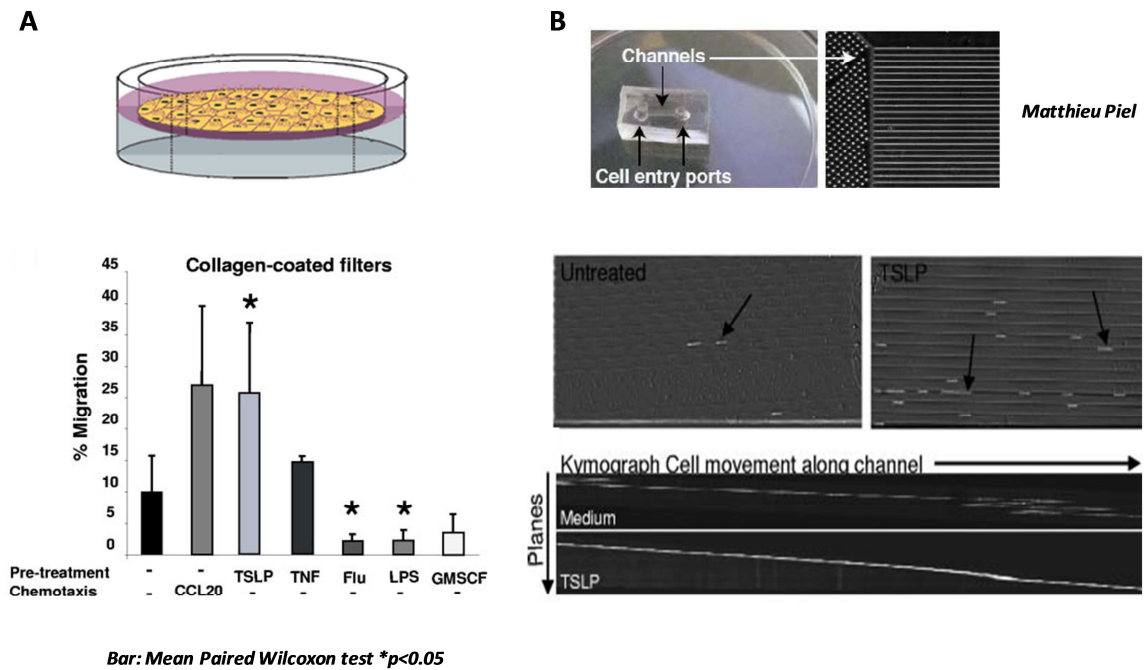


Figure 1: La TSLP induit la chimiokinèse des cellules dendritiques.

A. Panel du haut : Système de cellules de migration. Deux compartiments sont séparés par un filtre permettant le passage des cellules du haut vers le bas. Panel du bas : les données représentent le pourcentage de migration des DCs du sang traitées avec de différents stimuli après 6 heures de migration dans les cellules de migration.

B. Panel du haut : Système de migration en microcanaux. Les cellules sont semées dans un puits et leur entrée dans les microcanaux est enregistrée par vidéomicroscopie. Panel du milieu : Photos montrant que plus de cellules sont entrées dans les canaux dans le cas du stimulus avec TSLP en comparaison avec les cellules traitées dans du milieu sans TSLP. Panel du bas : kymographe représentant les cellules traitées en présence et absence de TSLP dans les microcanaux. La migration des TSLP-DCs est plus persistante.

Par ailleurs, par des techniques d'immunofluorescence on a mis en évidence que la TSLP induisait la polarisation du cytosquelette d'actine et de microtubules dans les DCs (Figure 2A). L'actine et le moteur moléculaire myosine II co-localisent vers l'arrière des cellules, suggérant une contractilité de cette zone (Figure 2A). Nous avons montré que la polarisation et la migration induites par la TSLP sur les DCs du sang étaient dépendantes de l'activation de la myosine II (Figure 2B).

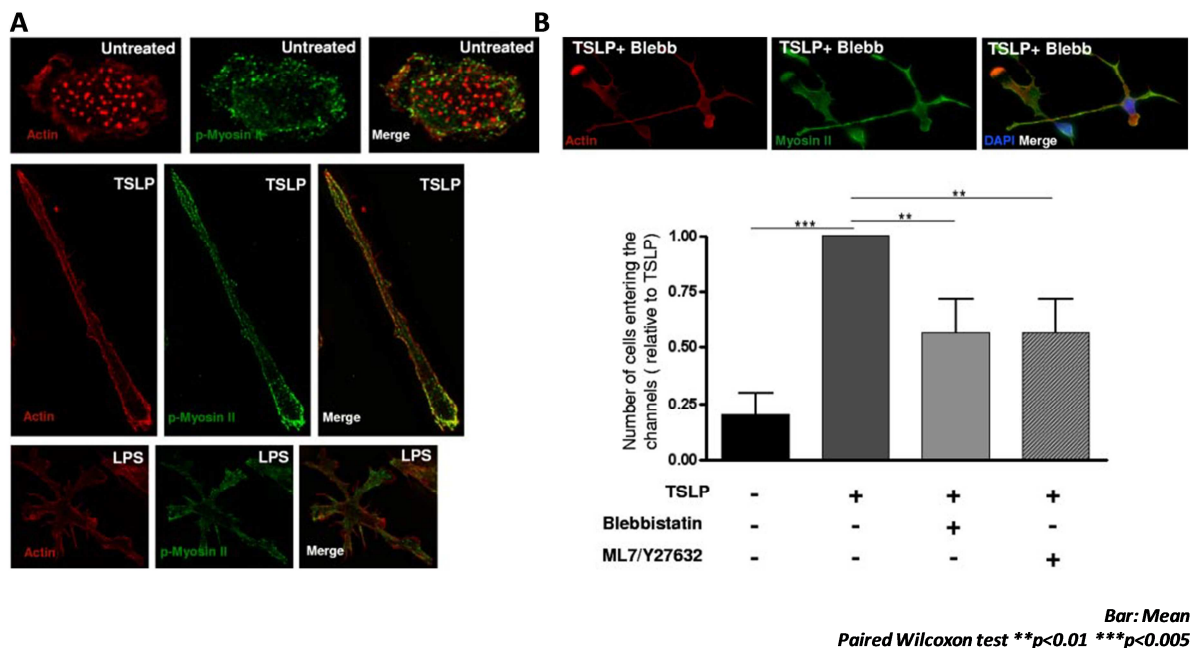


Figure 2: La polarisation et la migration induites par la TSLP sont dépendantes de la myosine II.

A. Les images correspondent à des DCs traitées ou pas avec de la TSLP ou du LPS. La TSLP, en opposition au LPS, induit la polarisation des DCs. En jaune on peut observer la co-localisation entre l'actine et la myosine II.

B. Panel du haut : les images correspondent à des DCs traitées avec la TSLP et la blébbistatine, inhibiteur spécifique de la myosine II. On peut voir la perte de polarisation en présence de blébbistatine. Panel du bas : numéro de DCs entrant dans les microcanaux suite au traitement avec et sans TSLP et deux types d'inhibiteurs de l'activité de la myosine II, la blébbistatine et le ML7/Y27632.

A l'issue de ces résultats, je me suis demandé si la TSLP induisait la chimiokinèse des DCs directement ou à travers l'induction de la sécrétion d'autres facteurs qui à leur tour stimulaient, de façon autocrine, la migration des DCs. Pour tester ceci, j'ai traité sur la nuit un premier groupe de DCs avec la TSLP (Figure 3A). Le surnageant issu de cette culture contenant la TSLP ainsi que les facteurs sécrétés par les TSLP-DCs fut collecté. Pour adresser le rôle joué par ces facteurs dans la migration des DCs, j'ai bloqué l'activité directe de la TSLP dans le surnageant grâce à un anticorps spécifique anti-TSLP (surnageant TSLP-bloqué par opposition au surnageant non-bloqué traité avec l'isotype contrôle). Un deuxième groupe de DCs fut mis en culture sur la nuit avec ces surnageants et la migration de ce deuxième

groupe de DCs fut évaluée dans des cellules de migration pendant 6 heures (Figure 3A). Les résultats de ces expériences ont montré que la migration induite par la TSLP est récapitulée par les surnageants non-bloqués du fait qu'ils contiennent de la TSLP non neutralisée (Figure 3B). Cependant les DCs traitées avec des surnageants dont l'activité TSLP fut bloquée ne migrèrent pas (Figure 3B). Ceci nous a permis de conclure que les facteurs sécrétés par les TSLP- DCs ne récapitulent pas la migration induite par la TSLP ou ne sont pas suffisants pour induire la migration des DCs. Nous avons aussi contrôlé l'activation des DCs traitées avec les surnageants bloqués ou pas bloqués en utilisant l'expression de CD80 comme marqueur de maturation. Nos résultats ont montré que les facteurs sécrétés par les TSLP- DCs ne récapitulent pas la maturation induite par la TSLP.

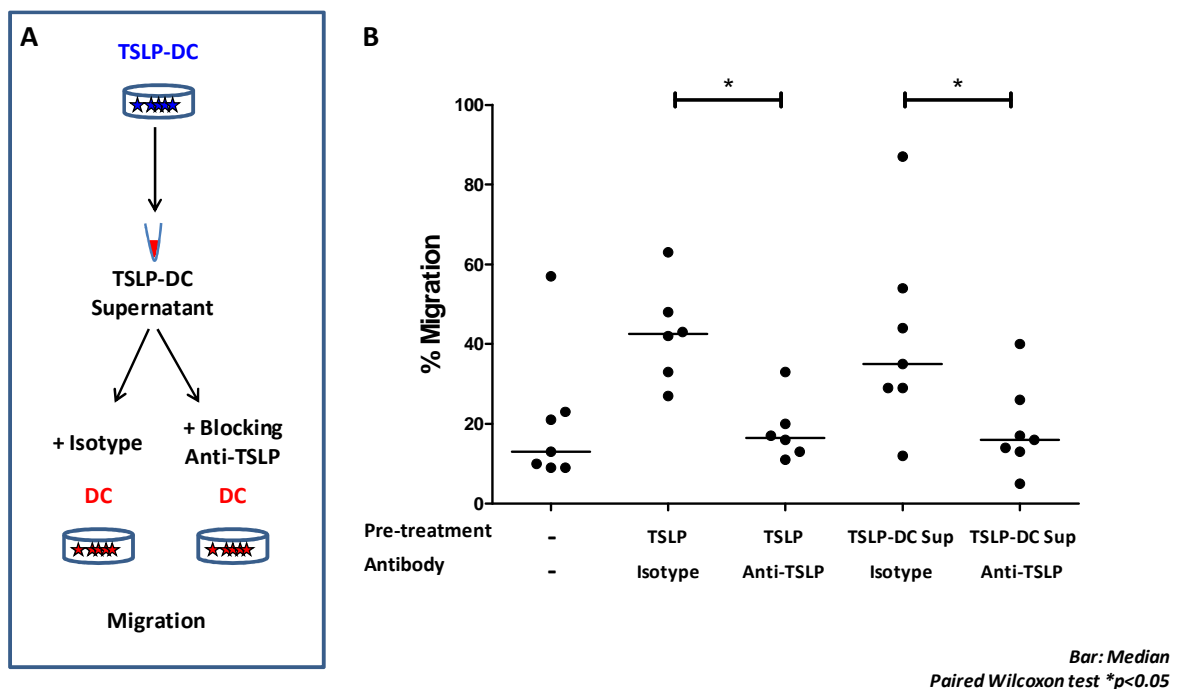


Figure 3: Les facteurs sécrétés par les TSLP-DCs ne récapitulent pas la migration induite par la TSLP.

