



**HAL**  
open science

# Développement de modèles de souris humanisées pour l'étude des cellules immunitaires de la peau in vivo

David Boccara

► **To cite this version:**

David Boccara. Développement de modèles de souris humanisées pour l'étude des cellules immunitaires de la peau in vivo. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066287 . tel-01706714

**HAL Id: tel-01706714**

**<https://theses.hal.science/tel-01706714>**

Submitted on 12 Feb 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE  
Paris VI**

**Spécialité Immunologie**  
(ED Physiologie et Physiopathologie)

Soutenue par

**David Jacob Boccara**

**DEVELOPPEMENT DE MODELES DE SOURIS  
HUMANISEES POUR L'ETUDE DES CELLULES  
IMMUNITAIRES DE LA PEAU IN VIVO**

Soutenue le 17 OCTOBRE 2017

Dirigée par Docteur Béhazine Combadière et Docteur Angèle Soria

Devant un jury composé de :

Président du Jury : Pr Bertrand Bellier  
Rapporteur : Pr David Fuks  
Rapporteur : Pr Jean-David Bouaziz  
Examineur : Dr Hans Yssel  
Directrices de thèse : Dr Béhazine Combadière  
Dr Angèle Soria



## REMERCIEMENTS

---

À Monsieur le **Professeur David Fuks,**

Tu me fais l'amitié de juger mon travail. Ta rigueur et ta détermination m'ont toujours impressionné. Tu es aujourd'hui le Professeur respecté que tu mérites d'être. Merci pour ta disponibilité et l'attention que tu as portée à ce travail.

À Monsieur le **Professeur Jean David Bouaziz,**

Je te suis extrêmement reconnaissant d'avoir accepté de participer au jury de soutenance de ma thèse. Ton enthousiasme et ta gentillesse vont de pair avec tes immenses compétences et connaissances. J'espère que nous travaillerons longtemps ensemble.

À Monsieur le **Professeur Bertrand Bellier,**

Je vous remercie de m'accorder l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver l'expression de mes sincères remerciements et de ma gratitude.

À Monsieur le **Docteur Hans Yssel,**

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez immédiatement porté au sujet. Vous me faites l'honneur de juger mon travail. Veuillez recevoir l'expression de ma respectueuse gratitude.

À Madame le **Docteur Béhazine Combadière,**

Ta compétence, ta rigueur scientifique et ta clairvoyance m'ont guidé tout au long de ces années. Tu m'as accueilli au sein de ton équipe malgré l'immense chemin qui me restait à parcourir. Je n'oublierai jamais tous ces conseils et toute l'attention que tu as pu m'apporter. Tu m'as suivi avec obstination et toujours aidé avec la pertinence et la rigueur qui te caractérisent, sans jamais désespérer, et tout cela avec le sourire. Je n'aurai pas non plus assez de ces quelques lignes pour t'exprimer toute ma gratitude.

A Madame le **Docteur Angèle Soria,**

Tes conseils et ton aide m'ont été précieux. La pertinence de tes remarques et la justesse de tes corrections, sont pour moi un exemple de rigueur et je t'en remercie. Tu seras un grand Professeur et j'espère que nous resterons longtemps en contact.

A mon Maître, **Monsieur le Professeur Maurice Mimoun,**

Sans vous rien de tout cela n'aurait été possible. C'est un immense honneur et privilège de travailler à vos côtés. Je mesure chaque jour la chance que j'ai d'apprendre de vous. Votre savoir, votre enseignement, votre disponibilité et votre bienveillance n'ont pas d'égal. Vous êtes plus qu'un modèle pour moi. J'espère toujours me montrer digne de la confiance que vous m'avez accordée. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma plus grande admiration.

A **Monsieur le Professeur Marc Chaouat,**

Trouve dans ce travail l'expression de mon plus grand respect. Tu es à la fois un Maître d'enseignement pratique et théorique pour moi. Ta sagesse et ta rigueur sont un exemple. Tu as toujours su trouver les mots et les réponses à mes questions. Je mesure la chance inestimable que j'ai de pouvoir travailler avec toi. Sois assuré de ma profonde reconnaissance et de mon admiration.

A mes parents, **Nicole et Hector**, votre soutien sans faille et votre amour sans limite m'accompagnent chaque jour. Je n'aurai jamais assez de mots pour vous exprimer toute ma reconnaissance et mon amour.

A **mes frères, mes belles-sœurs, mes neveux et nièce**, je vous aime.

A mes beaux-parents et toute ma famille, merci de rendre ma vie si heureuse.

A Madame le **Docteur Hélène Perrin** qui m'a tant aidé.

A toute l'équipe du **CIMI**, merci pour votre bienveillance.

A tous mes collègues du **service de Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique de l'hôpital Saint-Louis**, travailler avec vous est un vrai bonheur.

A tous **mes amis**, merci pour tous les bons moments passés ensemble.

A **Salomé et Ruben**, vous êtes ma vie. Je vous guiderai, vous accompagnerai et vous aimerai à chacun de vos pas.

A ma femme **Anouk**, mon binôme, ma coéquipière, ma partenaire, mon double, rien ne me rend plus heureux que vivre avec toi. Ce travail est aussi un peu le tien. Tu es irremplaçable et inimitable. Je t'aime pour la vie. (L'Ironman n'a jamais été aussi près...).



## TABLE DES MATIERES

---

TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	9
TABLE DES TABLEAUX .....	10
ANNEXES.....	11
ABREVIATIONS .....	13
INTRODUCTION ET CONTEXTE DE L'ETUDE .....	15
OBJECTIFS .....	16
RESUME DE L'ETUDE.....	18
Résumé en Français.....	18
Résumé en Anglais .....	19
<b>PREMIERE PARTIE : La peau humaine et ses modèles d'études .....</b>	<b>22</b>
<b>1. LA PEAU HUMAINE, ANATOMIE, FONCTIONS, SPECIFICITES .....</b>	<b>22</b>
1.1. Fonctions de la peau.....	22
1.2. Histologie de la peau .....	22
1.2.1. L'Epiderme.....	23
1.2.2. La jonction dermo- épidermique .....	25
1.2.3. Le derme.....	26
1.2.4. L'hypoderme.....	28
1.2.5. La vascularisation cutanée .....	29
1.2.6. L'innervation cutanée.....	29
1.3. Les cellules immunitaires cutanées .....	30
1.3.1. Les cellules dendritiques.....	31
1.3.2. Les cellules de Langerhans .....	32
1.3.3. Les cellules dendritiques dermales.....	41
1.3.4. Les lymphocytes T .....	51
1.3.5. Autres cellules résidentes du système immunitaire cutané .....	52
<b>2. MODELES D'ETUDE DES CELLULES IMMUNITAIRES DE LA PEAU HUMAINE.....</b>	<b>54</b>
2.1. Modèles in vivo ou explants cutanés humains.....	54
2.2. Modèles in vivo ou explants animaux .....	54
2.3. Modèles de cultures cellulaires de cellules de la peau humaine .....	56
2.4. Modèles de peau reconstruite .....	57
2.5. Modèles de greffe de peaux .....	59
<b>DEUXIEME PARTIE : Modèle de souris humanisée avec greffe de peau humaine .....</b>	<b>66</b>
<b>1. CONTEXTE.....</b>	<b>67</b>
<b>2. OBJECTIF .....</b>	<b>67</b>
<b>3. MATERIEL ET METHODE.....</b>	<b>68</b>
3.1. Animaux .....	68
3.2. Explants de peau humaine.....	69
3.3. Réalisation de la greffe .....	71
3.4. Contrôle de la greffe et du modèle.....	76

<b>TROISIEME PARTIE : modèle de souris humanisé par injection de progéniteurs hématopoïétiques</b>	<b>84</b>
1. <b>CONTEXTE</b>	<b>85</b>
2. <b>OBJECTIF</b>	<b>85</b>
3. <b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>85</b>
4. <b>RESULTATS</b>	<b>86</b>
<b>QUATRIEME PARTIE : Etude des cellules de Langerhans sur explants cutanés</b>	<b>92</b>
1. <b>CONTEXTE</b>	<b>92</b>
2. <b>OBJECTIF</b>	<b>92</b>
3. <b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>92</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>105</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1 : Histologie de la peau (Leridant-Commonswiki 2006) .....	23
Figure 2: Jonction dermo- épidermique .....	26
Figure 3: Vascularisation cutanée .....	29
Figure 4 : Innervation de la peau.....	30
Figure 5 : Microscopie électronique d'une cellule de Langerhans avec visualisation des granules de Birbeck (Dr Schmitt et Dr De Zutter Inserm U.346) .....	35
Figure 6 : Populations de DC/macrophages extraites du derme humain (A) ou murin (B) et analysées en cytométrie de flux.....	43
Figure 7: Localisation des DDC et des macrophages du derme sur coupes histologiques de peau humaine en conditions non inflammatoires. ....	44
Figure 8: Ontogénèse des APC cutanées.....	50
Figure 9: Cellules dendritiques et macrophages de la peau humaine et murine .....	50
Figure 10: Principales cellules immunitaires cutanées et localisation en conditions non inflammatoires (Frank O. Nestle et al. 2009). ....	53
Figure 11: Modèle de peau Episkin .....	57
Figure 12: Différentes étapes de la mise au point de souris immunodéficientes. (Shultz).....	61
Figure 13 : Evolution des différentes lignées de souris immunodéficientes. ....	68
Figure 14: Préparation des explants.....	71
Figure 15: différentes étapes de la mise au point du modèle de souris humanisées.....	73
Figure 16: Différentes étapes de greffe de peau humaine sur souris NSG. ....	74
Figure 17 : Bilan globale et taux de réussite des greffes selon protocoles. ....	75
Figure 18 : Architecture et maintien des APC dans la peau humaine greffée et dans l'explant témoin. ....	77
Figure 19 : APC et différentes voies de réponse immunitaire à un vaccin dans la peau humaine greffée .....	79
Figure 20 : Réponse immunitaire des LT humains de la peau greffée en présence d'antigènes.....	80
Figure 21 : Colonisation de la peau des souris humanisées par des cellules humaines. ....	87
Figure 22 : Cellules humaines présentes dans la peau des souris humanisées et voie de vaccination intradermique.....	88
Figure 23: Distribution des cellules CD1a+ chez des volontaires sains âgés de 21 à 68 ans (Objectif x10. Échelle : barre = 100µm).....	94
Figure 24: Numération des cellules CD1a dans l'épiderme et dans le derme d'explants de peaux humaines en fonction de l'âge des donneurs. ....	95
Figure 25 : Numération des cellules CD1a dans l'épiderme et dans le derme d'explants de peaux humaines en fonction des différents sites donneurs. ....	96

## TABLE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Phénotype des APC de souris et délétion .....	39
Tableau 2 : Phénotype APC humains .....	40
Tableau 3: rôle des APCs et vaccination .....	48
Tableau 4: Modèles récents de souris humanisées et résultats. ....	62
Tableau 5: Différents modèles d'étude des mécanismes immunitaires .....	63

### ❖ ANNEXE 1 : PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

1. **Maintenance of human skin tissue and cellularity after engraftment in immunodeficient mouse model.** David Boccara, Béhazine Combadière, Angèle Soria. *Journal of Experimental and Applied Animal Sciences*. Volume 2, Number 2, pp. 165-171, 2017

2. **Long-term maintenance of skin immune system in a NOD-Scid IL2rgnull mouse model transplanted with human skin.** Soria A, **Boccara D**, Chonco L, Yahia N, Dufossée M, Cardinaud S, Moris A, Liard C, Joulin-Giet A, Julithe M, Mimoun M, Combadière B, Perrin H. *Exp Dermatol*. 2014 Nov;23(11):850-2. doi: 10.1111/exd.12530.

3. **Analysis of the skin of mice humanized for the immune system** Mireille Centlivre, Maxime Petit, Andrew J. Hutton, Mélody Dufossée, David Boccara, Maurice Mimoun, Angèle Soria, Béhazine Combadière. *Exp Dermatol*. 2017 Mar 7. doi: 10.1111/exd.13340.

4. **IL-32 promotes detachment and activation of human Langerhans cells in a human skin explant model.** Jessica Gonnet, Hélène Perrin, Andrew John Hutton, David Boccara, Olivia Bonduelle, Maurice Mimoun, Michaël Atlan, Angèle Soria and Béhazine Combadière. (soumis).

### ❖ ANNEXE 2 CONSENTEMENT POUR L'UTILISATION D'EXPLANTS DE PEAU DANS UN PROJET DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE

### ❖ ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE STANDARDISATION DE LA TECHNIQUE DE GREFFE



## ABREVIATIONS

Abréviations	
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>Ag</b>	Antigène
<b>APC</b>	Cellule présentatrice d'antigène
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CXCL10 (ou IP-10)</b>	Interféron gamma-induced protein 10
<b>DC</b>	Cellule dendritique
<b>DDC</b>	Cellule dendritique dermale
<b>DM</b>	Macrophage dermique
<b>HSV</b>	Virus Herpès Simplex
<b>ID</b>	Intradermique
<b>IDEC</b>	Cellule dendritique épidermique inflammatoire
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IL</b>	Interleukine
<b>Ig</b>	Immunoglobulines
<b>IM</b>	Intramusculaire
<b>FP</b>	Follicule pileux
<b>LC</b>	Cellule de Langerhans
<b>LB</b>	Lymphocytes B
<b>LT</b>	Lymphocytes T
<b>MVA</b>	Modified Vaccinia Ankara
<b>NK</b>	Cellules Natural Killer
<b>NOD</b>	Souris Nonobese Diabetic
<b>NS</b>	Souris NOD/SCID (Nonobese Diabetic/ Severe Combined Immuno Deficiency)
<b>NSG</b>	Souris NOD.SCID.IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup>
<b>NKT</b>	Cellules T Natural Killer
<b>pDC</b>	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
<b>PVH</b>	Papillomavirus humain
<b>SC</b>	Sous-cutané
<b>SCID</b>	Souris Severe Combined Immuno Deficiency
<b>TC</b>	Transcutanée
<b>TCM</b>	Cellules T centrales mémoires
<b>TCR</b>	Récepteur des cellules T
<b>TEM</b>	Cellules T effectrices mémoires
<b>Tfh</b>	LT CD4 folliculaires "helper"
<b>TLR</b>	Toll-Like-Recepteur
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>tDC</b>	Cellule dendritique télégène



## INTRODUCTION ET CONTEXTE DE L'ETUDE

---

**La peau** est un organe riche en cellules immunitaires, il joue un rôle important dans la défense du corps humain, en tant que barrière mécanique mais également en tant que premier relais de l'immunité.

De nombreux modèles d'études de peau sont utilisés à ce jour. Que ce soit des explants de peau humaine issus de chirurgie plastique, des peaux reconstruites en deux ou trois dimensions, des modèles vivants de « souris humanisées » ou de la peau humaine greffée sur une souris immunodéprimée.

Chaque support présentant des avantages, (préservation prolongée pour les modèles construits, populations cellulaires et architectures similaires pour les modèles vivants) et des limites (persistance de cellules murines, raréfaction des cellules présentatrices de l'antigène...). L'objectif de ce travail était de mettre au point un ou plusieurs modèles d'étude de l'immunité cutanée.

**La problématique principale** de recherche menée au sein de l'équipe est le **développement de nouvelles stratégies vaccinales et la compréhension des mécanismes de réponses immunitaires et inflammatoire dans la peau humaine.**

Leur étude approfondie a permis de mieux participer au développement et à l'amélioration des nouveaux vaccins - notamment la vaccination sans aiguilles - pour prévenir et contrôler l'émergence ou la persistance des maladies infectieuses. L'équipe développe et étudie depuis plus d'une quinzaine d'années des méthodes innovantes d'administration de vaccin et leur impact sur la réponse immunitaire après vaccination épidermique ou dermique. Le travail de l'équipe s'effectue dans un cadre de recherche translationnelle entre des modèles fondamentaux précliniques (modèles murins, explants de peau, modèles de souris humanisées) et le développement clinique des programmes de vaccination. Dans ce cadre particulier de développement de protocole préclinique, **un modèle de greffes de peau humaine sur souris immunodéficientes est un outil essentiel à la compréhension des mécanismes cutanés face à l'injection d'un vaccin.**

## OBJECTIFS

---

Mon expertise et mes compétences en chirurgie cutanée et le lien essentiel que je pouvais établir entre un laboratoire de recherche et un service clinique, m'ont permis d'intégrer l'équipe et mettre en place les conditions particulières d'un modèle de greffes de peau humaine sur des souris immunodéficientes dans le but de conserver à la fois la structure de la peau (épiderme, derme) et le maintien des cellules immunitaires de types dendritiques sans lesquelles la réponse immunitaire ne peut pas être initiée. De par mon activité de chirurgien plasticien et en collaboration avec Dr Angèle Soria (dermatologue), j'ai pu :

- 1- Mettre en place un protocole clinique de prélèvements de peau après chirurgie plastique soumis à la réglementation en rigueur actuellement
- 2- Développer et standardiser un protocole de greffe de peau humaine à des souris immunodéficientes (article 1 et 2)
- 3- Étudier et suivre dans le temps la conservation des cellules présentatrices d'antigène dans la peau après xéno greffe.
- 4- Participer à des travaux d'études de l'inflammation cutanée après injection de vaccin (article)

La principale difficulté de ces études réside dans le choix est la mise au point d'un modèle d'étude qui permette de tester, et de comprendre les différents mécanismes de réponse immunitaire cutanée.

**La première étape** de mon travail de recherche a consisté à **la mise au point d'un modèle de souris humanisée.**

De ma part ma formation et mon travail de chirurgien plasticien, la maîtrise des différentes techniques de greffe de peau ainsi que la possibilité de recueillir de la peau humaine au bloc opératoire ont été un atout pour la réalisation de ce travail de recherche. Dans un premier temps il a fallu recueillir des explants de peau de patientes opérées à l'hôpital Saint-Louis, puis chercher à optimiser et à fiabiliser la technique de greffe de peau humaine sur des souris NSG HLA-A2 tg immunodéprimées.

Une fois les greffes réalisées, il a été nécessaire de tester la conservation des structures et de l'architecture de la peau humaine ainsi que la persistance et de la fonctionnalité des cellules présentatrices de l'antigène et des lymphocytes T.

Ainsi mis au point, ce modèle pourra permettre d'étudier les différents mécanismes immunitaires cutanés, rôle de l'inflammation, vaccinations.

La principale limite de ce modèle étant la raréfaction des cellules présentatrices de l'antigène (APC) au-delà de plusieurs semaines, nous avons mis au point et testé un deuxième modèle de « souris humanisée » sans avoir recours à une greffe de peau humaine, mais par des injections intra-hépatiques de progéniteurs hématopoïétiques humain.

**La deuxième étape de mon travail a donc permis de valider la mise au point d'un deuxième modèle de souris humanisée.**

Pour ce modèle, les souris bénéficiaient d'injections intra-hépatiques de progéniteurs hématopoïétiques humains HLA-A2+CD34+.

Afin d'obtenir une réponse immunitaire aux tests vaccinaux, il a fallu injecter aux souris des APC provenant du même sang que les progéniteurs hématopoïétiques. Ils étaient au préalable cultivés in vitro durant 3 jours en présence de hGM-CSF et d'IL-4.

Nous avons ainsi pu constater que les populations cellulaires en APC et lymphocytes de nos souris humanisées étaient équivalentes à celle de nos explants cutanés témoin.

Si le modèle de souris humanisée est un très bon support pour l'étude des mécanismes immunitaires, son coût et la lourdeur des manipulations nécessaires à sa réalisation, nous ont conduits à travailler le plus souvent possible sur des explants cutanés. Cependant, les données de la littérature concernant la concentration en APC des explants est pauvre. Si leur concentration en APC n'est pas la même selon l'âge du patient ou la localisation du site donneur, il faudra choisir ceux qui seront exploitables et utilisables. Il a donc été important d'étudier ces paramètres.

**Ainsi, la troisième étape de mon travail de recherche a donc consisté à l'étude des explants cutanés.**

Les explants issus des liftings cutanés proviennent de sites donneurs très différents (seins, abdomen, cuisses, face) et de patient d'âge très variable (18-75 ans). Il a donc fallu s'assurer que tous présentaient un nombre d'APC équivalent dans l'épiderme et le derme. Une analyse comparative des différents prélèvements a été réalisée permettant d'étudier le nombre de cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et cellules de Langerhans).

## *RESUME DE L'ETUDE*

### Résumé en Français

---

Le développement de nouvelles stratégies vaccinales et le traitement de nombreuses pathologies dermatologiques font partis des enjeux majeurs des années à venir. L'étude et la compréhension des mécanismes de réponses immunitaires cutanées sont ainsi essentielles. Les cellules de Langerhans épidermiques et les cellules dendritiques dermiques jouent un rôle central dans l'immunité adaptative spécifique à un pathogène, et dans l'immunité innée, de par leur fonction de présentation des antigènes (APC), mais également d'activateur et de régulateur de l'action des autres cellules immunitaires.

Durant ce travail de recherche, nous avons mis au point et testé plusieurs modèles d'étude des mécanismes de l'immunité cutanée. **Un premier modèle de « souris humanisées »** a été mis au point, à partir de souris immunodéprimées NSG HLA-A2 tg et de greffes de peau humaine. Une fois le modèle techniquement mis au point, nous avons vérifié de la conservation et de la fonctionnalité des APC. La faible conservation des APC au-delà de plusieurs semaines, nous a conduit à mettre au point **un deuxième modèle de « souris humanisées » qui bénéficiaient d'injections intra-hépatiques** de progéniteurs hématopoïétiques humains. La colonisation en APC cutanées humaines n'étant pas suffisante, il a fallu injecter aux souris des APC provenant du même sang que les progéniteurs hématopoïétiques afin d'obtenir une réponse immunitaire suffisante. La faible concentration en APC cutanées de ce modèle, la lourdeur et le coût de mise au point sont des limites non négligeables pour l'utilisation de ce support d'étude.

Ces souris humanisées sont d'excellents modèles d'étude, mais ils présentent chacun leurs limites. Lorsque cela est possible il est ainsi plus simple **d'utiliser des explants cutanés frais**. Nous avons quantifié les APC cutanées en fonction du site d'origine (abdomen, seins...) et de l'âge du donneur de ces explants issus de chirurgie plastique. Sur les 21 explants testés, nous n'avons pas retrouvé de différence significative dans la concentration en APC quel que soit le site et l'âge du donneur.

**Ces 3 modèles offrent des possibilités d'étude** des mécanismes de l'immunité cutanée, nous les utilisons actuellement au sein du laboratoire pour des tests vaccinaux, et pour l'étude du rôle de l'IL-32 produite par les kératinocytes impliqués dans l'activation des cellules de Langerhans.

**Mots clés** : Greffe de peau humaine, souris humanisées, explants, lymphocytes T, cellules présentatrices d'antigène, modèle murin, vascularisation cutanée.

The development of new vaccination strategies and the treatment of many dermatological pathologies are among the major challenges of the years to come. The study and understanding of the mechanisms of cutaneous immune responses are thus essential. Epidermal Langerhans cells and dermal dendritic cells play a central role in pathogen-specific adaptive immunity, and in innate immunity, by their antigen presenting function (APC), but also as an activator and regulator of the action of other immune cells.

During this research, we developed and tested several models for the study of the mechanisms of cutaneous immunity. **A first model of "humanized mice"** was developed from immunosuppressed NSG HLA-A2 tg mice and human skin grafts. Once the model was technically developed, we verified the conservation and functionality of the APCs. The low PCA retention beyond several weeks, led us to develop **a second model of "humanized mice" that benefited from intrahepatic injections of human hematopoietic progenitors**. Since colonization in human skin APCs was not sufficient, it was necessary to inject the APCs from the same blood as the hematopoietic progenitors to obtain a sufficient immune response. The low concentration of skin APCs in this model, the cumbersomeness and the cost of development are not insignificant limits for the use of this study support.

These humanized mice are excellent models of study, but they each have their limitations. Where possible, it is thus easier to use **fresh skin explants**. We quantified the cutaneous APCs according to the site of origin (abdomen, breasts ...) and the age of the donor of these explants resulting from plastic surgery. Of the 21 explants tested, there was no significant difference in APC concentration at any site and age of the donor.

**These three models** offer possibilities for studying the mechanisms of skin immunity, we are currently using them in the laboratory for vaccine tests, and for studying the role of IL-32 produced by the keratinocytes involved in I activation of Langerhans cells.

**Keywords:** Human skin graft, humanized mice, explants, T lymphocytes, antigen presenting cells, murine model, vascularization of the skin.

## ***PREMIERE PARTIE***

### ***La peau humaine et ses modèles d'études***



### 1. LA PEAU HUMAINE, ANATOMIE, FONCTIONS, SPECIFICITES

Formidable barrière de protection contre les agressions extérieures, la peau possède une architecture et un système immunitaire qui lui sont propres. La réalisation de notre modèle de souris humanisées nécessite de maîtriser la structure et la vascularisation cutanée. Nous reverrons ainsi en détail dans cette première partie l'ensemble des cellules de la peau et leurs fonctions.

#### 1.1. Fonctions de la peau

La peau est un organe essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. Représentant un peu plus de 6% du poids du corps, soit environ 4 kilogrammes, elle assure de nombreuses fonctions. Sa surface moyenne est estimée à 1,7m<sup>2</sup>. Le revêtement cutané enveloppe le corps humain et constitue ainsi la première protection de l'organisme contre les agressions de l'environnement, mais aussi l'interface sociale avec le monde extérieur.

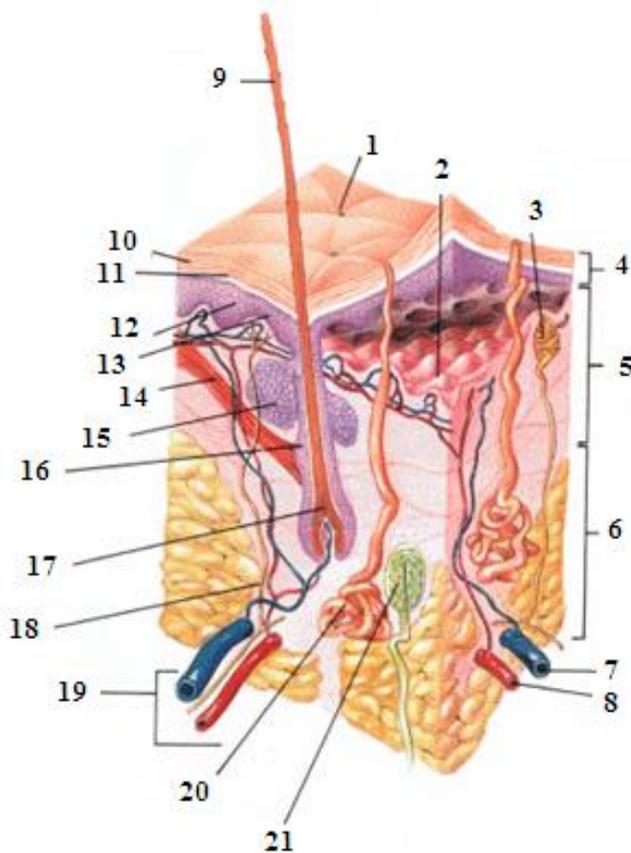
De par son élasticité et de sa solidité, elle constitue un rempart mécanique. L'imperméabilité de la couche cornée, le renouvellement cellulaire, la présence de microorganismes saprophytes, et la présence de cellules immunitaires aussi nombreuses que différentes (macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques...) protège contre les infections.

La peau participe également à la régulation de l'organisme (thermorégulation, homéostasie...) et protège des rayonnements UV.

Enfin, son aspect, son élasticité, sa texture, et sa couleur conditionnent l'apparence sociale et esthétique de chacun. Son altération peut ainsi avoir un retentissement fonctionnel majeur mais aussi social, psychologique et affectif.

#### 1.2. Histologie de la peau

La peau est constituée de 3 couches principales : L'épiderme, épithélium d'épaisseur variable, qui repose sur un tissu conjonctif, le derme, et l'hypoderme, couche conjonctivo-adipeuse.



### Légendes

- 1- PORE DE TRANSPIRATION
- 2- JONCTION DERMO-EPIDERMIQUE (PAPILLE DERMIQUE)
- 3- TERMINAISON NERVEUSE (TOUCHER)
- 4- EPIDERME
- 5- DERME
- 6- HYPODERME
- 7- VEINE
- 8- ARTERE
- 9 - POIL
- 10- COUCHE CORNEE
- 11- COUCHE PIGMENTEE
- 12- KERATINOCYTES
- 13- MELANOCYTES
- 14- MUSCLE ERECTEUR DU POIL
- 15- GLANDE SEBACEE
- 16- FOLICULE PILEUX
- 17- BULBE
- 18- NERF
- 19- SYSTEME LYMPHATIQUE ET VASCULAIRE
- 20- GLANDE SUDORIPARE ECCRINE
- 21- CORPUSCULE DE PACINI

**Figure 1 : Histologie de la peau (Leridant-Commonswiki 2006)**

### **1.2.1. L'Épiderme**

D'origine ectoblastique, l'épiderme est composé à 95% de kératinocytes. Ces cellules s'unissent entre elles pour former un épithélium pavimenteux, stratifié, et kératinisé. D'autres cellules d'origine embryonnaire différente, les mélanocytes, des cellules à fonction immunitaire, et les cellules de Merckel participent également à la constitution des cinq couches de l'épiderme. Son épaisseur varie de 60 à 100 micromètres. L'épiderme est séparé du derme par la membrane basale. C'est un tissu avasculaire dont les nutriments proviennent en majorité du derme par des mécanismes de diffusion passive.

### ❖ Les kératinocytes.

Les kératinocytes (KC) constituent la majorité des cellules de l'épiderme (80%). Issues de la couche basale, compartiment germinatif, elles suivent un programme de différenciation puis d'apoptose et d'élimination de la profondeur vers la surface. Elles produisent en abondance des protéines filamentaires du cytosquelette appelées tonofilaments, et se transforment progressivement en cellules cornées. L'épiderme se renouvelle en moyenne tous les 28 jours, temps nécessaires aux kératinocytes pour se différencier et migrer à travers les 5 couches constituant l'épiderme :

- La couche basale (stratum germinatum), est la plus profonde. Directement en contact avec la membrane basale, elle ne comporte qu'une assise cellulaire de kératinocytes cylindriques unies les unes aux autres par des desmosomes et à la membrane basale par des hémidesmosomes. Elle est l'unique couche de régénération cellulaire.
- La couche de Malpighi ou à cellules à épines (stratum spinosum) est faite de plusieurs couches cellulaires qui se détachent de la membrane basale, acquérant alors la capacité à synthétiser de la kératine. Cette kératine permet de rigidifier les cellules et de les rendre imperméables. On retrouve 2 types d'assises cellulaires, polyédriques (profondeur) et aplaties (superficie). Les épines correspondent à l'aspect histologique de la convergence des tonofilaments et des desmosomes, dont le rôle est essentiel dans le maintien de la cohésion cellulaire.
- La couche granuleuse (stratum granulosum) est formée de trois à cinq assises de cellules aplaties à noyaux pycnotiques, extrêmement basophiles du fait de la présence de grains de kératohyaline dans le cytoplasme.
- La couche claire (stratum lucidum, muqueuse, transitoire) est constituée de cellules aplaties, éosinophiles et anucléées. Elle est uniquement présente dans les épidermes épais, palmaires et plantaires.
- La couche cornée (stratum corneum) est composée de plusieurs assises cellulaires aplaties, kératinisées et anucléées. Leur cytoplasme est occupé par des fibres de kératines enrobées d'une substance amorphe qui renferme une protéine

ultrarésistante : l'involutine. Cette protéine confère sa rigidité et sa résistance à la couche cornée dont l'ensemble des cellules est mort. En surface des cornéocytes sont éliminés de façon ordonnée, ce processus est appelé desquamation. La couche cornée un écran étanche limitant les pertes d'eau par évaporation.

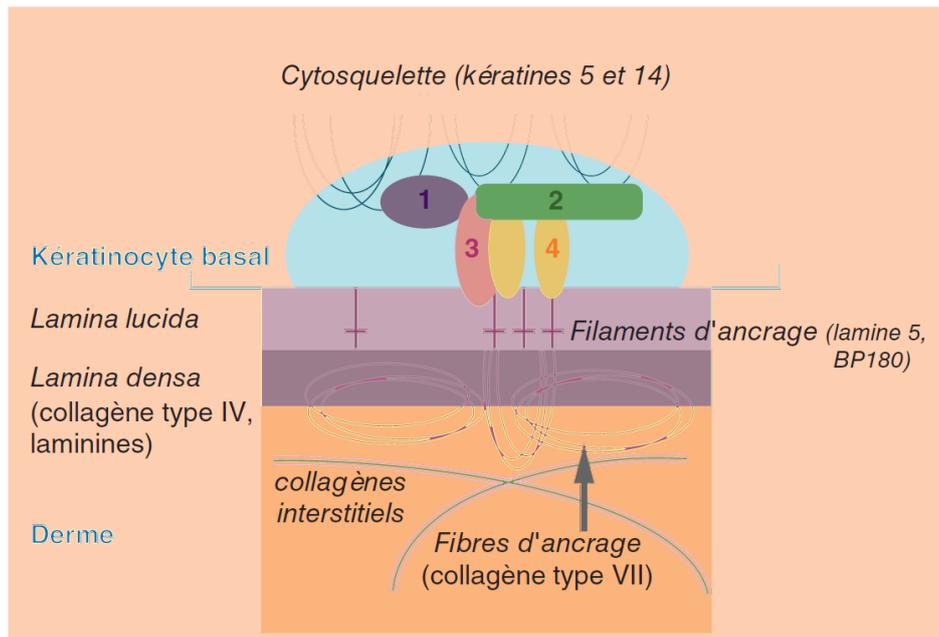
D'un point de vue immunitaire les kératinocytes ont un rôle essentiel. Elles sécrètent en permanence des cytokines (IL-6, IL-10, IL-18, TNF alpha (Bos et Kapsenberg 1993)) qui permettent aux LC de migrer, de se différencier et de changer de morphologie. En 2000, Dieu-Nosjean et al, ont montré qu'elles exprimaient également des CCL20 (MIP3alpha) qui participent à la régulation des cellules progénitrices des LC. (Figure Liard).

En l'absence d'inflammation, les KC ne sécrètent que des précurseurs de l'IL-1alpha et de l'IL-1bêta, qui ne sont pas actifs. En cas d'agression (inflammation, UV, pathogène...), elles pourront rapidement entraîner une activation de tous ces précurseurs.

### **1.2.2. La jonction dermo-épidermique**

L'épiderme repose entièrement sur une membrane basale, dont on distingue trois zones différentes au microscope électronique : la zone sous basale, la lamina densa, et la lamina lucida. Celle-ci peut être lisse ou sinueuse selon les localisations. Lorsqu'elle est sinueuse, le derme émet des expansions vers l'épiderme appelées papilles dermiques (d'où le nom de derme papillaire), séparées par des expansions de l'épiderme vers le derme appelés bourgeons ou crêtes inter-papillaires.

La jonction dermo-épidermique est dense et forme localement une barrière difficile à franchir pour nombre de cellules. La migration des cellules T à travers cette structure se fait par le biais de metalloprotéinases ou gélatinases, en particulier les MMP2 et MMP9 (respectivement gélatinases A et B) (Wu, Crampton, et Hughes 2007).



**Figure 2: Jonction dermo- épidermique**

### 1.2.3. Le derme

D'origine mésoblastique, il est essentiellement constitué de fibres et de fibroblastes. C'est dans le derme que se trouvent les filets nerveux et les vaisseaux cutanés. L'épiderme est ainsi nourri par imbibition à partir des vaisseaux du derme, dont il est séparé par la membrane basale.

Il contient également les annexes cutanées, des corpuscules sensoriels et des cellules libres (histiocytes, lymphocytes...).

Les cellules dermiques sont séparées les unes des autres par un tissu conjonctif fait de trois familles de macromolécules : les protéines fibreuses (collagène et élastine), les mucopolysaccharides, et les glycoprotéines de structure. Ces macromolécules, responsables de l'ensemble des propriétés biomécaniques du derme, sont dégradées et synthétisées en permanence par les fibroblastes.

**Le derme** contient de nombreuses cellules spécialisées: les fibroblastes, les mastocytes, les cellules dendritiques dermales (DDC) (Nestle et Nickoloff 1995), les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et les macrophages dermiques (DM), les cellules T mémoires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les cellules T  $\gamma\delta$ , les cellules T natural killer (NKT) et les natural killer (NK).

Des innates lymphoïdes cells (ILC) ont été décrites dans le derme récemment (Roediger et al. 2013). Ces cellules sont actuellement classées en trois groupes en fonction de leur profil de sécrétion de cytokines et l'expression de facteurs de transcription (Spits et al. 2013 ; Spits et Cupedo 2012). Dans le derme ce sont les ILC2 qui ont été décrites ; elles ont des fonctions antiparasitaires et sont impliquées dans la réparation tissulaire pulmonaire et digestive. Dans la peau elles interagissent avec les mastocytes et ont des fonctions à la fois pro- et anti-inflammatoires (Roediger et al. 2013).

Le derme contient de nombreuses CPA, les macrophages dermiques, les cellules dendritiques plasmocytaires et surtout les cellules dendritiques dermales (DCC) (N Romani et al. 2012 ; Teunissen, Haniffa, et Collin 2012). Certaines sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires (les DC inflammatoires), ou de l'interféron de type I (les DC plasmacytoïdes) ou participent à la présentation croisée (Frank O. Nestle et al. 2009).

Les macrophages dermiques :

Principalement situés dans le derme réticulaire profond autour des capillaires, ils ont la capacité de migrer jusque dans les ganglions lymphatiques en cas d'inflammation.

Ils expriment plusieurs marqueurs communs aux monocytes tels que CD68, CD163, CD209 et DC-SIGN, contrairement aux DDC qui n'expriment pas DC-SIGN (Ochoa et al. 2008).

On distingue deux zones dermiques :

- ❖ La couche papillaire, superficielle, est riche en cellules et capillaires sanguins qui assurent la nutrition de l'épiderme.
- ❖ La couche réticulaire, profonde, est pauvre en cellules. Elle est composée de faisceaux de fibres collagènes et de fibres élastiques. Son rôle principal est d'absorber et de répondre aux contraintes mécaniques sur la peau.

Son épaisseur est très variable d'un site à l'autre. Le dos, le scalp sont des zones où le derme est très épais. Au contraire, les paupières ou le dos de la main ont un derme particulièrement fin. L'âge joue un rôle important dans l'épaisseur du derme : le tissu conjonctif s'altérant fortement avec le temps, le derme ne cesse de s'affiner au fil des années.

#### ❖ Les mélanocytes.

Les mélanocytes sont des cellules issues de la crête neurale. Ils sont localisés dès la fin de leur migration dans la couche basale et la couche des cellules à épines. Ils sont dénués de tout desmosome et tonofilament. Leur cytoplasme contient de nombreux mélanosomes et vésicules qui permettent la synthèse de mélanine, responsable de la coloration cutanée.

#### ❖ Les cellules de Merkel.

Les cellules de Merkel ont un rôle essentiel dans la transmission des différents stimuli au contact de la peau. Elles sont associées aux corpuscules de Meissner, de Pacini, de Ruffini, et à des terminaisons libres, dont le rôle est de transmettre toutes les informations sensorielles sous forme de signal électrique.

Les cellules de Merkel répondent à de très faibles pressions et permettent de ressentir le moindre contact. Leur densité varie selon la localisation (très nombreuses au niveau des pulpes des doigts par exemple).