A. Schéma expérimental. Un premier groupe de DCs est traité ou pas avec la TSLP. Le surnageant est collecté et divisé en deux. Une partie est traitée avec un anticorps neutralisant l'activité de la TSLP, l'autre partie traitée avec l'isotype contrôle. Ces surnageants sont utilisés dans un deuxième temps pour traiter un deuxième groupe de DCs qui sont évaluées postérieurement pour leur capacité de migration pendant 6 heures dans les cellules de migration.

B. Pourcentage de migration des DCs traitées avec la TSLP bloquée ou pas et avec des surnageants bloqués ou pas.

Ainsi les conclusions de cette première partie sont:

- La TSLP induit la migration des DCs dans les cellules de migration ainsi qu'en milieu confiné.
- La TSLP induit la polarisation des DCs.
- La migration et la polarisation des DCs induites par la TSLP sont myosine II-dépendantes.
- Les facteurs sécrétés induits par les TSLP-DCs ne sont pas suffisants pour induire ni la migration ni la maturation des DCs.

2/ Mécanismes moléculaires impliqués dans la migration induite par la TSLP sur les cellules dendritiques du sang.

Plusieurs facteurs tels que les intégrines, les métalloprotéases et les chimiokines participent activement dans la migration cellulaire à travers les tissus. Dans le cas des DCs il a été montré in vitro, que leur type de migration, dit améboïde, est indépendant des intégrines et des métalloprotéases [25]. Ainsi les chimiokines jouent un rôle particulièrement important dans la migration des DCs. Des concentrations uniformes de chimiokines induisent la chimiokinèse des DCs tandis que des gradients de chimiokines induisent une migration dirigée. En fonction de leur état d'activation et du facteur activateur, les DCs expriment différents récepteurs de chimiokines ce qui permet de réguler leur migration [26].

Nous avons montré dans les expériences antérieures que les facteurs induits par la TSLP sur les DCs du sang, ne reproduisent pas l'induction de migration par la TSLP (Figure 3). Ce

résultat suggérait que les chimiokines présentes dans les surnageants des TSLP-DCs n'étaient pas impliquées dans cette migration. Cependant nous n'avons pas déterminé comment la TSLP pouvait réguler l'expression des récepteurs de chimiokines qui permettraient aux TSLP-DCs de détecter les chimiokines présentes dans les surnageants.

J'ai donc décidé d'étudier comment la TSLP pouvait réguler l'expression des récepteurs de chimiokines sur les DCs, et si ces récepteurs pouvaient être impliqués dans la migration induite par la TSLP sur les DCs. L'hypothèse testée était que la TSLP pouvait induire la sécrétion d'une chimiokine et simultanément l'expression du récepteur correspondant afin d'induire la migration.

Les récepteurs pour les chimiokines appartiennent à une grande famille de récepteurs appelés récepteurs couplés aux protéines G (GPCR pour G protein coupled receptor). Dans le cas des récepteurs pour les chimiokines, cette protéine G est appelée inhibitrice ; elle peut être irréversiblement bloquée par l'utilisation de toxine pertussique (PTX). La PTX bloque la signalisation et la migration dépendante des récepteurs pour les chimiokines [27].

Afin de déterminer si les récepteurs pour les chimiokines étaient impliqués dans la migration induite par la TSLP, j'ai traité sur la nuit, des DCs, avec et sans TSLP et PTX, puis j'ai adressé la migration cellulaire dans des cellules de migration (Figure 4).

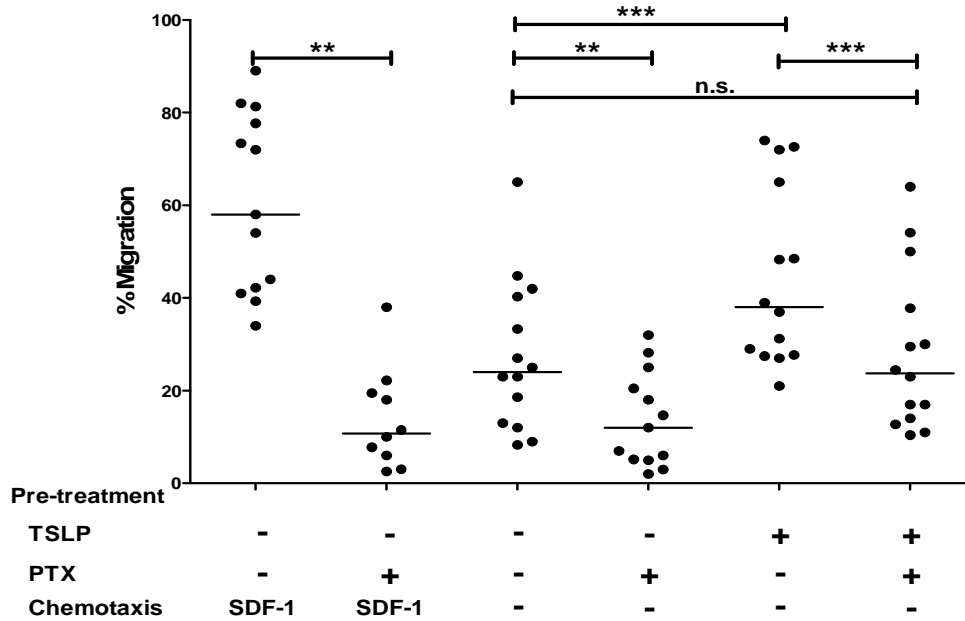


Figure 4: La migration induite par la TSLP est sensible au traitement par la PTX.

Pourcentage de cellules relatif à la numération totale. La chimiokine SDF-1 fut utilisée dans le compartiment inférieur en tant que facteur chimiotactique et contrôle positif. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.005$ *** $p \leq 0.0005$, Test de Wilcoxon non-paramétrique apparié. Les barres représentent les médianes.

Mes résultats ont montré que l'utilisation de la PTX réduit la migration induite par la TSLP aux niveaux de la migration spontanée observés chez les cellules cultivées en absence de TSLP ou PTX. Cependant le traitement par la PTX réduit aussi les niveaux de migration spontanée, mettant en doute l'inhibition spécifique de la migration induite par la TSLP. Nous avons montré que la migration induite par la TSLP était liée à la polarisation des DCs. Ainsi j'ai testé si le traitement avec ou sans TSLP et PTX induisait des changements dans la polarisation du cytosquelette (Figure 5). Pour avoir des données quantitatives j'ai calculé un ratio entre les deux axes majeurs des cellules, me permettant d'évaluer le degré de polarisation des cellules ; Si le logarithme du ratio des axes est près de 0, la cellule est non polarisée tandis que s'il est différent de 0, la cellule est polarisée. Mes résultats ont montré que le traitement par la PTX inhibe la polarisation induite par la TSLP et non pas la polarisation spontanée.

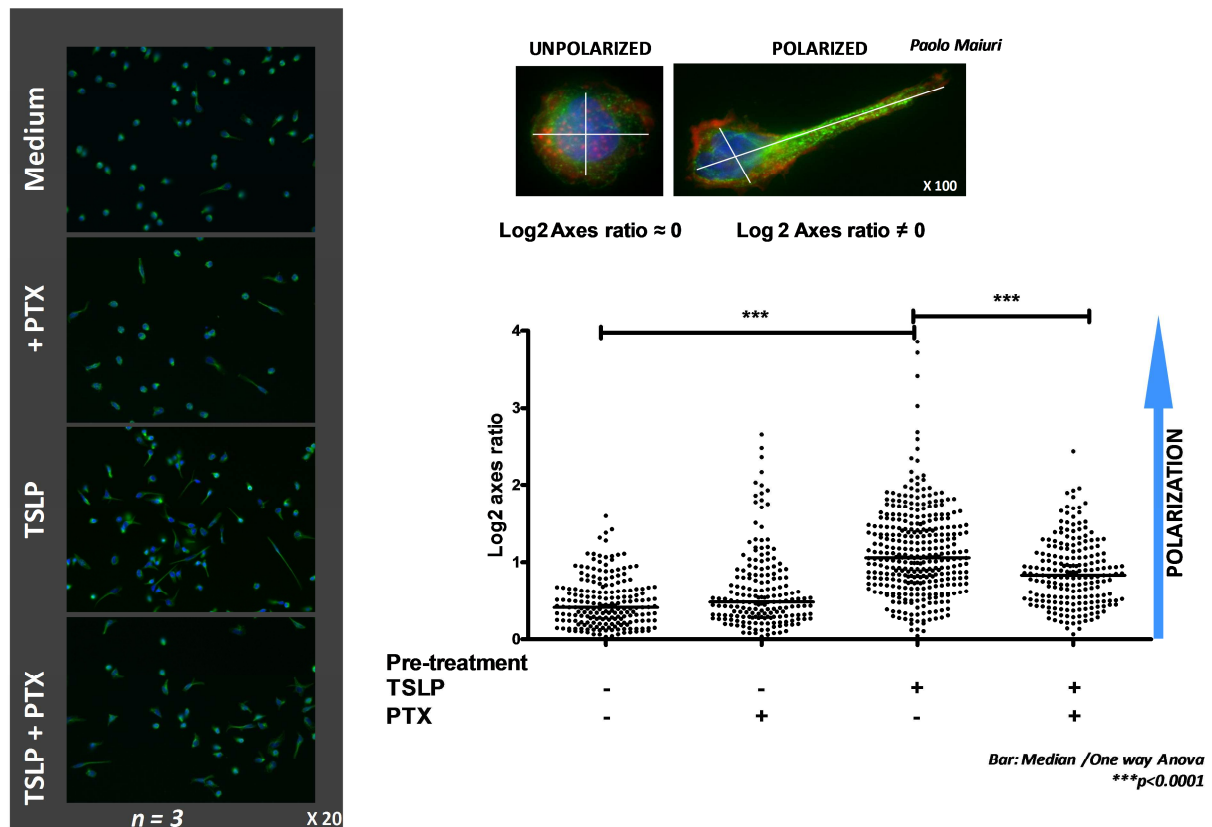
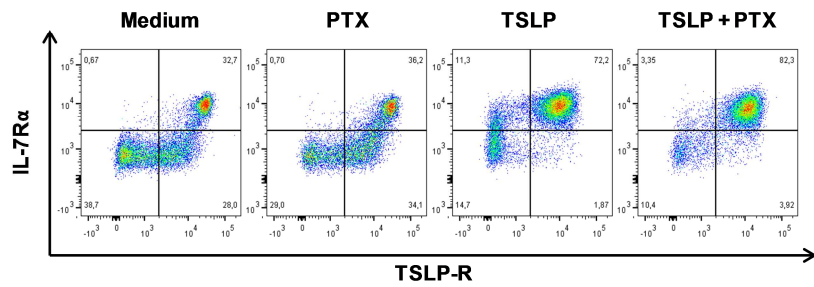
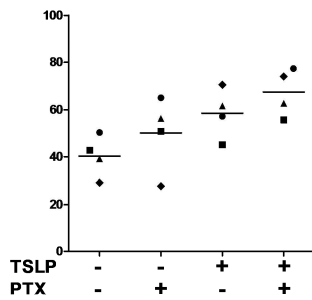


Figure 5: La polarisation induite par la TSLP est sensible au traitement par la PTX.

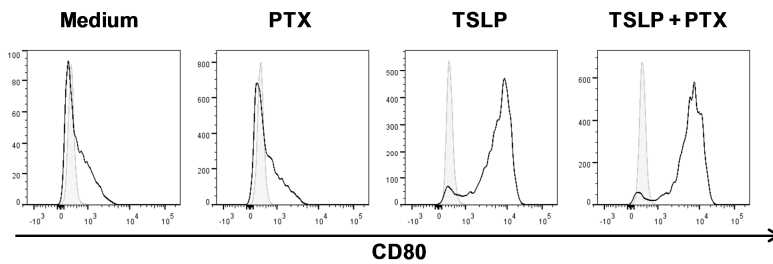
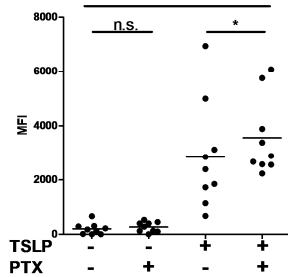
Gauche : photos représentatives de 3 expériences. Polarisation du cytosquelette de tubuline dans les cellules traitées ou pas avec la TSLP et la PTX. Haut : schéma explicatif du calcul du ratio entre les deux axes majeurs des cellules utilisé pour quantifier le degré de polarisation des cellules. Droite : Logarithme base 2 du ratio entre les axes pour les cellules traitées ou pas avec la TSLP et la PTX.

Comme contrôle, j'ai vérifié si la PTX pouvait affecter l'expression du récepteur de la TSLP (TSLPR) par les DCs, leur viabilité ou leur maturation (Figure 6). La PTX n'affecte pas la viabilité des TSLP-DCs, l'expression du complexe TSLPR ou la maturation des DCs. Ainsi j'ai pu conclure que la PTX pouvait inhiber les effets de la TSLP sur la migration et la polarisation des DCs.

% cells expressing TSLPR complex



CD80 MFI



Bar: Median
Paired Wilcoxon test ****p<0.005**

Figure 6: La PTX n'affecte pas l'expression du TSLPR ni la maturation des TSLP-DCs.

Panel du haut : Pourcentage de cellules exprimant les deux chaînes du récepteur pour la TSLP dans les différentes conditions de culture. A droite, plots représentatifs du marquage des deux chaînes du récepteur de la TSLP dans les différentes conditions de culture.

Panel du bas : Intensité médiane de fluorescence (MFI) pour l'expression du marqueur de maturation CD80 dans les différentes conditions. A droite, histogrammes représentatifs du marquage pour CD80 dans les différentes conditions de culture.

Ces résultats suggéraient qu'un récepteur couplé à une protéine G inhibitrice, (comme les récepteurs pour les chimiokines) pouvait bien être impliqué dans la migration des DCs induite par la TSLP. Ainsi j'ai fait un criblage des récepteurs de chimiokines régulés par la TSLP sur les DCs. Parmi tous les récepteurs évalués au niveau transcriptomique et au niveau protéique, j'ai trouvé que la TSLP régulaient significativement l'expression de CCR6 et CCR7 (vers le haut), et CXCR4 et CX3CR1 (vers le bas) (Figure 7). J'ai analysé la disponibilité de ligands pour les récepteurs de chimiokines en faisant une matrice (array) protéique pour 38 chimiokines pouvant être présentes dans les surnageants des TSLP-DCs (Figure 7). J'ai trouvé que mise à part CCL17 et CCL22, les TSLP-DCs sécrétaient aussi du CCL3 et CCL4.

Cependant aucun des ligands de CCR6 ou CCR7 (CCL19, CCL21, CCL20) ne fut détecté dans les surnageants. Ainsi je n'ai pas pu identifier une paire de ligand/récepteur de chimiokine qui pouvait expliquer la migration induite par la TSLP sur les DCs.

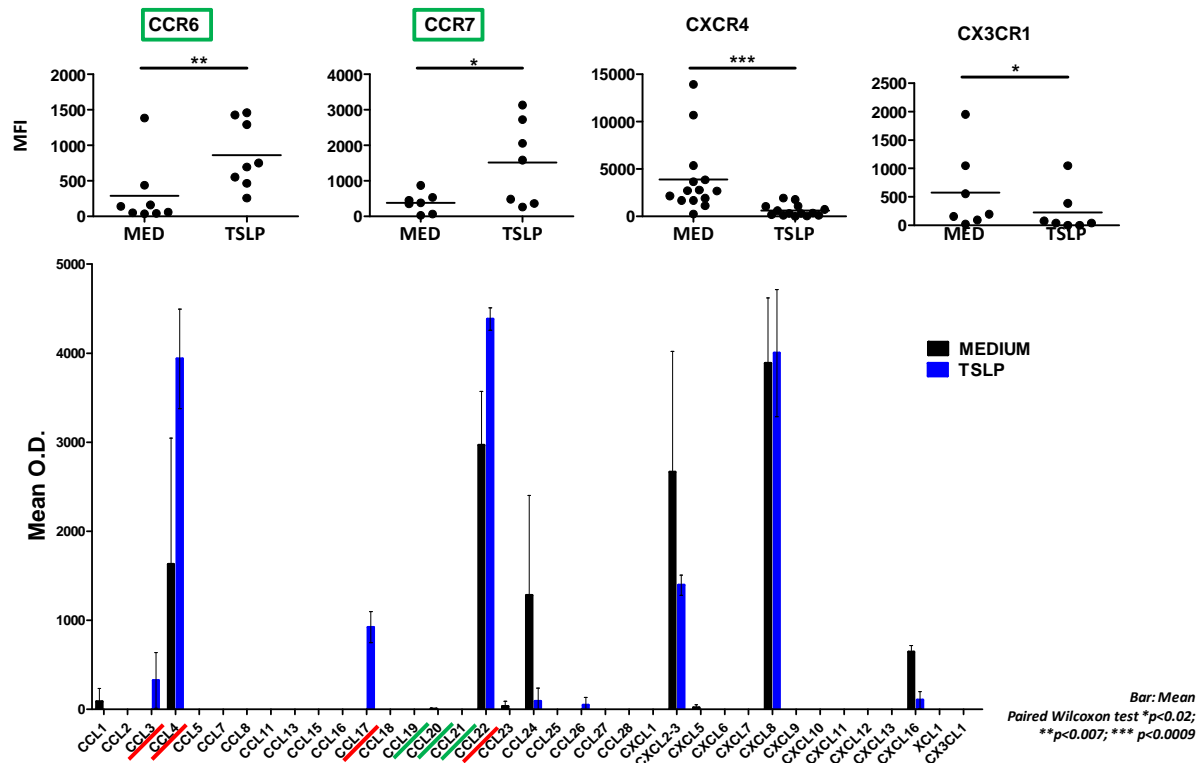


Figure 7 : La TSLP régule l'expression des récepteurs de chimiokines et la sécrétion de chimiokines sur les DCs.

Panel du haut: Les données représentent l'expression en surface des récepteurs de chimiokines après 24 heures de traitement avec ou sans TSLP. L'expression fut évaluée par cytométrie en flux. MFI: intensité médiane de fluorescence. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.005$, Test de Wilcoxon apparié et non-paramétrique. Les barres représentent des moyennes. Seuls les récepteurs étant régulés par la TSLP sont montrés.

Panel du bas : Les données représentent les densités optiques moyennes obtenues pour 38 chimiokines différentes évaluées dans des surnageants de culture des milieu-DCs ou des TSLP-DCs. Les mesures furent réalisées par chimioluminescence grâce à une matrice protéique. Du milieu frais avec ou sans TSLP fut utilisé comme contrôle de bruit de fond. $n=3$.

Cependant il est bien connu que les chimiokines peuvent agir en synergie ou à travers de récepteurs autres que leurs correspondants. C'est par exemple le cas de la synergie entre CXCR3 et les ligands de CXCR4 dans le cas de la migration des DCs plasmacytoïdes [28,

29]. Par Ailleurs Stutte et al, ont montré que CCL17 peut induire la migration de LCs murines d'une façon indépendante de l'expression de son récepteur correspondant CCR4 [30].

D'une façon intéressante j'ai trouvé que la PTX induisait une inhibition dans l'expression et dans la sécrétion de CCL17 et CCL22 dans les TSLP-DCs (Figure 8), ce qui ne fut pas le cas pour CCL3 et CCL4, suggérant que ces chimiokines peuvent encore jouer un rôle important dans l'induction de la migration par la TSLP, probablement en agissant sur un récepteur non connu.