#### **1.2.4. L'hypoderme.**

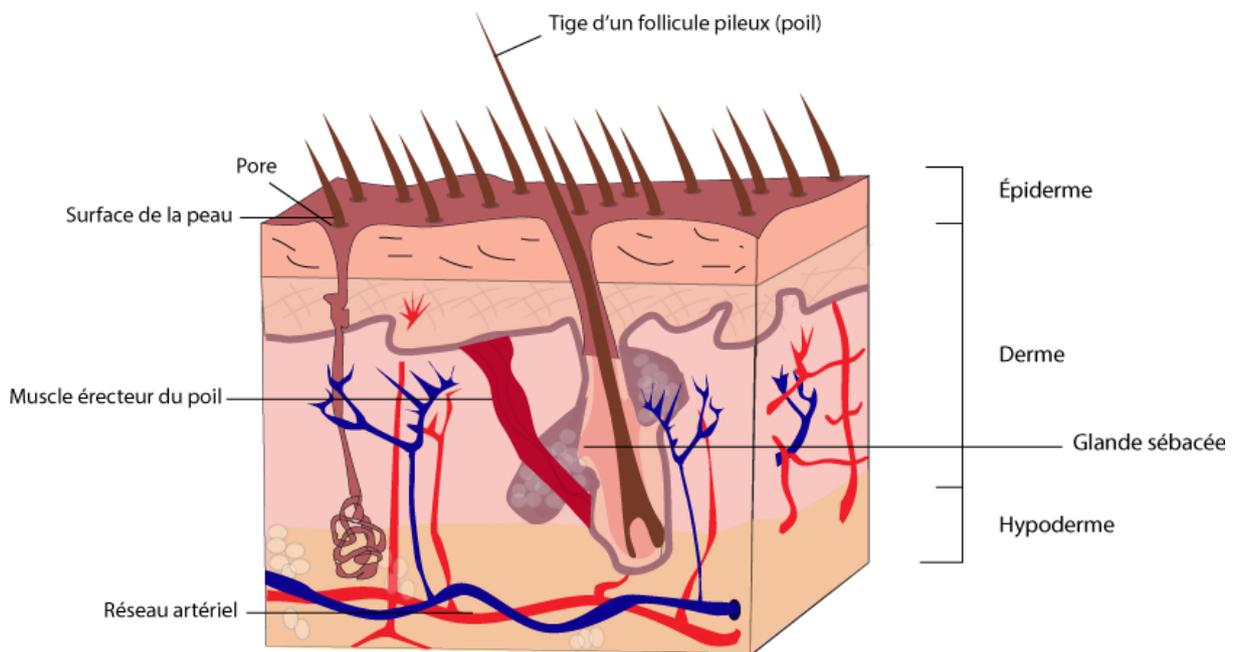
D'une épaisseur très variable en fonction de la région et de la charge pondérale, il est constitué de nombreux adipocytes au sein d'un tissu conjonctif lâche reliant la peau aux organes sous-jacents.

L'hypoderme participe activement à l'isolement thermique de l'organisme et joue le rôle de réserve énergétique, à la fois pour la peau mais également pour le reste du corps.

### 1.2.5. La vascularisation cutanée

Seuls le derme et l'hypoderme sont directement vascularisés. L'épiderme est quant à lui avasculaire. Sa nutrition est assurée par diffusion des métabolites et de l'oxygène à travers la membrane basale.

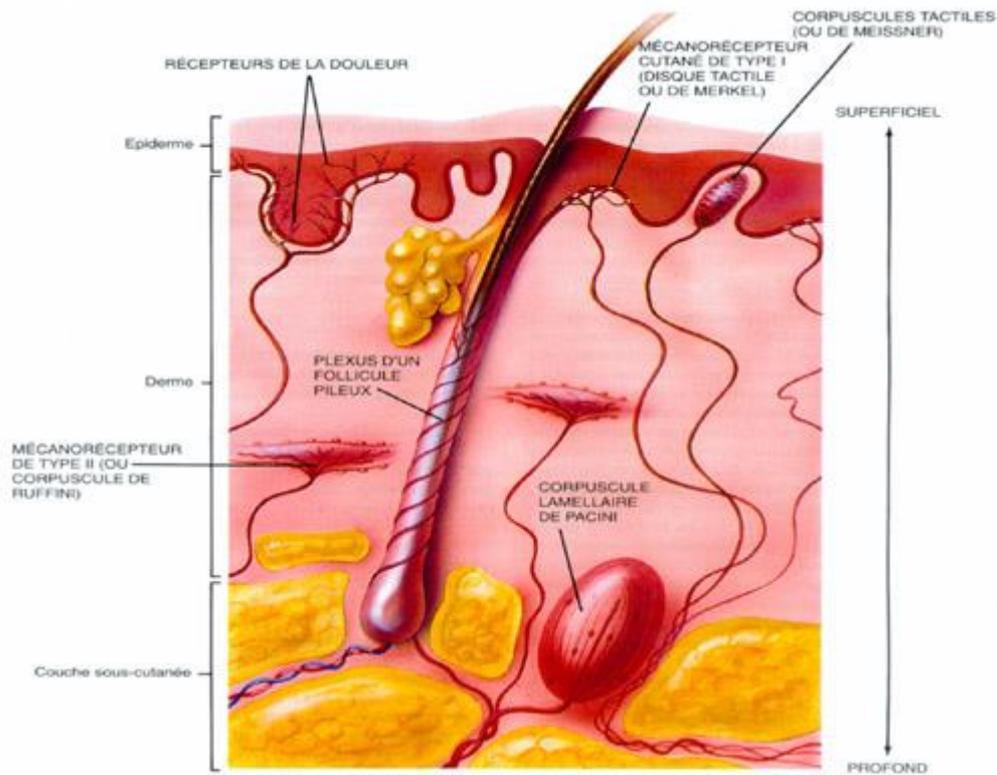
Il existe 5 systèmes différents qui assurent la vascularisation cutanée, la vascularisation parallèle sous-dermique et hypodermique, la vascularisation cutanée directe spécifique de la peau et anastomosée au réseau parallèle, la vascularisation musculo-cutanée, la vascularisation fascio-cutané, et la vascularisation neuro-cutanée.



**Figure 3: Vascularisation cutanée**

### 1.2.6. L'innervation cutanée

De nombreuses structures sensorielles participent à la sensibilité cutanée. On distingue cinq types de structures histologiques assurant la sensibilité épicrotique, photopathique, thermique et nociceptive. Les terminaisons nerveuses libres et les corpuscules de Merkel épidermiques, les corpuscules de Meissner et les corpuscules de Ruffini dermiques, et les corpuscules de Pacini hypodermiques, les corpuscules de Merkel épidermiques.



**Figure 4 : Innervation de la peau**

### 1.3. Les cellules immunitaires cutanées

En l'absence d'inflammation, la peau contient de nombreuses cellules immunitaires dont le rôle est de préserver le corps de toute agression.

Inspiré de la théorie de Streilein qui avait proposé la notion de SALT (Skin Association Lymphoid Tissue), c'est Bos et Kapsenberg qui en 1993 introduisent la notion de SIS (Skin Immune System) qui est encore utilisée aujourd'hui.

Il est depuis longtemps possible d'étudier le rôle et la fonction des cellules immunitaires, néanmoins ce n'est que depuis quelques années (Merad et al., 2008) que nous les étudions dans leur environnement tissulaire, et que nous pouvons tenir compte de leurs interactions cellulaires.

En l'absence d'inflammation, une grande partie du système immunitaire cutané est constitué par les cellules présentatrices de l'antigène (APC), les lymphocytes T, les cellules lymphoïdes, et même des kératinocytes qui peuvent avoir un rôle pro-inflammatoire.

Dans la peau, les principales APC sont les cellules dendritiques (DCS), les macrophages (M $\phi$ ), et les monocytes. Ces cellules jouent un rôle de sentinelle qui permet de limiter les attaques extérieures, en reconnaissant et en présentant les différents antigènes. Elles ont ainsi un rôle clé dans l'initiation, la modulation et la résolution de l'inflammation cutanée. Ce groupe cellulaire hautement hétérogène d'un point de vue fonctionnel est soumis aux différents signaux de son microenvironnement.

Dans l'épiderme les principales APC sont les cellules de Langerhans (LC) (Igyarto et Kaplan 2010; Streilein, Lonsberry, et Bergstresser 1982). Le derme possède quant à lui une plus grande variété d'APC : des cellules dendritiques dermales (dDC), des macrophages dermiques (dM) et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (N Romani et al. 2012; Teunissen, Haniffa, et Collin 2012). Certaines sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires (les DC inflammatoires), ou de l'interféron de type I (les DC plasmacytoïdes) ou participent à la présentation croisée (Frank O. Nestle et al. 2009) des antigènes.

### **1.3.1. Les cellules dendritiques**

**Les cellules dendritiques constituent un groupe hétérogène de cellules dont le phénotype varie selon leur localisation anatomique. Ayant pour origine des précurseurs médullaires CD34+, elles sont présentes dans la circulation lymphatique et sanguine, dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, et peuvent interagir avec les cellules des autres tissus.**

Ce sont des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles qui jouent un rôle dans l'immunité adaptative spécifique d'un pathogène, mais également dans l'immunité innée.

Les DC immatures peuvent capturer un antigène (Ag), ce qui induit leur maturation. Une fois mature, ils présenteront l'Ag aux LT naïfs entraînant à leur tour leur activation. Banhereau et Steinman (1998) ont ainsi prouvé que les DC sont uniques dans l'initiation de la réponse immunitaire.

Les Dc proviennent toutes de cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse. Elles forment un réseau de cellules sentinelles dans la peau (Shortman et Naik, 2007), tandis que d'autres assureront ce rôle au sein des muqueuses, des tissus périphériques ou des organes lymphoïdes.

Il existe 2 catégories de cellules dendritiques :

- Les DC myéloïdes conventionnelles (cDC) qui résident dans les organes lymphoïdes secondaires, les tissus périphériques, et sont dans la circulation sanguine.
- Les DC plasmacytoïdes (pDC) qui présents dans le sang périphérique peuvent migrer jusqu'aux organes lymphoïdes ou aux tissus en cas d'inflammation.

Pour ce qui est de la peau, si le derme contient différentes sous-populations de DC (Gros et al, 2012), l'épiderme sain n'en contient qu'un seul type appelé cellules de Langerhans.

Plus récemment (2017), Kashem, Haniffa, et Kaplan ont proposé une nouvelle classification des cellules dendritiques en fonction de leurs rôles et fonctions.

### **1.3.2. Les cellules de Langerhans**

Découvertes en 1868 par Paul Langerhans, elles appartiennent à la famille des cellules dendritiques, professionnelles de la présentation des antigènes. C'est à la même époque qu'Ilya Mechnikov a découvert les macrophages qui lui a valu le prix Nobel en 1908. Ce n'est qu'en 1976 que Silberberg et al. ont mis en évidence leur fonction immunologique lors d'une étude sur l'hypersensibilité cutanée. Leur découverte a permis la compréhension de nombreux mécanismes immunitaires dont la régulation du processus de présentation antigénique et du concept de « Langerhans cell paradigm ».

Depuis le début des années 2000, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence le rôle des LC dans l'induction de la réponse immunitaire adaptative, mais aussi dans celui du maintien de la régulation des réponses auto-immunes.

De nombreuses études portent sur les LC. En 2011, Ralph Steinman et Gerold Schuler obtinrent même le prix Nobel pour leurs travaux sur les LC et leur appartenance aux cellules dendritiques. Produites dans la moelle osseuse, et à durée de vie prolongée, ce sont les principales cellules présentatrices de l'antigène de l'épiderme.

Il existe 2 catégories de LC, les résidents du système lymphoïde, et ceux qui vont coloniser les organes périphériques tels que la peau, les bronches, le tube digestif, l'appareil urogénital...

#### **❖ Origine des cellules de Langerhans**

Bon nombre des études initiales concernant l'origine des LC ont été faites sur celles de la peau, dont celles concernant leur origine. Leur origine médullaire a été constatée chez la souris puis chez l'homme.

En 1979, Katz et al. utilisèrent des souris dont les cellules souches de la moelle osseuse étaient détruites par des rayons X. Aucune LC n'était alors retrouvée. Seule la greffe de moelle osseuse d'une souris allogénique permettait de retrouver à nouveau des LC dans l'épiderme. En 1993, Démarchez et al. ont utilisé des souris nude greffées avec de la peau humaine reconstruite in vitro et dépourvu de LC. Elles étaient composées de kératinocytes humains déposés soit sur un derme désépidermisé, soit sur un lattis constitué de fibroblastes inclus dans du collagène de type I. Comme attendu, aucune cellule de Langerhans humaine n'a été observée dans le greffon avant ou après la transplantation. Par contre, il a été observé, à la fois par immunofluorescence indirecte et en microscopie électronique à transmission, des cellules de Langerhans de souris dans l'épiderme humain des deux types d'équivalents de peau reconstruite in vitro. En fait, il est apparu qu'à des longues périodes (5 et 12 mois) après la transplantation de la peau humaine normale sur la souris nude, des cellules de Langerhans des deux origines, humaine et murine étaient présentes dans l'épiderme humain transplanté. Czerniewlewski et al. ont par la suite remarqué que les Lc étaient à des cycles de différenciation différents dans l'épiderme. Démarchez et al. ont quant à eux mis en évidence le fait que les LC quel que soit leur phase du cycle cellulaire, avaient la capacité de se maintenir et de proliférer dans la peau humaine greffée.

Pour la première fois, l'hypothèse selon laquelle l'augmentation des LC en cas de présence d'antigènes pouvait provenir des précurseurs et LC locaux avait été émise.

En 2012, Hoeffel et al. ont montré que chez la souris, les LC, comme la plupart des cellules dendritiques, étaient issues de macrophages du sac vitellin, mais surtout de monocytes hépatiques fœtaux, que nous retrouvions dans la peau après 7.5 et 16.5 jours de de vie embryonnaires. Dans la semaine qui suit, ces LC proliféraient rapidement jusqu'à représenter 3% du contingent cellulaire de l'épiderme à l'âge adulte. Cette vague proliférative est accompagnée de l'expression de molécules de surface telles que CD11c, HLA-II...

Merad et al. ont quant à eux confirmé l'hypothèse selon laquelle le renouvellement et l'homéostasie des Ls se faisait à partir des précurseurs locaux et non à partir du recrutement de précurseurs circulants.

Ghigo et al. (2013), ont constaté que le renouvellement des LC ne se faisait pas au hasard, mais à partir de précurseurs prédifférenciés. Ce n'est qu'en cas d'inflammation importante et de déplétion rapide en LC cutanés que le renouvellement se fera à partir de cellules acheminées par la circulation sanguine (Nagao et al. 2012, Seré et al. 2012) suite à la production locale de chimiokines (CCL2 et CCL20).

Contrairement aux autres DC, dépendants du facteur de croissance FLT3L, les LC ont besoin lors de l'inflammation, d'IL-34 produite par les kératinocytes, et de CSF1 produite par les neutrophiles pour se différencier, et se multiplier.

Les similitudes de développement entre les LC et les macrophages ont un temps laissé penser que les LC pouvaient être reclassés comme appartenant à la famille des macrophages. Cependant les LC des comportent plutôt comme des prototypes de DC migrants capables de migrer vers les ganglions lymphatiques que ce soit à l'état d'équilibre ou d'inflammation, atteignant et activant en profondeur les LT en 3 à 4 jours.

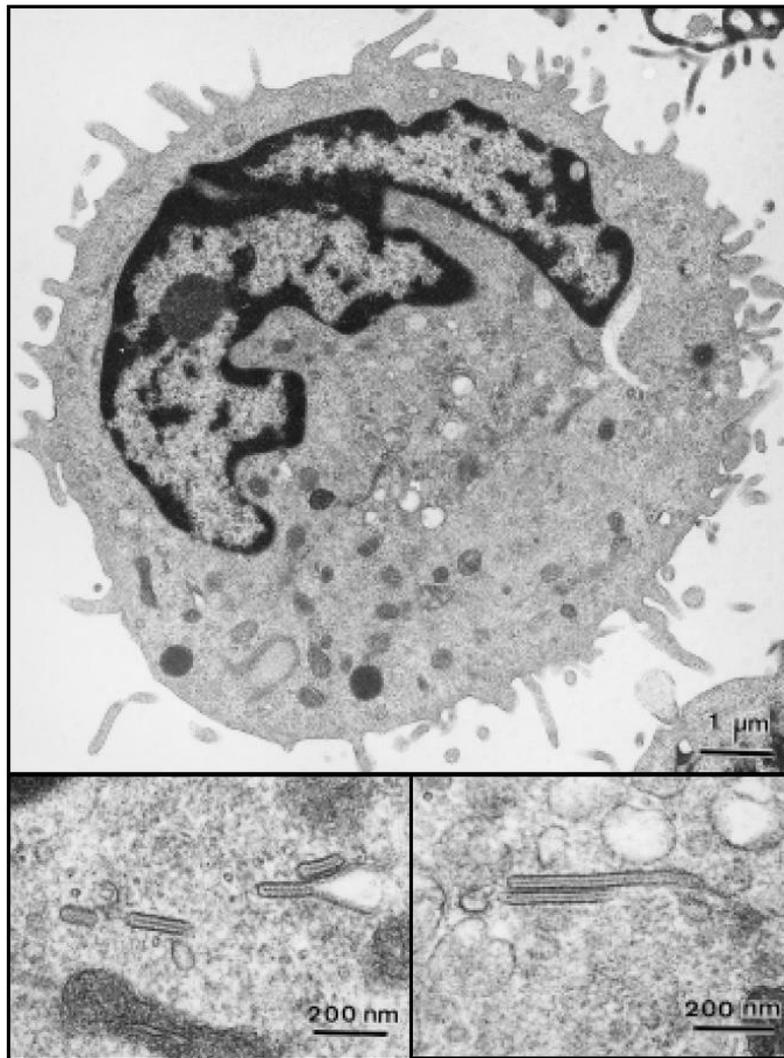
Il existe une autre théorie qui n'est pas démontrée à ce jour : les précurseurs embryonnaires seraient capables de générer des DC et des macrophages. La différenciation se faisant durant la vie embryonnaire dans l'épiderme.

### ❖ **Morphologie et caractéristiques ultra structurales des cellules de Langerhans**

La LC est reconnaissable au microscope électronique par son noyau bilobé à circonvolutions, son cytoplasme clair, sans mélanosome ni tonofilament, l'absence de desmosome et la présence caractéristique de de granules de Birbeck. Ces organites en forme de raquettes sont constitués de deux membranes accolées, séparées par une zone régulièrement striée en « fermeture éclair ». Ces granules uniquement visibles en microscopie électronique pourraient correspondre à des structures membranaires impliquées dans le transport intracellulaire. (Hanua et al. 1987). Elles sont détectées grâce à l'anticorps Lag (Langerhans associated granules) qui reconnaît des protéines associées à ces granules (Kashihara M 1986), ou avec des anticorps anti-langérine, molécule présente dans ces granules. Ces anticorps anti-langérine ont pour principal avantage d'éviter d'avoir recours aux techniques de microscopie électronique pour identifier les LC.

La présence constitutive du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) permet de les distinguer des autres cellules de l'épiderme. Si certains kératinocytes peuvent également l'exprimer en cas d'inflammation prolongée voir chronique, les LC demeurent les seules cellules épidermiques à posséder ce marqueur de manière permanente.

Les LC humains présentent le marqueur CDa1 qui est associé à la bêta2 microglobuline. Ce marqueur présente des analogies avec le complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui présente des lipides microbiens aux LT. La protéine S100 est le 4<sup>ème</sup> marqueur qui permet d'identifier les LC.



**Figure 5 : Microscopie électronique d'une cellule de Langerhans avec visualisation des granules de Birbeck (Dr Schmitt et Dr De Zutter Inserm U.346)**

Les LC présentent à leur surface de nombreuses molécules d'adhérence, principalement la E-cadhérine qui assure la cohésion avec les kératinocytes au niveau de l'épiderme. (Blauvelt A, 1995).

Les LC possèdent également à leur surface des intégrines (CD11b, CD18, CD11c, CD 18), et des récepteurs de la laminine (intégrines alpha6bêta1).

## ❖ Fonction des cellules de Langerhans

Présentes dès le début du développement embryonnaire (Merad et al. 2002), elles représentent 3 à 5 % des cellules épidermiques, et leur densité varie de 300 à 900/mm<sup>2</sup>. Ce n'est qu'en 1985 suite aux travaux de Streilein (1982) et de Steinman (1985) qu'elles sont reconnues comme appartenant aux cellules dendritiques du système immunitaire.

Il est acquis depuis longtemps que les LC sont des cellules présentatrices d'antigènes, capables de les capter dans la peau et de les transporter sous forme de peptides membranaires jusqu'aux tissus ganglionnaires aux LT afin d'induire une réponse immunitaire spécifique ou un message de tolérance (limitation auto-immunité).

Dans la peau, elles sont situées au niveau de la couche supra-basale de l'épiderme (Mulholland et al., 2006) et forment un réseau interconnecté autour des kératinocytes (adhésion LC/KC via l'E-Cadhérine) Tang et al., 1993. Elles tapissent également le canal folliculaire ou elles sont en lien direct avec les DDC.

En l'absence d'inflammation, elles circulent naturellement de la peau vers les ganglions. La synthèse de chimiokines par les cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques comme CCL20. Une partie des cellules de Langerhans sont capables d'étendre leurs dendrites entre les kératinocytes à la recherche d'Antigènes, et de les transporter aux ganglions (le dSEARCH dendrite surveillance extension and retraction cycling habitude) (Nishibu et al. 2006). Ce réseau permet une surveillance de l'environnement et une communication entre les cellules du système immunitaires (Udey 2006).

Elles renferment des inclusions cytoplasmiques caractéristiques, les granules de Birbeck. Leur membrane plasmique possède comme les monocytes et les macrophages, des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et pour le fragment C3b du complément. Elles sont impliquées dans l'induction de l'hypersensibilité de contact et le rejet des greffes cutanées car elles sont porteuses à leur surface des antigènes de la classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Les rayons ultraviolets annulent l'action de ces cellules.

En 2012, Seré et son équipe ont montré que les LCS se développaient distinctement en condition inflammatoire. En cas d'inflammation, Liard (2011) a montré que leurs dendrites se raccourcissaient lorsqu'elles s'enfonçaient dans le derme. Ce changement de morphologie associé à une production de TNF $\alpha$  et l'IL1 $\beta$  vont permettre aux LC de se dissocier des kératinocytes qui les entourent su fait d'une diminution d'expression de la E-cadhérine.

En cas d'inflammation, les LC sont remplacés par des précurseurs à courte et longue durée de vie.

Dans un premier temps, des LC à courte durée de vie générée à partir de monocytes Gr-1<sup>hi</sup> vont coloniser l'épiderme et acquérir l'expression de CMH-II et de Langerine (Ginhoux 2006, Seré 2012). Puis apparaissent des LC à durée de vie prolongée à partir de précurseurs de la moelle osseuse. Certains LC peuvent aussi dériver de précurseurs situés dans les follicules pileux (Gilliam et al. 1998).

En l'absence d'inflammation, 3% des LC circulent entre la peau et les ganglions drainant le territoire (Kissenpfennig 2005 ; Brand 1999). En effet, les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques expriment de manière constitutive une protéine chimio-attractante le CCL20, qui interagit avec les LC par le biais de la protéine CCR7. En cas d'inflammation, il survient une surexpression du CCR7 qui induit une migration des LC de la peau vers les lymphoïdes.

Sans inflammation, Udey a mis en évidence en 2006, la capacité des LC de pratiquer le dSEARCH (dendrite Surveillance Extension and Retraction Cycling habitude). Les LC étendent ainsi leurs dendrites entre les KC à la recherche d'antigènes environnants, qu'ils apporteront jusqu'aux tissus lymphoïdes, afin d'induire une réponse immunitaire.

En cas d'inflammation, leur activation peut se produire directement par une boucle autocrine (IL-1bêta) ou sous l'effet de cytokines produites par les kératinocytes environnants (TNF-alpha, GM-CSF...).

La production de TNF-alpha diminuerait la production de E-cadhérine, qui lie les LC aux kératinocytes environnants. Les LC vont alors traverser la jonction dermo-épidermique, entrer dans le derme superficiel et pénétrer dans les vaisseaux lymphatiques.

Les intégrines b1 qui permettent les contacts avec les collagènes I et IV, la fibronectine et la laminine, sont ainsi surexprimés.

L'interaction entre les LC et les LT est rendu possible par l'augmentation de molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86). Dès le début de la migration, il est constaté dans le même temps une augmentation des marqueurs d'activation cellulaire (CD83 et DC- LAMP) et une diminution de l'expression de CD1a, de la langérine et du nombre de granules de Bierbeck.

Une fois parvenues dans les vaisseaux lymphatiques, les LC sont appelés cellules voilées, puis cellules interdigitées une fois dans les ganglions drainant la peau.

Les LC sont ainsi capables de migrer jusqu'aux ganglions.

Depuis longtemps, les avis sont partagés quant à leur rôle dans la tolérance immunitaire. Ceci s'explique en partie par la fréquente utilisation de souris transgéniques dont les LC ne présentaient pas de Langerin de surface.

La majoration de l'hypersensibilité de contact en cas de déplétion en LC cutanés (Kaplan et al. 2005) et la mise en évidence les dysfonctionnements de la régulation de l'hypersensibilité cutanée lorsque les cellules dendritiques étaient dépourvues de Langerin (Noordegraaf et al. 2010) témoignent du fait que les LC jouent un rôle dans l'homéostasie immunitaire. Néanmoins leur rôle exact reste à ce jour inconnu.

#### ❖ **Phénotype : (Tableaux)**

La mise au point du modèle de souris humanisées, vient de la découverte de différences phénotypiques entre les LC humaines et murines. Si elles ont des différences de marqueurs de surface, elles en ont bon nombre en commun :

- Des marqueurs dendritiques CD11c
- Des molécules du CMH de classe II
- Des marqueurs hématopoïétiques CD45
- La molécule E-Cadhérine (CDH1)
- Les granules de Birbeck
- EpCAM (TACSTD1)
- Le récepteur aux leptines C CD205
- Des organelles intra-cytoplasmiques

Une des différences majeures entre les LC humains et murins, est l'absence de marqueurs CD1a, CD1c et HLA-DR chez la souris, alors qu'ils ont fortement exprimés sur les LC humains (Klechevsky et al. 2008).

C'est Valladeau et al. qui en 2000 et 2002, ont permis d'immenses progrès dans la caractérisation des LC en découvrant la Langérine/CD207 qui est un récepteur aux lectines C de type II, qui est internalisé dans les granules de Birbeck lors de la maturation des LC (McDermott et al. 2004, Stoitzner et al. 2005).

Le développement de techniques d'immunohistochimie/immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la Langérine, ont permis de mieux caractériser les LC in vitro et in vivo (Cheong et al. 2007).

## Tableau 1 : Phénotype des APC de souris et délétion

(Sakeen W. Kashem, Muzlifah Haniffa, and Daniel H. Kaplan, Annu. Rev. Immunol. 2017. 35:469–99)

	LC	cDC1	cDC2	DN dDC	mo-DC	Mφ	cDC1	cDC2
<b>Other names</b>		XCR1 <sup>+</sup> dDC CD103 <sup>+</sup> dDC IRF8 <sup>+</sup> DC	CD11b <sup>+</sup> dDC IRF4 dDC				XCR1 <sup>+</sup> cDC CD8 <sup>+</sup> DC IRF8 DC CLEC9A DC	CD11b <sup>+</sup> cDC DCIR <sup>+</sup> DC IRF4 DC
<b>Location</b>	Epidermis	Dermis	Dermis	Dermis	Dermis	Dermis	LN/spleen	LN/spleen
<b>Surface markers</b>								
CD8α	–	–	–	–	–	–	+	–
CD103	–	+	–	–	–	–	–	–
XCR1	–	+	–	–	–	–	+	–
CD327 (Clec9A)	–	+	–	–	–	–	+	–
CD11b	+	–	+	–	+	–/+	–	+
CD207 (langerin)	+	+	–	–	–	–	–/+ <sup>a</sup>	–
CD301b	–/+	–	+	–	+	+	–	–
CD172α (SIRPα)	+	–	+	+	–	–	–	+
CD64 (FcγR1)	–	–	–	–	+/low	+	–	–
MERTK	–	–	–	–	–/low	+	–	–
CCR2	–	–	+	+	+	–/low	–	–
F4/80	+	–	+	+	+	+	–	–
CD326 (EpCAM)	+	–	–	–	–	–	–	–
CX3CR1	+	–	+	+	–	+	–/+	–
CD24	+	+	–	–	–	–	+	+
CD205	+	+	+	–	+	–	+	+
<b>Transcription factors</b>								
Batf3	–	+	–	–	–	–	+	–
ID2	+	+	–	–	–	–	+	–
IRF4	–	–	+	+	–	–	–	+
IRF8	+	+	–	–	–	–	+	–
Klf4	–	–	–	+	–	–	–	–

	LC	cDC1	cDC2	DN dDC	mo-DC	Mφ	cDC1	cDC2
<b>Soluble factors/receptors</b>								
Flt3	–	+	+	+	–	–	+	+
Csf-1R	+	–	+	–	+	+	–	+
Csf-2R	–	+	+	–	–	–	+	+
<b>Murine depletion models</b>								
CD11c-DTR	+	+	+	+	–	–	+	+
Human-langerin DTR	+	–	–	–	–	–	–	–
Human-langerin DTA	+	–	–	–	–	–	–	–
Murine-langerin DTR	+	+	–	–	–	–	+	–
Batf3 <sup>-/-</sup>	–	+	–	–	–	–	+ <sup>a</sup>	–
Zbtb46-DTR	–	+	+	+	–	–	+	+
CD11c cre-IRF4 fl	–	–	+ <sup>b</sup>	+	–	–	–	+
CSF1-R DTR	+	–	+	–	–	–	–	–
CSF2R-DTR	–	+	+	?	–	–	–	–
CD11c cre Klf4 fl	–	–	–	+	–	–	–	–
MGL2-DTR	+	–	+	?	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	–	–

<sup>a</sup>Varies by background strain.

<sup>b</sup>Migration defective.

<sup>c</sup>Partial deletion.

Abbreviations: cDC, conventional DC; DC, dendritic cell; dDC, dermal DC; DN, double negative; LC, Langerhans cell; LN, lymph node; mo-DC, monocyte-derived DC; Mφ, macrophage.

## Tableau 2 : Phénotype APC humains

(Sakeen W. Kashem, Muzlifah Haniffa, and Daniel H. Kaplan, *Annu. Rev. Immunol.* 2017. 35:469–99)

	LC	CD141+ DC	CD1c+ DC	pDC	CD14+
Location	Epidermis	Dermis/lymph/blood			Dermis
Murine equivalent	LC	cDC1	cDC2	pDC	mo-M $\phi$
HLA-DR	+	+	+	+	+
CD11c	low	low	+	-	+
CD1a	++	-	+ <sup>a</sup>	-	-
CD14	-	-	-	-	+
CD1c (BDCA1)	+	-	+	-	-/+
CD303 (BDCA2)	-	-	-	+	-
CD304 (BDCA3)	-	+	+/-	+	-
CD141 (BDCA4)	-	++	-/+	-/+	-
XCR1	-	+	-	-	-
CD370 (CLEC9A)	-	+	-	-	-
CD207 (langerin)	++	-	-/+ <sup>a</sup>	-	-
CD326 (EpCAM)	+	-	-	-	-
CD324 (E-cadherin)	+	-	-	-	-
CD11b	low	-	+	-	+
CX3CR1	+	-	+	-	+
CD172 $\alpha$ (SIRP $\alpha$ )	+	-	+	-	+

<sup>a</sup>Migratory skin DC.

Abbreviations: cDC, conventional DC; DC, dendritic cell; LC, Langerhans cell; M $\phi$ , monocyte-derived macrophage; pDC, plasmacytoid DC.

Les modèles de souris transgéniques ont permis de mieux connaître les facteurs influents sur le développement des LC. Le TGF- $\beta$ 1 qui est exprimé de manière autocrine, ainsi que les intégrines dérivées de kératinocytes  $\alpha\beta$ 6 et  $\alpha\beta$ 8 sont indispensables au maintien des LC dans l'épiderme (Kaplan et al. 2007, Mohammed J 2016). Ils permettent également la différenciation des précurseurs hématopoïétiques CD34+ humains en LC in vitro (Geissman et al.1999).

Le récepteur tyrosine kinase, AXL et un membre de la superfamille TGF- $\beta$ , le BMP7, sont également nécessaires pour le développement des LC (Hieronymus T 2015). RUNX3, PU.1 (SPI1) et ID2 (Merad 2008) sont d'autres facteurs de transcription impliqués dans le développement des LC.

## ❖ Langerhans et Vieillessement

Il est acquis depuis longtemps que le système immunitaire décline avec l'âge. Dès 1982, Gilchrist et al. avaient mis en évidence le déficit fonctionnel des LC avec le temps. Néanmoins, le vieillissement était alors provoqué par une exposition aux UV. Ces UV changeaient la morphologie de cellules. Plus que l'âge c'est l'exposition aux UV qui était responsable de la baisse d'activation et de réponse des LC.

D'autres chercheurs se sont intéressés au vieillissement. Si des changements morphologiques peuvent être observés au fil du temps (Zegarska et al. 2017) tels que la diminution de la taille du corpuscule ou de la longueur des dendrites, ce sont principalement les modifications de leur microenvironnement qui sont à l'origine de leur déficit fonctionnel.

Le déclin de l'immunité cutanée est illustré par la diminution de l'expression de Toll-like-récepteurs (TLR) au fil du temps. En effet on note une baisse progressive de l'expression de TLR1 et de TLR5 de la période prénatale jusqu'à l'âge adulte (Iram et al. 2012).

Xu et al en 2012, ont constaté que les LC de souris plus jeunes avaient ainsi une meilleure fonctionnalité.

Plus récemment Chang et al. ont constaté que l'expression spécifique du gène KCND2 par les Langerhans de la peau laissent penser que des facteurs génétiques pourraient également jouer un rôle dans la vitesse de vieillissement et de fonctionnalité des LC de la peau.

Néanmoins, le rôle des LC et de l'immunité cutanée dans l'augmentation de survenue d'infections et de cancer de la peau n'est pas encore bien défini.

### **1.3.3. Les cellules dendritiques dermales**

Les cellules dendritiques du derme ont été caractérisées plus tardivement que les cellules de Langerhans. Cette population est bien moins homogène, et présente moins de similitudes entre l'Homme et la souris. Elles représentent 3% de la population totale des DC et constituent une autre sous population de DC résidents de la peau. Ces DC expriment le facteur de transcription Zbtb46 que ce soit chez l'homme ou la souris.

## ❖ Origine

Elles sont issues de précurseurs locaux indépendants des précurseurs radio-résistants circulants issus de la moelle osseuse (Bogunovic et al. 2006). Elles sont continuellement renouvelées par recrutement à partir de progéniteurs de la moelle osseuse.

Les pDC ont une origine lymphoïde (Reizis et al.2010), tandis que les autres DC ont une origine myéloïde du sang périphérique (Bangert et al. 2011).

## ❖ Morphologie et caractéristiques ultra structurales :

Elles présentent des prolongements cytoplasmiques fins et nombreux. Leur noyau est polylobé et à la grande différence des LC, elles ne possèdent pas de granules de Birbeck de manière native in vivo. Ainsi elles ne sont pas marquées par l'anticorps Lag

En microscopie électronique, on y retrouve des lysosomes, de nombreuses mitochondries, un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique développé.

## ❖ Phénotype :

Si certains marqueurs de surface sont communes aux DC, d'autres sont spécifiques du microenvironnement. Comme les macrophages et d'autres cellules endothéliales, les DC expriment les molécules du CMH-II. L'expression du marqueur CD1c (BDCA) permet de les différencier des macrophages dermiques (CD1c-).

Les cellules dendritiques du derme expriment le marqueur CD1a mais bien plus faiblement que les LC.

Que ce soit chez l'homme ou la souris, elles expriment à leur surface XCR1, récepteur de la chimiokine XCL1 des LTCD8 (65-66), CLEC9A, récepteur pour la F-actine, CADM1, TLR3, CD141 / BDCA3, et le facteur de transcription IRF8 (tableaux 1 et 2).

Comme toutes les cellules dendritiques, elles expriment les marqueurs de surface du CMH de classe I, les molécules CD45 et CD33 traduisant leur origine myéloïde.

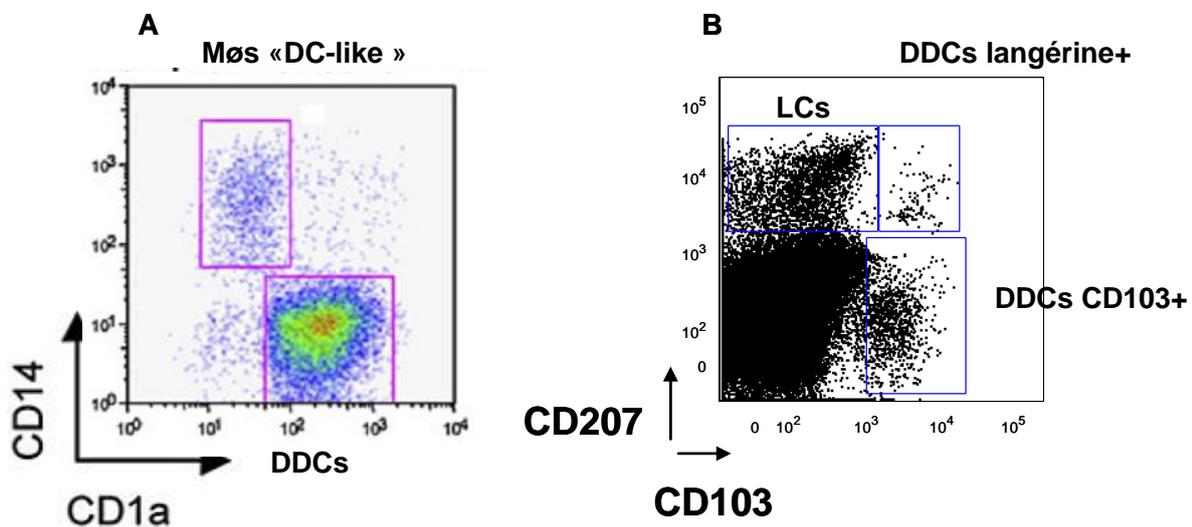
Elles expriment des molécules impliquées dans les fonctions de présentation antigénique telles que CD11b/CD18, CD11c/CD18, CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), CD40, CD80 et CD86. Néanmoins elles n'expriment pas les marqueurs de lignées CD3, CD8, CD14, CD68, CD19 et CD20.

Elles expriment également le facteur de coagulation XIIa. S'il a longtemps été utilisé pour caractériser les DC, ce n'est plus le cas aujourd'hui, car nous savons que son expression est induite par la culture cellulaire et caractérise plutôt les macrophages dermiques CD29+ (Torocsik 2009).

Leur rôle dans la présentation des antigènes aux LT a été mis en évidence par la présence du phénotype activé CD83+CMRF-44+, qui correspond à un stade de maturation plus avancé de certaines DC.

En cytométrie de flux, dans des suspensions cellulaires de derme humain, le phénotype des DC est le suivant : CD1a<sup>dim</sup> CD14<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> (

Figure 6).