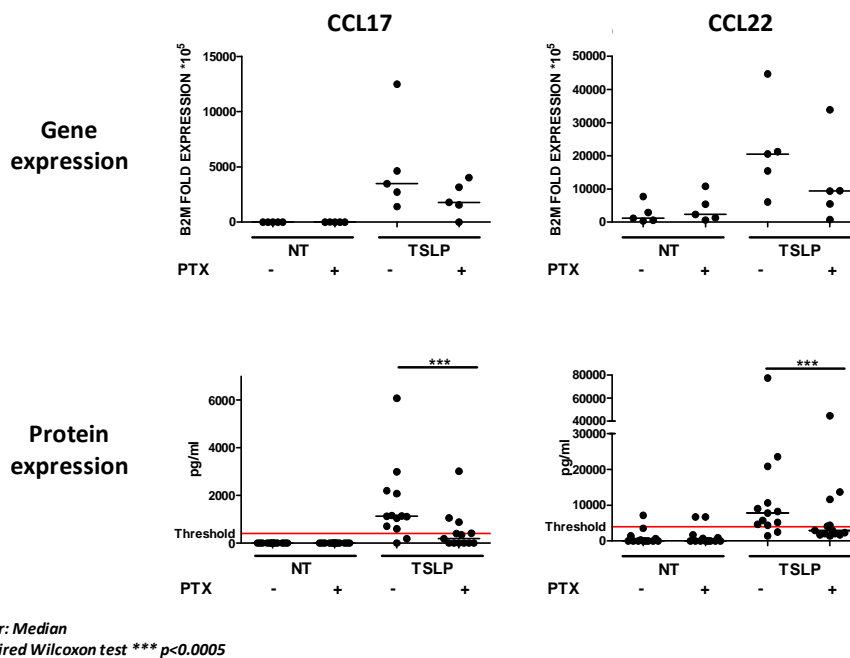


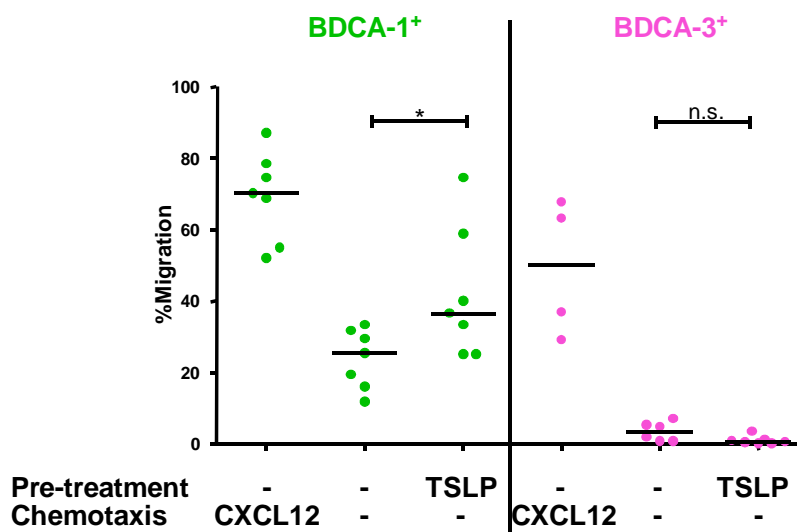
Figure 8 : La PTX inhibe la sécrétion de CCL17 et de CCL22 par les TSLP-DCs.

Panel du haut: Les données représentent l'expression des gènes codant le CCL17 et le CCL22, par des DCs traitées avec ou sans la TSLP et la PTX. L'évaluation fut réalisée par PCR en temps réel.

Panel du bas : Les données représentent la quantité de CCL17 et CCL22 présentes dans les surnageants de culture de DCs traitées avec ou sans la TSLP et la PTX. La mesure fut réalisée par ELISA.

Jusqu'à présent j'avais testé l'induction de la migration par la TSLP sur les DCs totales du sang. Or cette population est constituée majoritairement par un sous-groupe de DCs caractérisées par l'expression de la molécule BDCA-1. Cependant une autre sous-population largement minoritaire constitue aussi les DCs du sang ; cette dernière est caractérisée par l'expression du marqueur de surface BDCA-3 [31].

Ainsi j'ai testé si la TSLP pouvait induire la migration dans ces deux sous-types de DCs. J'ai isolé les DCs BDCA-1 et BDCA-3 du sang et je les ai traitées d'une façon indépendante avec la TSLP. Les résultats montrèrent que les DCs BDCA-3 ont globalement une capacité de migration inférieure aux BDCA-1 (Figure 9). Cependant ce qui est très intéressant c'est que la TSLP induit la migration des DCs BDCA-1 et non pas la migration des DCs BDCA-3 (Figure 9).



Bar: Median
Paired Wilcoxon test * $p < 0.01$;

Figure 9 : La TSLP n'induit pas la migration des DCs BDCA-3 du sang

Pourcentage de cellules qui migrent relatif à la numération totale. La migration des DCs BDCA-1 et BDCA-3 fut adressée indépendamment. * $p \leq 0.05$, test de Wilcoxon apparié non-paramétrique. Les barres représentent les moyennes.

J'ai regardé si la TSLP était en effet capable d'activer les deux sous-populations de DCs. En effet la TSLP fut capable d'induire l'expression de molécules de co-stimulation de façon équivalente dans les deux sous-types de DCs (Figure 10).

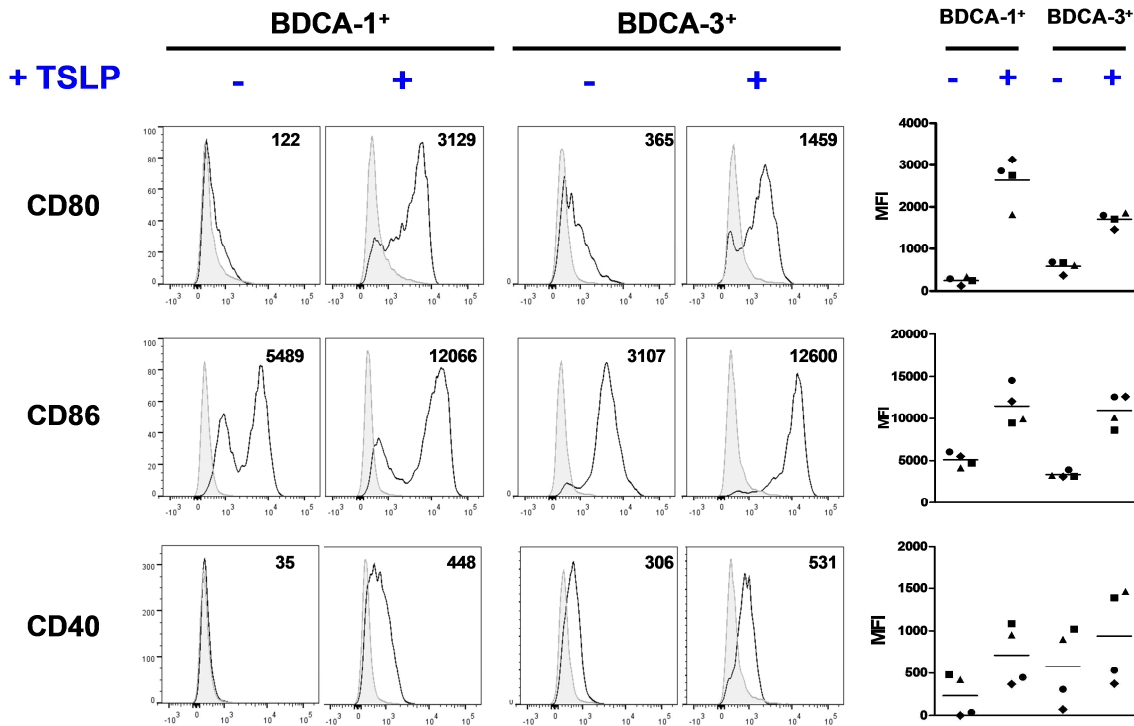


Figure 10: Maturation induite par la TSLP sur les DCs BDCA-1 et BDCA-3

Histogrammes représentant l'expression de surface des marqueurs de maturation sur les cellules BDCA-1 et BDCA-3 après le traitement par la TSLP. Les histogrammes gris représentent les contrôles isotypiques correspondants. Les numéros représentent les intensités moyennes de fluorescence. A droite, intensités moyennes de fluorescence pour 4 donneurs indépendants pour chaque marqueur.

J'ai cherché si la TSLP pouvait avoir d'autres effets différentiels sur les sous-types de DCs du sang. J'ai trouvé que la TSLP non seulement ne pouvait pas induire la migration des BDCA-3 mais induisait aussi une sécrétion moins importante des chimiokines CCL17, CCL22, CCL3 et CCL4 sur ce sous-type en comparaison avec les DCs BDCA-1 (Figure 11).

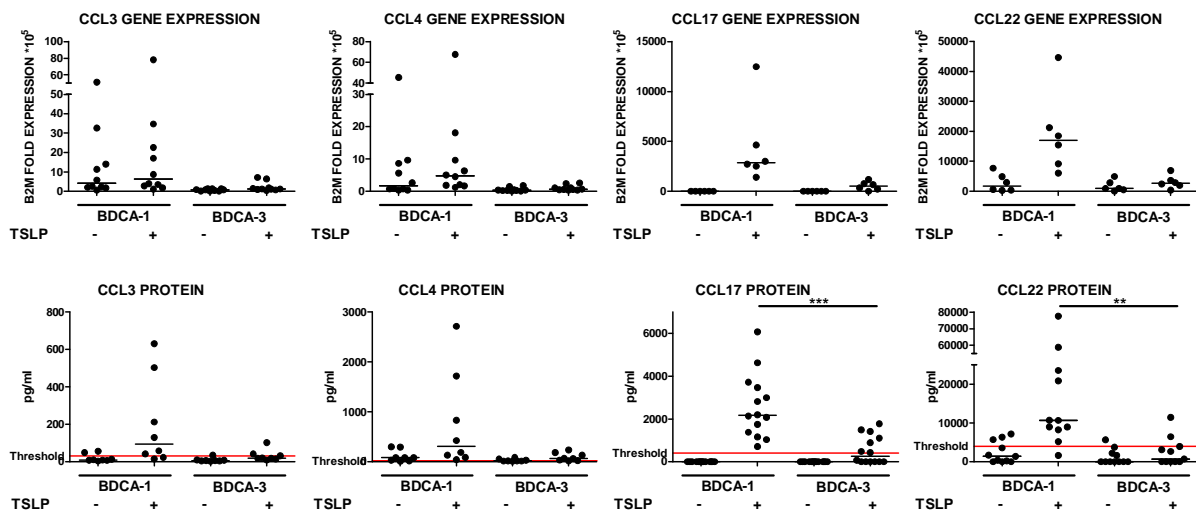


Figure 11: la sécrétion de chimiokines induite par la TSLP est restreinte aux DCs BDCA-1.

Panels du haut: Expression des gènes codant les chimiokines, sur les DCs BDCA-1 et BDCA-3 traitées pendant 24 heures avec ou sans TSLP. Les données furent obtenues par PCR en temps réel.

Panels du bas: quantification protéique des chimiokines présentes dans les surnageants de DCs BDCA-1 et BDCA-3 traitées pendant 24 heures avec ou sans TSLP. Les données furent obtenues par ELISA pour CCL17 et CCL22 et CBA pour CCL3 et CCL4. $**p \leq 0.005$ $***p \leq 0.0005$, test de Wilcoxon non-paramétrique apparié.

Ainsi les conclusions de cette deuxième partie sont :

- L'induction de la migration et de la polarisation des DCs par la TSLP est dépendante d'un récepteur associé à une protéine G inhibitrice.
- La migration et la sécrétion de chimiokines induite par la TSLP sont restreintes à la sous-population de DCs BDCA-1 et sont inhibées par le traitement à la PTX.

Ainsi je propose que la TSLP induise au moins deux voies de signalisation différentes. Une première voie de signalisation serait commune aux cellules BDCA-1 et BDCA-3 et induirait la maturation des DCs. La deuxième voie induirait la sécrétion de chimiokines et la migration cellulaire. Cette deuxième voie ne serait activée par la TSLP que dans le cas des cellules BDCA-1 et serait sensible au traitement par la PTX.

3/ Rôle de la TSLP dans l'ontogénie des cellules de Langerhans

Des études dans la souris ont montré que les populations myéloïdes dérivent d'un précurseur hématopoïétique qui progressivement donne lieu à d'autres progéniteurs s'engageant de façon restrictive dans une lignée déterminée [32]. Les DCs du sang semblent être les cellules qui maintiennent les populations de DCs présentes dans les tissus. Le cas des LCs est assez particulier étant donné que ces cellules proviennent d'un précurseur embryonnaire qui colonise l'épiderme avant la naissance [33]. Il a été montré qu'à l'âge adulte les LCs sont capables de s'auto renouveler et de se différencier à partir de précurseurs locaux [33, 34]. Ce phénomène est dépendant du facteur de croissance TGF beta (TGF- β) [35, 36]. Dans le cas des conditions inflammatoires, de nouvelles DCs peuvent être générées à partir de monocytes ou de précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ provenant du sang [37-39]. Chez l'être humain ceci est suggéré par la différenciation *in vitro* de DCs à partir de ces précurseurs en présence de différents cocktails de cytokines. Par ailleurs, il a été montré que les monocytes stimulés avec du GM-CSF + IL4 [37] et les cellules CD34⁺ stimulées avec du FLT3 + TNF α + GM-CSF [40] peuvent aussi donner lieu à des LCs en présence de TGF- β . Cependant on ne peut pas savoir si ceci arrive réellement *in vivo* ou quelle serait la relevance de ces cocktails de cytokines dans la pathologie humaine.

Dans notre laboratoire, une base de données des profils d'expression génique des DCs de sang humaines traitées ou pas avec la TSLP et le TNF- α avait été générée au préalable par Raphael Zollinger.

Une analyse méticuleuse des gènes induits par la TSLP sur les DCs, m'a permis d'observer que les gènes CD1a, CCR6 et CD207 (ou langérine) étaient induits sur les DCs par la TSLP et non pas par le TNF- α (Figure 12A). Ces gènes caractérisent phénotypiquement les LCs

épidermiques [41-44]. Ainsi j'ai testé l'hypothèse selon laquelle la TSLP induisait un phénotype de type LC sur les DCs du sang.

A

TCELL TYPE	mRNA expression profile				^b Literature based		
	^a BLOOD TOTAL DC				DDC	LC	Reference
TREATMENT	EX VIVO	Medium	TNF	TSLP	-	-	-
CD1A	+	-	-	++	++	+++	Santegoets, S. 2008
CD14	-	-	-	-	Expressed	-	Nestle, O. 1993
Langerin (CD207)	-	-	-	++	-	+++	Santegoets, S. 2008
CD205	++	+	++	++	+	++	Santegoets, S. 2008
MRC1 /// MRC1L1	++	++	-	+++	++	-	Santegoets, S. 2008
CD209	-	-	-	-	+	-	Santegoets, S. 2008
CDH1	++	++	++	++	++	+++	Santegoets, S. 2008
MMP12	-	-	-	++	nd	Expressed	Rust, R. 2006
CCL22	++	+++	+++	+++	nd	Expressed	Rust, R. 2006
CCL17	-	-	-	+	nd	Expressed	Rust, R. 2006
CCR2	-	-	-	-	-	-	Lundberg, K. 2013
CCR6	-	-	-	+	-	+	Santegoets, S. 2008
CCR7	+	+++	+++	+++	+++	-	Santegoets, S. 2008
CXCR4	+++	++	++	++	+++	++	Santegoets, S. 2008

B

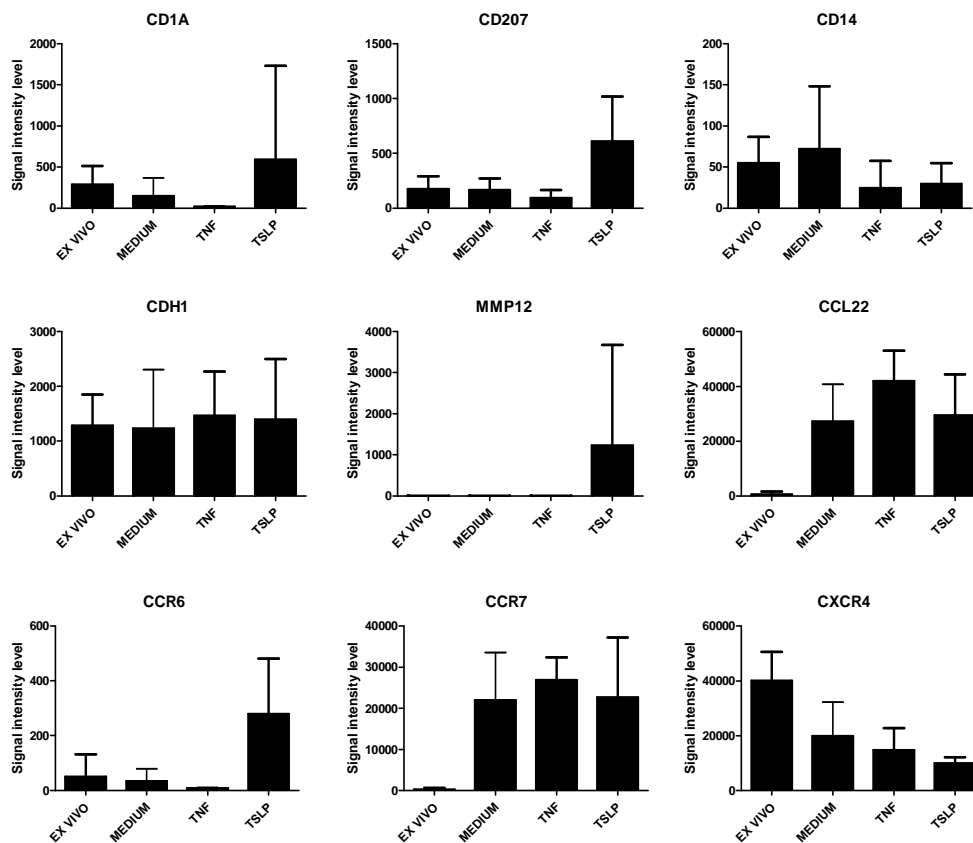


Figure 12: Profil génétique des TSLP-DCs du sang et des DCs de la peau

(A) ^aExpression génique de DCs totales purifiées du sang juste après le tri (Ex-vivo) ou après 6 heures de culture avec du milieu plus ou moins TSLP ou TNF- α . L'expression génique fut déterminée par Affymetrix (Human Genome U133 Plus 2.0). ^bExpression décrite dans la littérature par Santegoets,

Nestle[44], Rust et Lundberg. Cellules de Langerhans (LC); DCs dermales (DDC); Non déterminé (nd). Intensité des signaux: -, ≤ 200 ; +, 200-500; ++, 500-5000; +++, ≥ 5000 .

(B) Les données représentent les intensités de fluorescence des différents gènes pour les conditions évaluées. (Ex-vivo n=5, milieu et TNF- α n=3, TSLP n=4).

Chorro et al, avait montré au préalable, dans un modèle murin de dermatite atopique, que les LCs étaient plus abondantes dans l'épiderme des souris malades par rapport aux souris contrôle [45]. Ils ont montré que ceci était dû à la prolifération des LCs in situ, et que cette prolifération était indépendante de la présence de TSLP dans l'épiderme [45]. Cependant les auteurs n'ont pas testé qu'elle était la contribution des progéniteurs sanguins en présence ou absence de TSLP, au phénotype observé dans l'épiderme malade. Le récepteur pour la TSLP n'est exprimé ni par les monocytes ni par les progéniteurs CD34⁺ humains (Nos observations non-publiées). Etant donné mes résultats antérieurs sur le phénotype génique type LC induit par la TSLP sur les DCs de sang (Figure 12), j'ai décidé de tester si la TSLP pouvait induire la différenciation des DCs sanguines en LCs.

Mes résultats montrent que les DCs BDCA-1 et BDCA-3 du sang et des amygdales humaines, expriment le récepteur TSLP et répondent à la TSLP par une forte activation représentée par l'expression du marqueur de maturation CD80 (Figure 13B). La TSLP induit l'expression de la molécule caractéristique des LCs, CD1a (Figure 13A). Cependant de façon intéressante l'induction de CD1a fut restreinte aux cellules BDCA-1 du sang, puisque ni les BDCA-3 sanguines ni les cellules tonsillaires exprimèrent CD1a (Figure 13A). Cependant quand j'ai évalué l'expression de CD207 je n'ai pu voir aucune induction suite au traitement par la TSLP. Comme il avait été reporté que le TGF- β était essentiel pour la différenciation en LCs, j'ai traité les DCs avec la TSLP ou le TGF- β ou avec une combinaison de TSLP + TGF- β (Figure 13A).

J'ai observé qu'avec la combinaison de TSLP + TGF- β , une fraction des BDCA-1 du sang exprimait les marqueurs CD1a et CD207 (Figure 13A). Cependant ceci ne fut pas le cas des BDCA-3 ou des cellules tonsillaires. Des progéniteurs CD34⁺ du sang humain furent stimulés avec un cocktail de cytokines (FLT3 + GMCSF + TNF α + TGF- β) induisant la différenciation LC en temps que contrôle (Figure 13A).