**Figure 6 : Populations de DC/macrophages extraites du derme humain (A) ou murin (B) et analysées en cytométrie de flux**

D'après Klechevsky et coll.2008 (A), Immunity et Liard et coll.2010

Les DC sont divisées en plusieurs sous-populations :

- CD11b+ ou – chez la souris
- CD11c+ ou – chez l'homme (Malissen et al. 2014).

Ce sont les CD11b+ et c+ qui sont le plus abondantes dans le derme sain. Une partie des CD11b+ expriment le gène *aldhal2* qui code pour la rétinaldéhyde déshydrogénase 2, facteur limitant de la production d'acide rétinoïque qui est un métabolite de la Vitamine A qui permet la génération de treg à partir de LT CD4+naifs (Guilliams et al. 2010).

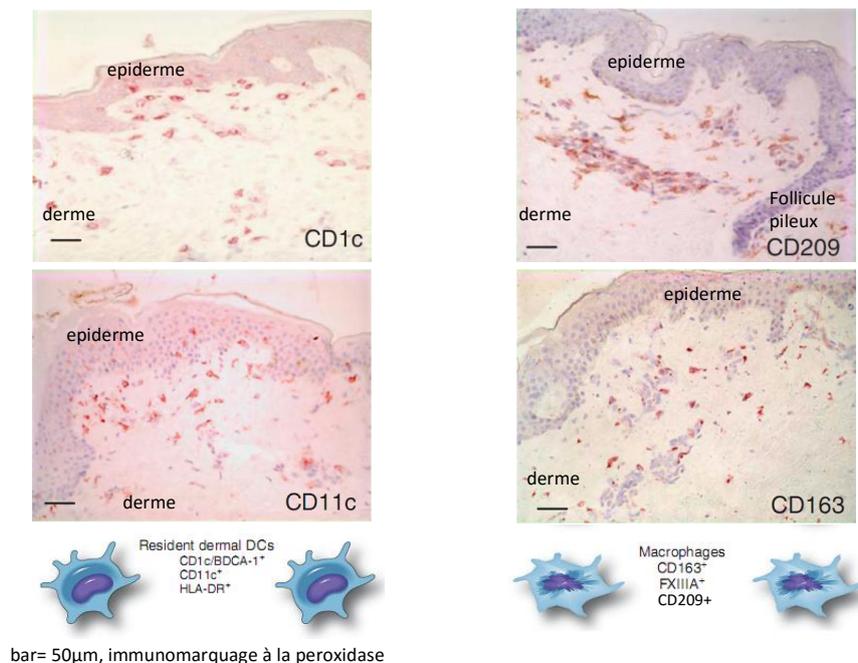
Les Dc CD11b- sont aussi divisés en 2 populations : CD103+ et CD103- (tableau).

Chez la souris, une population de DC CD103+ est également CD207+ (langérine) qui n'est pas retrouvée chez l'homologue CD141<sup>high</sup> humain. Il a récemment été montré que des DC myéloïdes CD1c+ expriment la langérine et sont présentes dans plusieurs organes comme la peau, le foie et le poumons (Bigley et al. 2014).

Chez l'Homme les cDC CD1c- sont DDC 141<sup>high</sup> humaines très performants dans la présentation d'auto-antigènes dérivés des kératinocytes (Malissen et al. 2014). Les CD141<sup>high</sup> expriment peu le CD11c et pas du tout le CD14 (Haniffa et al. 2015).

### ❖ Fonction :

Contrairement aux macrophages et mastocytes qui sont situés dans le tissu conjonctif périfolliculaire (Christoph et al. 2000), les DC sont principalement localisés dans l'épithélium distal des follicules pileux et dans le derme papillaire. Ils ont la capacité de migrer rapidement vers les ganglions lymphatiques drainants et de coloniser les zones du para cortex.



**Figure 7: Localisation des DDC et des macrophages du derme sur coupes histologiques de peau humaine en conditions non inflammatoires.**

D'après Ochoa et coll. 2009 JID

Elles ont des fonctions semblables aux LC, et permettent la présentation des antigènes aux lymphocytes T effectrices.

Les DC immatures expriment des Toll-Like Recepteurs, le CD206, l'expression du CD209 ou DC-SIGN n'est pas admise par tous sur les DC (Ochoa et al. 2008). Les DC plus matures ont un haut niveau d'expression de molécules de co-stimulation comme le CD83.

En 2003, Allan et al. ont montré *in vitro* que les LC étaient des APC professionnelles induisant l'activation des LT dans la peau. Chez la souris infectée par HSV-1, les DC isolées des ganglions drainants de la peau sont les seules à pouvoir activer les LT CD8+ spécifiques d'HSV-1, alors que les LC ayant migré de la peau au ganglion drainant ne pouvaient pas les activer (Allan et al. 2003). Les DC ont donc un rôle important dans l'induction et l'activation de LT CD8+ spécifiques d'Ag en réponse à une infection cutanée.

D'autre part, certains virus comme vaccinia et HSV-1 sont cytolytiques et induisent l'apoptose des DC, limitant donc leur possibilité à activer les LT spécifiques cutanés, chez la souris (C. A. Jones et al. 2003; He et al. 2006).

Les DC humains *in vitro* activent préférentiellement les LT CD4+ helper et les LT follicular helper (Tfh) CD4+ impliqués dans l'activation des cellules B en cellules sécrétrices d'Ac (Morita et al., 2011; Ueno et al., 2010).

*In vitro*, les DC CD14<sup>+</sup> différenciées peuvent capturer les Ag exogènes de façon plus efficace et pour des périodes plus longues que les DC CD1a<sup>+</sup> (F O Nestle et al. 1993; Caux et al. 1997). Les DC internalisent le matériel extracellulaire par des mécanismes variés de phagocytose, de macropinocytose ou d'endocytose. Cette endocytose est médiée majoritairement par la voie dépendante de la clathrine, une autre voie indépendante de la clathrine, les caveolae a été décrite (Gilbert, Goldberg, et Benjamin 2003). Il a été montré que les VLP-HPV étaient internalisées par les DC humaines *in vitro* par la voie dépendante de la clathrine (Joyce et al. 1999).

### DC en conditions homéostatiques

Différents types de DC résident en conditions physiologiques dans le derme papillaire. Elles expriment fortement le CD1c (BDCA), le CD1b et faiblement le CD1a et elles sont CD209<sup>-</sup> (DC-SIGN). Les macrophages ressemblant aux DC ("like-dendritic cells") sont CD209<sup>+</sup>, CD1c<sup>-</sup>, CD1a<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup> et CD68<sup>+</sup> dans le derme humain (Ochoa et al. 2008). Elles sont majoritairement localisées autour des capillaires et dans le derme profond.

Initialement les DC ont été isolées en utilisant un anticorps polyclonal reconnaissant le facteur XIIIa (Suvarna et Cotton 1993), mais ce marqueur n'est pas spécifique de ces cellules, il est exprimé par de nombreux autres types cellulaires et en particulier les macrophages (Zaba et al. 2007).

Chez l'homme en conditions non-inflammatoires, 3 populations de DC ont été identifiées : les DC CD1a<sup>+</sup>, les DC CD14<sup>+</sup> et les DC CD141<sup>+</sup>. Toutes ces DC sont capables de capturer des antigènes par endocytose et pour la présentation croisée. Les DC CD141<sup>+</sup> chez l'homme correspondent aux DC CD103<sup>+</sup> de la souris impliquées dans la présentation croisée (Bedoui et al. 2009; Lenz et al. 1993). Chez la souris, on peut trouver 4 types de DDC identifiées selon leur niveau de CD103 et CD11b, les DDC CD103<sup>+</sup> jouant un rôle très important dans la présentation croisée (Bedoui et al. 2009).

Dans la peau quiescente, 5 % des DDC ont un phénotype mature CD83<sup>high</sup> CD208<sup>high</sup> (DC-Lamp). *In vitro* après culture de précurseurs CD34<sup>+</sup> les DDC ont un phénotype CD1a<sup>+</sup> CD14.

### DC en conditions inflammatoires

Des DC peuvent aussi être recrutées dans la peau et les muqueuses après infection ou inflammation cutanée. En 2013, Merad et al. avaient montré qu'elles disparaissaient dès la résolution de l'inflammation.

Tour à tour, Bangert et al. (2011) et Gros et al. (2012), ont mis en évidence des marqueurs phénotypiques qui permettent de classer les DC inflammatoires en 4 sous-populations :

- Les slanDC, exprimant le 6-sulpho LacNac DC : Leur nombre double en cas d'inflammation, elles produisent des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-12 et le TNFalpha.
- Les Tip-DC producteurs d'INOS (Inducible Nitric oxide Synthase), présents en cas d'inflammation cutanée et différenciés à partir de monocytes sanguins. Ils sont également producteurs de cytokines pro-inflammatoires.
- Les pDC (plasmacytoïdes) qui ne sont présentes qu'en cas d'inflammation et migrent depuis la circulation sanguine. Leur capacité à produire de l'IFN de type 1 (alpha et bêta) leur permet de jouer un rôle important dans la réponse antivirale. Elles expriment les TLR7 et 9.
- Les IDEC( DC inflammatoires épidermales) qui lorsqu'elles sont activées vont exprimer de nouveaux marqueurs phénotypiques et produire des cytokines telles que l'IL1, l'IL6, MIP-1alpha et l'IL16 favorisant le recrutement des éosinophiles.

Bon nombres d'études ont été effectuées chez la souris : L'inoculation de  $10^6$  parasites par voie sous-cutanée de *Leishmania major* permet la différenciation des monocytes sanguins recrutés dans le derme et les ganglions drainants en DC sous l'influence de stimuli pro-inflammatoires (León, López-Bravo, et Ardavin 2007). De plus, les LC et les DC ne sont pas nécessaires dans ce modèle à l'induction de la réponse immunitaire contre *Leishmania major*.

Chez la souris ce sont les DC CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> qui présentent les antigènes viraux HSV aux cellules T CD8<sup>+</sup> (Bedoui et al. 2009). Récemment, l'importance de la molécule SIRP $\alpha$  dans la migration des cellules dendritiques a été montrée chez la souris ; les souris exprimant une forme mutée de SIRP $\alpha$  ont une diminution marquée de la migration des DC (LC et DDC) de la peau vers les ganglions lymphatiques drainants ; suggérant l'implication de cette molécule dans les phénomènes de circulation des APC de la peau (Iwamura et al. 2011).

Elles ont la capacité de **présentation croisée**. Des études récentes *in vitro*, sur des DC dérivées de peaux humaines ont montré que les DC résidentes CD141<sup>hi</sup> avait une capacité de présentation croisée plus efficace que les LC (Haniffa et al. 2012). De plus l'analyse du transcriptome de ces DC 141<sup>hi</sup> a confirmé que ces cellules humaines correspondaient aux DC CD103<sup>+</sup> murines ; confirmant des données déjà connues chez la souris de la capacité de cette catégorie de DC CD103<sup>+</sup> à la présentation croisée aux LT CD8 (Igyártó et Kaplan 2013).

**Tableau 3: rôle des APC et vaccination**

Cellules Localisation	Conditions	In vitro	Types de réponses immunitaires	Migration
Cellules de Langerhans Epiderme	Expansion LC à partir précurseurs CD34+ <i>(Ratzinger et al J Immunol 2004)</i> Purification in vitro des LC <i>(Klechevsky et al Immunity 2008)</i>	Activation/prolifération LT cytotoxiques	Réponses cellulaires	Zone des cellules T <i>(Kissenpfennig et al Immunity 2005)</i>
Cellules dendritiques dermales Derme	Expansion DDC à partir de précurseurs CD34+ <i>(Caux et al Blood 1997)</i> Purification in vitro DDC <i>(Klechevsky et al Immunity 2008)</i>	Commutation isotypique des cellules B	Réponses humorales	Zone des cellules B <i>(Kissenpfennig et al Immunity 2005)</i>

### ❖ Les cellules dendritiques tolérogènes

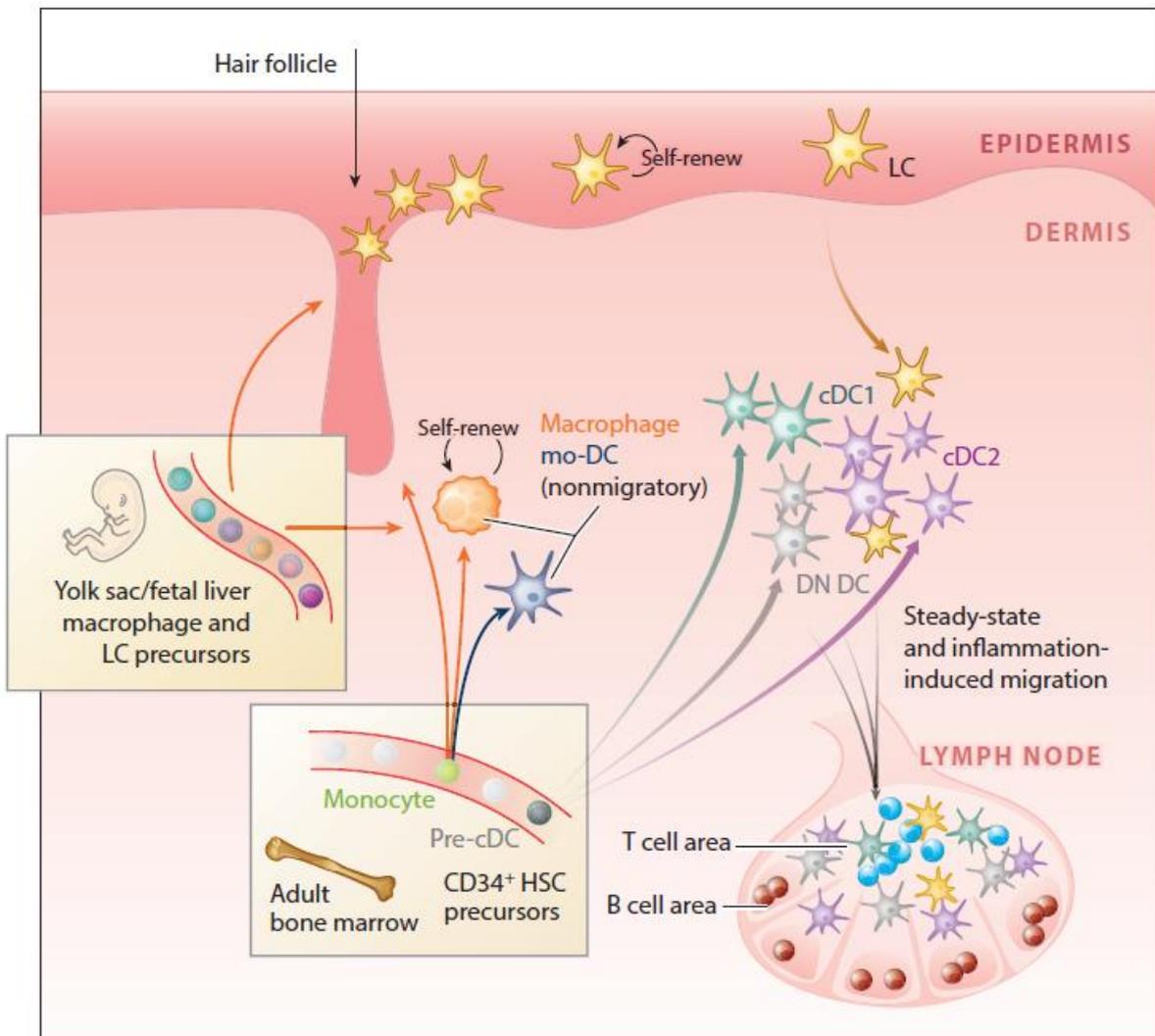
En 2002, Steinman et al. ont introduit la notion de tolérance immunitaire centrale et périphérique dont les DC pouvaient être responsables. Le maintien des DC dans un état appelé « steady-state » (immature) et l'induction de LT anergiques et/ou de Treg (Probst et al. 2014) permet d'empêcher toute présentation antigénique responsable d'une quelconque réponse immunitaire.

La présence de DC télégènes dont la maturation est incomplète, permet de maintenir cet équilibre entre tolérance et immunogénicité. Leur incapacité à produire certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 mène à la production de Treg (Sael et al. 2013).

Ce type de DC est même capable de produire des médiateurs antiinflammatoires tels que l'IL-10, le TGFβ, le NO (monoxyde d'azote), des PGE (prostaglandines), de l'indoléamine 2,3 et de la dioxygénase qui vont eux aussi stimuler les Treg.

Une fois stimulés, les Treg vont exprimer des protéines inhibitrices (CTLA-4, PDL-1, LAG-3, et sécréter des cytokines (IL-10, IL-35, et TGFβ) qui vont inhiber l'activation des autres DC (Saie et al. 2013).

En 2011, Luckey et al. ont également mis en évidence le rôle des tDC dans la tolérance cutanée. En effet la sécrétion de TNFα va induire une lyse des LT CD8 cytotoxiques et ainsi l'induction d'un état de tolérance à des agents pathogènes sur le modèle murin.



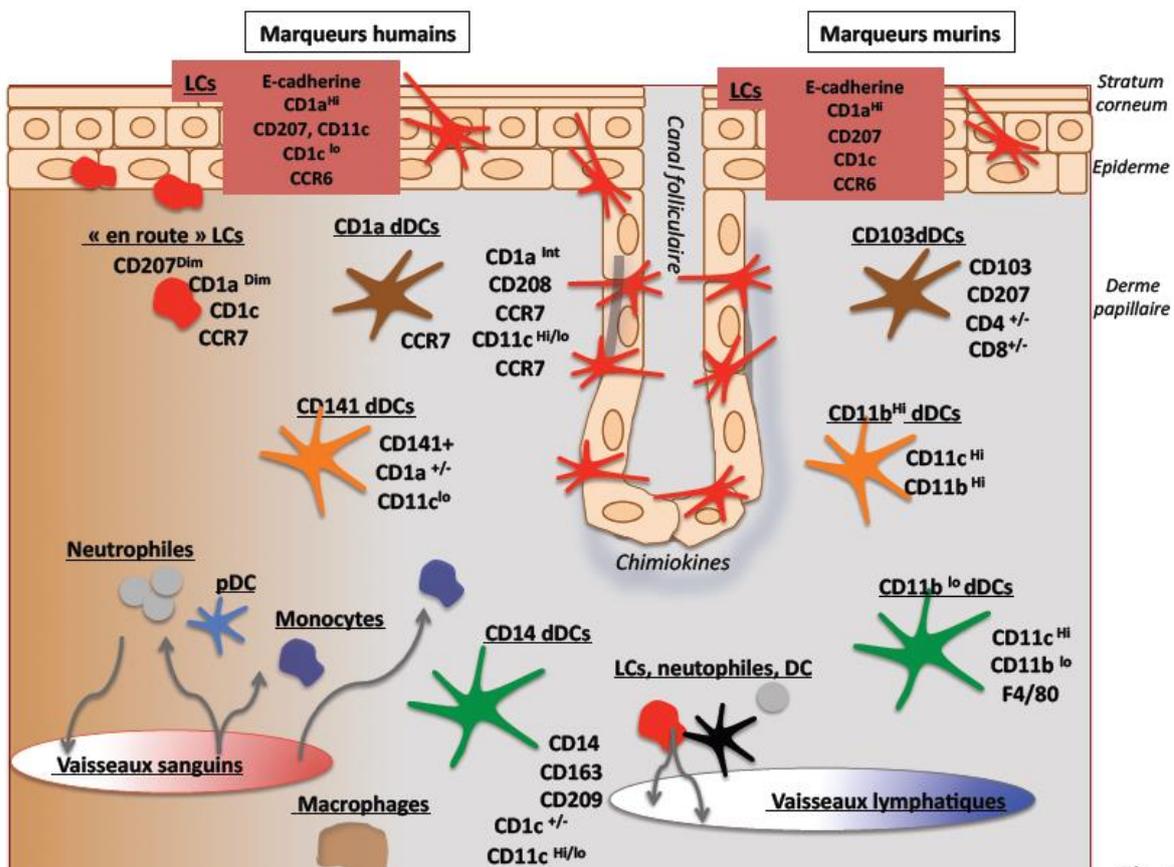
**Figure 8: Ontogénèse des APC cutanées.**

Elles sont issues du sac vitellin, des précurseurs de foie foetal, et des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Elles migrent vers les ganglions lymphatiques qui drainent la peau pour présenter les antigènes aux LT CD4+ et CD8+. (Sakeen W. Kashem, Muzlifah Haniffa, and Daniel H. Kaplan, Annu. Rev. Immunol. 2017. 35:469–99)

❖ **Les macrophages dermiques**

Principalement situé dans le derme réticulaire profond autour des capillaires, ils peuvent migrer dans les ganglions lymphatiques en conditions inflammatoires.

Ils expriment le CD14 et des marqueurs commun aux monocytes/macrophages : CD68, CD163 et le CD209 ou DC-SIGN dont la forte expression en histologie permet de les différencier des DC (Ochoa et al. 2008).



**Figure 9: Cellules dendritiques et macrophages de la peau humaine et murine** (Combadière B, Perrin H 2014).

### 1.3.4. Les lymphocytes T

Au nombre de  $2 \times 10^{10}$ , les lymphocytes sont deux fois plus nombreux dans la peau que dans le sang, même en l'absence d'inflammation (Clark et Al 2006).

Il existe différents types de lymphocytes T (LT) mémoires qui dérivent des LT naïfs.

- Les cellules T centrales mémoires (TCM) : siègent principalement dans les tissus lymphoïdes secondaires et dans le sang (Mackay, Marston, et Dudler 1990)
- Les cellules T effectrices mémoires (TEM) : sont en circulation entre le sang, les tissus périphériques et la rate
- Les cellules T résidentes mémoires (TRM) : sont dans les tissus périphériques et en particulier à l'état non inflammatoire dans la peau et les muqueuses, mais aussi à l'état inflammatoire.

Si 5% des cellules T ont un phénotype mémoire (CD57+CD45RA<sup>-</sup>, 80% CXCR3<sup>+</sup>), la plupart (95%), sont de type T alpha beta, avec un phénotype mémoire CD45RO.

Ces lymphocytes mémoires expriment des molécules d'adhésion et des récepteurs à certains chimiokines afin de pouvoir résider dans la peau. Le homing (Sigmundsdottir and Butcher 2009) n'est autre que l'expression cellulaire de ces marqueurs d'adressage tissulaire sur les lymphocytes T au moment de l'apprêtement par les DC.

En 2009, Wooland et Kolmeier ont mis en évidence que 90% des LT de la peau expriment un ligand appelé CLA (cutaneous lymphocyte antigen) (ligand P et E-selectines) qui leur permet de se lier aux cellules vasculaires endothéliales. Ils expriment également les récepteurs aux chimiokines CCR4 et CCR10 qui interagissent avec les chimiokines dermiques CCL17 et CCL27.

Il existe plusieurs types de phénotypes :

- Les TCM qui sont considérés par certains comme des précurseurs des TEM (Stubbe et al. 2006; Caserta et Zamoyska 2007), résident quant à eux dans les organes lymphoïdes (Reinhardt et al. 2001; D Masopust et al. 2001; Sallusto et al. 1999).
- Les TEM (effectrices mémoire CD62<sup>-</sup>-et CCR7<sup>-</sup> Sallusto et al. 1999) qui sont majoritaires, n'expriment plus les récepteurs CCR7 et à la L-selectine et ne peuvent donc pas migrer dans les ganglions. Ainsi 10% seulement des TEM apprêtés dans un ganglion du système lymphatique se retrouvent dans la circulation. Le reste résidera dans la peau.

### 1.3.5. *Autres cellules résidentes du système immunitaire cutané*

Dans la peau humaine en conditions physiologiques, les cellules T CD3  $\gamma\delta$ , NK, NKT et pDC composent le compartiment de l'immunité innée.

**Les cellules T $\gamma\delta$**  représentent entre 2 à 9% de la totalité des cellules T dans le derme et entre 1 à 10 % dans l'épiderme, chez l'homme (Hayday et Tigelaar 2003). Les cellules T  $\gamma\delta$  humaines sont impliquées dans les mécanismes de cicatrisation cutanée (Toulon et al. 2009).

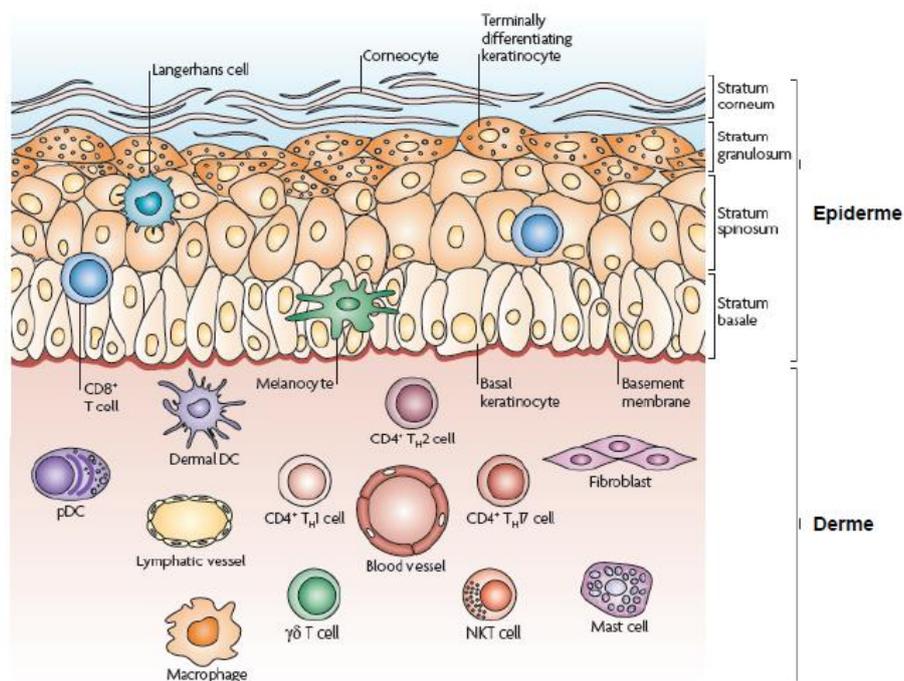
**Les cellules T régulatrices** (Treg) sont caractérisées par la forte expression de CD25 et de Foxp3. Une grande proportion de ces cellules est localisée dans les peaux humaine et murine en condition non inflammatoire. Les LTreg ont une fonction immunorégulatrice de tolérance périphérique importante dans la peau, même en absence d'inflammation ou d'infection, permettant le maintien de l'intégrité de la peau (Sather et al. 2007; Hirahara et al. 2006). Des altérations de ces cellules sont à l'origine de maladies auto-immunes et auto-inflammatoires en particulier cutanées (atopie, eczéma de contact ou psoriasis) (Ling et al. 2004; Cavani et al. 2003; Sugiyama et al. 2005). Le rôle des Treg dans l'immunité cutanée est mal connu. Une grande majorité des cellules Treg CD4 dans le sang humain exprime le CLA, de hauts niveaux de CCR4 et de CCR6 (Hirahara et al. 2006 ; Iellem, Colantonio, et D'Ambrosio 2003).

**D'autres cellules** sont présentes dans le derme : les mastocytes qui se localisent autour des vaisseaux sanguins et des fibroblastes et qui sont des cellules mésenchymateuses synthétisant les composants de la matrice extracellulaire. Ces cellules sécrètent des cytokines qui jouent un rôle essentiel dans l'inflammation cutanée, en particulier l'interleukine-6 (IL-6) impliquée dans l'activation des DC et le Tumoral Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) impliqué dans la maturation des précurseurs des LC. Les kératinocytes, principales cellules composant l'épiderme, sont très impliquées dans l'immunité innée et en particulier la lutte contre les toxines, les irritants et les agents infectieux extérieurs. Ils expriment à leur surface des TLRs (Toll-like receptors).

Les mastocytes sont impliqués dans la présentation antigénique aux cellules B et dans la production d'IgA au niveau des muqueuses. Ce mécanisme est principalement dû à l'interaction entre les mastocytes et les LB via la voie CD40/CD40L et la sécrétion d'IL-6 par les mastocytes (Merluzzi et al. 2010). Les TLRs 1 à 10 (à l'exception du TLR8) ont été décrits sur les mastocytes humains et contribuent à la défense antivirale (Sandig et Bulfone-Paus

2012). L'activation du TLR2 des mastocytes est impliquée dans le contrôle de l'infection par le virus de la vaccine chez la souris (Z. Wang, MacLeod, et Di Nardo 2012).

Le derme est par ailleurs vascularisé (vaisseaux lymphatiques et sanguins) et innervé permettant le recrutement de cellules de l'immunité innée (neutrophiles, monocytes, cellules T mémoires et pDC) (Frank O. Nestle et al. 2009). La peau est donc un organe avec des fonctions immunitaires essentielles, assurant son homéostasie en conditions pathologiques grâce à un système immunitaire de communication continue entre la peau et les ganglions drainants, et également avec les muqueuses (Combadiere et Liard 2011).



**Figure 10: Principales cellules immunitaires cutanées et localisation en conditions non inflammatoires (Frank O. Nestle et al. 2009).**

## **2. MODELES D'ETUDE DES CELLULES IMMUNITAIRES DE LA PEAU HUMAINE**

Depuis de nombreuses années, la recherche scientifique, l'industrie pharmaceutique et l'industrie cosmétologique cherchent à étudier les cellules de la peau et en particulier les cellules immunitaires. Différents modèles ont été utilisés depuis les années 1980, que ce soit des modèles in vivo ou in vitro. A ce jour, tous ont présentés leurs limites :

### **2.1. Modèles in vivo ou explants cutanés humains**

L'explant cutané a pour avantage d'être tridimensionnel et de contenir la plupart des populations cellulaires. Il est ainsi possible de choisir les différents paramètres cellulaires à étudier. Malheureusement la perte des systèmes vasculaires et nerveux rend sa durée d'utilisation très brève et sa conservation impossible d'un point de vue immunitaire. En effet, si la peau humaine peut être conservée près de 10 à 14 jours dans certains milieux de culture, la plupart des cellules résidentes migrent en dehors de la peau après quelques heures.

Comme l'ont décrit Lebonvallet et al. en 2010, il existe différents milieux de conservation de la peau. Pour les conservations de longue durée, Jensen, Gwatkin et Biggers ont développé en 1964 une méthode qui a par la suite été amélioré par Compajen et al en 2001, où le derme est déposé sur une grille métallique et baigne dans un milieu de culture, les explants sont ainsi nourris par diffusion passive. Une interface air-liquide est utilisée permettant le maintien de l'intégralité des structures cutanées et la différenciation de l'épiderme.

Pour les conservations de courte durée, les explants sont immergés dans un milieu de culture à 37°C ne contenant pas de sérum, et avec 5% de CO<sub>2</sub>.

De plus, la variabilité interindividuelle peut parfois poser des difficultés de paramétrage et de comparativité des résultats. En effet, la qualité des explants est différente selon l'âge, le sexe, le phototype ou le site de prélèvement. Ces explants proviennent pour la plupart de résidus chirurgicaux, avec pour certains d'entre eux une architecture sensiblement remaniée (vergetures, cicatrices...)

### **2.2. Modèles in vivo ou explants animaux**

Si la peau de cochon est plus fréquemment utilisée pour la recherche clinique du fait de ses similitudes avec la peau humaine d'un point de vue architecturale, la peau de souris représente le modèle de référence en immunologie. Leur facilité d'utilisation et de conservation permet de

les exploiter en grande série. Néanmoins, les peaux murines présentent de nombreuses différences architecturales avec la peau humaine notamment l'épaisseur, la perméabilité et la densité des follicules pileux. Mestas et Hughes en 2004, puis Groeber et al. en 2011 ont mis en évidence des différences entre la peau murine et humaine.

D'un point de vue histologique, la souris présente de nombreuses différences avec la peau humaine. En 1964, déjà, Montagna et Yum avaient introduit la notion de « loose-skinned » pour les rongeurs. (Debeer et al., 2013 ; Kong and Bhargava, 2011 ; Marquet et al., 2011 ; Montagna and Yun, 1964 ; Sullivan et al., 2001). La peau de la souris glisse sur le fascia musculaire sous-jacent, limitant ainsi les échanges. Cette mobilité est rendue possible par un feuillet adipeux appelé panniculus carnosus qui n'existe pas chez l'homme.

Comme l'ont démontré de nombreux travaux, la peau de la souris est bien plus fine que celle de l'homme. L'épiderme murin ne possédant que 2 à 3 assises cellulaires en comparaison des 10 à 15 chez l'homme, son épaisseur moyenne est d'environ 10 $\mu$ m contre une centaine chez l'homme. Il ne possède pas de couche granuleuse, ses cellules basales sont cubiques, et suprabasales aplaties et recouvertes d'une couche cornée. Le derme murin étant lui aussi plus fin, la peau de la souris ne fait en moyenne que 400  $\mu$ m d'épaisseur contre 1400  $\mu$ m pour l'homme. La densité des follicules pileux est aussi très sensiblement différente. Elle est d'environ 1000 / mm<sup>2</sup> pour les rongeurs contre 25 / mm<sup>2</sup> pour l'Homme).

La différence de mécanisme cicatriciel de type contraction contre ré-épithélialisation chez l'homme, nous fait penser que les mécanismes immunitaires sont sensiblement différents.

Pour toutes ces raisons, le modèle murin présente de nombreuses limites dans l'étude des mécanismes immunitaires cutanés. Les différences architecturales et cellulaires ne nous permettent pas d'extrapoler à l'homme les résultats obtenus.

Un autre animal est fréquemment utilisé pour l'expérimentation scientifique. En effet, le mini-porc est fréquemment utilisé pour l'étude des mécanismes cicatriciels (Ansell et al., 2012 ; Jung et al., 2013 ; Sullivan et al., 2001) des brûlures (Abdullahi et al., 2014 ; Sheu et al., 2014), en cosmétologie, allergologie (Vana and Meingassner, 2000) et toxicologie Barbero and Frasch, 2009 ; Godin and Touitou, 2007 ; Mahl et al., 2006 ; Simon and Maibach, 2000 ; Yu et al., 2013 ; Meurens et al., 2012). Il présente de bien plus grandes similitudes que la souris. Dès 1978, Meyer et al. s'étaient intéressés à son histologie. La densité pileuse, l'adhérence de la peau au tissu sous cutané, l'absence de panniculus carnosus font de la peau de cochon un support d'étude bien plus proche de la peau humaine.

Récemment différentes études histologiques (Debeer et al., 2013, (Kong and Bhargava, 2011, (Tfaili et al., 2012) concernant l'épaisseur de la peau ont mis en évidence une grande similitude entre la peau humaine et la peau de cochon : l'épaisseur de la couche cornée (20-26  $\mu\text{m}$ ), l'épaisseur de l'épiderme (30-140  $\mu\text{m}$  chez le cochon pour 50-120  $\mu\text{m}$  chez l'homme) (Hammond et al., 2000 ; Mahl et al., 2006), et l'épaisseur du derme également très semblable.

Il existe tout de même certaines différences architecturales, telles que l'épaisseur de la graisse hypodermique bien plus importante chez le cochon, l'absence de glandes eccrines sous cutanées, et la présence de glandes apocrines sur tout le revêtement cutané de l'animal.

En 2014, Mair et al. ont montré que le système immunitaire cutané du cochon présentait des similitudes avec celui de l'homme et qu'il pouvait être un support d'étude des mécanismes immunitaires intéressants. Néanmoins, les marqueurs cellulaires porcins sont différents de ceux de l'homme (Summerfield et al. 2014). Si certains ont été identifiés, comme pour les cellules dendritiques, il faudrait réaliser une étude transcriptomique complète pour identifier toutes les populations.

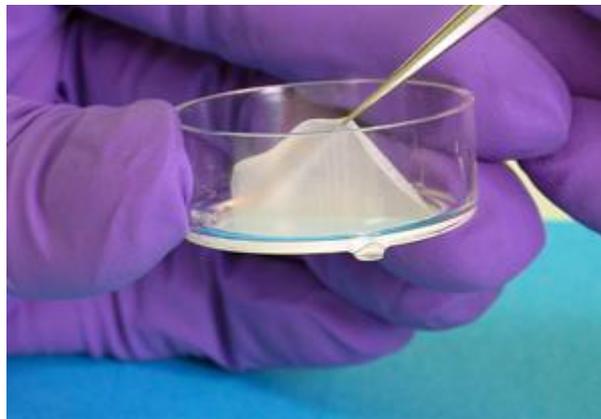
De plus le cochon présente d'autres contraintes d'utilisation, tel que le coût qui est bien supérieur à celui de la souris, les contraintes de reproduction et de stockage. D'un point de vue moléculaire, particulier ICAM-3, CXCR1 et leurs ligands, sont également absentes dans la peau murine (Mestas et Hughes 2004). De plus, les cellules  $\text{T}\gamma\delta$  localisées dans la gaine épithéliale interne du follicule ont été décrites chez la souris mais sont quasi absentes chez l'homme (Ito et al. 2008). Ces cellules  $\text{T}\gamma\delta$  représentent la population T majoritaire dans la peau et dans les muqueuses de souris. Pour les APC, les LC murines n'expriment pas le CD1c fortement exprimé chez l'homme. Et les différentes populations de DDC n'expriment pas les mêmes TLR entre l'homme et la souris.

### **2.3. Modèles de cultures cellulaires de cellules de la peau humaine**

La recherche en pharmacologie et cosmétologie a permis le développement des cultures cellulaires cutanées. Depuis les années 1980 il est possible de cultiver in vitro la quasi-totalité des cellules de la peau. Les premiers modèles (Tammi et Maibach 1987), de culture mono ou multicellulaires n'étaient que bidimensionnelles. Bien que reproductibles, faciles d'utilisation et cryopréservables, ils sont peu utilisables dans l'étude de l'immunité cutanée. Leur architecture est trop différente de celle de la peau. Les seules études possibles avec ce modèle ne mettent en évidence que les cellules migrants hors de la peau après culture en présence de cytokines (Clark, Chong, Mirchandani, Yamanaka, et al. 2006). L'ajout de cytokine dans le milieu de culture entraîne une modification du phénotype et la sélection de certaines cellules

immunitaires. Ainsi les cellules recueillies diffèrent de celles qui résident dans la peau. Par ailleurs certaines populations spécifiques d'antigènes telles que les lymphocytes T, sont présentes en très faible quantité. Afin de pouvoir les isoler, il faut ainsi une grande quantité de tissus.

Depuis plusieurs années, la réglementation mondiale impose certaines limites concernant les tests animaux. Ainsi, plusieurs laboratoires ont mis au point un modèle de peaux reconstruites à partir de tissus humains afin de tester la sécurité et l'efficacité de produits cosmétiques pour la plupart. Les kératinocytes issus d'explants de chirurgie plastique sont isolés et déposés sur une matrice de collagène. Cette peau reconstituée est principalement utilisée pour quantifier le niveau d'irritabilité ou d'inflammation produit par différentes substances au contact de la peau. Le laboratoire français Episkin est le leader mondial.



**Figure 11: Modèle de peau Episkin**

#### **2.4. Modèles de peau reconstruite**

Du fait des limites des modèles précédemment utilisés, des modèles de peaux reconstruites ont été développés dès le début des années 2000. Le principal objectif était de mettre au point un modèle tridimensionnel. Le principe consiste en la culture de kératinocytes et plusieurs types cellulaires cutanés cultivés sur un support. Différents supports ont été utilisés tels que des membranes poreuses, une matrice de collagène, une matrice de polymères synthétiques biocompatibles. En 2009, Auxenfants et al, ont répertorié tous les supports, qui peuvent varier par leur structure (en couches ou poreuses) et leur composition (acide polyglycolique, nylon).