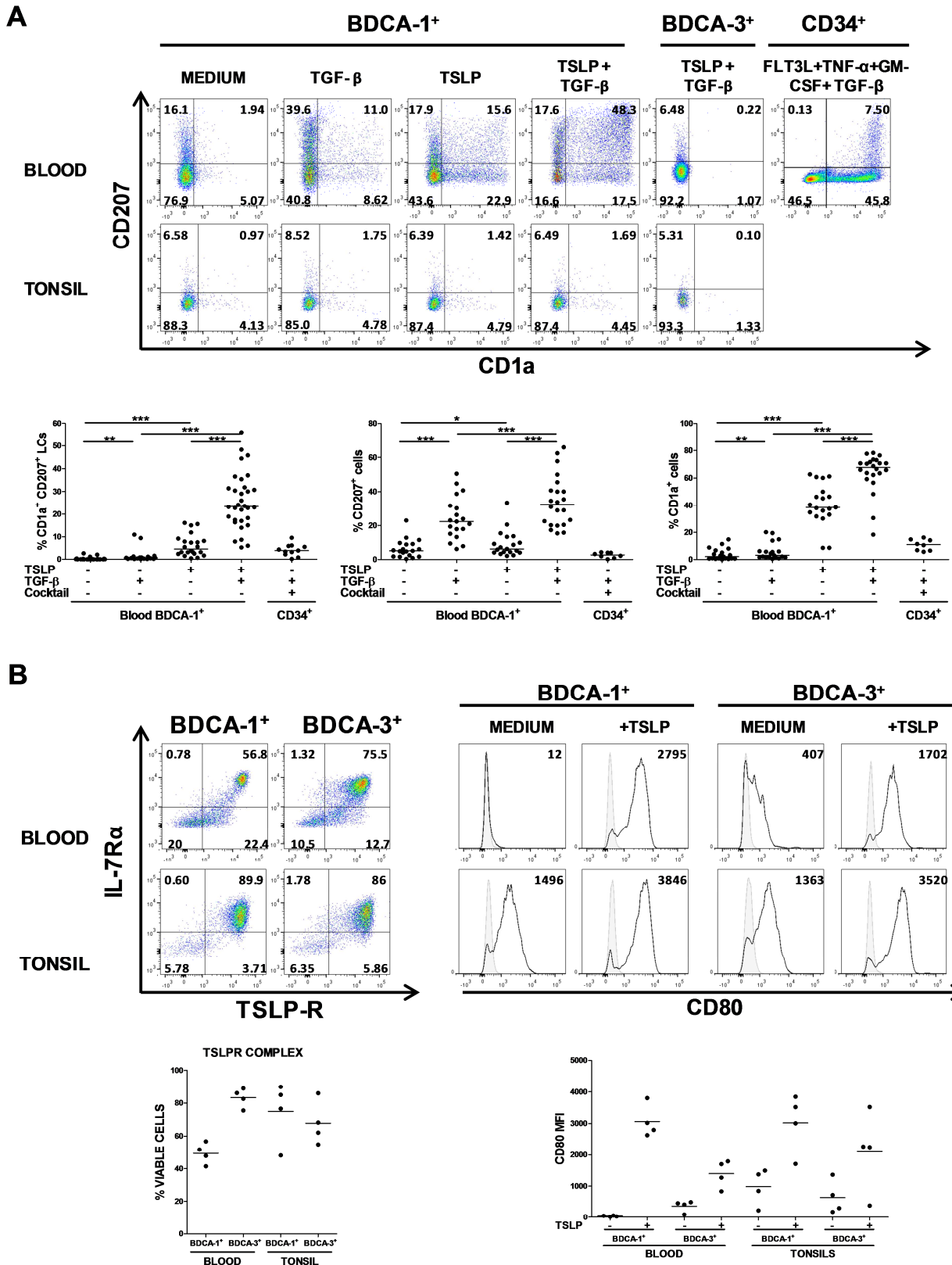


Figure 13: La TSLP et le TGF-β induisent la différenciation des DCs BDCA-1 du sang en LCs

(A) Panel du haut: Plots représentatifs de l'expression de CD1a et CD207 par les DCs humaines BDCA-1 et BDCA-3 issues du sang et des amygdales après 24h de culture sous différentes conditions.

Des LCs dérivées de cellules CD34⁺ après traitement avec Flt3-L, TNF- α , GM-CSF et TGF- β (Cocktail) sont montrées comme contrôle positif du marquage. Les numéros représentent le pourcentage de cellules viables. Panel du bas: Quantification du pourcentage de cellules viables différenciées en LCs CD1a⁺ CD207⁺, CD207⁺ et CD1a⁺ pour toutes les conditions. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.005$ *** $p \leq 0.0005$, test de Wilcoxon non-paramétrique apparié.

(B) Panel gauche: Plots représentatifs de l'expression des chaînes TSLPR et IL-7 α du récepteur pour la TSLP humaine. Les pourcentages correspondent à des cellules viables. Panel de droite: Histogrammes représentatifs de l'expression de CD80 par les DCs humaines BDCA-1 et BDCA-3 issues du sang et des amygdales après 24h de culture sous différentes conditions. Les histogrammes gris représentent les contrôles isotypiques et les numéros représentent les intensités moyennes de fluorescence. En bas, quantification des MFIs pour quatre donneurs indépendants.

Mes résultats montrent qu'en présence de TSLP et de TGF- β , on peut obtenir en moyenne 25-30% de cellules de type LC, CD1a⁺CD207⁺, et ceci dans 71% des donneurs (Figure 13A). Dans le cas des progéniteurs CD34⁺ on a obtenu moins de 10% de LCs dans 80% des donneurs. Dans nos mains, la combinaison de TSLP + TGF- β sur les DCs BDCA1 du sang, fut plus efficace dans la génération de LCs que le protocole à partir de cellules CD34⁺. Par ailleurs nos résultats suggèrent que la TSLP est importante dans la régulation de l'expression du CD1a alors que le TGF- β est essentiel pour l'expression en surface du CD207 (Figure 13A).

Mise à part l'expression de CD1a et de C207, une des caractéristiques fondamentales des LCs est la présence cytoplasmique de granules de Birbeck. Ces organelles furent découvertes par Birbeck en 1961 et semblent faire partir de la voie endosomale dans les LCs murines et humaines [2, 46]. Ainsi j'ai testé si les DCs BDCA-1 stimulées avec la TSLP et le TGF- β possédaient aussi des granules de Birbeck. Les DCs BDCA-1 du sang furent stimulées avec la combinaison de TSLP + TGF- β . Les LCs CD1a⁺ CD207⁺ (TSLP +TGF- β -LCs) et furent triées après 3 jours de culture et analysées par électron microscopie (Figure 14). Nos résultats montrent la présence de granules de Birbeck dans le cytoplasme des cellules. Ainsi j'ai pu confirmer que cette population CD1a⁺ CD207⁺ dérivée des DCs BDCA-1 du sang était bien constituée de *bona fide* LCs (Figure 14).