Ainsi les cellules déposées sur leur support, vont y adhérer, proliférer et synthétiser une matrice extracellulaire en 3 dimensions, ressemblant au derme humain.

Après 3 à 4 semaines de culture des fibroblastes dans ce derme reconstitué, le dépôt de kératinocytes obtenu est à l'origine du développement d'un épiderme stratifié grâce à la culture en interface air-liquide. En 2007 (Vermette et al) puis en 2009 (Vallée et al) ont réussi à reconstituer les 3 couches de la peau humaine en produisant un hypoderme à partir d'adipocytes issus de cellules stromales ou de cellules souches.

Jusqu'à la fin des années 1990, les peaux reconstruites ne contenaient ni annexes, ni terminaison vasculaire et lymphatique. Seuls des kératinocytes, des fibroblastes et des mélanocytes étaient présents (M Ponec et al. 1997 ; Pruniéras, Delescluse, et Regnier 1976). En 1998 Black et al, puis en 2004 Ponec et al., ont tour à tour réussi à intégrer des vaisseaux sanguins dans ces peaux reconstruites en co-cultivant sur une membrane de collagène en biopolymère des fibroblastes, des kératinocytes, et des cellules endothéliales veineuses permettant la formation de structures vasculaires ayant la même architecture interne que les vaisseaux in vivo. Ils ont ainsi pu montrer que la nature du derme et de la matrice extracellulaire avait un rôle majeur dans le développement d'un réseau vasculaire traditionnel. En 1999, Michel et al. ont sur le même principe réussi à enrichir leurs peaux reconstruites de follicules pileux. En 2008, c'est Gingras et al. qui ont pu en faire de même avec les structures nerveuses, en déposant des neurones murins moteurs sur une matrice de fibroblastes, ce qui avait permis la myélinisation et la migration axonale de ces neurones.

Une nouvelle génération de peaux reconstruites immunocompétentes est maintenant développée. Pour cela, des cellules progénitrices hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> isolées de sang de cordon sont cultivées en présence de GM-CSF, de TGFβ1 et de TNFα. Ces cellules sont ensuite déposées sur des peaux reconstruites endothelialisées, permettant ainsi la différenciation de ces cellules en LC dans l'épiderme et en DC dans le derme. Des modèles plus récents utilisent des cellules CD34<sup>+</sup> isolées du sang circulant et prédifférenciées avec du GM-CSF, du TGFβ1, de l'IL-13 et du TNFα avant de les déposer sur des peaux reconstruites (Bechetoille et al. 2007; Auxenfans et al. 2009).

Très récemment un modèle tridimensionnel de peaux reconstruites a permis de mettre en évidence l'interaction entre les kératinocytes et les cellules T CD4<sup>+</sup> en reproduisant une inflammation psoriasiforme et une augmentation cutanée de l'expression de cytokines et de chimiokines (van den Bogaard et al. 2014).

Malheureusement, ces peaux reconstruites présentent encore de nombreuses limites. Ainsi leur préservation et leur maintien en culture est difficile au-delà de 4 heures, délai au-delà duquel une partie du contingent cellulaire sera altéré. Aucun de ces modèles ne contient à ce jour un contingent cellulaire immunitaire complet, limitant l'étude des différents mécanismes. De même, la desquamation, étape finale de la différenciation des kératinocytes ainsi que la perméabilité cutanée ne peuvent être reproduites (Lebonvallet et al. 2010).

Ainsi si ces modèles organiques permettent une étude structurelle tridimensionnelle, et le choix du temps de maturation des cellules (Lebonvallet et al. 2010), leur utilisation demeure limitée à ce jour dans l'étude de l'immunité cutanée.

## 2.5. Modèles de greffe de peaux

Afin de faire face aux limites d'exploitation des modèles de culture cellulaire, des modèles animaux in vivo et des modèles organotypiques de peaux reconstruites, s'est développé la mise au point de modèles de souris humanisées. L'idée est de greffer de la peau humaine à une souris, afin de maintenir la structure, l'immunogénicité et les fonctions in vitro de la peau humaine afin de pouvoir l'étudier.

Le principe est de greffer de la peau humaine à des souris immunodéprimées afin d'éviter toute interaction entre le système immunitaire murin et humain qui biaiserait nos résultats.

**Les premières souches de souris immunodéprimées ont été mises au point en 1965**, il s'agissait de souris nude dépourvues de thymus. Les premières allogreffes ont été réalisées au début des années 1980, il s'agissait d'épiderme humain ou de peau fœtale humaine (Krueger et Shelby 1981; Lane, Scott, et Day 1989). Malheureusement des Ig et des cellules endothéliales avaient envahis le greffon le rendant inexploitable.

**En 1992, Kim et al., ont greffé des souris SCID** (Severe Combined Immuno Deficiency) mutées pour les gènes Rag1 et Rag2 à l'origine d'une sévère déficience en lymphocytes B et T, d'une lymphopénie, et d'une hypogammaglobulinémie. La peau provenait de biopsies cutanées de patients atteints d'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive. 24 semaines après la greffe, les cellules humaines étaient toujours présentes mais sans collagène VII de l'épidermolyse bulleuse. Dès 1993, Yan et al. ont greffé ces souris SCID avec de la peau humaine normale et ont montré que les structures histologiques et vasculaires de la peau humaine étaient préservées. Ils ont retrouvé après injections intradermiques de TNF $\alpha$  dans la peau humaine greffée une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion E-selectines, VCAM-1 et ICAM-1 équivalente à celle retrouvée dans une peau humaine non

greffée. Malheureusement, la présence de structures vasculaires murines 4 à 6 semaines après la greffe, et l'infiltrat inflammatoire (monocytes et neutrophiles) murin retrouvé au niveau des sites d'injection de cytokines. La préservation de l'immunité innée chez ces souris SCID, rend ainsi difficile son exploitation.

**En 1995, Brandsma et al.** ont utilisé ce même modèle. Ils ont tout d'abord constaté que l'épiderme, le derme, et les kératinocytes humains étaient conservés. Par la suite, ils ont étudié la pénétration de l'ADN du papillomavirus humain (PVH) de type 16 couplé à des particules d'or a été étudié après inoculation par gène gun dans la peau humaine greffée. Sept souris avaient survécu et deux avaient développé des signes histologiques d'infection à PVH identiques à ceux de la peau normale infectée.

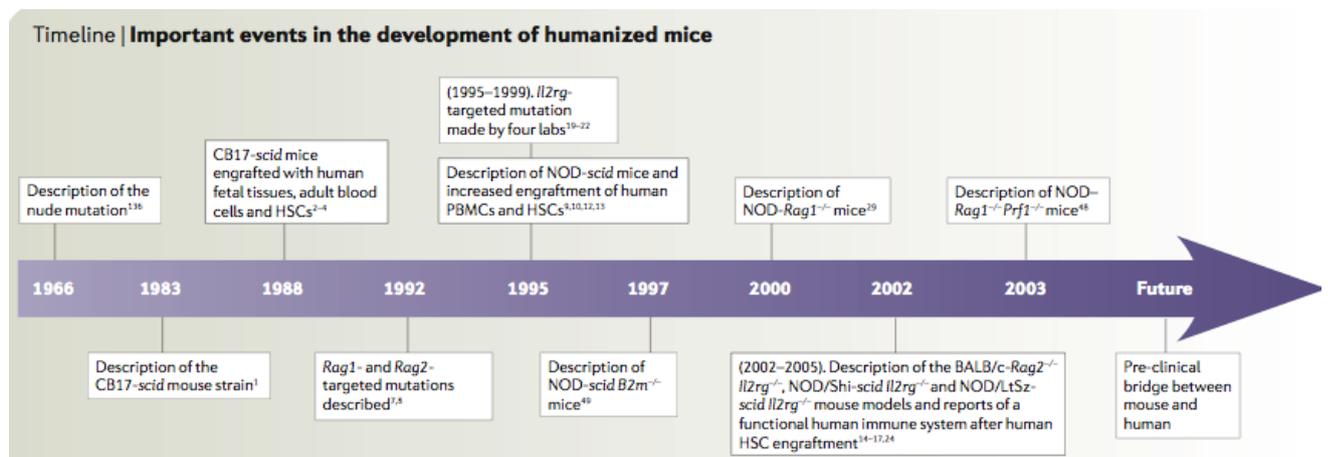
**Soballe et al. En 1996**, puis Nomura et al. ont également travaillé sur ce modèle de souris humanisées, et ont constaté que les peaux humaines conservaient leurs principales structures architecturales plus d'une année après la greffe.

A la même période, de nouvelles lignées de souris ont été mises au point. Elles présentaient tour à tour un déficit en NK (natural killers), et d'autres anomalies de fonction de l'immunité innée.

**En 1998**, des modèles de souris SCID associant à la fois la reconstitution d'un système immunitaire humain et la greffe de peau humaine ont été développés. Un modèle de ce type ayant pour but d'évaluer l'efficacité de la réponse spécifique d'antigène après injection intradermique dans la peau greffée d'un vecteur viral recombinant (virus canary pox) pour le gène gp160 du VIH-1 LAI a montré que la peau humaine greffée était de structure normale 4 à 5 semaines après la greffe (Delhem et al. 1998). De plus, on ne retrouvait pas d'infiltrat inflammatoire mais des cellules CD1a<sup>+</sup> correspondant aux LC humaines dans l'épiderme dans les mêmes proportions que dans la peau humaine normale. La densité des LC diminuait progressivement dans les 3 mois suivant la greffe. Par ailleurs l'injection ID du vecteur viral recombinant dans cette peau humaine greffée provoquait l'apparition d'un infiltrat périvasculaire dans le derme de cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ainsi que l'augmentation du nombre de cellules CD1a<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup> et CD86<sup>+</sup> correspondant aux LC dans l'épiderme (Delhem et al. 1998). Cette étude a été la première à isoler et caractériser des lignées de cellules T spécifiques d'antigène humaines dans un modèle de souris humanisées greffées avec de la peau humaine.

En 2006, Igney et al. ont développé des souris NOD/SCID, en plus des déficits propres aux souris SCID, elles présentaient des déficits de fonction des NK, du système du complément et des cellules présentatrices de l'antigène. Hemmerling et al. ont montré que les LC humains étaient de nouveau présents 6 à 9 semaines après la greffe, alors qu'ils avaient disparu. Au préalable, ils avaient injecté à certaines souris du PBMCs humain allogénique. Cette repopulation s'effectue en l'absence de précurseurs humains de moelle osseuse (Hemmerling et al. 2011).

Depuis 2010, plusieurs équipes dont celles de Racki, ont évalué la qualité des souris humanisées en fonction des épaisseurs de peau greffée et des différents types de souris. Il a été démontré qu'il était nécessaire d'injecter des Ac anti-Gr1<sup>+</sup> afin d'éviter la destruction des structures et cellules humaines telles que les fibroblastes et les cellules de l'endothélium vasculaire humain. En effet, il a été constaté qu'un infiltrat inflammatoire murin de cellules Gr1<sup>+</sup> se formait au contact de la greffe humaine et empêchait la revascularisation et détruisait les fibroblastes.



**Figure 12: Différentes étapes de la mise au point de souris immunodéficientes. (Shultz)**

Ces différents modèles de souris humanisées représentent une grande avancée pour l'étude des mécanismes de l'immunité cutanée. L'étude des réponses vaccinales (dans la trichinose, le papilloma virus, l'HSV-2 ou encore des modèles de cancers) (Spranger, Frankenberger, et Schendel 2012; Kwant-Mitchell, Ashkar, et Rosenthal 2009; Taylor et Else 2002; Buitrago-Pérez et al. 2012), des allogreffes et réaction du greffon contre l'hôte (Issa et al. 2012) ainsi que l'étude de différentes maladies dermatologiques inflammatoires (Boehncke et al. 1999; Boyman et al. 2004).

**Tableau 4: Modèles récents de souris humanisées et résultats.**

<b>Lignées</b>	<b>Système immunitaire</b>	<b>Greffe de peau</b>	<b>Résultats</b>
<b>Souris SCID</b> <i>(Kim 1992, Yan 1993, Brandsma 1995, Soballe 1996, Nomura 1997)</i>	Déficit en cellules B et T, lymphopénie, hypogammaglobulinémie	Pathologies dermatologiques (épidermolyse bulleuse récessive, carcinomes cutanés) Peau normale	<b>Conservation de la peau</b> et des caractéristiques de la maladie 24 semaines à 20 mois après greffe <b>Infiltrat inflammatoire de cellules murines</b> (monocytes et PNN)
<b>Souris SCID+injection de lymphocytes périphériques humains</b> <i>(Delhem 1998)</i>		Peau normale et injection ID vecteur viral recombinant	<b>Infiltrat de cellules T</b> CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> humaines Augmentation LC peau greffée
<b>Souris NSG (NOD/SCID/IL2R<math>\gamma</math><sup>null</sup>)</b> <i>(Hemmerling 2011, Racki 2010, Issa 2012)</i>	SCID+ déficit immunité innée : fonction des cellules NK, APC, complément et chaîne $\gamma$ du récepteur IL2	Peaux normales : études allogreffe (GVH)	<b>Diminution des LC</b> 3-4 semaines après greffe et repopulation à 6-9 semaines <b>Infiltrat cellules Gr1+</b>

**Tableau 5: Différents modèles d'étude des mécanismes immunitaires  
(Lebonvallet et al Eur J Dermatol 2010)**

Modèles		Avantages	Limites
<b>Mono-cellulaire (2D)</b>		Conditions définies Reproductibilité Cryopréservation possible Facile d'utilisation	Seulement 1 type cellulaire Pas de culture tridimensionnelle Variabilité et paramètres non contrôlés pour cellules primaires
<b>Co-culture (2D)</b>		Reproductibilité Conditions définies Cryopréservation possible Facile d'utilisation	Pas de culture tridimensionnelle Variabilité et paramètres non contrôlés pour cellules primaires
<b>Modèles organotypiques (3D)</b>	<b>Peaux reconstruites</b>	Choix du temps de maturation Structure tridimensionnelle	Absence d'annexes/pores Seulement quelques types cellulaires Reproductibilité <b>Utilisation immédiate, pas de préservation</b> <b>Pas de système immunitaire cutané</b>
	<b>Explants de peau</b>	La plupart des types cellulaires Choix des paramètres Structure tridimensionnelle	Grande variabilité et paramètres non contrôlés Perte des systèmes vasculaire et nerveux <b>Utilisation immédiate, pas de préservation</b>
<b>Modèles animaux in vivo</b>		Plus proches de la réalité Intégration de tous les paramètres	<b>Différences structurelles et moléculaires peau murine/humaine</b>

## ***DEUXIEME PARTIE***

### ***Modèle de souris humanisée avec greffe de peau humaine***



## DEUXIEME PARTIE : Modèle de souris humanisée avec greffe de peau humaine

Le modèle de souris humanisé avec greffe de peau humaine a fait l'objet de deux articles scientifiques publiés. Les articles complets sont disponibles en ANNEXE 1 de ce document.

### *Maintenance of human skin tissue and cellularity after engraftment in immunodeficient mouse model*

Journal of Experimental and Applied Animal Sciences  
Volume 2, Number 2, pp. 165-171, 2017  
Print ISSN 2314-5684 | Online ISSN 2314-5692

SHORT COMMUNICATION

### **Maintenance of human skin tissue and cellularity after engraftment in immunodeficient mouse model**

**David Boccara<sup>1,2</sup>, Béhazine Combadière<sup>1\*</sup>, Angèle Soria<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Sorbonne Universités UPMC université Paris 06 UMRS CR7, Inserm U1135, CNRS, ERL 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses-Paris (Cimi-Paris), 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France, <sup>2</sup>Service de chirurgie plastique reconstructrice, esthétique, centre des brûlés, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France, <sup>3</sup>Service de Dermatologie et d'Allergologie, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine 75020 Paris HUEP, APHP Assistance Publique Hôpitaux de Paris, France

### *Long-term maintenance of skin immune system in a NOD-Scid IL2r<sup>null</sup> mouse model transplanted with human skin*

DOI: 10.1111/exd.12530  
www.wileyonlinelibrary.com/journal/EXD

Methods Letter to the Editor

### **Long-term maintenance of skin immune system in a NOD-Scid IL2r<sup>null</sup> mouse model transplanted with human skin**

**Angèle Soria<sup>1,2,3</sup>, David Boccara<sup>1,2,4</sup>, Louis Chonco<sup>1,2</sup>, Nora Yahia<sup>1,2</sup>, Mélody Dufossée<sup>1,2</sup>, Sylvain Cardinaud<sup>1,2,5</sup>, Arnaud Moris<sup>1,2,5</sup>, Christelle Liard<sup>1,2</sup>, Alix Joulin-Giet<sup>1,2</sup>, Marion Julithe<sup>1,2</sup>, Maurice Mimoun<sup>4</sup>, Béhazine Combadière<sup>1,2</sup> and Hélène Perrin<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses Cimi-Paris, Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, UMR\_S CR7, Paris, France; <sup>2</sup>INSERM U1135, Cimi-Paris, Paris, France; <sup>3</sup>Service de dermatologie et allergologie, hôpital Tenon, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; <sup>4</sup>Service de chirurgie plastique, reconstructrice, esthétique, centre de brûlés, hôpital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; <sup>5</sup>CNRS ERL8255, Cimi-Paris, Paris, France

*Correspondence:* Béhazine Combadière, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses Cimi-Paris, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France, Tel.: +33140979887, Fax: +33140779734, e-mail: behazine.combadiere@upmc.fr  
*Béhazine Combadière and Hélène Perrin – co-last author.*

**Abstract:** We developed a NOD-Scid IL2r<sup>null</sup> mouse model transplanted with human skin that brings fundamental insight on *in vivo* cellular mechanisms of intradermal immunization and antigen presentation by dermal dendritic and epidermal Langerhans cells for skin T-cell immunity. Indeed, T-cell immunity is a crucial checkpoint for the induction of *in vivo* rapid control of skin infection. With the long-term preservation of a complete human skin immune system, this model offers the unique opportunity not only to better understand mechanisms of skin immune response but also to test new compounds and devices for cutaneous routes of vaccination, as well as new therapeutics approach for skin diseases, allergies or infections.

**Abbreviations:** APC, antigen-presenting cell; DC, dendritic cell; HIV, human immunodeficiency virus; ID, intra-dermal; LC, Langerhans cell; MVA, modified vaccinia Ankara virus; NP, nanoparticle; NSG, non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 gamma chain receptor null (NOD-Scid IL2r<sup>null</sup> mice); pfu, plaque-forming unit; VZV, Varicella zoster virus.

**Key words:** humanised mice – intra-dermal immunization – NOD-Scid IL2r<sup>null</sup> – skin graft – skin-resident T cells

*Accepted for publication 28 July 2014*

## 1. CONTEXTE

Le choix du modèle est essentiel dans l'étude des mécanismes immunitaires de la peau. La mise au point de souris SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) dépourvues de lymphocytes B et T (Yan et al. 1993) a permis le développement des modèles de souris humanisées. Si d'importants progrès ont ainsi pu être réalisés, il n'en demeure pas moins que l'utilisation de ces souris présente certaines limites, telles que la revascularisation murine de la greffe de peau humaine accompagnée d'un important infiltrat inflammatoire de monocytes et lymphocytes causant le rejet de la greffe.

Plus récemment, un nouveau type de souris NOD-Scid IL2rgamma(null) (NSG) a pu être utilisé. Ces souris, non obèses et non diabétiques ont pour particularité de présenter un sévère déficit de l'immunité innée (système du complément, APC et Natural Killers) (Igney 2006, Hemmerling 2011, Racki 2010, Boyman 2004).

## 2. OBJECTIF

L'objectif était donc de mettre au point un nouveau modèle de souris humanisées.

Ma pratique de la chirurgie plastique me permettant de disposer des explants de peau frais, il a fallu mettre au point un protocole de recueil de la peau humaine, pour ce qui est de l'accord du patient, du conditionnement de la peau et de son transport. Il a également fallu constituer un dossier auprès du comité d'éthique de l'hôpital Saint Louis.

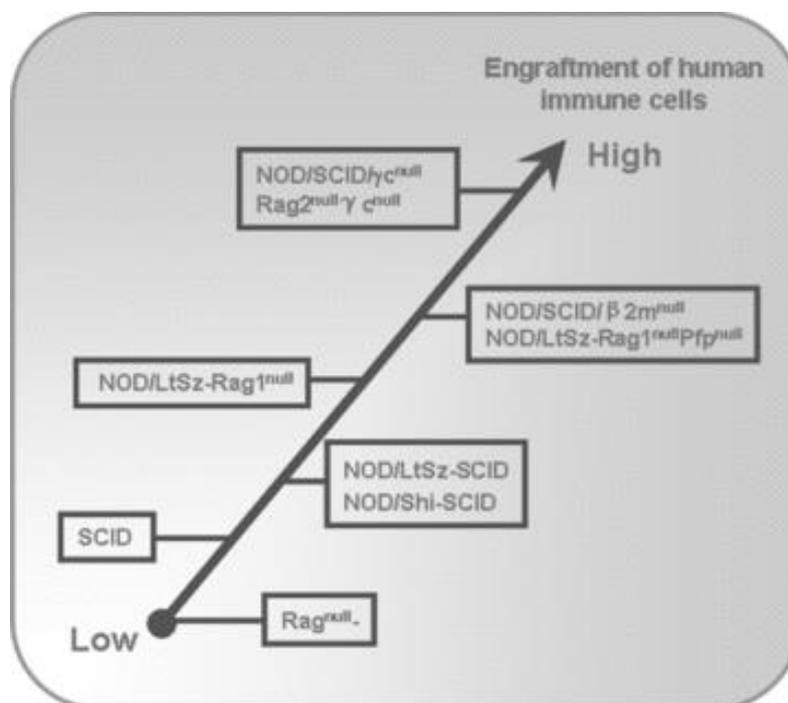
Il a également fallu mettre au point une technique de greffe de peau humaine sur les souris NSG HLA-A2 tg immunodéprimées, fiable, reproductible et la moins chronophage. Ces 3 aspects étant les facteurs limitants décrits dans la plupart des articles concernant ces modèles d'étude (Delhem et al. 1998).

Par la suite, il a fallu valider la qualité de notre modèle en vérifiant que la structure et l'architecture de la peau étaient conservées, et que les lymphocytes T et les APC (DC et LC) étaient toujours présents en nombre suffisant et conservés leur fonction.

### 3. MATERIEL ET METHODE

#### 3.1. Animaux

Les souris immunodéficientes utilisées pour les greffes de peau sont des souris NSG : Non Obese-Diabétiques (NOD) avec une sévère déficience immunitaire combinée (SCID), due à une mutation spontanée du gène *Prkdc* à l'origine de la production des protéines kinases impliquées dans la réparation de l'ADN associés à une mutation délétère en chaîne gamma du récepteur à l'interleukine 2 (souris NOD.Cg-Prkdcscid112rgtm1Wjl/SzJ, The Jackson Laboratory). Ces mutations ont pour conséquence une déficience en lymphocytes B et T et cellules NK à activité cytotoxique. Elles présentent aussi des anomalies de structure au niveau du thymus et de la rate et une absence de ganglions périphériques. Ces caractéristiques font de la souris NSG un modèle de souris immunodéficientes de choix pour une reconstitution immunitaire par la greffe de cellules souches hématopoïétiques CD34+ humaines, cellules mononuclées périphériques CD45+ ou dans ce cas précis pour la xénotransplantation de peau humaine. Ces souris sont issues de plus de 25 ans de recherche (figure 4) et ont été récemment développées. Elles représentent aujourd'hui le modèle le plus avancé pour la reconstitution et le développement d'un système immunitaire humain ou de greffes de tissus humains.



**Figure 13 : Evolution des différentes lignées de souris immunodéficientes.**

Les couples reproducteurs et les portées en sevrage sont élevés à la Nouvelle Animalerie Commune (NAC, 91 boulevard de l'Hôpital, agrément n° B751308). Après la période de sevrage (6 à 8 semaines), les portées sont transférées au Centre d'Expérimentation Fonctionnelle (CEF, 105 boulevard de l'Hôpital, agrément n° A751315) et maintenues en élevage dans une pièce réservée aux souris immunodéficientes. Les greffes et autres manipulations sur les souris sont réalisées seulement après une période d'adaptation d'une semaine au nouvel environnement et dans une salle réservée à la chirurgie du CEF.

Les actes d'expérimentation de chirurgie animale se font sous la responsabilité du Dr. Béhazine Combadière. Le protocole de xénogreffe aux souris NSG a été étudié et approuvé par le comité éthique de l'animalerie.

Les souris sont anesthésiées avant chaque manipulation par injection intra-péritonéale de 200 à 300  $\mu$ L d'un mélange de kétamine 8 % (Imalgen 1000, Merial, Lyon, France) et xylazine 2 % (Bayer AG, Leverkusen, Germany) dans du NaCl stérile, suivant le poids de l'animal.

### **3.2. Explants de peau humaine**

Les explants cutanés utilisés pour nos greffes de peau, proviennent de liftings mammaires, brachiaux ou abdominaux dans le cadre d'une chirurgie plastique. Au préalable, l'autorisation du comité d'éthique de l'hôpital Saint Louis (IRB 00003835), et le consentement éclairé des patients avaient été obtenus selon les règles de la convention d'Helsinki. (Consentement disponible en ANNEXE 2)

Un archivage des données est immédiatement réalisé, avec un code par donneur, son sexe, l'âge, le site d'origine et le phototype de la peau.

Une fois arrivés au laboratoire les explants cutanés sont préparés pour la greffe sur les souris. Les explants étaient lavés à la povidone-iodine (Betadine® dermique 10 %, MEDA pharma, France) et au PBS 1X.

Les prélèvements de peau sont ensuite finement dégraissés et découpés en petits patches de 1 à 1,5 cm<sup>2</sup> conservés dans une solution spéciale (figure). Ce temps de dégraissage est un temps essentiel de la manipulation. Il conditionne la qualité de la prise de la greffe (revascularisation) et la préservation de l'architecture et des différents contingents cellulaires. La première étape a donc consisté à évaluer différents niveaux de dégraissage.

Trois différents niveaux de dégraissage ont été réalisés et 10 souris ainsi greffées à chaque fois :

- Peau mince : Respect de l'épiderme et du derme papillaire
- Peau demi-épaisse : Respect de l'épiderme, du derme papillaire et partiel du derme réticulaire
- Peau épaisse : Respect de l'épiderme, du derme papillaire et du derme réticulaire.

Ainsi nous pourrons par la suite évaluer la qualité de la prise de greffe et du respect de l'architecture tissulaire en fonction de l'épaisseur de la peau greffée.



**Figure 14: Préparation des explants dégraissage et découpage aux ciseaux de Joseph**

### 3.3. Réalisation de la greffe

La revascularisation d'une greffe de peau se faisant à partir des vaisseaux sous-jacents, il a fallu choisir une zone receveuse plane et étendue pour que la greffe soit bien appliquée. La région interscapulaire nous a semblé idéal, car en plus d'être étendue et régulière, elle est difficilement accessible aux pattes et au museau de la souris, ainsi celle-ci ne pourra pas arracher les tissus greffés ni les différents moyens de fixation.

**2 techniques différentes** ont été réalisées :

- Classique avec rasage de la zone receveuse, et avulsion cutanée à la lame froide, la greffe est alors appliquée et fixée au contact du muscle soit par de six points de suture (Nylon), soit par de la colle biologique, soit par un bourdonnet.
- Enfouie sous la peau de la souris qui est incisée, la greffe étant appliqué au contact du muscle sans fixation, la peau de la souris par la suite suturée avec quelques points de suture.

L'utilisation des agrafes pour fixer la greffe est courante chez l'homme mais difficile sur une souris compte tenu de leur taille trop importante par rapport au gabarit de la souris. Plusieurs techniques de fixation ont ensuite été testées : **Colle biologique ou suture par points séparés.**

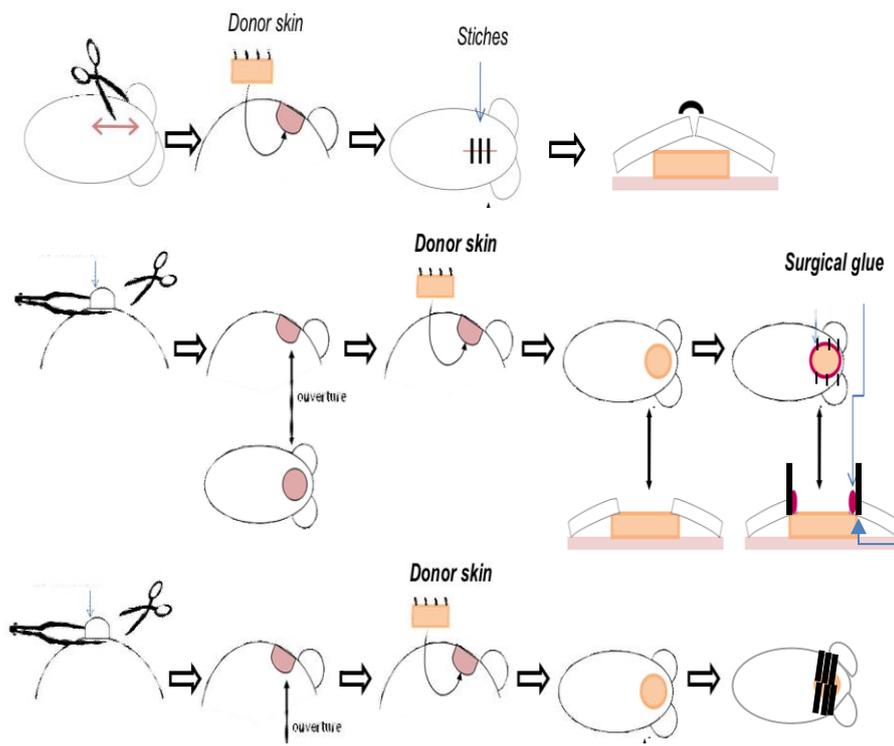
La colle biologique a très rapidement été abandonnée au profit de la suture. Malgré la facilité d'utilisation, et le temps de manipulation gagné, l'interface de colle ainsi apportée entre la peau et la souris rend la prise de greffe très improbable et difficile. En particulier, la conservation de l'épiderme était très mauvaise. Sur 10 greffes réalisées ainsi, seule 1 a été un succès, nous poussant à abandonner cette méthode.

**La suture par points séparés de fils de nylon a ainsi systématiquement été utilisée.** Six points séparés de Nylon sont réalisés afin de maintenir au mieux la greffe.

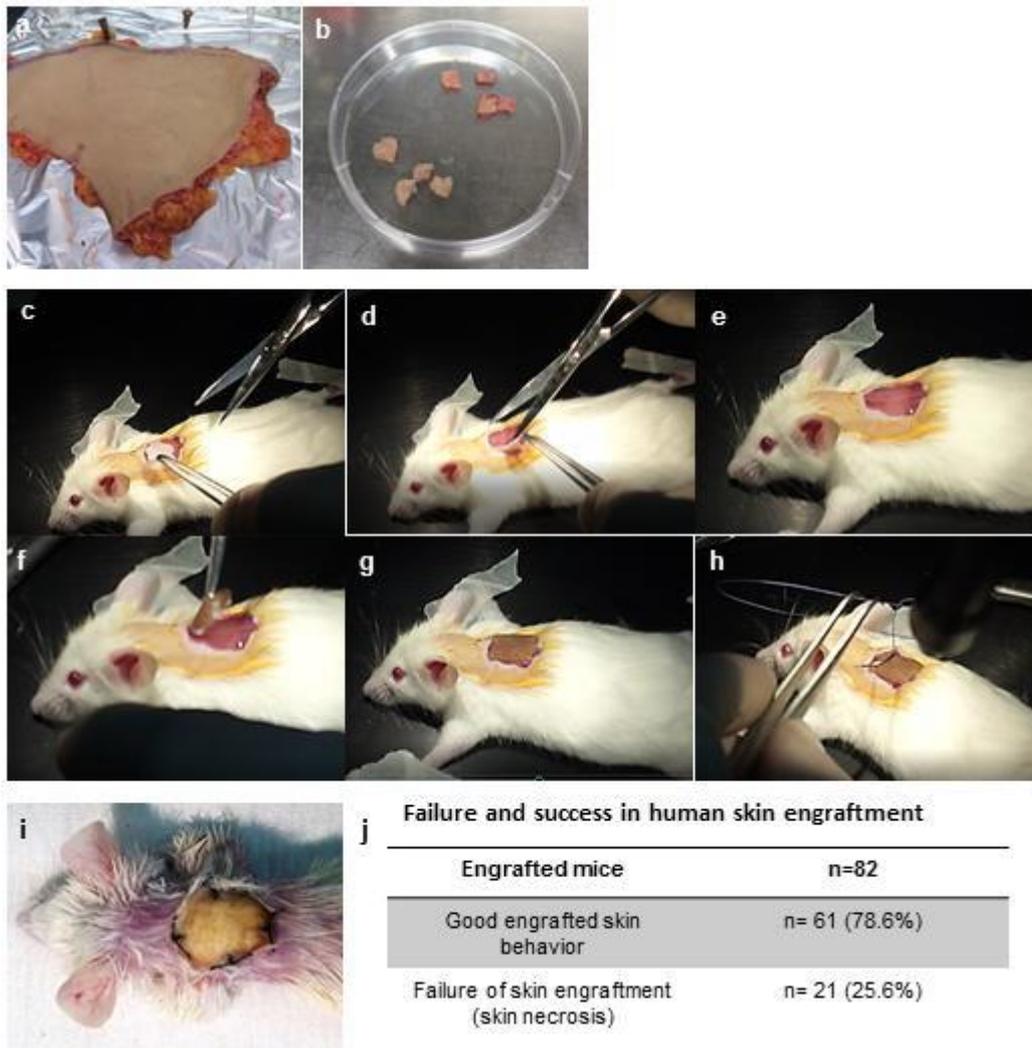
L'hydratation de la peau au cours de la greffe et après la greffe est également un paramètre important pour maintenir la qualité du greffon de peau. Nous avons ainsi pu observer que l'hydratation régulière du greffon avec du sérum physiologique au cours de la manipulation améliorait nos résultats (figure 5). Une pommade grasse à base de vaseline est appliquée sur le greffon après la greffe et à chaque renouvellement du pansement (les pommades Homéoplasmine puis Dexeryl ont été utilisées). Un tulle gras était initialement utilisé pour recouvrir le greffon, puis il a été remplacé par un pansement siliconé Mèpitel qui améliore nettement le maintien de la qualité de l'épiderme et de la peau greffée. Il est ensuite recouvert d'une compresse stérile, fixé au corps de la souris (en dessous et au-dessus des pattes avant) avec une bandelette de Cohéban puis une bandelette adhésive d'Adhéban. Ce pansement est ensuite renouvelé tous les 4 à 5 jours dans les semaines suivantes.

Pour ce qui est des soins post-opératoires, nous avons ainsi testé un pansement siliconé Mèpitel qui améliore nettement le maintien du pansement gras et donc la qualité de l'épiderme et de la peau greffée. Il est ensuite recouvert d'une compresse stérile, fixé au corps de la souris (en dessous et au-dessus des pattes avant) avec une bandelette de Cohéban puis une bandelette adhésive. Ce pansement est ensuite renouvelé tous les 5 jours dans les semaines suivantes.

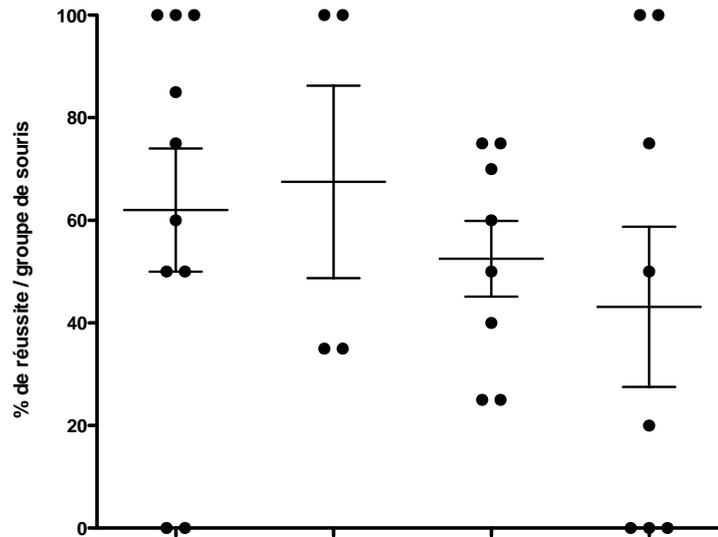
Nous avons comparé les résultats obtenus avec des souris dont le pansement était changé une et deux fois par semaine.



**Figure 15: différentes étapes de la mise au point du modèle de souris humanisées.**



**Figure 16: Différentes étapes de greffe de peau humaine sur souris NSG.**  
 Explant de peau humaines (a) Exérèse aux ciseaux de la graisse sous cutanée et hypodermique et réalisation de patch de 1 à 1.5 cm<sup>2</sup> (b). Avulsion d'un patch cutané de peau de souris de la région interscapulaire. (C-e). Mise en place de la greffe de peau humaine (f). Le greffon est placé bords à bords à la peau de souris (g) fixation par des points séparés (h). Résultats des prises de greffe de peau. (I). Tableau récapitulative des résultats (j) pour 82 souris greffées avec de la peau humaine provenant de 16 donateurs.



Epaisseur du greffon: (dégraissage)	+	+	+	-
Technique de suture Bourdonnet:	-	-	+	-
Hydratation (greffe et pansement)	+	-	-	-

**Figure 17 : Bilan globale et taux de réussite des greffes selon protocoles.**

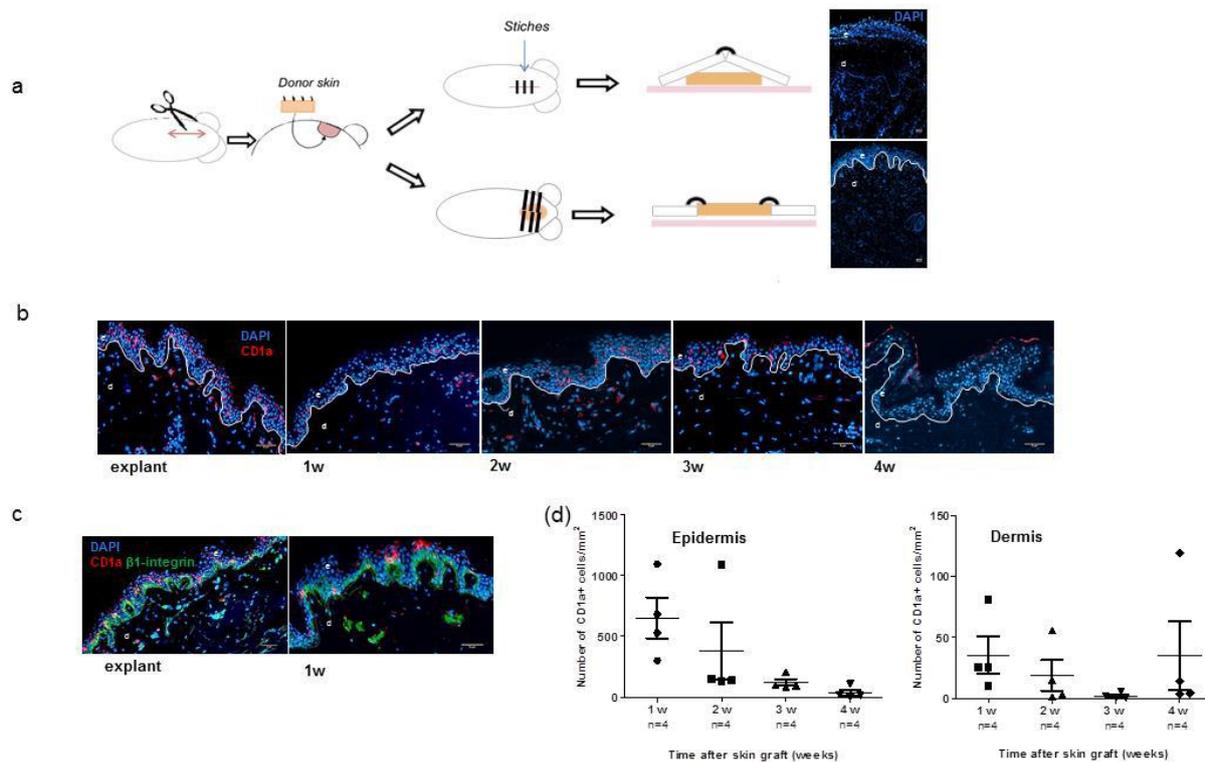
Chaque point du graphique correspond au pourcentage de réussite de la greffe pour un groupe de souris (3 à 10) greffé avec un même échantillon de peau. Les échecs sont dus soit au décès de la souris soit à la nécrose partielle ou totale du greffon. Les greffes réussies sont maintenues jusqu'à leur utilisation à 1 semaine post-greffe et plus.

### **3.4. Contrôle de la greffe et du modèle**

Le principal critère d'évaluation était la prise de la greffe à une semaine. En plus de l'évaluation clinique, une analyse microscopique par immunofluorescence de l'architecture et de la répartition cellulaire était réalisée. Les souris étaient sacrifiées en fin de procédure afin de réaliser l'analyse immunologique.

3 semaines après la greffe de peau, nous constatons que l'architecture de la peau humaine était conservée. Comme dans les modèles de Hemmerling en 2011, et Racki en 2010, nous avons constaté une diminution de la densité en kératinocytes et fibroblastes par rapport aux explants témoins. Par ailleurs, un développement des structures vasculaires d'origine humaine et murine était observé, mais sans vascularisation lymphatique d'origine murine au sein de la greffe contrairement aux modèles précédents.

Pour ce qui est des cellules immunitaires, nous retrouvons une densité quasi semblable à celle des explants témoins pour ce qui concerne les APC résidentes (Langerhans CD1a<sup>+</sup> et LT), les Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.



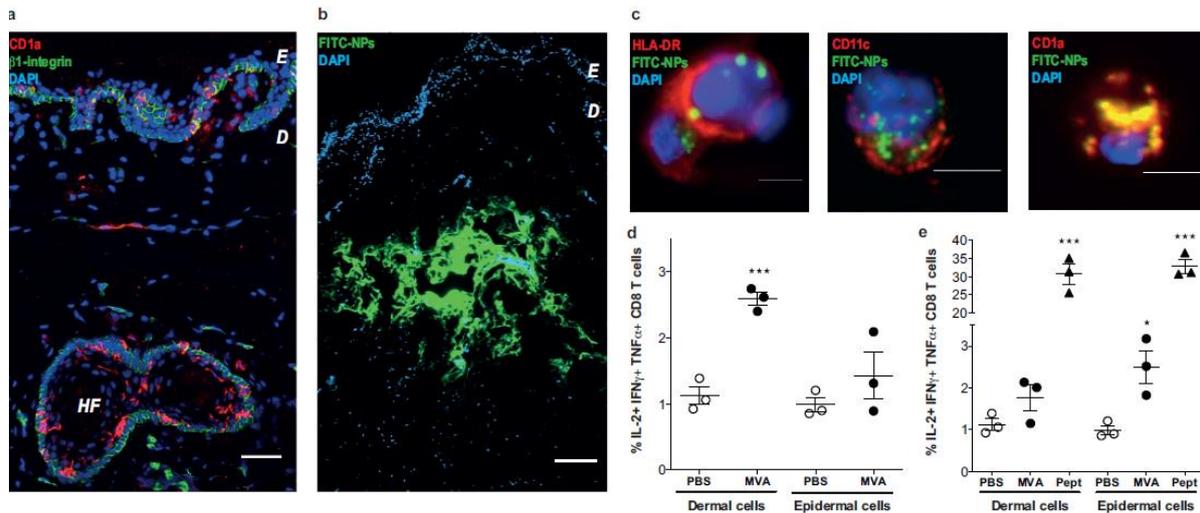
**Figure 18 : Architecture et maintien des APC dans la peau humaine greffée et dans l'explant témoin.**

Schéma représentant 2 techniques différentes de greffe de peau humaine (a). Pour la première, la peau humaine est entièrement recouverte par de la peau de souris, après une semaine l'épiderme est lysé. Pour la deuxième, la greffe de peau est placée bords à bords avec la peau de la souris et fixée par des points de souris. L'architecture cutanée est préservée à 1 et 3 semaines post greffe. Magnification x4, e : épiderme d : derme. Image d'une coupe de peau humaine réalisée par cryosection de 5µm à 1, 2, 3 et 4 semaines après la greffe. (b), Marquage au DAPI (bleu) et anti- CD1a humain (rouge), et anti β1 intégrin (vert) humain (c) pour les explants 1 semaine après la greffe. Magnification x10, e : épiderme, d : derme. (d): Nombre de cellules CD1a+ dans le greffon humain après (w) 1, 2, 3 et 4 semaines après la greffe (n=4 dans chaque groupe).

L'étape suivante a consisté à s'assurer du maintien de la fonctionnalité des APC au sein de nos greffes. Ainsi 4 heures après immunisation intradermique de la peau greffée, nous avons constaté que la prise en charge par différentes APC de nanoparticules-FITC (40 nm) par différentes DC (CD11c<sup>+</sup>, CD1a<sup>+</sup> et HLA-DR<sup>+</sup>) était possible.

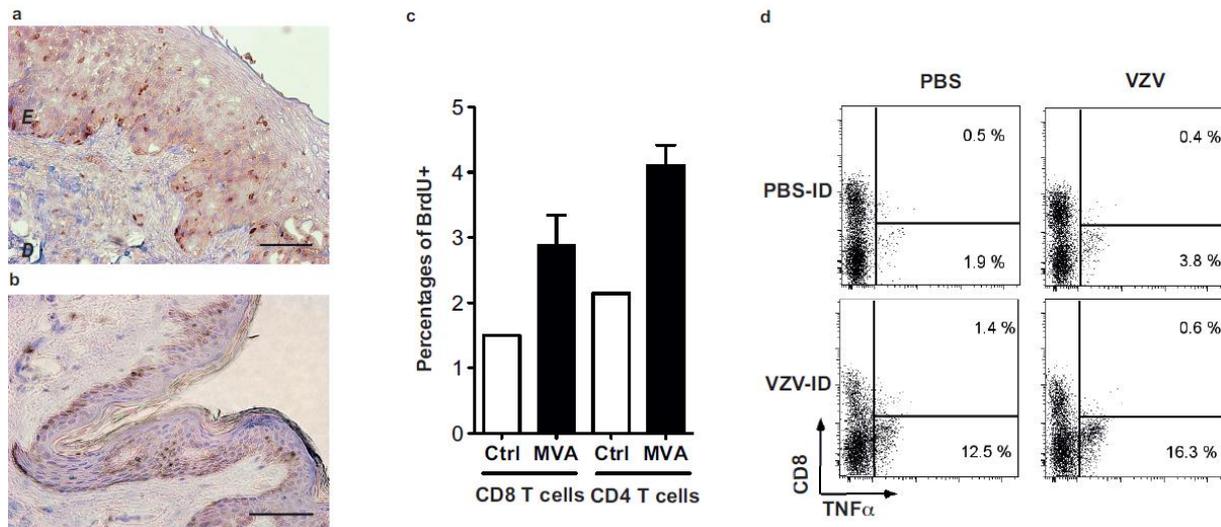
Ces mêmes APC capables de présenter l'Ag sont aussi capables d'induire une réponse spécifique par les LT CD8<sup>+</sup>. Pour prouver cela, nous avons utilisé un virus recombinant MVA codant pour la protéine Gag du VIH (MVA- HIVgag) que nous avons injecté en intradermique. Une fois l'injection faite, nous avons extrait les cellules dermiques et épidermiques des peaux humaines greffées, et les avons co-cultivés avec des cellules T CD8<sup>+</sup> HIVgag spécifiques (aa 75- 83, SL9 peptide). La sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$ , et d'IL-2, étaient ensuite mesurées en cytométrie de flux. Trois semaines après la greffe nous constatons que les APC de la peau greffée étaient toujours présentes et fonctionnelles pour la présentation antigénique et pour l'induction d'une réponse T spécifique du MVA.

Nous avons ensuite voulu nous assurer de la persistance de cellules T. Par la suite, nous avons réalisé des injections intradermiques avec le vaccin vivant atténué de la varicelle et le MVA. 48h après l'injection de MVA dans la peau humaine, nous constatons une multiplication par 2 de la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (évaluée par incorporation de BrdU *in vivo*). De même, l'injection intradermique du vaccin vivant atténué varicelle induit une sécrétion rapide et importante d'IFN  $\gamma$  et de TNF $\alpha$  par les LT CD4<sup>+</sup>.



**Figure 19 : APC et différentes voies de réponse immunitaire à un vaccin dans la peau humaine greffée**

**a.** Maintenance of skin structure and CD1a+ LCs and dermal DCs 3 weeks after engraftment onto NSG mice: 5  $\mu$ m skin cryosections were immunostained with blue DAPI, anti-human-CD1a (in red) and anti-human- $\beta$ 1-integrin (in green) that lined the epidermis (E), hair follicles (HF) and dermis (D). Scale bar = 50  $\mu$ m. **b.** Accumulation of FITC-NPs (in green) into dermis close to surrounding dermal cells, 4h after ID injection ( $10^{10}$  FITC-NPs). Scale bar = 100  $\mu$ m. **c.** FITC-NPs (green) are inside HLA-DR+ antigen presenting cells, CD11c+ and CD1a+ dermal DCs, 4h after ID administration: cells were extracted from skin graft by enzymatic and mechanical dissociation, coated on poly-L-lysine cover-slides and immunostained with anti-human-HLA-DR, CD11c or CD1a (in red) and blue DAPI. Scale bar = 5  $\mu$ m. **d.** Dermal and epidermal cell suspensions were recovered from HLA-A02 engrafted skin 4h after MVA-HIVgag (MVA,  $1 \cdot 10^7$  pfu) or PBS ID injection (PBS). **e.** Dermal and epidermal cell suspensions from non-immunized graft were incubated for 4h with MVA-HIVgag (MVA, 1 pfu/cell), HIV-gag peptide (Pept, HIV gag SL9 peptide: SLYNTVATL, aa 75-83, 1  $\mu$ g/mL) as positive control or not stimulated (PBS). SL9 clone 2, an HIV-specific CD8+ cytotoxic clone, was used to evaluate HLA class I antigen presentation efficacy after overnight co-culture with dermal or epidermal cells (ratio 1/1), IL-2, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  production by CD8+ T cells was monitored by intracellular staining and flow cytometry (n=3 mice for each condition, bar represent mean +/- SEM, \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  in non parametric t-test compared to PBS negative control).



**Figure 20 : Réponse immunitaire des LT humains de la peau greffée en présence d'antigènes**

**a, b.** Maintenance of T cells within the epidermis (E) and dermis (D) 3 weeks after engraftment onto NSG mice: 5  $\mu$ m skin cryosections of engrafted (a) or non-engrafted (b) human skin were immunostained with anti-human-CD3 (clone SP7 thermo Scientific) and with Ultra View universal DAB chromogen (Ventana Medical System). Scale bar = 50  $\mu$ m **c.** Percentages of proliferating BrdU+ CD8 and CD4 T cells induced by intradermal injection of MVA in human skin graft, compared to non-treated control (Ctrl). Three weeks post-graft,  $1 \cdot 10^7$  pfu of MVA (or PBS as control) were injected intradermally and NSG mice were injected intra-peritoneally 3 times 12 hours apart with 1 mg of BrdU. The following day, human skin cells suspension were recovered for flow cytometry staining, the percentages of BrdU+ within the live CD3+ CD8+ and CD4+ cell subsets in MVA ID treated skin graft (n=3) and untreated skin (Ctrl) (bars represent mean +/- SEM; one experiment representative of 2). **d.** TNF $\alpha$  production by skin graft T cell in 4h after VZV intradermal vaccination (VZV-ID): 135 pfu/50  $\mu$ l of Varicella live-attenuated vaccine (Varivax® Sanofi Pasteur MSD) or saline buffer (PBS-ID), was injected into the skin graft by ID route. Intracellular cytokine staining was performed on skin cell suspensions, after overnight in vitro stimulation with VZV (13.5 pfu) or not (PBS). Dot plots show the percentages of TNF $\alpha$ + and CD8+ cells within the live CD3+ cell subset, for one representative experiment of 3.

**Ainsi nous avons standardisé et fiabilisé notre technique de réalisation de souris humanisée par greffe de peau.**

Protocole de standardisation de la technique de greffe disponible en ANNEXE 3



## **TROISIEME PARTIE**

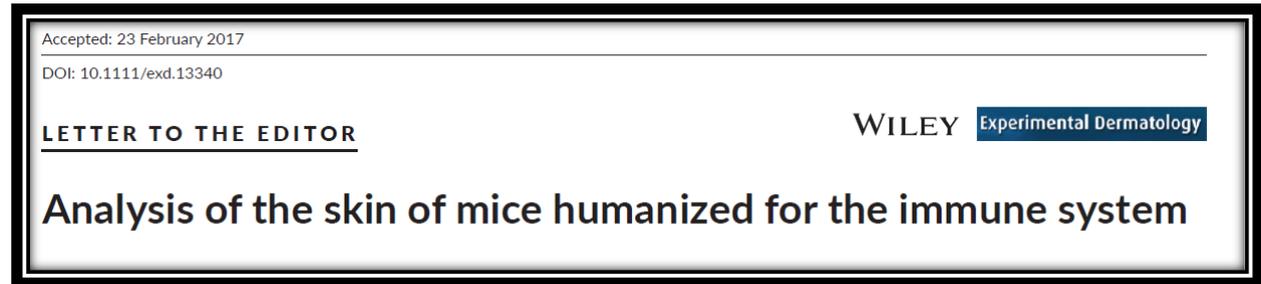
### ***Mise au point du modèle de souris humanisé par injection de progéniteurs hématopoïétiques***



## TROISIEME PARTIE : modèle de souris humanisé par injection de progéniteurs hématopoïétiques

Le modèle de souris humanisé par injection de progéniteurs hématopoïétiques a fait l'objet d'un article scientifique publié. La publication complète est disponible en ANNEXE 1 de ce document.

*Analysis of the skin of mice humanized for the immune system*



Mireille Centlivre<sup>1,2</sup>

Maxime Petit<sup>1,2</sup>

Andrew J. Hutton<sup>1,2</sup>

Mélody Dufossée<sup>1,2</sup>

David Boccara<sup>1,2,3</sup>

Maurice Mimoun<sup>3</sup>

Angèle Soria<sup>1,2,4</sup>

Béhazine Combadière<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>UMR\_S CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses- Paris (CIMI-Paris), Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, Paris, France

<sup>2</sup>INSERM U1135, CIMI-Paris, Paris, France

<sup>3</sup>Service de Chirurgie Plastique, Reconstructrice, Esthétique, Centre de Brûlées, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

<sup>4</sup>Service de Dermatologie et Allergologie, Hôpital Tenon, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

## 1. CONTEXTE

Le modèle de souris humanisée par greffe de peau humaine est à présent un modèle fiable et reproductible. Néanmoins, il reste fastidieux à réaliser, et présente certaines limites, telles que la perte d'APCs au-delà de plusieurs semaines.

La difficulté d'obtention des explants, l'aspect chronophage et coûteux des manipulations nous a poussé à envisager un nouveau modèle.

## 2. OBJECTIF

Ainsi nous avons tenté de mettre au point un nouveau modèle murin où l'immunité cutanée humaine se ferait par colonisation de la peau de souris et non pas par greffe.

Dans ce modèle, les souris bénéficiaient d'injections intra-hépatiques de progéniteurs hématopoïétiques humains HLA-A2+CD34+. Une fois ces injections réalisées, il a fallu s'assurer que les tests vaccinaux permettraient d'obtenir une réponse immunitaire. Ceci n'étant pas le cas, il a fallu injecter aux souris des APCs provenant du même sang que les progéniteurs hématopoïétiques, qui étaient au préalable cultivé in vitro durant 3 jours en présence de hGM-CSF et d'IL-4.

Comme précédemment, nous avons par la suite pour objectif de valider le modèle en s'assurant que les populations cellulaires en APCs et lymphocytes de nos souris humanisées étaient équivalentes à celle de nos explants cutanés témoin.

## 3. MATERIELS ET METHODES

Ce sont les mêmes souris immunodéprimées que pour les greffes de peau qui ont utilisées ici. « L'humanisation » était réalisée par une injection intra-hépatique de  $0.5 \times 10^5$ - $1.5 \times 10^5$  HLA-A2+CD34+ de cellules progéniteurs hématopoïétiques humaines (hHPC) à de jeunes souris irradiées NSG-HLA-A2 de moins de 5 jours.

Dans un premier temps nous avons voulu vérifier la repopulation en cellules immunitaires humaines (hCD45+) de différents organes tels que le foie, la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques et la peau. Par la suite nous avons contrôlé la capacité de nos souris humanisées à produire une réponse immunitaire en cas d'inoculation d'un antigène (vaccin, infection...) par voie transcutanée.

## 4. RESULTATS

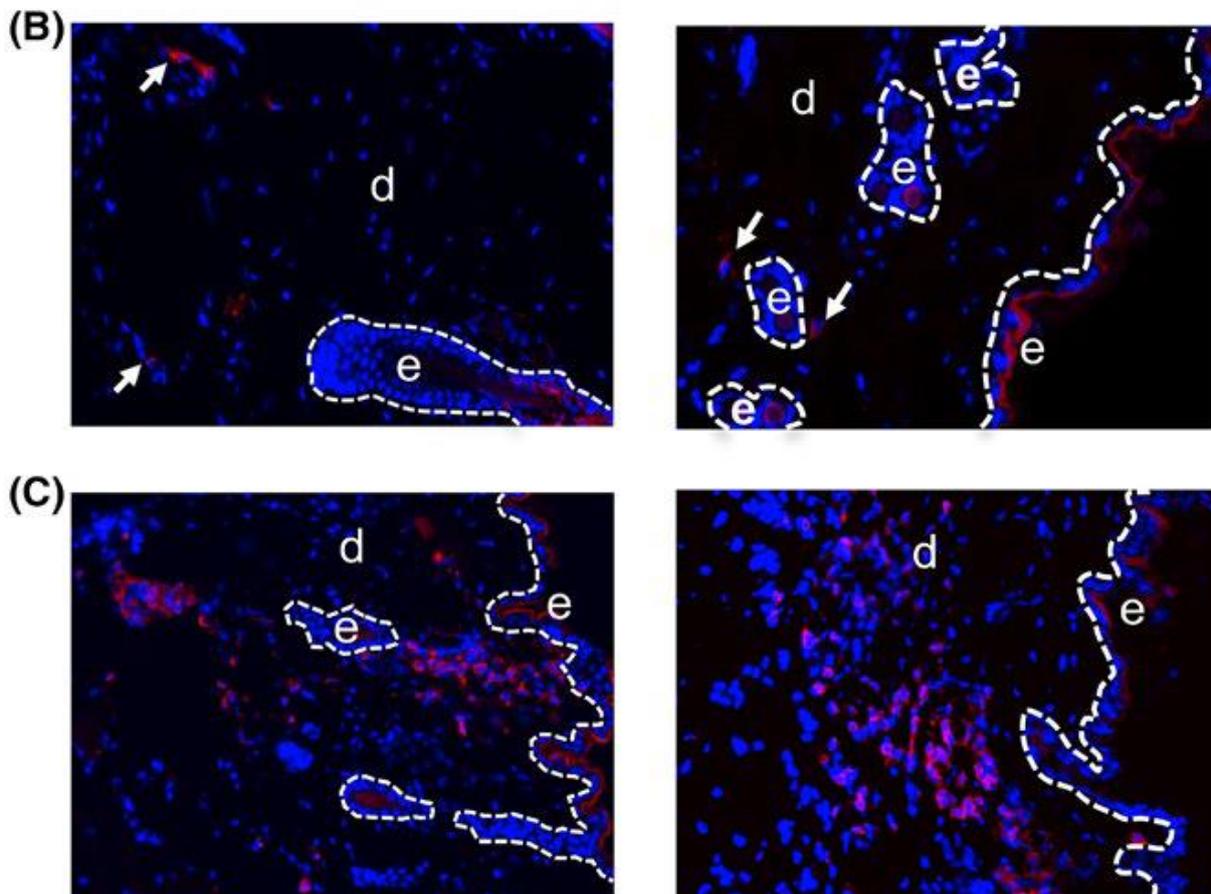
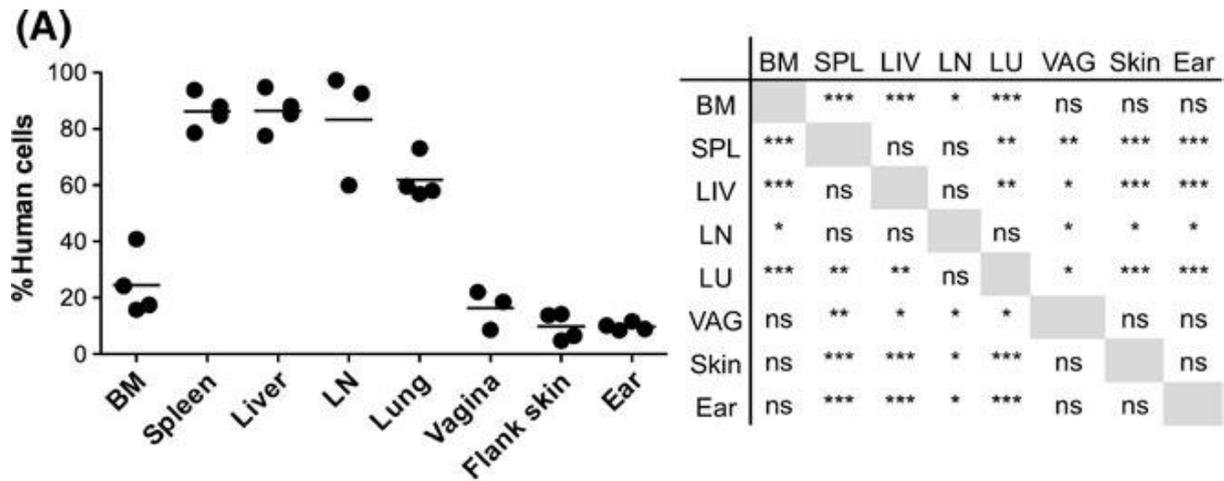
Après analyse par cytométrie de flux, nous avons constaté une bonne colonisation en cellules immunitaires humaines (hCD45<sup>+</sup>) de plusieurs organes tels que le thymus, la rate, et les ganglions lymphatiques. Au niveau cutané, cette colonisation était bien plus faible. Pratiquement absente au niveau de l'épiderme, elle était un peu plus conséquente au niveau du derme.

Contrairement aux souris humanisées greffées, nous avons constaté ici que la colonisation s'amplifiait avec le temps et devenait plus conséquente chez des souris âgées de 23 à 26 semaines par rapport à des souris plus jeunes (12-13 semaines).

Une autre différence notable a été retrouvée chez ces souris « injectées » par rapport aux souris « greffées », c'est la forte prédominance en lymphocytes T par rapport aux APC, dont 2/3 étaient des LT CD4<sup>+</sup> et 1/3 LT CD8<sup>+</sup>. Comme dans les explants humains témoins, et dans les ganglions lymphatiques des souris humanisées, il s'agissait de lymphocytes dont le phénotype mémoire était prédominant.

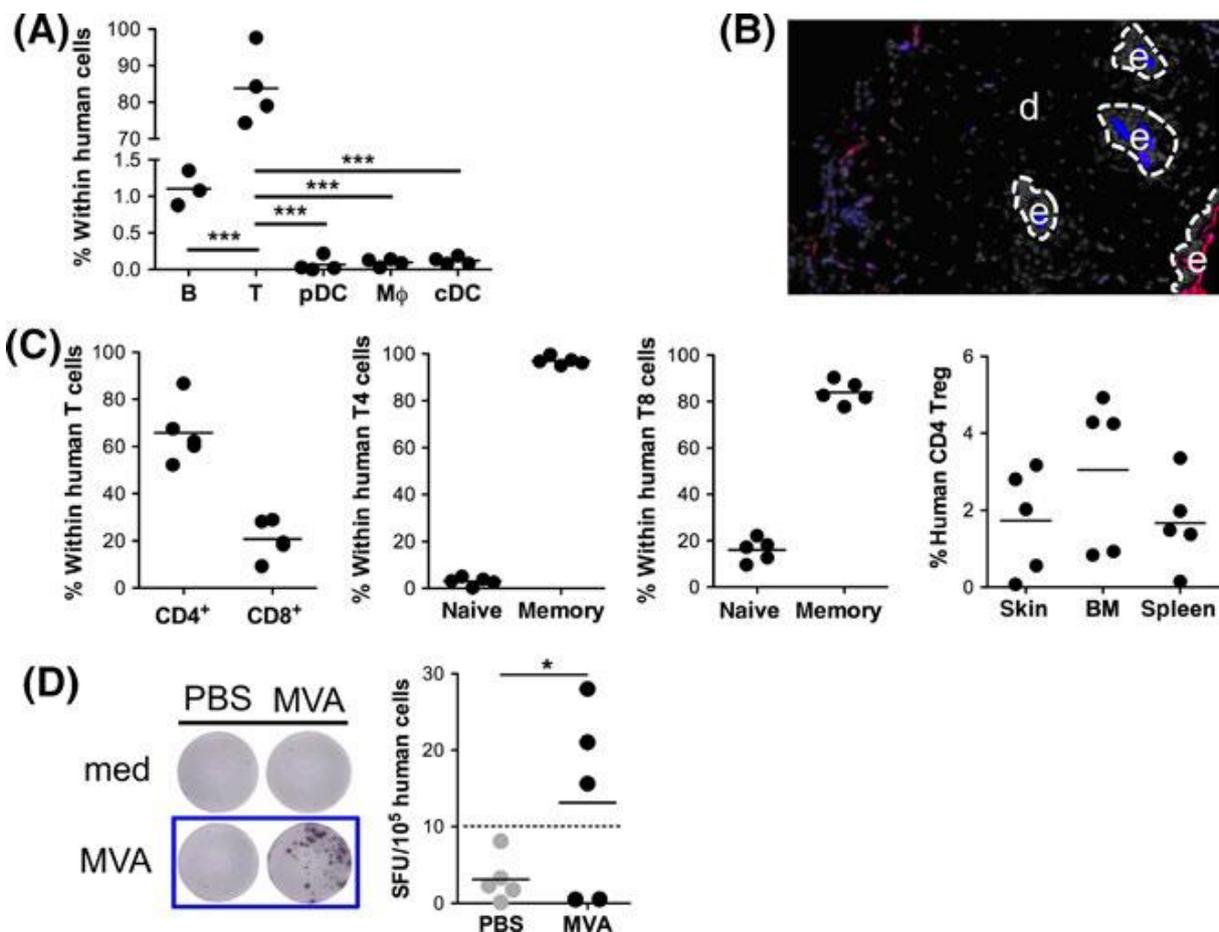
Afin d'obtenir une réponse immunitaire aux tests vaccinaux, il a fallu injecter aux souris des APC provenant du même sang que les progéniteurs hématopoïétiques. Ils étaient au préalable cultivés in vitro durant 3 jours en présence de hGM-CSF et d'IL-4.

Ainsi une réponse immunitaire était observée chez nos souris humanisées 7 jours après



**Figure 21 : Colonisation de la peau des souris humanisées par des cellules humaines.**

The frequency of human CD45<sup>+</sup> cells was determined for NSG-HLA-A2-HIS mice ( $n=4$ ) in various organs by flow cytometry. Each symbol corresponds to an individual animal. BM: bone marrow, LN: lymph node. The paired  $t$  test analysis is presented in the table (ns: not statistically significant,  $* < .05$ ,  $** < .01$ ,  $*** < .001$ ). (B) Representative 5  $\mu$ m flank skin cryosections labeled with DAPI (blue) and anti-human CD45 (red) of 2 HLA-A2Tg- NSG- HIS mice of 14 weeks old and (C) 2 HLA-A2Tg- NSG- HIS mice of 26 weeks old. Magnification  $\times 10$ . The arrows indicate the rare human CD45<sup>+</sup> cells present in the skin of 14-week-old animals. e: epidermis, d: dermis



**Figure 22 : Cellules humaines présentes dans la peau des souris humanisées et voie de vaccination intradermique**

(A) The frequency of different human cell subsets—B cells (CD19+), T cells (CD3+), pDC (BDCA2+HLADR+), monocytes (Mφ, CD14+CD11c+HLA-DR+), conventional DC (cDC, CD11c+CD14-HLADR+)—in the skin of NSG-HLA- A2- HIS mice (26-30 weeks old, n=4) was determined by flow cytometry. Each symbol corresponds to an individual animal. \*\*\* $P < .001$  (paired  $t$  test). (B) Representative 5 μm flank skin cryosection of NSG-HLA- A2- HIS mouse of 26 weeks old labeled with DAPI (white), anti-human CD3 (blue) and anti-human HLA-DR (red). Magnification  $\times 20$ . e: epidermis, d: dermis. (C) Analysis of the human CD3+ cells in the skin of NSG HLA- A2- HIS mice (n=5) by flow cytometry. The expression of CD45RA defined the naïve phenotype of the human T cells. (D) IFN- $\gamma$  ELISPOT analysis of MVA-specific human T cells responses in the spleen of NSG-HLA- A2- HIS mice (32 weeks old) on day 7 after intra-dermal injection of  $5 \times 10^5$  autologous human monocyte-derived DC loaded with MVA (1 pfu/ cell) or PBS in the flank of the animals. Total splenocytes of MVA-or PBS-immunized NSG-HIS mice were incubated with medium (med) or MVA for 40 hours and analysed by ELISPOT assay. The graph represents the number of spot-forming unit (SFU) counted in the MVA stimulated well minus the ones counted in the medium stimulated well and according to the frequency of human CD45+ cells in the spleen of each vaccinated animals. \* $P = .019$  (chi-square test)



## **QUATRIEME PARTIE**

### ***Etude des cellules de Langerhans sur explants cutanés humains en fonction de l'âge du patient et du site donneur***



### 1. CONTEXTE

Les explants cutanés sont ainsi utilisés pour donner le jour à nos souris humanisées. Si le protocole est à ce jour bien standardisé et facilement reproductible, il demeure chronophage et coûteux tant d'un point de vue humain que financier. Ainsi, les explants cutanés peuvent être utilisés seuls lors de certaines études concernant les différentes populations cellulaires. Nous savons que la très grande majorité de la population cellulaire est préservée dans les 4 à 6 heures après la dévascularisation.

### 2. OBJECTIF

Dans la suite de nos travaux nous avons cherché à savoir si tous les explants étaient exploitables. En effet, ces explants obtenus lors d'interventions de chirurgie plastique peuvent provenir de patients âgés de 18 à 75 ans, et de localisations aussi variées que différentes, seins, abdomen, membres, face... ; Nous avons voulu connaître les variations du nombre des APC au sein de ces explants en fonction du site de prélèvement. Que ce soit les cellules dendritiques pour le derme, ou les cellules de Langerhans pour l'épiderme. Nous avons ainsi réalisé une analyse comparative afin d'étudier le nombre de cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et cellules de Langerhans) dans les différents types d'explants.

### 3. MATERIELS ET METHODES

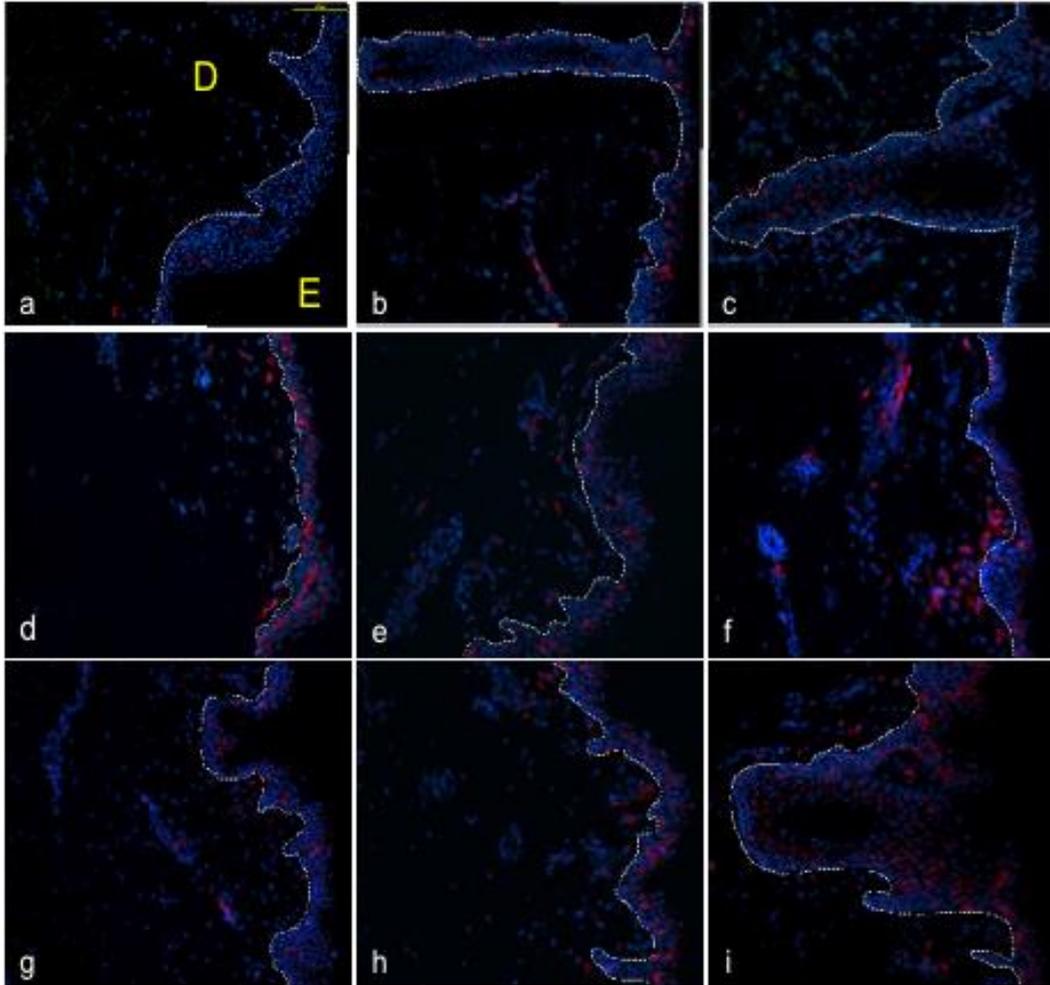
Comme nous l'avons expliqué précédemment, les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques CD1a jouent un rôle essentiel dans l'immunité cutané. Elles sont les principales cibles de la vaccination transcutanée et intra dermique. Il est donc important de savoir si l'âge et la localisation des explants sont des facteurs influençant la présence de ces cellules dans le derme ou l'épiderme.

Nous avons réalisé une étude histologique après immunomarquage sur des explants cutanés prélevés au niveau de l'abdomen, de la face et des seins chez 21 sujets sains âgés de 21 à 68 ans.

Un immunomarquage de la molécule CD1a a été réalisé (IgG1 de souris anti CD1a et IgG de chèvres anti IgG1 de souris couple au fluorochrome Alexa 594 rouge) et une coloration des noyaux cellulaires par le DAPI (bleu). Par immunofluorescence, nous pouvons ainsi observer les cellules CD1a positives (rouges) : cellules de Langerhans dans l'épiderme et cellules dendritiques CD1a+ dermiques (figure 8).

Dans un premier temps, nous avons, pour les 21 sujets, réalisé un comptage des cellules CD1a + par mm<sup>2</sup> d'épiderme ou de derme après analyse de 10 photos sur 5 coupes par explant (utilisation du logiciel *ImageJ*).

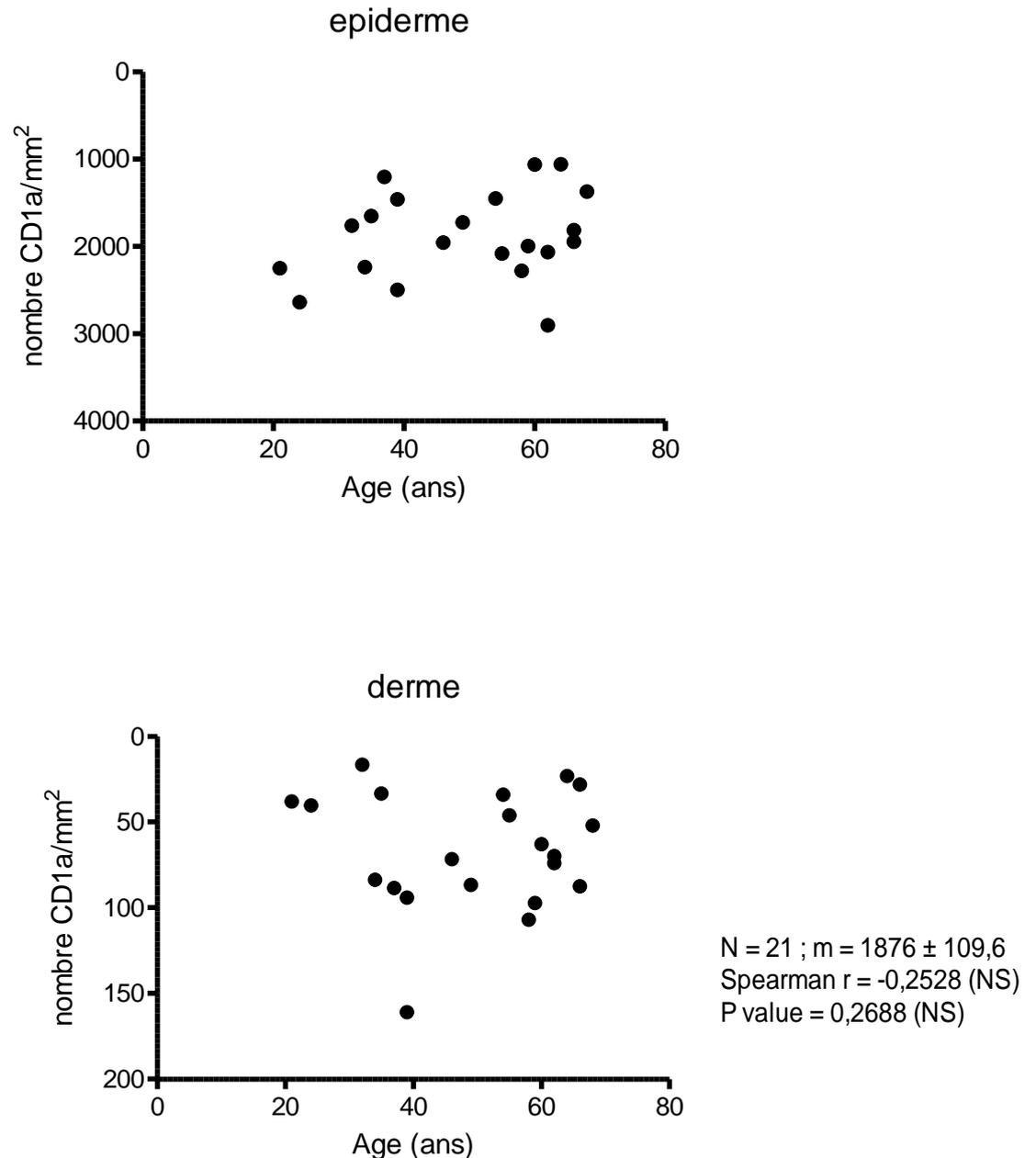
Nous avons ainsi pu analyser si l'âge du donneur avait un impact sur la fréquence de cellules de Langerhans et DC CD1a du derme. La figure 9 présente les résultats obtenus. Une analyse statistique est ensuite réalisée, de type corrélation de Spearman ( $r < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ) afin de conclure à une différence statistiquement significative ou non entre le nombre de cellules en fonction de l'âge. Nos résultats montrent que dans ce groupe de 21 donneurs, âgés de 21 à 68ans, l'âge n'affecte pas de façon significative la fréquence des LC dans l'épiderme ni celle des DC CD1a+ dermiques.