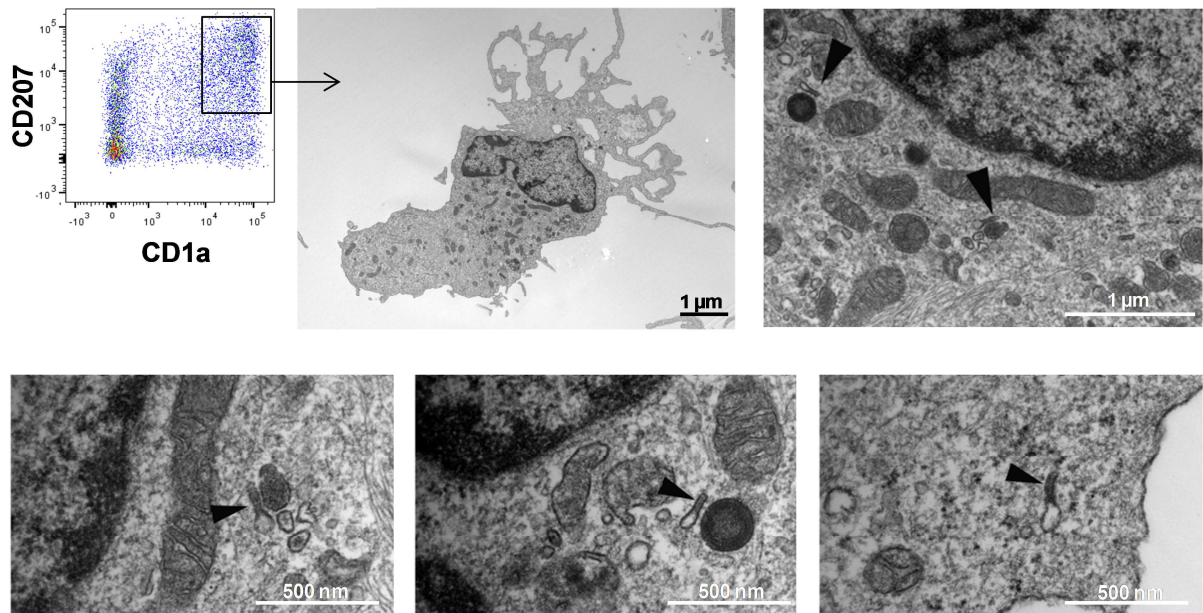


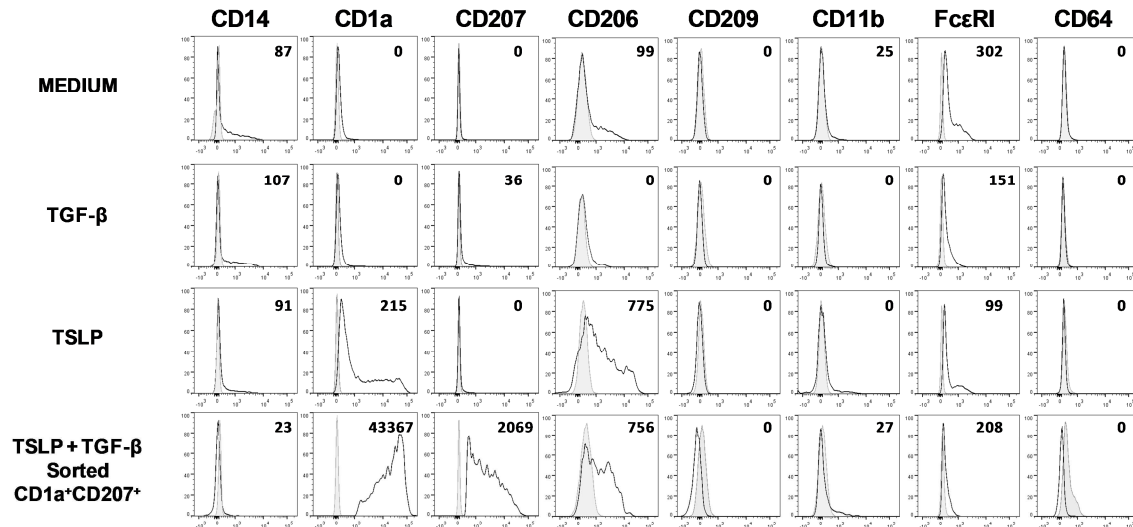
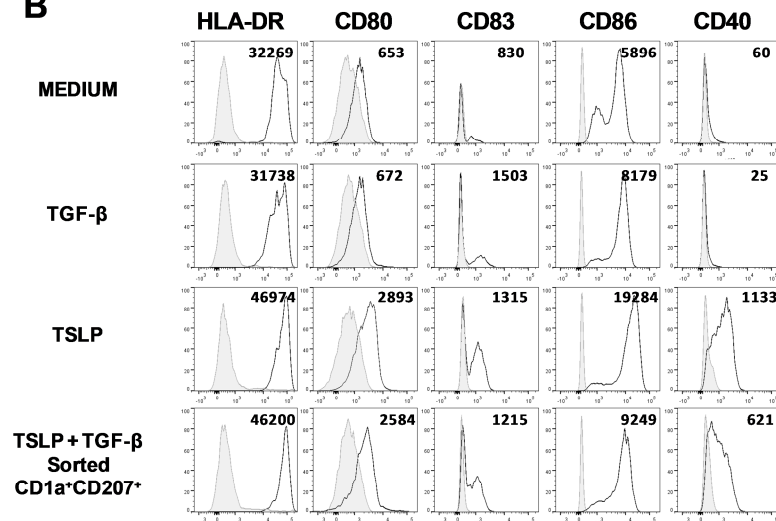
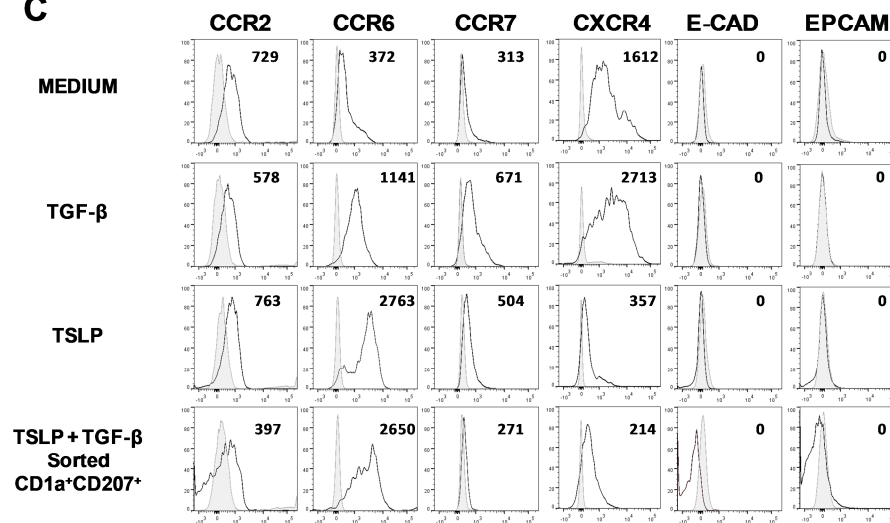
Figure 14: Granules de Birbeck dans les DCs BDCA-1⁺ du sang traitées avec de la TSLP et du TGF- β

Après 3 jours de culture avec de la TSLP et du TGF- β , les BDCA-1 différenciées en LCs ont été triées selon l'expression de CD1a et de CD207. Les photos d'électronmicroscopie révèlent la présence de granules de Birbeck dans le cytoplasme (flèches). Les granules montrés sur les photos du bas correspondent à des cellules indépendantes.

L'étape suivante fut de caractériser plus en profondeur les TSLP+TGF- β -LCs au niveau des marqueurs de surface et du phénotype. J'ai trouvé que ces cellules exprimaient le CD206, marqueur qui caractérise les macrophages et les DCs inflammatoires. D'autres marqueurs comme CD14, CD64 et CD209 furent absents (Figure 15A). Pour déterminer l'état de maturation de ces cellules, j'ai évalué l'expression de différentes molécules co-stimulatoires. Les TSLP+TGF- β -LCs présentèrent un état mature, caractérisé par l'expression de HLA-DR, CD80, CD83, CD86 et CD40 (Figure 15B).

Les marqueurs CD86 et CD40 semblèrent être régulés à la baisse par le TGF- β en comparaison avec le traitement simple par la TSLP (Figure 15B).

En ce qui concerne le recrutement vers la peau, il a été montré que les précurseurs de LCs suivent séquentiellement deux gradients de chimiokines : ils doivent exprimer d'abord le récepteur CCR2 et puis le CCR6 [47]. Pour être retenues dans l'épiderme, les LCs expriment les molécules E-cadhérine et Epcam [48]. Finalement pour quitter la peau, à nouveau d'une façon séquentielle les LCs activées doivent exprimer le CXCR4 et le CCR7 qui leur permettront d'atteindre les ganglions lymphatiques [47]. Les TSLP+ TGF- β -LCs régulent à la baisse CCR2, CCR7 et CXCR4 mais régulent à la hausse le récepteur CCR6 qui les localise dans l'épiderme (Figure 15C). Cependant les molécules de rétention dans l'épiderme, E-cadhérine et Epcam, ne sont pas exprimées (Figure 15C).

A**B****C****Figure 15: Phénotype des TSLP- LCs.**

Histogrammes représentatifs de l'expression de différents marqueurs de lignée myéloïde (A), d'activation (B) et molécules concernant le recrutement vers la peau (C) sur les cellules BDCA-1 du

sang après 24h de culture avec ou sans TSLP et/ou TGF- β . Les données sur les DCs BDCA-1 avec la TSLP et le TGF- β correspondent à la population CD1a⁺ CD207⁺. Les histogrammes gris représentent les contrôles isotypiques et les numéros représentent les intensités moyennes de fluorescence. *n* = 4 to 11

Afin de comprendre qu'elle pourrait être la fonction des TSLP⁺ TGF- β -LCs, j'ai trié des cellules BDCA-1 et je les ai stimulées avec la TSLP, le TGF- β ou les deux en combinaison. Des progéniteurs CD34⁺ furent mis en culture en parallèle avec le cocktail de différenciation en LCs. Les cellules qui furent différenciées en LCs dans le cas des TSLP⁺ TGF- β -LCs et CD34-LCs furent triées pour ne tester que la population effectivement différenciée en LCs. Ces différents types de DCs furent mis en culture avec des lymphocytes T naïves allogéniques pendant 5 jours (Figure 16). Ensuite les cellules T furent comptées et restimulées pendant 24 heures. Les surnageants issus de cette dernière culture de 24 heures furent testés pour la présence de différentes cytokines, afin de déterminer le profil T généré dans chacune des différentes conditions.

Dans tout les cas les DCs activées furent capables d'induire une expansion des cellules T naïves (Figure 16A). Pour visualiser de façon simultanée l'effet des différents types de DCs sur le priming T j'ai fait une analyse multiparamétrique, une analyse par composantes principales qui résume les résultats de toutes les cytokines évaluées (Figure 16C). Nous avons observé que les cellules T stimulées par des TSLP-DCs et des TSLP⁺ TGF- β -LCs constituent un ensemble séparé des cellules T stimulées avec des Medium-DC, des TGF- β -DCs et des CD34-LCs (Figure 16C). Ceci pourrait suggérer que cet ensemble serait plus relevant pour des conditions inflammatoires tandis que le deuxième ensemble serait représentatif de la condition basale.

Les TSLP⁺ TGF- β -LCs induisent un profil T de type Th2 similaire à celui reporté pour les TSLP-DCs et pour les LCs en général (Figure 16B). Cependant, on a trouvé une sécrétion de

cytokines inflammatoires élevée pour TNF- α , IL9 et IL6 en comparaison avec les CD34-LCs (Figure 16B).

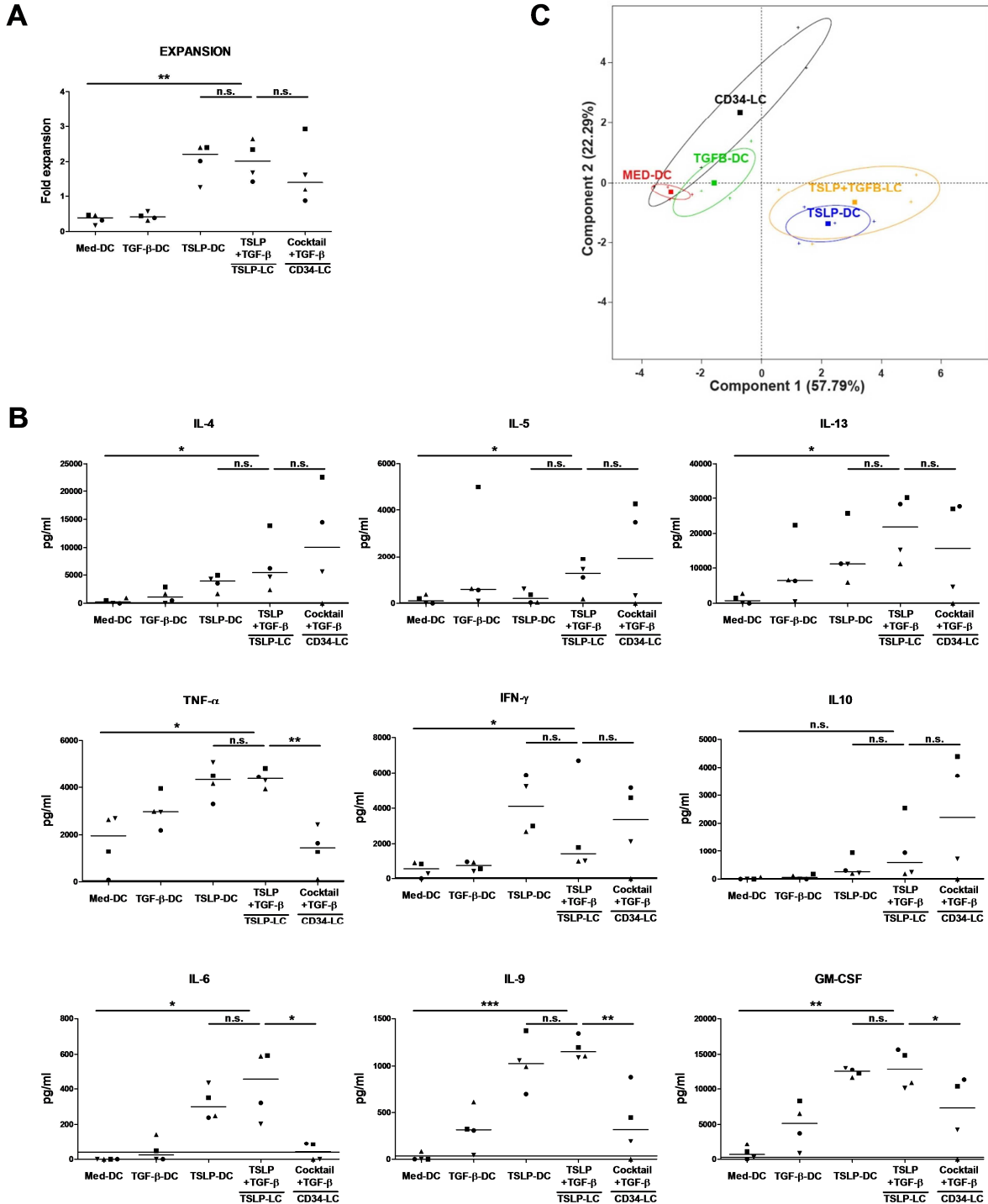


Figure 16: Les TSLP-LCs induisent in profil Th2 sur les cellules T CD4⁺ naïves.