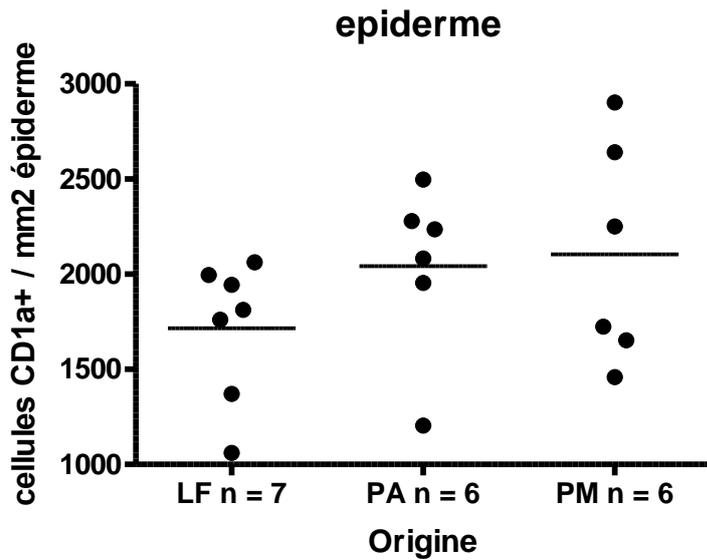
**Figure 23: Distribution des cellules CD1a+ chez des volontaires sains âgés de 21 à 68 ans (Objectif x10. Échelle : barre = 100µm)**

L'épiderme (E) et le derme (D) d'explants de peau humaine issus de chirurgies faciales (a,b,c), mammaires (d,e,f 39 ans, h : 46 ans, i : 58 ans, b : 59 ans, f : 62 ans et c : 68 ans). Analyse de l'expression de CD1a sur coupes de peau congelées (5µm d'épaisseur) après immunomarquage (IgG1 de souris anti CD1a humain et IgG de chèvre anti IgG1 de souris couplé au fluorochrome Alexa 594 rouge) et coloration DAPI (noyaux bleus).

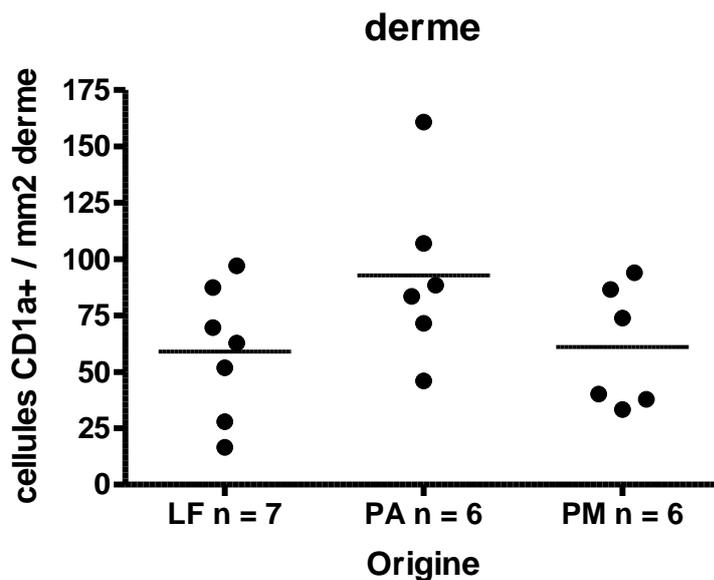
À partir des photos d'immunomarquages prises à l'objectif x10 (10 photos sur 5 coupes par explant). Chaque point représente le nombre moyen de CD1a par mm<sup>2</sup> d'épiderme ou de derme pour chaque donneur. L'analyse statistique a été réalisée de façon séparée pour l'épiderme et le derme sur 21 donneurs en utilisant le test d'analyse de corrélation de Spearman ( $r < 0,05$ ) et détermination de la valeur P ( $P < 0,05$ ) (NS = non significatif).



**Figure 24:** Numération des cellules CD1a dans l'épiderme et dans le derme d'explants de peaux humaines en fonction de l'âge des donneurs.



LF :  $m = 1716 \pm 139,0$  PA :  $m = 2042 \pm 183,6$  PM :  $m = 2014 \pm 238,7$   
 LF VS PA :  $Pvalue = 0,07$  (NS) LF VS PM :  $Pvalue = 0,44$  (NS)  
 PA VS PM :  $Pvalue = 0,93$  (NS)



LF :  $m = 59 \pm 11,1$  PA :  $m = 93 \pm 15,9$  PM :  $m = 61 \pm 11$  ; LF VS PA :  $Pvalue = 0,14$  (NS) ; LF VS PM :  $Pvalue = 0,94$  (NS) ; PA VS PM :  $Pvalue = 0,18$  (NS)

**Figure 25 : Numération des cellules CD1a dans l'épiderme et dans le derme d'explants de peaux humaines en fonction des différents sites donneurs.**

Après comptage cellulaire CD1a+ du derme et de l'épiderme, nous n'avons pas constaté de différence statistiquement significative du nombre d'APC entre les différentes localisations ni entre les donneurs d'âge différent.



## DISCUSSION

---

Le choix du type de souris immunodéficiente et l'épaisseur de la greffe de peau sont des éléments essentiels à la mise au point de notre modèle de souris humanisées.

Nous avons choisi les souris NOD.Cg-PrkdcscidII2rgtm1Wjl/SzJ (The Jackson Laboratory) pour l'importance de leur immunodéfiance. Porteuses de nombreuses mutations, elles présentent une défiance en lymphocytes B et T et cellules NK à activité cytotoxique. Elles présentent aussi des anomalies de structure au niveau du thymus et de la rate et une absence de ganglions périphériques.

Cela fait de la souris NSG un modèle de souris immunodéficientes de choix dans ce cas précis de xénotransplantation de peau humaine. Un tournant important dans la transformation des souris immunodéficientes a été réalisé en 2010 par Racki et son équipe. Ils avaient constaté un infiltrat de monocytes Gr1+ dans la peau greffée (derme et épiderme) entre le 10<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour post greffe. Racki et al (2010), ont ainsi décidé d'injecter à leurs souris des anticorps anti-Gr1 monoclonaux afin de prévenir toute destruction ou désorganisation épidermiques dues aux monocytes. Ce progrès majeur a permis le développement et la remise en avant de ce type de modèle d'étude.

Pour ce qui est de l'épaisseur de la peau greffée, c'est le taux de réussite technique de notre modèle de souris humanisées, proche de celui de Hemmerling et al. (2011) qui nous a permis de conclure à un bon résultat. En effet, Hemmerling et al. présentaient un taux de réussite de 90% pour 230 souris greffées à partir de 14 donneurs différents. L'épaisseur du derme préservé y joue un rôle essentiel. Plus celui-ci est fin plus la revascularisation de la greffe par la profondeur sera rapide et efficace. Néanmoins il est essentiel de préserver un derme relativement épais pour que le contingent de cellules immunitaire soit suffisant pour assurer une réponse immunitaire efficace. Les APC étant pour la plupart situés dans l'épiderme (LC) et le derme papillaire (DC), il faut que les deux soient préservés.

Nous avons ainsi travaillé sur cet aspect de la greffe de peau, testant différentes épaisseurs. Le compromis idéal entre la finesse (permettant une prise plus fiable) et l'épaisseur (permettant une conservation d'APC plus importante) se situe ainsi entre 2 et 3 mm. Ainsi c'est principalement l'étape de préparation de la greffe (dégraissage) qui est essentiel pour permettre la bonne prise de greffe et la préservation d'une quantité d'APC suffisante.

Une, deux et trois semaines après la réalisation de la greffe, nous avons constaté en histologie sur des coupes de greffes (épiderme et derme papillaire) congelées que la structure et l'architecture étaient préservées et très proches des explants témoins. De même, 1, 2 et 3 semaines après la greffe, le nombre d'APC et leur fonctionnalité étaient les mêmes que ceux des explants contrôle. Ce n'est qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine que nous avons constaté une désorganisation architecturale et une diminution du nombre d'APC. Progressivement, le nombre d'APC décroît, avec un ratio LC/kératinocytes pouvant chuter jusqu'à 14% à la fin de la 4<sup>ème</sup> semaine.

Néanmoins, Hemmerling et al. (2011) ont constaté une recolonisation en APC de la greffe entre la 6<sup>ème</sup> et la 9<sup>ème</sup> semaine post greffe, malgré l'absence de système hématopoïétique humain, rendant possible l'utilisation des souris humanisées tardivement après la greffe (9 semaines). L'utilisation tardive et prolongée de ces souris humanisées peut ainsi trouver son intérêt dans les tests vaccinaux, allergiques, dermatologiques...

S'il présente certains avantages, ce modèle a pour limites la perte d'APC au-delà d'un certain temps, et la lourdeur des manipulations.

Ainsi nous avons envisagé un nouveau modèle, dans lequel « l'humanisation » de nos jeunes souris irradiées NSG-HLA-A2 ne se faisait pas par de la peau humaine greffée mais par une injection intra-hépatique de cellules progéniteurs hématopoïétiques humaines (hHPC) HLA-A2+CD34+.

Il a fallu par la suite évaluer la colonisation tissulaire des différents organes en cellules hématopoïétiques humaines (hCD45+). A l'histologie, nous avons pu constater que leur nombre était rapidement important au niveau de la rate, du foie et des tissus lymphoïdes, et bien plus modeste dans la peau des oreilles et des flancs. Dans peau les cellules hématopoïétiques humaines (hCD45+) étaient principalement retrouvées au niveau du derme.

Quelques semaines plus tard, la même peau des souris était colonisée de manière bien plus importante en cellules hCD45+. Nous avons donc quantifié la colonisation à 12 semaines et à 26 semaines post injection, et avons constaté qu'elle s'amplifiait au fil des semaines. Malheureusement la concentration en APC était relativement faible. Ce sont principalement des lymphocytes T mémoires qui étaient retrouvés dont 2/3 étaient CD4+ et 1/3 CD8+. De ce fait, aucune réponse immunitaire de nos souris NSG-HLA-A2-HIS à l'injection intra dermique de vaccin MVA (Modified Vaccinia Ankara, 1 pfu/cell) n'a pu être possible. Afin d'obtenir une réponse immunitaire humaine lymphocytaire T, il a fallu injecter aux souris des APC provenant

du même sang que les progéniteurs hématopoïétiques. Ils étaient au préalable cultivé in vitro durant 3 jours en présence de hGM-CSF et d'IL-4. Cette réponse a pu être observée 7 jours après la vaccination.

Contrairement aux souris humanisées par greffe de peau humaine, les souris humanisées par injection de cellules progéniteurs hématopoïétiques humaines (hHPC) HLA-A2+CD34+ ont ainsi pour avantage de pouvoir être exploitées bien plus longtemps.

Leur mise au point nécessite également de lourdes et longues manipulations techniques, mais ce dernier modèle a pour avantage de pouvoir être conservé plusieurs semaines voire plusieurs mois. Il pourra être utilisé dans des études prospectives d'analyse vaccinale ou d'immunothérapie.

Si ces 2 modèles ont pour avantage de permettre l'étude des réactions immunitaires de la peau in vivo de manière prolongée, certaines études ne nécessitent pas un délai important. Ainsi pour s'éviter de longues et coûteuses manipulations, il est parfois possible d'utiliser les explants frais de peau humaine issus de chirurgie plastique sachant que la très grande majorité de la population cellulaire est préservée dans les 4 à 6 heures après la dévascularisation. Ces explants étant issus de patients d'âge différent et de sites différents nous avons voulu vérifier si tous contenaient le même nombre d'APC, ou s'il fallait exclure certaines localisations ou patients du fait de la pauvreté en LC et DC.

Nous avons ainsi réalisé une étude comparative histologique après immunomarquage de la molécule CD1a sur des explants provenant de 21 patients. Après comptage cellulaire CD1a+ du derme et de l'épiderme, nous n'avons pas constaté de différence statistiquement significative du nombre d'APC entre les différentes localisations ni entre les donneurs d'âge différent.

Nous pourrions donc penser que tous les explants peuvent servir de manière identique à l'étude des mécanismes immunitaires cutanée.

Néanmoins en 2017, Zegarska et al. ont observé des changements morphologiques des LC avec le temps. La longueur des dendrites, et la diminution de la taille des corpuscules seraient à l'origine d'une perte relative des fonctions des LC. En 2012, Xu et al. avaient déjà émis l'hypothèse selon laquelle les LC avaient une probable perte de fonction liée au vieillissement. Il conviendrait donc d'approfondir notre étude sur la fonctionnalité des APC selon le site et l'âge du donneur.

De plus, il faut tenir compte du fait que les sites prélevés, sont des zones peu exposées aux frottements et aux traumatismes. Ainsi en cas de recueil de peau provenant des plantes des pieds ou des paumes de la main, il est possible que l'architecture et la structure de la peau y soient altérées modifiant ainsi le nombre et l'action des APC.

Il serait également intéressant de chercher à mettre en évidence l'existence de facteurs externes à l'origine d'une perte de fonctionnalité des APC, ou des mécanismes d'action des facteurs connus comme étant responsable d'un déficit fonctionnel des LC (Gilchrest et al.).

## CONCLUSION

---

**En conclusion**, au cours de mon doctorat, j'ai pu mettre au point et travailler sur différents modèles d'étude des mécanismes d'étude de l'immunité cutanée. Les explants cutanés, les souris humanisées par greffe de peau ou cellules hématopoïétiques répondent chacun à des problématiques et des applications différentes.

Dans un premier temps, il a fallu organiser la récupération des explants cutanés et coordonner leur acheminement au laboratoire. Ainsi, un important travail préalable à celui du laboratoire a dû être effectué : recueil du consentement auprès du patient, traitement et dégraissage primaire des explants, et acheminement.

Deux modèles d'étude ont ainsi été mis au point et ont prouvé toute leur fiabilité et leur potentiel. Par la suite, il serait intéressant de comparer la concentration et la fonctionnalité des APC de l'un par rapport à l'autre.

Ils pourront à l'avenir être utilisés dans le domaine de la recherche pour l'étude des différents mécanismes immunitaires, le développement de nouvelles stratégies vaccinales, de nouvelles thérapies antivirales, antibactériennes, mais aussi dans le domaine de la cosmétologie.

Néanmoins, et malgré la standardisation des protocoles ils demeurent fastidieux, coûteux et présentent chacun leurs limites :

- L'absence d'APC en quantité suffisante dans la peau des souris humanisées par l'injection de progéniteurs hématopoïétiques.
- La présence limitée dans le temps d'APC dans la peau des souris humanisées par greffe de peau humaine.

Ainsi, et lorsque cela suffit, il est plus simple d'utiliser de simples explants cutanés.

Avant de pouvoir conclure qu'il était possible d'utiliser ces explants cutanés de manière identique quel que soit l'âge du donneur et le site de prélèvement (abdomen, seins...), il faudra s'assurer qu'en plus d'un nombre d'APC suffisant dans la peau, il faut que ces derniers restent fonctionnels. En effet, nous n'avons en effet pas retrouvé de différence significative sur les différents prélèvements en ce qui concerne le nombre de cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques et cellules de Langerhans), certains auteurs (Zegarska et al., Xu et al.) ont émis l'hypothèse que les APC pouvaient présenter un déficit fonctionnel sous l'influence du vieillissement ou de facteurs externes (UV par exemple).

Ainsi les explants cutanés humains gardent encore toute leur place dans l'étude des mécanismes immunitaires. Ainsi nous avons récemment utilisé ces explants au sein du laboratoire pour étudier le rôle de l'IL-32 produite par les kératinocytes dans l'activation des cellules de Langerhans.

**Au total, 3 articles ont été publiés** et 1 soumis dans des revues scientifiques. J'ai également eu l'opportunité de pouvoir présenter mes travaux lors des Journées de l'Ecole Doctorale. J'espère également pouvoir participer à mon niveau à de nouveaux projets de recherche au sein de l'équipe.



## BIBLIOGRAPHIE

---

Abdullahi A1, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Sep;71(17):3241-55. doi: 10.1007/s00018-014-1612-5. Epub 2014 Apr 9.

Ainscough JS, Frank Gerberick G, Dearman RJ, Kimber I. Danger, intracellular signaling, and the orchestration of dendritic cell function in skin sensitization. *J Immunotoxicol.* 2013 Jul-Sep;10(3):223-34. doi: 10.3109/1547691X.2012.711782. Epub 2012 Sep 7. Review. PMID: 22954466

Ainscough JS, Frank Gerberick G, Zahedi-Nejad M, Lopez-Castejon G, Brough D, Kimber I, Dearman RJ. Dendritic cell IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are polyubiquitinated and degraded by the proteasome. *J Biol Chem.* 2014 Dec 19;289(51):35582-92. doi: 10.1074/jbc.M114.595686. Epub 2014 Nov 4. PMID: 25371210 Free PMC Article

Allan RS, Smith CM, Belz GT, van Lint AL, Wakim LM, Heath WR, Carbone FR. Epidermal viral immunity induced by CD8 $\alpha$ + dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science.* 2003 Sep 26;301(5641):1925-8. PMID: 14512632

Ansell DM, Holden KA, Hardman MJ. Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Exp Dermatol.* 2012 Aug;21(8):581-5. doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01540.x. PMID: 22775993

Auxenfans C, Builles N, Andre V, Lequeux C, Fievet A, Rose S, Braye FM, Fradette J, Janin-Manificat H, Nataf S, Burillon C, Damour O. [Porous matrix and primary-cell culture: a shared concept for skin and cornea tissue engineering]. *Pathol Biol (Paris).* 2009 Jun;57(4):290-8. doi: 10.1016/j.patbio.2008.04.014. Epub 2008 Jul 3. Review. French. PMID: 18602223

Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, Germain L, Kinikoglu B, Bechetoille N, Braye F, Auger FA, Damour O. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *Eur J Dermatol.* 2009 Mar-Apr;19(2):107-13. doi: 10.1684/ejd.2008.0573. Epub 2008 Dec 23. Review. PMID: 19106039

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52. Review. PMID: 9521319

Banchereau J, Thompson-Snipes L, Zurawski S, Blanck JP, Cao Y, Clayton S, Gorvel JP, Zurawski G, Klechevsky E. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood.* 2012 Jun 14;119(24):5742-9. doi: 10.1182/blood-2011-08-371245. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22535664

Banchereau J, Zurawski S, Thompson-Snipes L, Blanck JP, Clayton S, Munk A, Cao Y, Wang Z, Khandelwal S, Hu J, McCoy WH 4th, Palucka KA, Reiter Y, Fremont DH, Zurawski G, Colonna M, Shaw AS, Klechevsky E. Immunoglobulin-like transcript receptors on human dermal CD14+ dendritic cells act as a CD8-antagonist to control cytotoxic T cell priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 13;109(46):18885-90. doi: 10.1073/pnas.1205785109. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23112154

Bangert C, Brunner PM, Stingl G. Immune functions of the skin. *Clin Dermatol*. 2011 Jul-Aug;29(4):360-76. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.006. PMID: 21679864

Barbero AM, Frasnich HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol In Vitro*. 2009 Feb;23(1):1-13. doi: 10.1016/j.tiv.2008.10.008. Epub 2008 Oct 26. Review. PMID:19013230

Bechetolle N, Dezutter-Dambuyant C, Damour O, André V, Orly I, Perrier E. Effects of solar ultraviolet radiation on engineered human skin equivalent containing both Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Tissue Eng*. 2007 Nov;13(11):2667-79. PMID: 17883323

Bedoui S, Davey GM, Lew AM, Heath WR. Equivalent stimulation of naive and memory CD8 T cells by DNA vaccination: a dendritic cell-dependent process. *Immunol Cell Biol*. 2009 Mar-Apr;87(3):255-9. doi: 10.1038/icb.2008.105. Epub 2009 Jan 27. PMID:19172155

Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone FR, Brooks AG, Heath WR. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009 May;10(5):488-95. doi: 10.1038/ni.1724. Epub 2009 Apr 6. PMID:19349986

Bigley V, McGovern N, Milne P, Dickinson R, Pagan S, Cookson S, Haniffa M, Collin M. J Leukoc Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c+ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141high XCR1+ dendritic cells *Biol*. 2015 Apr;97(4):627-34. doi: 10.1189/jlb.1H10714-351R. Epub 2014 Dec 16. PMID: 25516751

Black AF, Berthod F, L'heureux N, Germain L, Auger FA. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J*. 1998 Oct;12(13):1331-40. PMID: 9761776

Blauvelt A, Katz SI, Udey MC. Human Langerhans cells express E-cadherin. *J Invest Dermatol*. 1995 Feb;104(2):293-6. PMID: 7829887

Boehncke WH, Kock M, Hardt-Weinelt K, Wolter M, Kaufmann R. The SCID-hu xenogeneic transplantation model allows screening of anti-psoriatic drugs. *Arch Dermatol Res*. 1999 Feb-Mar;291(2-3):104-6. PMID: 10195398. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO.

Bogunovic M, Ginhoux F, Wagers A, Loubeau M, Isola LM, Lubrano L, Najfeld V, Phelps RG, Grosskreutz C, Scigliano E, Frenette PS, Merad M. Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2627-38. Epub 2006 Nov 20. PMID: 17116734

Bos JD, Kapsenberg ML. The immune system of the skin. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1995 Aug 5;139(31):1587-91. Dutch.

Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med*. 2004 Mar 1;199(5):731-736.

Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med*. 2004 Mar 1;199(5):731-6. Epub 2004 Feb 23. PMID: 14981113

Brand CU, Hunger RE, Yawalkar N, Gerber HA, Schaffner T, Braathen LR. Characterization of human skin-derived CD1a-positive lymph cells. *Arch Dermatol Res*. 1999 Feb-Mar;291(2-3):65-72. PMID: 10195392

Brandsma JL, Brownstein DG, Xiao W, Longley BJ. Papilloma formation in human foreskin xenografts after inoculation of human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol*. 1995 Apr;69(4):2716-21. PMID: 7884930

Buitrago-Pérez Á1, Hachimi M, Dueñas M, Lloveras B, Santos A, Holguín A, Duarte B, Santiago JL, Akgül B, Rodríguez-Peralto JL, Storey A, Ribas C, Larcher F, del Rio M, Paramio JM, García-Escudero R. A humanized mouse model of HPV-associated pathology driven by E7 expression. *PLoS One*. 2012;7(7):e41743. doi: 10.1371/journal.pone.0041743. Epub 2012 Jul 23.

Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH, Hogquist KA. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med*. 2007 Dec 24;204(13):3147-56. Epub 2007 Dec 17. PMID: 18086865

Caserta S1, Zamoyska R. Memories are made of this: synergy of T cell receptor and cytokine signals in CD4(+) central memory cell survival. *Trends Immunol*. 2007 Jun;28(6):245-8. Epub 2007 Apr 25.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, de Saint-Vis B, Dezutter-Dambuyant C, Jacquet C, Schmitt D, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *Adv Exp Med Biol*. 1997;417:21-5. No abstract available. PMID: 9286332

Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pità O, Girolomoni G. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):5760-8. PMID:14634084

Cavani A, Ottaviani C, Nasorri F, Sebastiani S, Girolomoni G. Immunoregulation of haptens and drug induced immune reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003 Aug;3(4):243-7. Review. PMID: 12865766

Chang AL, Atzmon G, Bergman A, Brugmann S, Atwood SX, Chang HY, Barzilai N. Identification of genes promoting skin youthfulness by genome-wide association study. *J Invest Dermatol*. 2014 Mar;134(3):651-7. doi: 10.1038/jid.2013.381. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24037343 Free PMC Article

Cheong C1, Idoyaga J, Do Y, Pack M, Park SH, Lee H, Kang YS, Choi JH, Kim JY, Bonito A, Inaba K, Yamazaki S, Steinman RM, Park CG. Production of monoclonal antibodies that recognize the extracellular domain of mouse langerin/CD207. *J Immunol Methods*. 2007 Jul 31;324(1-2):48-62. Epub 2007 May 24.

Christoph T1, Müller-Röver S, Audring H, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, Rückert R, Paus R. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol*. 2000 May;142(5):862-73.

Chu CC, Di Meglio P, Nestle FO. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol*. 2011 Feb;23(1):28-41. doi: 10.1016/j.smim.2011.01.006. Epub 2011 Feb 4. Review. PMID: 21295490

Clark DA, Biron D, Sengupta P, Samuel AD. The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*. 2006 Jul 12;26(28):7444-51. PMID: 16837592

Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, Kupper TS. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol*. 2006 Apr 1;176(7):4431-9. PMID: 16547281

Clark RA, Chong BF, Mirchandani N, Yamanaka K, Murphy GF, Dowgiert RK, Kupper TS. A novel method for the isolation of skin resident T cells from normal and diseased human skin. *J Invest Dermatol*. 2006 May;126(5):1059-70. PMID: 16484986

Combadiere B, Liard C. Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccin*. 2011 Aug;7(8):811-27. doi: 10.4161/hv.7.8.16274. Epub 2011 Aug 1. Review. PMID: 21817854

Czernielewski J, Demarchez M, Prunieras M. Human Langerhans cells in epidermal cell culture, in vitro skin explants and skin grafts onto "nude" mice. *Arch Dermatol Res*. 1984;276(5):288-92. PMID: 6593008

Czernielewski J, Juhlin L, Shroot S, Brun P. Langerhans' cells in patients with psoriasis: effect of treatment with PUVA, PUVA bath, etretinate and anthralin. *Acta Derm Venereol*. 1985;65(2):97-101. PMID: 2408430

Czernielewski J, Vaigot P, Asselineau D, Prunières M. In vitro effect of UV radiation on immune function and membrane markers of human Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 1984 Jul;83(1):62-5. PMID: 6203989 Free Article

Czernielewski J, Vaigot P, Blachon F, Desbas C, Delasalle B, Prunieras M. Biology of human epidermal Langerhans cells: cell cycle studies. *Scand J Immunol.* 1985 May;21(5):479-84. PMID: 4001873 Similar articles Select item 3998492

Czernielewski J, Vaigot P, Prunières M. Epidermal Langerhans cells--a cycling cell population. *J Invest Dermatol.* 1985 May;84(5):424-6. PMID: 3998492 Free Article

Czernielewski JM, Schmitt D, Faure MR, Thivolet J. Functional and phenotypic analysis of isolated human Langerhans cells and indeterminate cells. *Br J Dermatol.* 1983 Feb;108(2):129-38. PMID: 6186266

Debeer S, Le Luduec JB, Kaiserlian D, Laurent P, Nicolas JF, Dubois B, Kanitakis J. Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur J Dermatol.* 2013 Jul-Aug;23(4):456-66. doi: 10.1684/ejd.2013.2060. PMID: 24047577

Démarchez M, Asselineau D, 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.* 1993 May;100(5):648-52. PMID: 7684055

Démarchez M, Asselineau D, Régnier M, Czernielewski J. Migration of Langerhans cells into the epidermis of human skin grafted into nude mice. *J Invest Dermatol.* 1992 Nov;99(5):54S-55S. Review. PMID: 1431213

Démarchez M, Dallanegra A, Czernielewski J. Immune system of the epidermis. *Ann Dermatol Venereol.* 1991;118(2):151-61. Review. French. PMID: 2048895

Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Zlotnik A, Caux C. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med.* 2000 Sep 4;192(5):705-18.

Geissmann F1, Revy P, Regnault A, Lepelletier Y, Dy M, Brousse N, Amigorena S, Hermine O, Durandy A. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol.* 1999 Apr 15;162(8):4567-75.

Ghigo C, Mondor I, Jorquera A, Nowak J, Wienert S, Zahner SP, Clausen BE, Luche H, Malissen B, Klauschen F, Bajénoff M. Multicolor fate mapping of Langerhans cell homeostasis. *J Exp Med.* 2013 Aug 26;210(9):1657-64. doi: 10.1084/jem.20130403. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23940255

Gilchrest BA, Murphy GF, Soter NA. Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cells in human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1982 Aug;79(2):85-8.

Gilliam AC, Kremer IB, Yoshida Y, Stevens SR, Tootell E, Teunissen MB, Hammerberg C, Cooper KD. The human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. *J Invest Dermatol*. 1998 Apr;110(4):422-7. PMID: 9540986

Gingras M, Beaulieu MM, Gagnon V, Durham HD, Berthod F. In vitro study of axonal migration and myelination of motor neurons in a three-dimensional tissue-engineered model. *Glia*. 2008 Feb;56(3):354-64. PMID: 18098124

Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, Ochando J, Kissenpfennig A, Malissen B, Grisotto M, Snoeck H, Randolph G, Merad M. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med*. 2007 Dec 24;204(13):3133-46. Epub 2007 Dec 17.

Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):265-73. Epub 2006 Jan 29.

Godin B1, Touitou E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Sep 30;59(11):1152-61. Epub 2007 Aug 16.

Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Apr 30;63(4-5):352-366.

Gros E, Novak N. Cutaneous dendritic cells in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2012 Aug;42(8):1161-75. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.03964.x. Review. PMID:22805463

Guilliams M, Crozat K, Henri S, Tamoutounour S, Grenot P, Devilard E, de Bovis B, Alexopoulou L, Dalod M, Malissen B. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood*. 2010 Mar 11;115(10):1958-68. doi: 10.1182/blood-2009-09-245274. Epub 2010 Jan 12. PMID: 20068222

Hammond SA, Tsonis C, Sellins K, Rushlow K, Scharon-Kersten T, Colditz I, Glenn GM. Transcutaneous immunization of domestic animals: opportunities and challenges. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000 Sep 15;43(1):45-55. Review. PMID: 10967220

Hanau D, Fabre M, Schmitt DA, Stampf JL, Garaud JC, Bieber T, Grosshans E, Benezra C, Cazenave JP. Human epidermal Langerhans cells internalize by receptor-mediated endocytosis T6 (CD1 "NA1/34") surface antigen. Birbeck granules are involved in the intracellular traffic of the T6 antigen. *J Invest Dermatol*. 1987 Aug;89(2):172-7. PMID: 3110299

Haniffa M, Bigley V, Collin M. Human mononuclear phagocyte system reunited. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 May;41:59-69. doi: 10.1016/j.semcd.2015.05.004. Epub 2015 May 15. Review. PMID: 25986054

Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. *Dermatol Sci*. 2015 Feb;77(2):85-92. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.08.012. Epub 2014 Sep 10. Review. PMID: 25301671

Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, Wasan PS, Wang XN, Malinarich F, Malleret B, Larbi A, Tan P, Zhao H, Poidinger M, Pagan S, Cookson S, Dickinson R, Dimmick I, Jarrett RF, Renia L, Tam J, Song C, Connolly J, Chan JK, Gehring A, Bertoletti A, Collin M, Ginhoux F. Human tissues contain CD141<sup>hi</sup> cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103<sup>+</sup> nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*. 2012 Jul 27;37(1):60-73. doi: 10.1016/j.immuni.2012.04.012. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22795876

Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar;3(3):233-42. Review. PMID:12658271

He H, Wisner P, Yang G, Hu HM, Haley D, Miller W, O'Hara A, Alvord WG, Clegg CH, Fox BA, Urba WJ, Walker EB. Combined IL-21 and low-dose IL-2 therapy induces anti-tumor immunity and long-term curative effects in a murine melanoma tumor model. *J Transl Med*. 2006 Jun 13;4:24.

Hemmerling J, Wegner-Kops J, von Stebut E, Wolff D, Wagner EM, Hartwig UF, André MC, Theobald M, Schopf RE, Herr W, Meyer RG. Human epidermal Langerhans cells replenish skin xenografts and are depleted by alloreactive T cells in vivo. *J Immunol*. 2011 Aug 1;187(3):1142-1149.

Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The majority of human peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4488-94. PMID: 16982885

Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, Leboeuf M, Low D, Oller G, Almeida F, Choy SH, Grisotto M, Renia L, Conway SJ, Stanley ER, Chan JK, Ng LG, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med*. 2012 Jun 4;209(6):1167-81. doi: 10.1084/jem.20120340. Epub 2012 May 7. PMID: 22565823

Iellem A, Colantonio L, D'Ambrosio D. Skin-versus gut-skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *Eur J Immunol*. 2003 Jun;33(6):1488-96. PMID: 12778466

Igney FH, Asadullah K, Zollner TM. Humanised mouse models in drug discovery for skin inflammation. *Expert Opin Drug Discov*. 2006 Jun;1(1):53-68.

Igyártó BZ, Kaplan DH. Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr Opin Immunol*. 2013 Feb;25(1):115-9. doi: 10.1016/j.coi.2012.11.007. Epub 2012 Dec 12. Review. PMID: 23246038

Igyarto BZ, Kaplan DH. The evolving function of Langerhans cells in adaptive skin immunity. *Immunol Cell Biol.* 2010 May-Jun;88(4):361-5. doi: 10.1038/icb.2010.24. Epub 2010 Mar 16. PMID: 20231856

Iram N1, Mildner M, Prior M, Petzelbauer P, Fiala C, Hacker S, Schöppl A, Tschachler E, Age-related changes in expression and function of Toll-like receptors in human skin. *Elbe-Bürger ADevelopment.* 2012 Nov;139(22):4210-9. doi: 10.1242/dev.083477. Epub 2012 Oct 3.

Issa F, Robb RJ, Wood KJ. The where and when of T cell regulation in transplantation. *Trends Immunol.* 2013 Mar;34(3):107-13. doi: 10.1016/j.it.2012.11.003. Epub 2012 Dec 7. Review. PMID: 23228885

Ito R, Shiina M, Saito Y, Tokuda Y, Kametani Y, Habu S. Antigen-specific antibody production of human B cells in NOG mice reconstituted with the human immune system. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;324:95-107. Review. PMID: 18481455

Iwamura H, Saito Y, Sato-Hashimoto M, Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H, Kanazawa Y, Kaneko T, Kusakari S, Kotani T, Nojima Y, Matozaki T. Essential roles of SIRP $\alpha$  in homeostatic regulation of skin dendritic cells. *Immunol Lett.* 2011 Mar 30;135(1-2):100-7. doi: 10.1016/j.imlet.2010.10.004. Epub 2010 Oct 16. PMID: 20955735

Jones CA1, Fernandez M, Herc K, Bosnjak L, Miranda-Saksena M, Boadle RA, Cunningham A. Herpes simplex virus type 2 induces rapid cell death and functional impairment of murine dendritic cells in vitro. *J Virol.* 2003 Oct;77(20):11139-49.

Jung Y, Son D, Kwon S, Kim J, Han K. Experimental pig model of clinically relevant wound healing delay by intrinsic factors. *Int Wound J.* 2013 Jun;10(3):295-305. doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.00976.x. Epub 2012 May 8. PMID: 22564221

Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity.* 2005 Dec;23(6):611-20. PMID: 16356859

Kaplan DH, Li MO, Jenison MC, Shlomchik WD, Flavell RA, Shlomchik MJ. Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.* 2007 Oct 29;204(11):2545-52. Epub 2007 Oct 15. PMID: 17938236

Kashihara M, Ueda M, Horiguchi Y, Furukawa F, Hanaoka M, Imamura S. A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 1986 Nov;87(5):602-7. PMID: 3534103

Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature.* 1979 Nov 15;282(5736):324-6. PMID: 503208

Kim YH, Woodley DT, Wynn KC, Giomi W, Bauer EA. Recessive dystrophic epidermolysis bullosa phenotype is preserved in xenografts using SCID mice:

development of an experimental in vivo model. *J Invest Dermatol.* 1992 Feb;98(2):191-7. PMID: 1370678

Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity.* 2005 May;22(5):643-54. PMID: 15894281

Klechevsky E, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes L, Briere F, Chaussabel D, Zurawski G, Palucka AK, Reiter Y, Banchereau J, Ueno H. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity.* 2008 Sep 19;29(3):497-510. doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.013. PMID: 18789730

Kong R, Bhargava R. Characterization of porcine skin as a model for human skin studies using infrared spectroscopic imaging. *Analyst.* 2011 Jun 7;136(11):2359-66. doi: 10.1039/c1an15111h. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21509377

Krueger GG, Shelby J. Biology of human skin transplanted to the nude mouse: I. Response to agents which modify epidermal proliferation. *J Invest Dermatol.* 1981 Jun;76(6):506-10. PMID: 7017014

Kupper TS1, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 2004 Mar;4(3):211-22.

Kwant-Mitchell A, Ashkar AA, Rosenthal KL. Mucosal innate and adaptive immune responses against herpes simplex virus type 2 in a humanized mouse model. *J Virol.* 2009 Oct;83(20):10664-76. doi: 10.1128/JVI.02584-08. Epub 2009 Aug 5. PMID: 19656896

Kwant-Mitchell A, Pek EA, Rosenthal KL, Ashkar AA. Development of functional human NK cells in an immunodeficient mouse model with the ability to provide protection against tumor challenge. *PLoS One.* 2009 Dec 21;4(12):e8379. doi: 10.1371/journal.pone.0008379. PMID: 20027308

Lane AT, Scott GA, Day KH. Development of human fetal skin transplanted to the nude mouse. *J Invest Dermatol.* 1989 Dec;93(6):787-91. PMID: 2584745

Langerhans cells on guard in the epidermis: poised to dSEARCH and ...? Udey MC. *J Invest Dermatol.* 2006 Apr;126(4):705-7. PMID: 16541095

Lebonvallet N, Jeanmaire C, Danoux L, Sibille P, Pauly G, Misery L. The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. *Eur J Dermatol.* 2010 Nov-Dec;20(6):671-84. doi: 10.1684/ejd.2010.1054. Epub 2010 Sep 7. Review. PMID: 20822970

Legrand N1, Weijer K, Spits H. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. *J Immunol.* 2006 Feb 15;176(4):2053-8.

León B, López-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):519-31. Epub 2007 Apr 5. PMID:17412618

Liard C, Munier S, Joulin-Giet A, Bonduelle O, Hadam S, Duffy D, Vogt A, Verrier B, Combadière B. Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar;132(3 Pt 1):615-25. doi: 10.1038/jid.2011.346. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22170490

Liard C1, Munier S, Arias M, Joulin-Giet A, Bonduelle O, Duffy D, Shattock RJ, Verrier B, Combadière B. Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. *Vaccine*. 2011 Aug 26;29(37):6379-91. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.080. Epub 2011 May 7.

Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004 Feb 21;363(9409):608-15.

Luckey U1, Maurer M, Schmidt T, Lorenz N, Seebach B, Metz M, Steinbrink K. T cell killing by tolerogenic dendritic cells protects mice from allergy. *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):3860-71. doi: 10.1172/JCI45963. Epub 2011 Sep 1.

Mackay CR1, Marston WL, Dudler L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med*. 1990 Mar 1;171(3):801-17.

Mahl JA, Vogel BE, Court M, Kolopp M, Roman D, Nogués V. The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. *Exp Toxicol Pathol*. 2006 Jul;57(5-6):341-5. Epub 2006 May 19. PMID: 16713702

Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jun;14(6):417-28. doi: 10.1038/nri3683. Review. PMID: 24854591

Marquet F, Bonneau M, Pascale F, Urien C, Kang C, Schwartz-Cornil I, Bertho N. Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. *PLoS One*. 2011 Jan 27;6(1):e16320. doi: 10.1371/journal.pone.0016320. PMID: 21298011

Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001 Mar 23;291(5512):2413-7. Epub 2001 Mar 1. PMID: 11264538

McDermott R1, Bausinger H, Fricker D, Spohner D, Proamer F, Lipsker D, Cazenave JP, Goud B, De La Salle H, Salamero J, Hanau D. Reproduction of Langerin/CD207 traffic and Birbeck granule formation in a human cell line model. *J Invest Dermatol*. 2004 Jul;123(1):72-7.

Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):935-47. doi: 10.1038/nri2455. PMID: 19029989

Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG, Engleman EG. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol.* 2002 Dec;3(12):1135-41. Epub 2002 Nov 4. Erratum in: *Nat Immunol* 2003 Jan;4(1):92. PMID: 12415265

Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. 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;31:563-604. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950. Review. PMID:23516985

Merluzzi S1, Frossi B, Gri G, Parusso S, Tripodo C, Pucillo C. Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells. *Blood.* 2010 Apr 8;115(14):2810-7. doi: 10.1182/blood-2009-10-250126. Epub 2010 Jan 25.

Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004 Mar 1;172(5):2731-2738. Review.

Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerds V The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.* 2012 Jan;20(1):50-7. doi: 10.1016/j.tim.2011.11.002. Epub 2011 Dec 5. Review. PMID: 22153753

Meyer W, Schwarz R, Neurand K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol.* 1978;7:39-52. No abstract available. PMID:v752456

Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, Xu W, Auger FA, Germain L. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999 Jun;35(6):318-26. PMID: 10476918

Montagna W, Yun js. The skin of the domestic pig. *J Invest Dermatol.* 1964 Jul;42:11-21. PMID: 14209446

Mueller SN1, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:137-61. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095954. Epub 2012 Dec 3.

Mulholland WJ, Arbuthnott EA, Bellhouse BJ, Cornhill JF, Austyn JM, Kendall MA, Cui Z, Tirlapur UK. Multiphoton high-resolution 3D imaging of Langerhans cells and keratinocytes in the mouse skin model adopted for epidermal powdered immunization. *J Invest Dermatol.* 2006 Jul;126(7):1541-8. Epub 2006 Apr 27. PMID: 16645596

Nagao K, Kobayashi T, Moro K, Ohyama M, Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, Kubo A, Cho YH, Clausen BE, Matsushima K, Suematsu M, Furtado GC, Lira SA, Farber JM, Udey MC, Amagai M.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):679-91. doi: 10.1038/nri2622. Epub 2009 Sep 18.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):679-91. doi: 10.1038/nri2622. Epub 2009 Sep 18. Review. PMID: 19763149

Nestle FO, Nickoloff BJ. A fresh morphological and functional look at dermal dendritic cells. *J Cutan Pathol*. 1995 Oct;22(5):385-93.

Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol*. 1993 Dec 1;151(11):6535-45. Erratum in: *J Immunol* 1994 Jan 1;152(1):376. PMID: 7504023

Nishibu A, Ward BR, Jester JV, Ploegh HL, Boes M, Takashima A. Behavioral responses of epidermal Langerhans cells in situ to local pathological stimuli. *J Invest Dermatol*. 2006 Apr;126(4):787-96. PMID: 16439974

Noordegraaf M, Flacher V, Stoitzner P, Clausen BE. Functional redundancy of Langerhans cells and Langerin+ dermal dendritic cells in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2010 Dec;130(12):2752-9. doi: 10.1038/jid.2010.223. Epub 2010 Aug 12. PMID: 20703247

Ochoa MT, Loncaric A, Krutzik SR, Becker TC, Modlin RL. "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J Invest Dermatol*. 2008 Sep;128(9):2225-31. doi: 10.1038/jid.2008.56. Epub 2008 Mar 13. PMID: 18337829

Ponec M, El Ghalbzouri A, Dijkman R, Kempenaar J, van der Pluijm G, Koolwijk P. Endothelial network formed with human dermal microvascular endothelial cells in autologous multicellular skin substitutes. *Angiogenesis*. 2004;7(4):295-305. Epub 2005 May 9. PMID: 15886873

Ponec M, Gibbs S, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Mommaas AM. Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res*. 1997 May;289(6):317-26. PMID: 9209676

Probst HC, Muth S, Schild H. Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. *Eur J Immunol*. 2014 Apr;44(4):927-33. doi: 10.1002/eji.201343862. Epub 2014 Mar 20. Review. PMID: 24652744

Pruniéras M, Delescluse C, Regnier M. The culture of skin. A review of theories and experimental methods. *J Invest Dermatol*. 1976 Jul;67(1):58-65.

Racki WJ, Covassin L, Brehm M, Pino S, Ignatz R, Dunn R, Laning J, Graves SK, Rossini AA, Shultz LD, Greiner DL. NOD-scid IL2rgamma(null) mouse model of human skin transplantation and allograft rejection. *Transplantation*. 2010 Mar 15;89(5):527-536.

Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):101

Reizis B. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Curr Opin Immunol*. 2010 Apr;22(2):206-11. doi: 10.1016/j.coi.2010.01.005. Epub 2010 Feb 9. Review. PMID: 20144853

Roediger B, Kyle R, Yip KH, Sumaria N, Guy TV, Kim BS, Mitchell AJ, Tay SS, Jain R, Forbes-Blom E, Chen X, Tong PL, Bolton HA, Artis D, Paul WE, Fazekas de St Groth B, Grimbaldston MA, Le Gros G, Weninger W. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*. 2013 Jun;14(6):564-73. doi: 10.1038/ni.2584. Epub 2013 Apr 21.

Romani N, Tripp CH, Stoitzner P. Langerhans cells come in waves. *Immunity*. 2012 Nov 16;37(5):766-8. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.013. PMID: 23159223

Sakeen W. Kashem,1 Muzlifah Haniffa,2,3,\* and Daniel H. Kaplan. Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annu. Rev. Immunol*. 2017. 35:469–99

Salguero G1, Daenthanasanmak A, Münz C, Raykova A, Guzmán CA, Riese P, Figueiredo C, Länger F, Schneider A, Macke L, Sundarasetty BS, Witte T, Ganser A, Stripecke R Dendritic cell-mediated immune humanization of mice: implications for allogeneic and xenogeneic stem cell transplantation. *J Immunol*. 2014 May 15;192(10):4636-47. doi: 10.4049/jimmunol.1302887. Epub 2014 Apr 16.

Sallusto F . The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica*. 1999 Jun;84 Suppl EHA-4:28-31. Review. No abstract available. PMID:10907461

Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Pillars article: two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999. 401: 708-712.

Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999 Oct 14;401(6754):708-12. PMID:10537110

Sandig H, Bulfone-Paus S. TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Front Immunol*. 2012 Jul 4;3:185. doi: 10.3389/fimmu.2012.00185. eCollection 2012. PMID: 22783258

Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowicz M, Fontenot JD, Rudensky AY, Campbell DJ. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1335-47. Epub 2007 Jun 4. PMID:17548521

Seré K, Baek JH, Ober-Blöbaum J, Müller-Newen G, Tacke F, Yokota Y, Zenke M, Hieronymus T. Two distinct types of Langerhans cells populate the skin during steady state and inflammation. *Immunity*. 2012 Nov 16;37(5):905-16. doi: 10.1016/j.immuni.2012.07.019. PMID: 23159228

Sheu SY, Wang WL, Fu YT, Lin SC, Lei YC, Liao JH, Tang NY, Kuo TF, Yao CH. The pig as an experimental model for mid-dermal burns research. *Burns*. 2014 Dec;40(8):1679-88. doi: 10.1016/j.burns.2014.04.023. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24908180

Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jan;7(1):19-30. Epub 2006 Dec 15. Review. PMID: 17170756

Shultz LD1, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol*. 2012 Nov;12(11):786-98. doi: 10.1038/nri3311. Epub 2012 Oct 12.

Silberberg I, Baer RL, Rosenthal SA. The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J Invest Dermatol*. 1976 Apr;66(4):210-7. Review. PMID: 774995

Simon GA1, Maibach HI. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2000 Sep-Oct;13(5):229-34.

Soballe PW, Montone KT, Satyamoorthy K, Nesbit M, Herlyn M. Carcinogenesis in human skin grafted to SCID mice. *Cancer Res*. 1996 Feb 15;56(4):757-64. PMID: 8631010

Soria A, Boccarda D, Chonco L, Yahia N, Dufossée M, Cardinaud S, Moris A, Liard C, Joulin-Giet A, Julithe M, Mimoun M, Combadière B, Perrin H. Long-term maintenance of skin immune system in a NOD-Scid IL2 $\gamma$ (null) mouse model transplanted with human skin. *Exp Dermatol*. 2014 Nov;23(11):850-852.

Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:647-75. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075053. Epub 2012 Jan 6.

Spits H. Group 2 innate lymphoid cells show up in the skin. *Immunol Cell Biol*. 2013 Jul;91(6):390-2. doi: 10.1038/icb.2013.24. Epub 2013 Jun 4.

Spranger S, Frankenberger B, Schendel DJ. NOD/scid IL-2R $\gamma$ (null) mice: a preclinical model system to evaluate human dendritic cell-based vaccine strategies in vivo. *J Transl Med*. 2012 Feb 25;10:30. doi: 10.1186/1479-5876-10-30. PMID : 22364226

Steinman RM, Inaba K. Stimulation of the primary mixed leukocyte reaction. *Crit Rev Immunol*. 1985;5(4):331-48. Review. PMID: 2931248

Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 8;99(1):351-8. Epub 2002 Jan 2. Review. PMID :11773639

Stoitzner P, Stössel H, Wankell M, Hofer S, Heufler C, Werner S, Romani N. Langerhans cells are strongly reduced in the skin of transgenic mice overexpressing follistatin in the epidermis. *Eur J Cell Biol*. 2005 Aug;84(8):733-41. PMID: 16180311

Stoitzner P, Tripp CH, Douillard P, Saeland S, Romani N. Migratory Langerhans cells in mouse lymph nodes in steady state and inflammation. *J Invest Dermatol*. 2005 Jul;125(1):116-25. PMID: 15982311

Streilein JW, Lonsberry LW, Bergstresser PR. Depletion of epidermal langerhans cells and Ia immunogenicity from tape-stripped mouse skin. *J Exp Med*. 1982 Mar 1;155(3):863-71.

Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol*. 2012 Jun 24;13(8):744-52. doi: 10.1038/ni.2353. PMID: 22729248

Stubbe M, Vanderheyde N, Goldman M, Marchant A. Antigen-specific central memory CD4+ T lymphocytes produce multiple cytokines and proliferate in vivo in humans. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):8185-90. PMID:17114495

Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*. 2005 Jan 1;174(1):164-73. PMID:15611238

Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen*. 2001 Mar-Apr;9(2):66-76. Review. PMID:11350644

Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol*. 2015 Jul;66(1):14-21. doi: 10.1016/j.molimm.2014.10.023. Epub 2014 Nov 13. Review. PMID: 25466611

Suvarna SK, Cotton DW. Dermal dendrocytes and other factor XIIIa-positive cells. *J Pathol*. 1993 Dec;171(4):251-2. PMID:7908965

Tammi R, Maibach H. Skin organ culture: why? *Int J Dermatol*. 1987 Apr;26(3):150-60.

Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature*. 1993 Jan 7;361(6407):82-5. PMID: 8421498

Taylor MD, Else KJ. Human Trichuris-specific antibody responses in vaccinated hu-PBL-SCID mice. *Parasite Immunol*. 2002 Jan;24(1):1-13. PMID: 11856441

Teunissen MB1, Haniffa M, Collin MP. Insight into the immunobiology of human skin and functional specialization of skin dendritic cell subsets to innovate intradermal vaccination design. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2012;351:25-76. doi: 10.1007/82\_2011\_169.

Tfaily S, Gobinet C, Josse G, Angiboust JF, Manfait M, Piot O. Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: a comparative study between human skin and pig skin. *Analyst*. 2012 Aug 21;137(16):3673-82. doi: 10.1039/c2an16292j. Epub 2012 Jul 3. PMID:22754919

Töröcsik D, Bárdos H, Hatalyák Z, Dezső B, Losonczy G, Paragh L, Péter Z, Balázs M, Remenyik E, Adány R. Detection of factor XIII-A is a valuable tool for distinguishing dendritic cells and tissue macrophages in granuloma annulare and necrobiosis lipoidica. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Aug;28(8):1087-96. doi: 10.1111/jdv.12290. Epub 2013 Nov 16. PMID: 24237365

Töröcsik D, Bárdos H, Nagy L, Adány R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Sep;62(18):2132-9. PMID: 16132226

Toulon A, Breton L, Taylor KR, Tenenhaus M, Bhavsar D, Lanigan C, Rudolph R, Jameson J, Havran WL. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med*. 2009 Apr 13;206(4):743-50. doi: 10.1084/jem.20081787. Epub 2009 Mar 23. PMID:19307328

Ueno H, Palucka AK, Banchereau J. The expanding family of dendritic cell subsets. *Nat Biotechnol*. 2010 Aug;28(8):813-5. doi: 10.1038/nbt0810-813. PMID:20697407  
Gilbert JM, Goldberg IG, Benjamin TL. Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J Virol*. 2003 Feb;77(4):2615-22. PMID:12552000

Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin JJ, Kissenpfennig A, Mattéi MG, Ait-Yahia S, Bates EE, Malissen B, Koch F, Fossiez F, Romani N, Lebecque S, Saeland S.

Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005 Aug;17(4):273-83. Review. PMID: 15953735

Valladeau J1, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S, Saeland S. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*. 2000 Jan;12(1):71-81.

Vallée M, Côté JF, Fradette J. Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol (Paris)*. 2009 Jun;57(4):309-17. doi: 10.1016/j.patbio.2008.04.010. Epub 2008 Jun 4. PMID: 18534784

Van den Bogaard EH, Tjabringa GS, Joosten I, Vonk-Bergers M, van Rijssen E, Tijssen HJ, Erkens M, Schalkwijk J, Koenen HJ. Crosstalk between keratinocytes and T cells in a 3D microenvironment: a model to study inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol*. 2014 Mar;134(3):719-27. doi: 10.1038/jid.2013.417. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24121402

Vana G, Meingassner JG. Morphologic and immunohistochemical features of experimentally induced allergic contact dermatitis in Göttingen minipigs. *Vet Pathol*. 2000 Nov;37(6):565-80. PMID:11105946

Vermette M, Trottier V, Ménard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2007 Jun;28(18):2850-60. Epub 2007 Feb 27. PMID: 17374391

Vishwanath M1, Nishibu A, Saeland S, Ward BR, Mizumoto N, Ploegh HL, Boes M, Takashima A. Development of intravital intermittent confocal imaging system for studying Langerhans cell turnover. *J Invest Dermatol*. 2006 Nov;126(11):2452-7. Epub 2006 Jun 22.

Wang Z, MacLeod DT, Di Nardo A. Commensal bacteria lipoteichoic acid increases skin mast cell antimicrobial activity against vaccinia viruses. *J Immunol*. 2012 Aug 15;189(4):1551-8. doi: 10.4049/jimmunol.1200471. Epub 2012 Jul 6. PMID:22772452

Wu B, Crampton SP, Hughes CC. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity*. 2007 Feb;26(2):227-39.

Yan HC, Juhasz I, Pilewski J, Murphy GF, Herlyn M, Albelda SM. Human/severe combined immu- nodeficient mouse chimeras. An experimental in vivo model system to study the regulation of human endothelial cell-leukocyte adhesion molecules. *J Clin Invest*. 1993 Mar;91(3):986-996.

Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2517-25. PMID:17786242

Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol*. 2009 Feb;129(2):302-8. doi: 10.1038/jid.2008.225. Epub 2008 Aug 14. Review. PMID: 18685620

Zegarska B, Pietkun K, Giemza-Kucharska P, Zegarski T, Nowacki MS, Romańska-Gocka K. Changes of Langerhans cells during skin ageing. *Postepy Dermatol Alergol*. 2017 Jun;34(3):260-267. doi: 10.5114/ada.2017.67849. Epub 2017 May 29.





## ***ANNEXE 1 : PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES***

## Maintenance of human skin tissue and cellularity after engraftment in immunodeficient mouse model

David Boccara<sup>1,2</sup>, Béhazine Combadière<sup>1\*</sup>, Angèle Soria<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Universités UPMC université Paris 06 UMRS CR7, Inserm U1135, CNRS, ERL 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses-Paris (Cimi-Paris), 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France, <sup>2</sup>Service de chirurgie plastique reconstructrice, esthétique, centre des brûlés, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France, <sup>3</sup>Service de Dermatologie et d'Allergologie, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine 75020 Paris HUEP, APHP Assistance Publique Hôpitaux de Paris, France

### ABSTRACT

A lack of an appropriate animal model to study human skin in vivo remains a major problem. Human skin explant can be conserved only few days in culture medium. For these reasons, it is necessary to developed humanized mice model with human skin graft for studying of skin innate and adaptive responses. Humanized mice model with human skin engraftment have been Non-obese diabetic-SCID gamma chain null mice (NSG, NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tmlWjl</sup>/Sz) were engrafted with fresh human skin obtained from healthy volunteers undergoing plastic surgery of breast, abdomen or face lifting. Eighty-two mice were engrafted with 16 different human skin with standard operating procedure. A failure of human skin engraftment was found in 21 (25.6%) of the engrafted mice, due to partial or total human skin necrosis. We observed very good or good engrafted skin behavior in 61 humanized mice (78.6%), with preservation of the structures of the human skin compared to non-engrafted human skin and conservation of the major skin resident immune Antigen Presenting Cells 1 to 3-week post-graft. Here, we described the standard operating procedure, and performance of human skin engraftment in NOD-Scid IL2rgamma(null) mouse model with the maintenance of skin epidermal tissue and cells.

**KEYWORDS:** CD1a positive cells, human skin graft, methods, NOD-Scid IL2rgamma(null) mouse model

## INTRODUCTION

The skin is the largest organ of the human body and the first line of protection against pathogens, physical and chemical injuries. Mouse and human skin are very different by numerous aspects; thickness, permeability, size and density of hair follicles and immune system (Groeber et al., 2011; Mestas and Hughes 2004). However, the lack of an appropriate animal model to study human skin in vivo remains a major problem. Humanized model with human skin engraftment have been developed in the past few years with important improvement of the model since its first demonstration in Severe Combined Immuno Deficiency (SCID) mice models (with B and T mouse cells default) (Yan et al., 1993). However, the model presented some limitation with the lack of murine vascularization and a presence of inflammatory murine cells (monocytes and lymphocytes) increasing graft rejection. A more efficient murine model is the use of Non-Obese Diabetic SCID (NOD-Scid IL2rgamma(null)) (NSG) mice with lack of innate immune system (i.e: complement system, Antigen Presenting Cells and Natural Killer cells) (Igney et al., 2006; Hemmerling et al., 2011; Racki et al., 2010; Boyman et al., 2004) increasing the rate of success of skin engraftment. Here, we described the standard operating procedure, and performance of human skin engraftment in NOD-Scid IL2rgamma(null) mouse model with the maintenance of skin epidermal tissue and cells.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Non-obese diabetic-SCID gamma chain null mice (NSG, NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/Sz) and NSG-HLA-A2 (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>Tg (HLA-

A2/H2-D/B2M) 1Dvs/Sz (NSG-HLA-A2/HHD)) were purchased from Charles Rivers (L'arbrèsle, France); the original strains were generated by Jackson Laboratories (Main, USA). All animals were housed at the Specific Pathogen Free animal facility (Centre d'Experimentation Fonctionnelle, Pitié-Salpêtrière, Paris, agreement number A75-13-15), given autoclaved food and water. Mice were anesthetized prior grafting and immunization with a mix solution of Xylazine 2% (Bayer AG, Leverkusen, Germany) and Ketamine 8% (Imalgen 1000, Merial, Lyon, France) in NaCl according to individual animal weight and duration of sedation. All animals were handled in strict accordance with good animal practice and complied with local animal experimentation and ethics committee guidelines. The study was approved by the French institutional ethics committee for animal experimentation, with authorization number 00954.02.

### *Human skin sample collection and preparation*

Fresh skin samples were obtained from healthy volunteers undergoing plastic surgery of breast, abdomen or face lifting (Service de chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique-Centre de brûlés, Saint-Louis hospital, Paris, France). All skin samples were taken after informed consent approval by the Institutional Ethics Committee of the Saint Louis Hospital (IRB 00003835), according to the ethical rules stated in the Declaration of Helsinki Principle. Directly after surgical excision, skin tissues were conserved in NaCl during two to four hours. Skin samples were washed sequentially in povidone-iodine (Betadine® dermique 10%, MEDA pharma, France) and PBS 1X. Subcutaneous fat and hypodermal tissue were removed using scissors. Skin tissues were divided into 1 to

1.5cm<sup>2</sup> pieces and conserved in RPMI medium supplemented with 10% Fetal Calf serum (FCS), glutamine and a mix solution antibiotic-fungicide (Invitrogen) before engraftment.

### ***Skin graft procedure***

Anesthetized mice were laid on a surgical hot plate to avoid hypothermia during procedure. A portion of dorsal skin was shaved and treated with povidone-iodine (Betadine® dermique 10%, MEDA pharma, France). A piece of skin (around 1.5 cm<sup>2</sup>) behind the shoulder blade and adjacent to the spine was carefully removed. Human skin sample was placed on the exposed graft bed and fastened to the wound site by 6 surgical sutures. Human skin edges were recovered with the adjacent murine skin, in order to facilitate angiogenesis processes. The graft was enveloped with non-adherent silicone bandage (Mepitel®, Molnlycke Health Care, Wasquehal, France), and wrapped into elastic bandage (Adheban®, 3M, Germany). Engrafted mice were kept for 1 to 4 weeks. Bandages were removed and changed twice a week. Skin and graft area were cleaned with povidone-iodine (Betadine® dermique 10%, diluted in RPMI) and Dexeryl® protective cream (Pierre Fabre, France) was applied to nourish epidermal layers.

### ***Skin graft behavior***

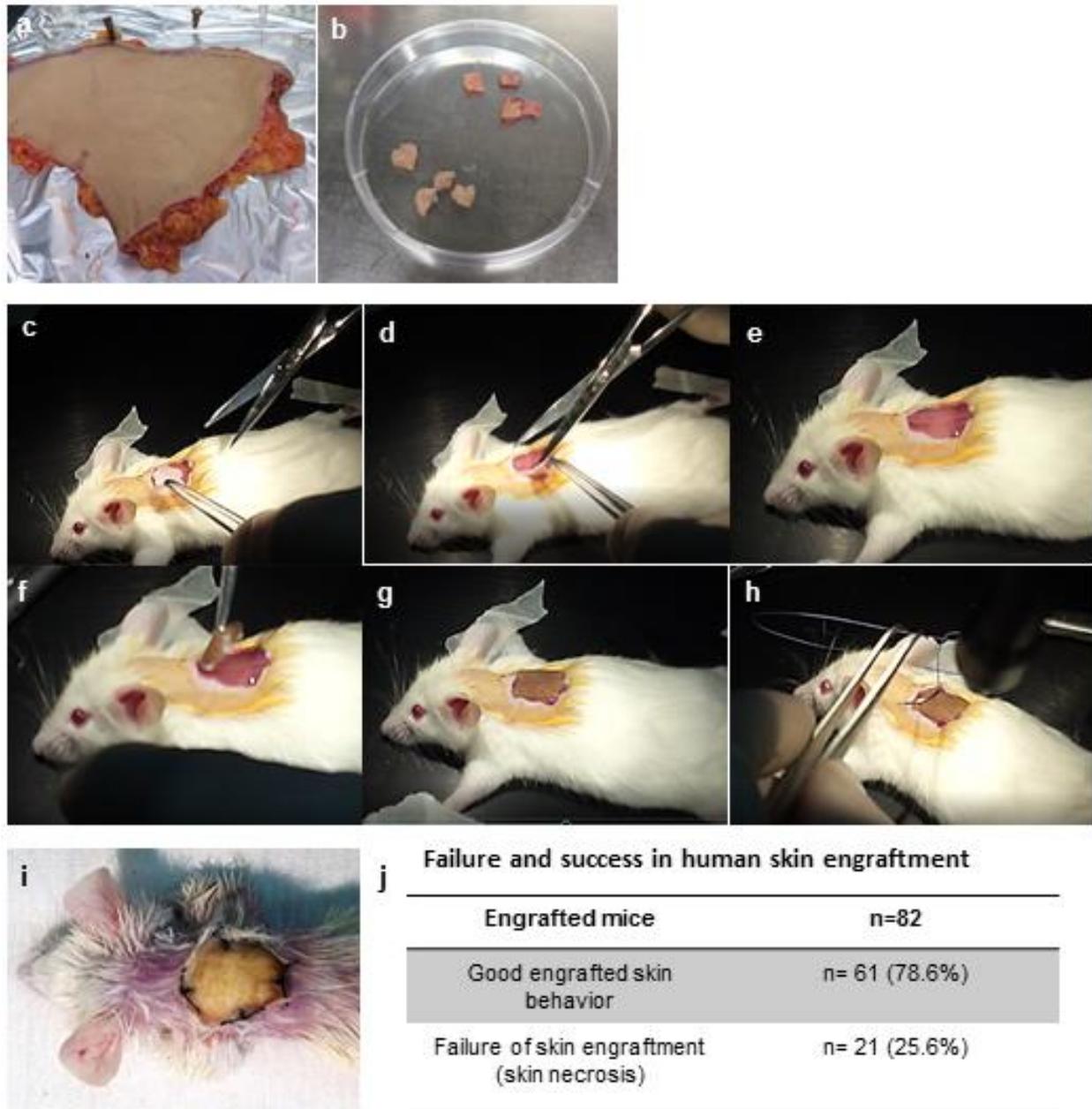
The major criterion of evaluation of graft success is the macroscopic preservation of human skin graft at least 1 week after engraftment with microscopic analysis with immunofluorescence of skin cells and structure.

## **RESULTS**

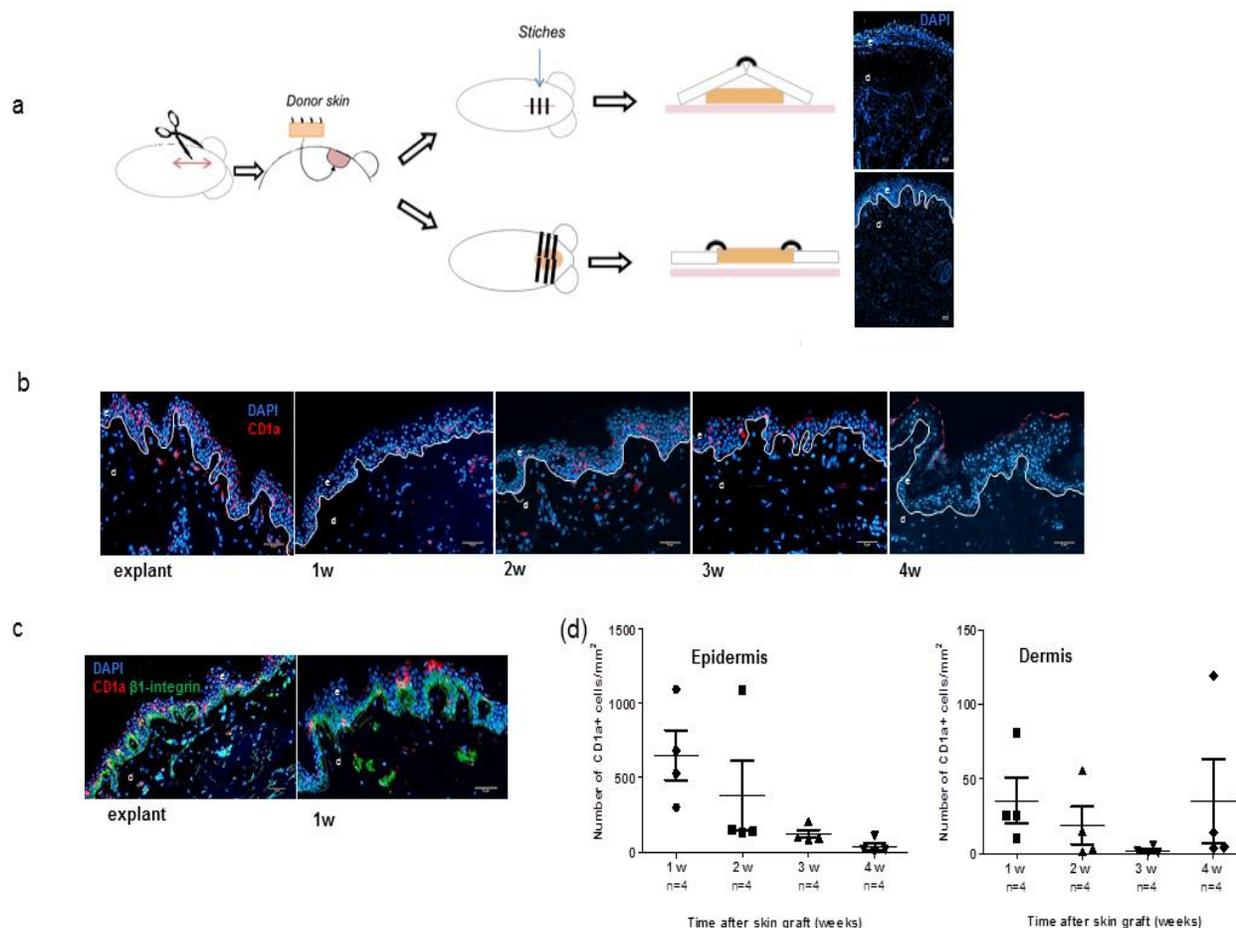
Eighty-two mice were engrafted with 16 different human skin with standard operating procedure (several mice with the same donor). The different steps of human skin graft were described in Figure 1 and in material and method section. Briefly, subcutaneous fat and hypodermal tissue was removed using scissors and human skin was divided into 1 to 1.5 cm<sup>2</sup> pieces Figure 1 (a-b). After removed of piece of mouse skin behind the shoulder blade (c-e), human skin is put down on the graft area (f), human skin edges are recover with the adjacent murine skin (g), stitches allow to maintain the human skin graft in position (h-i). The average age of the donors was of 47.56 years (Extremes: 29-70), all are women. The origin of the human graft skin was the breast in 13 cases, the abdomen in 2 cases, and the face in 1 case.

A failure of human skin engraftment was found in 21 (25.6%) of the engrafted mice, due to partial (more than 50% of human skin graft) or total human skin necrosis. Only 1 mouse died during engraftment, probably because of the anesthesia. We observed very good or good engrafted skin behavior in 61 humanized mice (78.6%) Figure 1 (j).

For optimized the number of skin graft success, we try another technical approach; with engraftment of human skin under mouse skin, Figure 2 (a). Unfortunately, we observed at 1 week after engraftment, a disorganization of normal human structures in engrafted human skin with disappearance of epidermis with immunofluorescence microscopic analysis Figure 2 (a).



**Figure 1: Different steps of human skin engraftment of NSG mouse.** Human skin explant (a) subcutaneous fat and hypodermal tissue were removed using scissors and human skin was divided into 1 to 1.5 cm<sup>2</sup> (b). A skin mouse piece around 1.5 cm<sup>2</sup> was removed behind the shoulder blade and adjacent to the spine (c-e). A human skin piece around 1.5 cm<sup>2</sup> with epidermis and dermis was deposited on the graft area (f). Human skin edges are recovering with the adjacent murine skin (g) and stitches (h) allow maintaining the human skin graft. Result of human skin engraftment (i). A table summarizes the failure and success in human skin engraftment (j) in 82 mice with skin from 16 healthy donors.



**Figure 2: Morphology and main antigen presenting cells (APCs) in human skin graft and explant.** A schematic representative human skin engraftment with two different techniques (a). First, human skin is engrafted completely recovered by murine skin, but epidermis is inaccessible and at 1 week human epidermis is confused. In the second way, the human skin engrafted is close to the adjacent murine skin with stiches; epidermis and dermis seemed good organization 1 to 3 week (w) after skin engraftment. Magnification x4, e: epidermis, d: dermis. Representative 5 $\mu$ m human skin cryosection for explant and for 1, 2, 3 and 4 weeks after human skin engraftment (b), labeled with DAPI (blue) and anti-human CD1a (red), and anti-human  $\beta$ 1 integrin (green) (c) for explant and at 1 week after human skin engraftment. Magnification x10, e: epidermis, d: dermis. (d): Number of positive CD1a cells in the human skin graft at week (w) 1, 2, 3 and 4 after skin graft (n=4 in each group).

## DISCUSSION

This rate of success in human skin engraftment is close that Hemmerling and co-workers about of 90% in 230 mice transplanted with skin from 14 donors (Hemmerling et al., 2011). In this study authors used a little

thick dermis, with skin of 2- to 3-mm depth, which can allow probably a better skin graft.

We observed at different time point 1, 2 and 3 weeks after human skin engraftment, the preservation of the structures of the human skin compared to non-engrafted human skin Figure 2 (b) in histology cryosections with ep-

idermis and papillary dermis. At week 4 human skin structures were not well-preserved Figure 2 (b). Epidermal and dermal skin layers, hair follicles are well and skin resident APCs such as CD1a+ epidermal LCs and dermal DCs subsets were preserved 1 to 3-week post-graft, as shown in Figure 2 (b). Human skin explant can be conserved more than few days in culture medium. One to three weeks after skin engraftment Figure 2 (b-c) we see the conservation of macroscopic and microscopic human skin on NSG mice retained main resident APCs, the Langerhans cells (CD1a+ cells located in epidermis), and human skin structure with epidermal basal layer (immunostaining with beta 1 integrin which is one of the major epidermal integrin implicated in adhesion of basal keratinocytes to basal membrane) had been preserved. In the same humanized mice model with human skin graft, Hemmerling and co-workers showed that human LC repopulated human skin graft 6 to 9 weeks after graft, despite the lack of a human hematopoietic system, and that one third of replenishing LC exhibit proliferative activity *in vivo* (Hemmerling et al., 2011). These results suggest this humanized mouse model could be using until 6 or 9 weeks after skin graft.

Moreover, in our experiments, human vascularization was present at different times point with colonization of a murine vascularization (data not shown) in human skin engrafted and its maintenance during several weeks (observed until 4 weeks) after skin graft testifying of the grip of the graft.

Some author described in the same humanized mouse model a cellular infiltrate of mononuclear Gr1<sup>+</sup> cells 10 days after human skin graft and persisted until 28 days throughout the dermis, basal lamina and epidermis. In

this study, an anti-Gr1 monoclonal antibodies treatment of NSG mice improved skin morphology and especially epidermal structure (Racki et al., 2010).

We can observe a progressive decrease of skin cell after graft. APC and dermal dendritic cells (DDC) CD1a+ in human engrafted skin Figure 2 (d) are fewer in number compared to normal explant. But we can see the same ratio between LC cells and keratinocytes in explant and human skin at 1 to 3 week after graft. Epidermal LC (corresponding to epidermal CD1+ cells) represents around 10 to 14% of total epidermal cells (keratinocytes).

Hence, using engrafted mice at 2 to 3 week post-surgery, we showed the relevance of this model for studying antigen penetration and immune responses in human skin (Soria et al., 2014).

## CONCLUSION

We have showed here that in a NOD-Scid IL2rgamma(null) mouse with human skin engraftment model can be used 1 to 3 week after skin engraftment. This model is reproducible in around 78% of graft. The human engrafted skin keep a well-conserved tissue environment; with epidermis, dermis, human vascularization and APC. This highlighted the potential of the NOD-Scid IL2rgamma(null) mouse with human skin engraftment model has an innovative preclinical model for human skin immunity. With the long-term preservation of a complete human skin, this model allows to test new therapeutics, compounds, and devices in the skin tissue.

## ACKNOWLEDGMENTS

DB, BC and AS designed the research, analyzed data and wrote the manuscript. The laboratory of Dr Combadière is funded by the FP7 CUTHIVAC program (241904) and by

the Fondation pour la Recherche Médicale “Equipe”. We thank Jessica Gonnet and Melody Dufossé for technical help. AS had a financial support of French Dermatology Society (Société Française de Dermatologie) for this work. We thank Dr Morosan and the CEF staff members of the Pitié Salpêtrière Hospital for excellent animal’s care.

## FUNDINGS

The laboratory of Dr Combadière is funded by the FP7 CUTHIVAC program (241904) and by the Fondation pour la Recherche Médicale “Equipe”. AS had a financial support of French Dermatology Society (Société Française de Dermatologie) for this work.

## CONFLICT OF INTERESTS

Conflicts of Interest: There were no conflicts of interests.

## REFERENCES

- Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med*. 2004 Mar 1;199(5):731-736.
- Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Apr 30;63(4-5):352-366.
- Hemmerling J, Wegner-Kops J, von Stebut E, Wolff D, Wagner EM, Hartwig UF, André MC, Theobald M, Schopf RE, Herr W, Meyer RG. Human epidermal Langerhans cells replenish skin xenografts and are depleted by alloreactive T cells in vivo. *J Immunol*. 2011 Aug 1;187(3):1142-1149.
- Igney FH, Asadullah K, Zollner TM. Humanised mouse models in drug discovery for skin inflammation. *Expert Opin Drug Discov*. 2006 Jun;1(1):53-68.

Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):2731-2738. Review.

Racki WJ, Covassin L, Brehm M, Pino S, Ignatz R, Dunn R, Laning J, Graves SK, Rossini AA, Shultz LD, Greiner DL. NOD-scid IL2rgamma(null) mouse model of human skin transplantation and allograft rejection. *Transplantation*. 2010 Mar 15;89(5):527-536.

Soria A, Boccaro D, Chonco L, Yahia N, Dufossée M, Cardinaud S, Moris A, Liard C, Joulin-Giet A, Julithe M, Mimoun M, Combadière B, Perrin H. Long-term maintenance of skin immune system in a NOD-Scid IL2ry(null) mouse model transplanted with human skin. *Exp Dermatol*. 2014 Nov;23(11):850-852.

Yan HC, Juhasz I, Pilewski J, Murphy GF, Herlyn M, Albelda SM. Human/severe combined immunodeficient mouse chimeras. An experimental in vivo model system to study the regulation of human endothelial cell-leukocyte adhesion molecules. *J Clin Invest*. 1993 Mar;91(3):986-996.