Les DCs BDCA-1⁺ furent stimulées avec ou sans TSLP et TGF- β pendant 24h. Les cellules CD34⁺ furent stimulées avec Flt3-L, TNF- α , GM-CSF et TGF- β (Cocktail). Les LCs dérivées de BDCA-1⁺ et

de CD34⁺ furent triées selon l'expression de CD1a et CD207 et cultivées avec des cellules T naïves CD4⁺ pendant 6 jours avant la restimulation des cellules T .

(A) L'expansion des cellules T représente le ratio entre les cellules comptées à la fin de la culture divisé par le nombre de cellules semées initialement. $^{**}p \leq 0$. Test T apparié.

(B) Les données représentent la concentration de cytokines après 24 heures de restimulation, mesurées par CBA. $^{*}p \leq 0.05$ $^{**}p \leq 0.005$. Test T apparié.

(C) Analyse par composantes principales (PCA) qui montre la ressemblance entre les différents profils T obtenus (sécrétion de 13 cytokines). Les composantes 1 et 2 furent choisies comme les axes expliquant la plupart de la variance données. Les croix représentent des donneurs individuels (n=4). Les carrés représentent les barycentres. Des ellipses de confiance à 95% furent dessinées pour chaque condition.

Les conclusions de cette troisième partie sont

- La TSLP et le TGF- β agissent en synergie pour induire la différenciation des DCs du sang BDCA-1 en LCs.
- Les TSLP⁺ TGF- β - LCs possèdent des granules Birbeck.
- Les TSLP⁺ TGF- β - LCs sont matures et expriment un phénotype de localisation épidermique.
- Les TSLP⁺ TGF- β -LCs induisent une réponse T auxiliaire de type Th2 inflammatoire.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a permis de montrer que la TSLP induit la migration des DCs du sang. Cette migration dépend de l'activation du moteur moléculaire myosine II, et dépend au niveau de la signalisation, de l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G inhibitrice. Cependant mes travaux n'ont pas permis de déterminer l'identité de ce récepteur. La TSLP régule l'expression de CCR6 et de CCR7 et la sécrétion des chimiokines CCL17, CCL22, CCL3 et CCL4. Il serait donc important d'évaluer de façon spécifique la contribution de ces facteurs à la migration induite par la TSLP sur les DCs du sang. J'ai montré que la migration induite par la TSLP, ainsi que la sécrétion de chimiokines est restreinte à la sous-population BDCA-1 des DCs du sang. Ainsi, une analyse transcriptionnelle des TSLP- DCs BDCA-1 en comparaison aux TSLP-DCs BDCA3 serait très utile pour déterminer qu'elles sont les différentes voies de signalisation induites par la TSLP sur ces sous-populations, et quels autres candidats pourraient être impliqués dans la migration induite par la TSLP.

J'ai montré que la TSLP en synergie avec le TGF- β induit la différenciation des DCs BDCA-1 du sang en LCs. Ces TSLP+TGF- β -LCs ont un phénotype activé et induisent un profil de type Th2 inflammatoire sur des lymphocytes T naïfs. Nous suggérons donc que les TSLP + TGF- β -LCs constituent des LCs inflammatoires. Il s'avère donc essentiel de comparer ces cellules aux LCs épidermiques fraîches provenant d'un tissu sain, ainsi qu'à des LCs isolées d'un tissu inflammatoire. Ces données permettraient d'évaluer quelle est la relevance de cette nouvelle voie de signalisation dans les pathologies liées à l'expression de TSLP.

Par ailleurs une comparaison entre les profils génétiques des différents progéniteurs de LCs, monocytes, cellules CD34⁺ et DCs BDCA-1 serait utile pour identifier des modules communs liés à la différenciation en LCs.

En ce qui concerne les effets différentiels de la TSLP sur les différentes sous-populations de DCs humaines, j'ai montré que la TSLP agit d'une façon différentielle au moins à trois niveaux :

- l'induction de la migration
- l'induction de l'expression et de la sécrétion de chimiokines
- la différenciation en LCs

Ces résultats montrent qu'un facteur unique, tel que la TSLP, peut stimuler de façon différente les sous-populations de DCs, en donnant lieu à de différentes fonctions ou comportements.

Mon travail ouvre de nouvelles perspectives concernant l'identification de ce type de facteurs inflammatoires qui peuvent induire des réponses différentes dans les sous-types de DCs. Par ailleurs il ouvre de nouvelles perspectives concernant la contribution relative de ces différents sous-types de DCs non seulement dans les maladies allergiques impliquant la TSLP mais aussi dans l'inflammation tissulaire en général.

REFERENCES

1. Langerhans, P., Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch Pathol Anat*, 1868. 44: p. 325-337.
2. Birbeck, M.S., An electron microscopy study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol*, 1961. 37: p. 51-64.
3. Basset, F., C. Nezelof, and J. Turiaf, [Presence in electron microscopy of odd filamentous structures in pulmonary and osseous lesions of histiocytosis X. Current status of the question]. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*, 1966. 117(5): p. 413-26.
4. Reams, W.M., Jr. and S.P. Tompkins, A developmental study of murine epidermal Langerhans cells. *Dev Biol*, 1973. 31(1): p. 114-23.
5. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 1973. 137(5): p. 1142-62.
6. Steinman, R.M., et al., Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med*, 1983. 157(2): p. 613-27.
7. Schuler, G. and R.M. Steinman, Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med*, 1985. 161(3): p. 526-46.
8. Banchereau, J. and R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998. 392(6673): p. 245-52.
9. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 2013.
10. Pulendran, B., et al., Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(3): p. 1036-41.
11. Merad, M., et al., The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*, 2013. 31: p. 563-604.
12. Maldonado-Lopez, R., et al., Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. *J Leukoc Biol*, 1999. 66(2): p. 242-6.
13. Dudziak, D., et al., Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*, 2007. 315(5808): p. 107-11.
14. Segura, E., M. Durand, and S. Amigorena, Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J Exp Med*, 2013. 210(5): p. 1035-47.
15. Reche, P.A., et al., Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol*, 2001. 167(1): p. 336-43.
16. Soumelis, V., et al., Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol*, 2002. 3(7): p. 673-80.
17. Pandey, A., et al., Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol*, 2000. 1(1): p. 59-64.
18. Ebner, S., et al., Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 119(4): p. 982-90.
19. Soumelis, V. and Y.J. Liu, Human thymic stromal lymphopoietin: a novel epithelial cell-derived cytokine and a potential key player in the induction of allergic inflammation. *Springer Semin Immunopathol*, 2004. 25(3-4): p. 325-33.

20. Watanabe, N., et al., Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol*, 2004. 5(4): p. 426-34.
21. Ying, S., et al., Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol*, 2005. 174(12): p. 8183-90.
22. Mou, Z., et al., Overexpression of thymic stromal lymphopoietin in allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol*, 2009. 129(3): p. 297-301.
23. Matsuda, A., et al., Functional role of thymic stromal lymphopoietin in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 51(1): p. 151-5.
24. Oyoshi, M.K., et al., Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a T(H)2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 126(5): p. 976-84, 984 e1-5.
25. Sixt, M., Interstitial locomotion of leukocytes. *Immunol Lett*, 2011. 138(1): p. 32-4.
26. Sallusto, F., et al., Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*, 1998. 28(9): p. 2760-9.
27. Zlotnik, A. and O. Yoshie, The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 2012. 36(5): p. 705-16.
28. Vanbervliet, B., et al., The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med*, 2003. 198(5): p. 823-30.
29. Krug, A., et al., IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation. *J Immunol*, 2002. 169(11): p. 6079-83.
30. Stutte, S., et al., Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(19): p. 8736-41.
31. Dzionek, A., et al., BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 2000. 165(11): p. 6037-46.
32. Kondo, M., et al., Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 759-806.
33. Merad, M., et al., Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol*, 2002. 3(12): p. 1135-41.
34. Kanitakis, J., et al., Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. *Exp Dermatol*, 2011. 20(2): p. 145-6.
35. Borkowski, T.A., et al., A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, 1996. 184(6): p. 2417-22.
36. Kaplan, D.H., et al., Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, 2007. 204(11): p. 2545-52.
37. Geissmann, F., et al., Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med*, 1998. 187(6): p. 961-6.
38. Caux, C., et al., GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*, 1992. 360(6401): p. 258-61.
39. Ginhoux, F., et al., Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol*, 2006. 7(3): p. 265-73.
40. Klechevsky, E., et al., Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity*, 2008. 29(3): p. 497-510.

41. Santegoets, S.J., et al., Transcriptional profiling of human skin-resident Langerhans cells and CD1a+ dermal dendritic cells: differential activation states suggest distinct functions. *J Leukoc Biol*, 2008. 84(1): p. 143-51.
42. Rust, R., et al., Gene expression analysis of dendritic/Langerhans cells and Langerhans cell histiocytosis. *J Pathol*, 2006. 209(4): p. 474-83.
43. Lundberg, K., Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models-unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e52875.
44. Nestle, F.O., et al., Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol*, 1993. 151(11): p. 6535-45.
45. Chorro, L., et al., Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*, 2009. 206(13): p. 3089-100.
46. Valladeau, J., et al., Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*, 2000. 12(1): p. 71-81.
47. Villablanca, E.J. and J.R. Mora, A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur J Immunol*, 2008. 38(11): p. 2975-80.
48. Tang, A., et al., Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature*, 1993. 361(6407): p. 82-5.