**Received:** 17 May 2017

**Accepted:** 25 May 2017

**Corresponding author:**

**Dr Béhazine Combadière**

Centre d’Immunologie et des Maladies Infectieuses CIMI-Paris

91 Boulevard de l’Hôpital

75013 Paris, France

**Tel.:** +33140779888

**Fax:** +33140779734

**E-mail:** [behazine.combadiere@upmc.fr](mailto:behazine.combadiere@upmc.fr)



# Long-term maintenance of skin immune system in a NOD-Scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> mouse model transplanted with human skin

Angèle Soria<sup>1,2,3</sup>, David Boccaro<sup>1,2,4</sup>, Louis Chonco<sup>1,2</sup>, Nora Yahia<sup>1,2</sup>, Mélody Dufossée<sup>1,2</sup>, Sylvain Cardinaud<sup>1,2,5</sup>, Arnaud Moris<sup>1,2,5</sup>, Christelle Liard<sup>1,2</sup>, Alix Joulin-Giet<sup>1,2</sup>, Marion Julithe<sup>1,2</sup>, Maurice Mimoun<sup>4</sup>, Béhazine Combadière<sup>1,2</sup> and Hélène Perrin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses Cimi-Paris, Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, UMR\_S CR7, Paris, France; <sup>2</sup>INSERM U1135, Cimi-Paris, Paris, France; <sup>3</sup>Service de dermatologie et allergologie, hôpital Tenon, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; <sup>4</sup>Service de chirurgie plastique, reconstructrice, esthétique, centre de brûlés, hôpital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; <sup>5</sup>CNRS ERL8255, Cimi-Paris, Paris, France

Correspondence: Béhazine Combadière, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses Cimi-Paris, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France, Tel.: +33140979887, Fax: +33140779734, e-mail: behazine.combadiere@upmc.fr

Béhazine Combadière and Hélène Perrin – co-last author.

**Abstract:** We developed a NOD-Scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> mouse model transplanted with human skin that brings fundamental insight on *in vivo* cellular mechanisms of intradermal immunization and antigen presentation by dermal dendritic and epidermal Langerhans cells for skin T-cell immunity. Indeed, T-cell immunity is a crucial checkpoint for the induction of *in vivo* rapid control of skin infection. With the long-term preservation of a complete human skin immune system, this model offers the unique opportunity not only to better understand mechanisms of skin immune response but also to test new compounds and devices for cutaneous routes of vaccination, as well as new therapeutics approach for skin diseases, allergies or infections.

**Abbreviations:** APC, antigen-presenting cell; DC, dendritic cell; HIV, human immunodeficiency virus; ID, intra-dermal; LC, Langerhans cell; MVA, modified vaccinia Ankara virus; NP, nanoparticle; NSG, non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 gamma chain receptor null (NOD-Scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> mice); pfu, plaque-forming unit; VZV, Varicella zoster virus.

**Key words:** humanised mice – intra-dermal immunization – NOD-Scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> – skin graft – skin-resident T cells

Accepted for publication 28 July 2014

## Background

As the primary protective barrier of the body, the skin plays a crucial role of immune surveillance through a highly diverse skin immune system. Epidermal and dermal skin layers are particularly rich in antigen-presenting cells (APCs): Langerhans cells (LCs) and several subsets of dermal dendritic cells (DCs) endowed with specific roles in capturing antigens, initiating and driving the appropriate adaptive immune response against antigen intrusion (1). Moreover, the skin contains nearly twice as many as the total number of blood circulating T cells (2). Skin-resident CD4 and CD8 T cells have mostly an effector/memory phenotype and thus can provide long-term immune protection after antigen exposure (s1). Thus, the skin appears as an interesting target for vaccination and maintenance of immune memory (3,4). However, mechanisms of immune responses in human skin are still poorly understood mainly because of the lack of a relevant model allowing long-term maintenance of intact skin immune system. If murine models are obviously very useful, they present several differences in skin thickness, permeability, hair follicle size and density and immune system (s2). On the other hand, *ex vivo* human skin explants do not allow tissue long-term maintenance. Therefore, most of the studies are performed on skin-emigrating immune cells after culture (s3). Reconstructed skin substitutes were also developed, however, without fully mimicking the complexity of the cutaneous tissue (5). 'Humanised mice', consisting of immunodeficient mice transplanted with human cells or tissues,

have emerged as powerful tools to investigate human immunology and diseases (6, s4-s6). Until now, most of the studies performed on such mice engrafted with human skin aimed to investigate rejection of allograft by co-engrafted blood cells (7-9), skin diseases or penetration by viruses or toxic compounds (s7-s10). However, these skin graft methods have not been designed to study skin immune response to antigen.

## Questions addressed

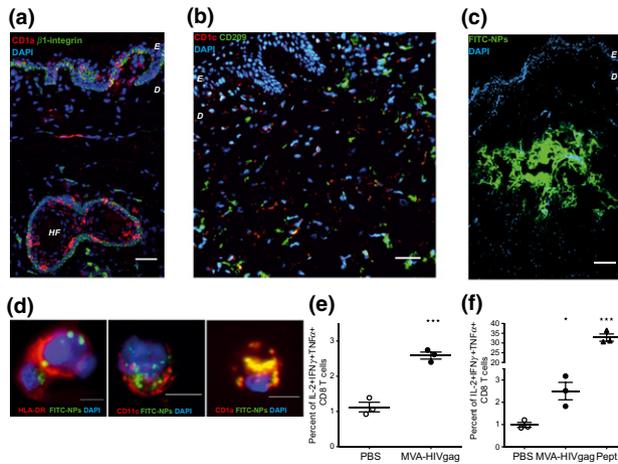
In order to study antigen-presenting cells and T-cell functions in the skin microenvironment, we need a relevant preclinical model that allows conservation of the whole epidermal and dermal skin layers. Here, we describe a model of mice transplanted with human skin that represents a crucial methodological step for studying skin immune responses and for testing new vaccination and therapeutic strategies.

## Experimental design

We have developed NOD-Scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> (NSG) mouse model transplanted with human skin to study skin immune cells *in vivo* behaviour and functions within 3-4 weeks post-engraftment. We propose a standard operating procedure where full-thickness 1 × 1 cm<sup>2</sup> of human skin samples are engrafted onto the back of NSG mice (Supporting information and Figure S1).

## Results

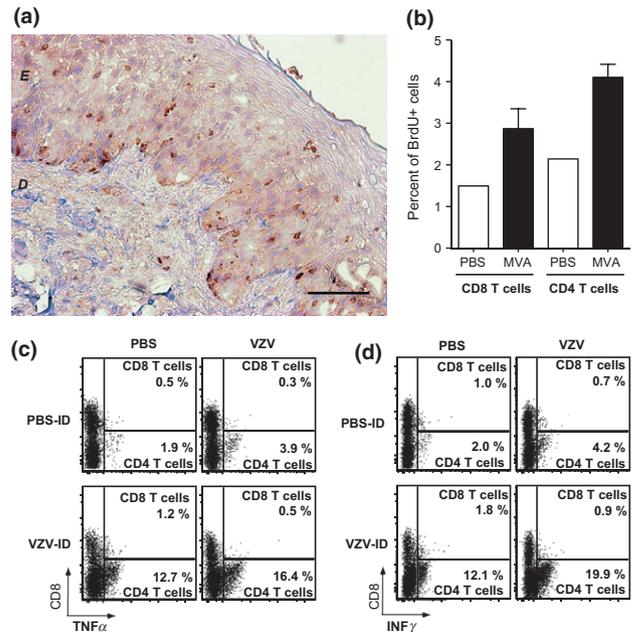
We observed very good skin integrity, its revascularisation (Figure S2) and its maintenance during several weeks after transplantation, without any sign of inflammation (Figure S3). Epidermal and



**Figure 1.** Antigen-presenting cells and cutaneous routes of vaccination in human skin xenograft. (a, b) Maintenance of skin structure and LCs and dermal DCs 3 weeks after engraftment onto NSG mice: 5  $\mu$ m skin cryosections were immunostained with blue DAPI and (a) anti-human-CD1a (in red) and anti-human- $\beta$ 1-integrin (in green) that lined the epidermis (E), hair follicles (HF) and dermis (D); (b) anti-human CD1c (in green) and anti-human CD209 (in red) that stain, respectively, dermal dendritic cells and macrophages. Scale bar = 50  $\mu$ m. (c) Accumulation of FITC-NPs (in green) into the human dermis close to surrounding dermal cells, 4 h after ID injection ( $10^{10}$  FITC-NPs). Scale bar = 100  $\mu$ m. (d) FITC-NPs (green) are detected inside HLA-DR+, CD11c+ and CD1a+ skin cells 4 h after ID administration: cells were extracted from whole skin graft by enzymatic and mechanical dissociation, coated on poly-L-lysine cover slides and immunostained with anti-human-HLA-DR, CD11c or CD1a (in red) and blue DAPI. Scale bar = 5  $\mu$ m. (e, f) SL9 clone 2, an HIV-specific CD8+ cytotoxic T cell clone, was used to evaluate HLA class I antigen presentation efficacy after overnight co-culture (ratio 1/1) with (e) dermal cells recovered from HLA-A02 engrafted skin 4 h after ID injection of MVA-HIV gag ( $1.10^7$  pfu) or PBS, or (f) epidermal cells from non-immunised graft pre-incubated for 4 h with MVA-HIV gag (1 pfu/cell) or PBS. HIV gag peptide (Pept, HIV gag SL9 peptide: SLYNTVATL, aa 75–83, 1  $\mu$ g/ml) was used as positive control. IL-2, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  production by CD8+ T cells was monitored by intra-cellular staining and flow cytometry ( $n = 3$  mice for each condition, bar represent mean  $\pm$  SEM, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  in non-parametric t-test compared to PBS negative control).

dermal skin layers, hair follicles, skin-resident cells including keratinocytes and resident CD1a+ epidermal LCs, CD1c+ dermal DCs and CD209 dermal macrophages were well preserved 3 weeks post-graft (Figures S3 and 1a,b). Hence, using engrafted mice at 2 to 4 weeks post-surgery, we showed the relevance of this model for studying antigen penetration and immune responses in human skin.

Fluorescent nanoparticles (FITC-NPs, 40 nm) were administered by intra-dermal (ID) injection to follow bio-distribution into the live human skin graft by immunohistology. Accumulation of FITC-NPs was observed near the site of injection into the dermis of the graft (Figure 1c), and FITC-NPs were detected inside HLA-DR+, CD11c+ and CD1a+ skin APC subsets as soon as 4 h after ID injection (Figure 1d). To further studying the capacity of epidermal and dermal cells to present antigen to T cells, we used a live-attenuated modified vaccinia Ankara virus encoding the gag protein of human immunodeficiency virus (MVA-HIV gag). HIV gag-specific CD8 T-cell clone (s11) was co-cultured with dermal cells from skin graft after ID injection (Figure 1e) or with epidermal cells after incubation with MVA-HIV gag (Figure 1f). CD8 T-cell activation was measured by IL-2, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  cytokines production. We showed that, 3 weeks after skin engraftment, skin APCs conserved their ability to uptake and process *in vivo* or *ex vivo* MVA-HIV gag and to induce antigen-specific CD8 T-cell response.



**Figure 2.** Skin graft-resident T cells immune response to antigens. (a) Maintenance of T cells within the epidermis (E) and dermis (D) 3 weeks after engraftment onto NSG mice: 5  $\mu$ m skin cryosections of engrafted human skin were immunostained with anti-human-CD3 (clone SP7) and with Ultra View universal DAB chromogen. Scale bar = 50  $\mu$ m. (b) Percent of proliferating BrdU+ CD8 and CD4 T cells induced by intra-dermal injection of MVA in human skin graft, compared to PBS-treated control. Three weeks postgraft,  $1.10^7$  pfu of MVA (or PBS as control) were injected intra-dermally, and NSG mice were injected intra-peritoneally 3 times 12 hours apart with 1 mg of BrdU. The following day, human skin cell suspension were recovered for flow cytometry staining, the percentages of BrdU+ within the live CD3+, CD8+ and CD4+ cell subsets in PBS and MVA ID treated skin graft. (bars represent mean  $\pm$  SEM; one experiment representative of 2 with  $n = 3$  mice). (c) TNF $\alpha$  and (d) IFN $\gamma$  production by skin graft T cells 4 h after VZV intra-dermal vaccination (VZV-ID): 135 pfu/50  $\mu$ l of Varicella live-attenuated vaccine (Varivax<sup>®</sup> Sanofi Pasteur MSD) or PBS (PBS-ID) was injected into the skin graft by ID route. Intra-cellular cytokine staining was performed on skin cell suspensions, after overnight *in vitro* stimulation with VZV (13.5 pfu) or PBS. Dot plots show the percentages of TNF $\alpha$ + and IFN $\gamma$ + CD8 and CD4 (CD8-) T cells within the live CD3+ T-cell subset, for one representative experiment of 3.

We also found that a significant number of tissue-resident T cells were maintained in the skin at 3 weeks post-enugraftment (Figure 2a). In order to analyse the functional capacities of skin graft-resident memory T cells, we performed ID injections of vaccinia (MVA) and Varicella zoster (VZV) live-attenuated viruses in engrafted skin. We demonstrated that 2 days after ID administration of MVA, both CD8 and CD4 T cells shown twofold increase in BrdU incorporation assessing of their *in vivo* proliferative capacities (Figure 2b). In addition, we showed that ID injection of VZV into the graft induced a rapid and significant secretion of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  by skin graft-resident CD4 T cells (Figure 2c,d). Our results demonstrated the *in vivo* persistence of fully functional antigen-specific T cells in the skin graft.

## Conclusions

This humanised NSG mouse model engrafted with human skin provides a long-term survival and functional maintenance of human skin immune system in a well-conserved tissue environment. It allows analysing *in vivo* antigen penetration in the tissue, antigen uptake and presentation by LCs and dermal DCs, local immune activation and skin-resident T-cell responses. With the

long-term preservation of a complete human skin immune system, this model offers the unique opportunity not only to better understand mechanisms of skin immune response but also to test new compounds and devices for cutaneous routes of vaccination, new therapeutic approaches for skin diseases, allergies or infections.

### Acknowledgements

AS, LC, NY, MD, SC, CL, AJG and MJ performed the research and analysed data. DB and MM provided skin explants. AM provided T-cell

clones. BC and HP designed the research, analysed data and wrote the manuscript. This study was funded by the European FP7 CUT<sup>H</sup>HIVAC program (grant agreement 241904), Fondation pour la Recherche Médicale and Société Française de Dermatologie. The authors thank S. Morosan and the staff members of 'Centre d'expérimentation fonctionnelle', B. Verrier for providing the MVA, Dr P. Moguelet and A. Rodenas (Tenon Hospital).

### Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

### References

- 1 Nestle F O, Di Meglio P, Qin J-Z *et al.* *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 679–691.
- 2 Mueller S N, Gebhardt T, Carbone F R *et al.* *Annu Rev Immunol* 2013; **31**: 137–161.
- 3 Combadière B, Vogt A, Mahé B *et al.* *PLoS ONE* 2010; **5**: e10818.
- 4 Combadière B, Liard C. *Hum Vaccin* 2011; **7**: 811–827.
- 5 Lebonvallet N, Jeanmaire C, Danoux L *et al.* *Eur J Dermatol* 2010; **20**: 671–684.
- 6 Shultz L D, Brehm M A, Garcia-Martinez J V *et al.* *Nat Rev Immunol* 2012; **12**: 786–798.
- 7 Racki W J, Covassin L, Brehm M *et al.* *Transplantation* 2010; **89**: 527–536.
- 8 Hemmerling J, Wegner-Kops J, von Stebut E *et al.* *J Immunol* 2011; **187**: 1142–1149.
- 9 Issa F, Hester J, Goto R *et al.* *Transplantation* 2010; **90**: 1321–1327.

### Supporting Information

Additional supporting data may be found in the supplementary information of this article:

**Figure S1.** Human skin graft method onto NSG mice.

**Figure S2.** Skin graft vascularization.

**Figure S3.** Cell viability and inflammatory status of the engrafted skin.

**Data S1.** Materials and methods.



# Analysis of the skin of mice humanized for the immune system

## Abstract

Development of new immunotherapeutic strategies relies on the ability to activate the right cells at the right place and at the right moment and on the capacity of these cells to home to the right organ(s). Skin delivery has shown high potency for immunotherapeutic administration. However, an adequate *in vivo* model of human skin immunity is still a critical bottleneck. We demonstrated here that the skin of human immune system mice is colonized by human hematopoietic cells, mainly human T cells and that complementation with human antigen-presenting cells at the vaccination site allowed the induction of an immune response.

## 1 | BACKGROUND

The skin, the largest organ of the human body, is the first line of protection against pathogens, physical and chemical injuries. It is a major immunological organ with an important density of antigen-presenting cells (APC),<sup>[1]</sup> able to capture pathogens through endocytic pathways and exhibiting cross-presentation ability. In addition, the skin tissue contains a large pool of T cells, mostly memory T cells expressing the skin-homing marker CLA (cutaneous lymphocyte antigen) and displaying long-term immune protection capacity.<sup>[2,3]</sup> These are features highly desirable for induction of vaccination and tissue maintenance of immune protection. We previously demonstrated that delivery of vaccine via the skin allows for the generation of a potent CD8 T-cell response and the induction of a humoral immune response in the mucosa.<sup>[4]</sup> However, the lack of an appropriate small animal model to study human skin immunity *in vivo* remains a major roadblock, which has been addressed by constructing mice humanized with human skin graft.<sup>[5]</sup> However, this mouse model is technically challenging to routinely establish. Alternatives exist with mice humanized for the human immune system (HIS).<sup>[6-8]</sup>

## 2 | QUESTIONS ADDRESSED

Human immune system mice represent an attractive tool to study ontogeny of cellular components of the human immune system *in vivo*. However, little is known about the skin compartment in these animals.

**Abbreviations:** APC, antigen-presenting cells; cDC, conventional dendritic cells; CLA, cutaneous lymphocyte antigen; hHPC, human hematopoietic progenitor cells; HIS, human immune system; MVA, modified vaccinia Ankara; pDC, plasmacytoid dendritic cells.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2017 The Authors. *Experimental Dermatology* Published by John Wiley & Sons Ltd

Here, we investigated colonization of the skin of HIS mice by human hematopoietic cells in order to establish a preclinical model to investigate vaccination and immunotherapeutic application via the skin route.

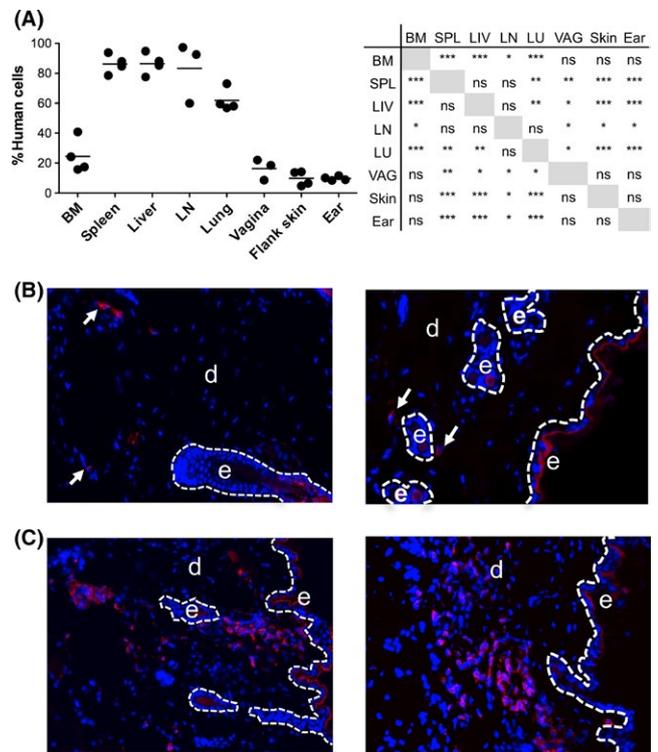
## 3 | EXPERIMENTAL DESIGN

HLA-A2 transgenic NSG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup> Tg(HLA-A2.1)1Enge/SzJ) mice were humanized (NSG-HLA-A2-HIS) with a single intra-hepatic injection of  $0.5 \times 10^5$ – $1.5 \times 10^5$  HLA-A2<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> human hematopoietic progenitor cells (hHPC) into sublethally irradiated newborn NSG-HLA-A2 mice (<5 days old). This led to a high-level engraftment of a human immune system with long-term maintenance capacity *in vivo*. NSG-HLA-A2-HIS mice were used as they demonstrated improved T-cell functionality after infection/immunization.

## 4 | RESULTS

We first evaluated by flow cytometry the level of human hematopoietic cell (hCD45<sup>+</sup>) engraftment in the skin as compared to various organs of NSG-HLA-A2-HIS mice. We observed a high level of hCD45<sup>+</sup> engraftment in the spleen, liver, lymph node (Figure 1A) and thymus of the animals (data not shown). The lung and bone marrow exhibited good to intermediate level of human hCD45<sup>+</sup> cells engraftment (Figure 1A), whereas the vagina and intestine (data not shown) were moderately colonized by human hematopoietic cells. This data were confirmed by histology (Fig. S1). In comparison, the skin from the flank and the ear was moderately engrafted with human CD45<sup>+</sup> cells, which were mostly located in the dermis (Figure 1B,C). The engraftment efficiency of human cells in the skin was time-dependent, with increasing human cell density in the skin of older animals (23–26 weeks old, Figure 1C) as compared to younger ones (12–13 weeks old, Figure 1B).

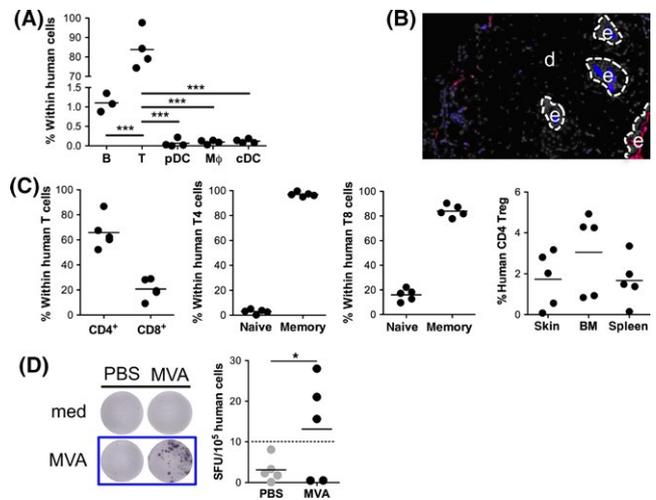
The human cells observed in the skin of the animals as well as in other mucosal tissues (eg lung, vagina) were mainly human T cells (Figure 2A,B), and only few human APC, in contrast to human skin explants (Fig. S2). The human T cells present in the skin were composed for two-third of human CD4<sup>+</sup> T cells and one-third of human CD8<sup>+</sup> T cells, which were both predominantly of memory phenotype (Figure 2C), similarly to what is observed in human skin explants (Fig. S2) and the HIS mice lymphoid organs (Fig. S3). A high fraction (~80%) of these human T cells expressed CLA allowing them to reside in the skin (Fig. S3). Interestingly, human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells



**FIGURE 1** Colonization of the skin of humanized mice by human cells (A) The frequency of human CD45<sup>+</sup> cells was determined for NSG-HLA-A2-HIS mice (n=4) in various organs by flow cytometry. Each symbol corresponds to an individual animal. BM: bone marrow, LN: lymph node. The paired t test analysis is presented in the table (ns: not statistically significant, \* < .05, \*\* < .01, \*\*\* < .001). (B) Representative 5 μm flank skin cryosections labelled with DAPI (blue) and anti-human CD45 (red) of 2 HLA-A2<sup>Tg</sup>-NSG-HIS mice of 14 weeks old and (C) 2 HLA-A2<sup>Tg</sup>-NSG-HIS mice of 26 weeks old. Magnification ×10. The arrows indicate the rare human CD45<sup>+</sup> cells present in the skin of 14-week-old animals. e: epidermis, d: dermis

(CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) were also identified in the skin of the animals at a frequency similar to the one observed in the spleen (Figure 2C).

We next immunized NSG-HLA-A2-HIS mice, intra-dermally, with MVA (Modified Vaccinia Ankara, 1 pfu/cell) or PBS control. No human T-cell response was detected by IFN-γ ELISPOT in the spleen of the animals (data not shown). Considering the size of the hAPC compartment in HIS mice and their critical role in the induction of T-cell responses, we speculated that hAPC density of at the site of administration (ie the skin) is potentially too low to optimally trigger T cells. We thus tested the capacity of human DC complementation in the skin of the NSG-HLA-A2-HIS mice,<sup>[9]</sup> deriving autologous human cDC from human CD14<sup>+</sup> cells isolated from the same cord blood than the hHPC used to reconstitute NSG-HLA-A2-HIS mice. Autologous umbilical cord blood CD14<sup>+</sup> monocytes were isolated by MACS and cultured for 3 days in presence of 50 ng/mL hGM-CSF and 5 ng/mL hIL-4. Autologous human monocyte-derived DC were loaded for 2 hours at 37°C with MVA or PBS. Next, NSG-HLA-A2-HIS mice were immunized intra-dermally in the flank with 0.5 × 10<sup>6</sup> matched human CD14<sup>+</sup>-derived MVA- or PBS-loaded DC loaded. A human



**FIGURE 2** Human cells present in the skin of humanized mice and vaccination via intra-dermal route. (A) The frequency of different human cell subsets—B cells (CD19<sup>+</sup>), T cells (CD3<sup>+</sup>), pDC (BDCA2<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>), monocytes (Mφ, CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), conventional DC (cDC, CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>HLADR<sup>+</sup>)—in the skin of NSG-HLA-A2-HIS mice (26–30 weeks old, n=4) was determined by flow cytometry. Each symbol corresponds to an individual animal. \*\*\*P < .001 (paired t test). (B) Representative 5 μm flank skin cryosection of NSG-HLA-A2-HIS mouse of 26 weeks old labelled with DAPI (white), anti-human CD3 (blue) and anti-human HLA-DR (red). Magnification ×20. e: epidermis, d: dermis. (C) Analysis of the human CD3<sup>+</sup> cells in the skin of NSG-HLA-A2-HIS mice (n=5) by flow cytometry. The expression of CD45RA defined the naive phenotype of the human T cells. (D) IFN-γ ELISPOT analysis of MVA-specific human T cells responses in the spleen of NSG-HLA-A2-HIS mice (32 weeks old) on day 7 after intra-dermal injection of 5 × 10<sup>5</sup> autologous human monocyte-derived DC loaded with MVA (1 pfu/cell) or PBS in the flank of the animals. Total splenocytes of MVA- or PBS-immunized NSG-HIS mice were incubated with medium (med) or MVA for 40 hours and analysed by ELISPOT assay. The graph represents the number of spot-forming unit (SFU) counted in the MVA stimulated well minus the ones counted in the medium stimulated well and according to the frequency of human CD45<sup>+</sup> cells in the spleen of each vaccinated animals. \*P = .019 (chi-square test)

T-cell response was observed 7 days after immunization by IFN-γ ELISPOT in the spleen of the MVA-vaccinated animals (Figure 2D), with significantly more responder animals (3/5) than in the control group (0/5) (chi-square test, P = .019).

## 5 | CONCLUSIONS

We demonstrated here that the skin of HIS mice is colonized by human hematopoietic cells, mainly human T cells expressing CLA and exhibiting a memory phenotype. Complementation with human APC at the vaccination site allowed the induction of an immune response. This highlighted the potential of the HIS mice has an innovative preclinical model for human skin immunity as well as for prospective analysis of vaccination via skin route, and notably DC therapies. As such, this will also generate knowledge on understanding the early events following immunotherapeutic

administration and support demands for in vivo biomodelling of the interaction of immunotherapeutic with the human immune system.

## ACKNOWLEDGEMENTS

MC, MP, AJH, MD and AS performed research; DB and MM provided human materials. MC and BC designed the research, analysed data and wrote the manuscript. Dr Centlivre was supported by a FRM postdoctoral fellowship (SPF20121226281) and Dr Combadière received EU-FP7 CUTHIVAC (no. 241904) and FRM fundings. We thank Dr Morosan for animal facility and Dormeur Foundation, Vaduz, for providing AID EliSpot Reader and Cryostat HM550 apparatus and Dr Verrier for providing MVA.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare they have no conflict of interests.

## Keywords

antigen-presenting cells, human immune system mice, intra-dermal vaccination, route of administration, skin T cells

Mireille Centlivre<sup>1,2</sup>

Maxime Petit<sup>1,2</sup>

Andrew J. Hutton<sup>1,2</sup>

Méloody Dufossée<sup>1,2</sup>

David Boccarda<sup>1,2,3</sup>

Maurice Mimoun<sup>3</sup>

Angèle Soria<sup>1,2,4</sup>

Béhazine Combadière<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>UMR\_S CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses- Paris (CIMI-Paris), Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, Paris, France

<sup>2</sup>INSERM U1135, CIMI-Paris, Paris, France

<sup>3</sup>Service de Chirurgie Plastique, Reconstructrice, Esthétique, Centre de Brûlées, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

<sup>4</sup>Service de Dermatologie et Allergologie, Hôpital Tenon, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

## Correspondence

Béhazine Combadière,

Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses CIMI-Paris, Paris,

France.

Email: behazine.combadiere@upmc.fr

## REFERENCES

- [1] T. S. Kupper, R. C. Fuhlbrigge, *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 211.
- [2] R. A. Clark, *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130*, 362.
- [3] S. N. Mueller, T. Gebhardt, F. R. Carbone, W. R. Heath, *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31*, 137.
- [4] C. Liard, S. Munier, M. Arias, A. Joulin-Giet, O. Bonduelle, D. Duffy, R. J. Shattock, B. Verrier, B. Combadière, *Vaccine* **2011**, *29*, 6379.
- [5] A. Soria, D. Boccarda, L. Chonco, N. Yahia, M. Dufosse, S. Cardinaud, A. Moris, C. Liard, A. Joulin-Giet, M. Julithe, M. Mimoun, B. Combadière, H. Perrin, *Exp. Dermatol.* **2014**, *23*, 850.
- [6] N. Legrand, K. Weijer, H. Spits, *J. Immunol.* **2006**, *176*, 2053.
- [7] A. Rongvaux, H. Takizawa, T. Strowig, T. Willinger, E. E. Eynon, R. A. Flavell, M. G. Manz, *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31*, 635.
- [8] L. D. Shultz, M. A. Brehm, J. V. Garcia-Martinez, D. L. Greiner, *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 786.
- [9] G. Salguero, A. Daenthanasamak, C. Münz, A. Raykova, C. A. Guzmán, P. Riese, C. Figueiredo, F. Länger, A. Schneider, L. Macke, B. S. Sundarasetty, T. Witte, A. Ganser, R. Stribeck, *J. Immunol.* **2014**, *192*, 4636.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

**Figure S1.** Human cells engraftment in various organs of NSG-HLA-A2-HIS mice

**Figure S2.** Analysis of cell subsets in human skin explant

**Figure S3.** Analysis of human T cells in the lymphoid organs of NSG-A2-HIS mice



## **IL-32 promotes detachment and activation of human Langerhans cells in a human skin explant model.**

Jessica Gonnet<sup>1</sup>, Hélène Perrin<sup>1</sup>, Andrew John Hutton<sup>1</sup>, David Boccara<sup>1,2</sup>, Olivia Bonduelle<sup>1</sup>, Maurice Mimoun<sup>2</sup>, Michaël Atlan<sup>3</sup>, Angèle Soria<sup>1,4</sup> and Béhazine Combadière<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Sorbonne Universités UPMC université Paris 06 UMRS CR7, Inserm U1135, CNRS ERL 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses-Paris (Cimi-Paris), 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

<sup>2</sup> Service de chirurgie plastique reconstructrice, esthétique, centre des br ul es, Hopital Saint-Louis, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France.

<sup>3</sup> Service de chirurgie plastique reconstructrice et esthétique, Hôpital Tenon, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), 4 Rue de la Chine, 75020 Paris, France.

<sup>4</sup> Service de Dermatologie et d'Allergologie, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine 75020 Paris, Hôpitaux Universitaire Est Parisien (HUEP), Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP)

**\*Corresponding author:** Dr Béhazine Combadière, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses CIMI-Paris, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Phone: +33140779888, Fax: +33140779734, E-mail: [behazine.combadiere@upmc.fr](mailto:behazine.combadiere@upmc.fr)

**Running title:** IL-32 induces Langerhans cells activation in human skin

**Funding sources:** This project has received funding from the European Union's Seventh Program for research, technological development and demonstration under grant agreement N o 241904, CUT'HIVAC (Cutaneous and mucosal HIV vaccination) and Agence National de Recherche (CE-16-0024-01). B. Combadière is a recipient of Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM 2013" funding award. The authors are grateful to the Dormeur Foundation, and Vaduz for providing the Cryostat HM550 apparatus.

**Conflicts of Interest:** The authors have no financial conflicts of interest.

**Manuscript word:** 2470 words

**Figure count:** 3 figures

**What's already known about this topic?**

Langerhans cells dendrites shortening, morphological changes and migration to the draining lymph nodes is a major step allowing initiation of adaptive immunity. Langerhans cells and keratinocytes interactions involve the regulation of adhesion molecules expression. Keratinocytes produce IL-32 in pathological inflammatory disorders such as atopic dermatitis. We questioned the role of IL-32 on the Langerhans cell behavior in response to external stimuli.

**What does study add?**

In response to danger signals in non-pathological skin, keratinocytes produce IL-32. The level of IL-32 production is dependent of TLR-ligand stimulation pathways. IL-32-produced by keratinocytes or alone promotes initial steps of Langerhans cells migration from the epidermis to the dermis. This step contributes to Langerhans cells activation, decreased surface expression of adhesion molecules and a slight but significant increase in CXCL10 production.

**What is the translational message?**

Our work proposes IL-32 as a molecular link between keratinocytes and Langerhans cells in healthy skin, which could be exacerbated in pathological conditions during skin barrier disruption such as atopic dermatitis, hidradenitis suppurativa, and alopecia areata.

**Abbreviations:**

EpCam: Epithelial cell adhesion molecule

KCs: keratinocytes

i.d.: intradermal

LCs: Langerhans cells

MVA: Modified Vaccinia Ankara virus

rhIL-32  $\gamma$ : human recombinant IL-32  $\gamma$  isoforms

siRNA: small interfering RNA

t.c.: transcutaneous

TLRs: Toll-like receptors

## **ABSTRACT**

**Background:** Cross-talk between skin keratinocytes (KCs) and Langerhans cells (LCs) plays a fundamental role at the first line of body defense. However, the mechanism behind the interaction between these two major epidermal cells is unknown. IL-32 is produced in skin inflammatory disorders. We questioned its role in the epidermis.

**Objectives:** We aimed to determine the role of IL-32 produced by KCs on surrounding LCs.

**Methods:** We used an ex vivo human explant model from healthy donors and investigated by imaging, flow cytometry, RT-qPCR and small interfering RNA treatment, the role of IL-32 on LC activation.

**Results:** Modified-Vaccinia Ankara virus (MVA) infection induced KC death alongside the early production of a pro-inflammatory cytokine, IL-32. We demonstrated that IL-32 produced by MVA-infected KCs induced a modest however significant LC morphological changes and down-regulation of adhesion molecules such as EpCam and VLA-4, and CXCL10 production. KCs treatment with IL-32-specific small interfering RNA (siRNA) significantly inhibited LC activation demonstrating the role of IL-32 in LC activation. We also found that some TLR ligands induced a very high level of IL-32 production by KCs, initiating LC activation.

**Conclusion:** We propose for the first time, IL-32 as a molecular link between keratinocytes and Langerhans cells in healthy skin, provoking Langerhans cells migration from the epidermis to the dermis prior their migration to the draining lymph nodes.

## INTRODUCTION

Epidermal cells play a fundamental role in cutaneous innate immunity, providing both a physical barrier via tight junction formation and a chemical barrier via the production of antimicrobial peptides and proteases production (1, 2). CD45<sup>neg</sup> keratinocytes (KCs) make up to 90% of this epidermal cell population, where they exist alongside the more scarce (1-5% of total epidermal cells) Langerhans cells (LCs) population (3), specialized antigen-presenting cells characterized by CD45, CD1a, CD1c and HLA-DR expression. Together, KCs and LCs form a challenging strong barrier to fight pathogen entry. Skin barrier disruption provokes the local production of pro-inflammatory cytokines and chemokines by KCs bridges innate to adaptive immunity via LCs (4, 5). In this regard, production of cytokines and chemokines by KCs and LCs was observed being involved in many skin disorders (6–9) and more particularly, IL-32, a pro-inflammatory cytokine produced by KCs (10, 11). However, the impact of local production of IL-32 on LC has not been explored. Here, we questioned whether IL-32 produced by KCs could impact LCs behavior during microbial insults.

LC activation is characterized by the up-regulation of co-stimulatory molecules such as CD80 and HLA-DR as well as the release of pro-inflammatory cytokines/chemokines including CXCL10 (12–14). In addition, activated LCs change their morphology by shortening of dendrite size in response to Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) intradermal (i.d.) administration (15). So, called ‘en route’ LCs, start migrating to the draining the lymph nodes (15). They also exhibit an altered expression of adhesion molecules, including VLA-4, EpCam and E-cadherin (16–18). We recently demonstrated that LC migration from skin to the draining lymph nodes allows the priming of CD4 and CD8 responses observed after i.d. and transcutaneous (t.c.) application of vaccines (19–22). However, local epidermal events initiating the activation of LCs remain to be studied.

Herein, we used a human skin explant model to investigate the role of a pro-inflammatory cytokine, IL-32, as a molecular link between stimulated KCs and LCs. We demonstrated that IL-32 leads to LC activation as shown by morphological changes, detachment from the epidermal layer and the production of chemotactic CXCL10.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Human skin explant collection and preparation**

Human skin samples were obtained from healthy volunteers undergoing plastic surgery for breast, abdomen or face lift (Service de chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique-Centre de traitement des brûlés, Saint-Louis hospital, Paris, France and centre de chirurgie plastique et reconstructrice, Tenon hospital, Paris, France). All skin samples were taken after informed consent according to the local Institutional Ethics Committee guidelines (IRB 00003835) and ethical rules stated in the Declaration of Helsinki Principle. Immediately after surgical excision, skin samples were conserved in NaCl and processed rapidly.

### **Skin administration**

Skin explant i.d injections were performed using the Mantoux method. For t.c immunization, cyanoacrylate skin surface stripping (CSSS) was performed as previously described (19). Wild-type MVA and recombinant strain MVA expressing GFP protein were provided by B. Verrier (Lyon, France), and R. Wagner (Wuppertal, Germany) and were used at  $10^7$  pfu/cm<sup>2</sup> of skin. Pam3CSK4 and Imiquimod TLRs ligands (Invivogen, San Diego, California, USA) and rhIL-32 $\gamma$  (R&D, Minneapolis, Minnesota, USA) were used as indicated.

### **Human skin cells suspension**

Fresh skin samples were prepared as previously described (15, 23) to separate epidermal sheets from the dermis. Epidermal cell suspensions were obtained by trypsin (trypsin-EDTA 0.2%, Sigma-Aldrich) treatment, supplemented with DNase I (10  $\mu$ g/mL, Roche, Boulogne Billancourt, France) in RPMI 1640 during 10 minutes. Fetal Calf Serum (FCS, Dominique Dutscher, Brumath, France) was then added. Cell suspensions were prepared as previously described for Keratinocytes and Langerhans cells sorting using a CD1c dendritic cell isolation Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) (85% and 99.3% purified LCs and KCs, respectively). For *in vitro* experiments, we used MVA (1 pfu/cell), TNF- $\alpha$  (200 ng/mL, R&D), rhIL-32 $\gamma$  (50 ng/mL, R&D), small interfering (si)RNA IL-32, and scrambled siRNA (1nM, 10 nM). For transfection, polyamines for delivering siRNA into human epidermal cell suspension were used (siPORT<sup>TM</sup> Amine Transfection Agent; Ambion) according to the manufacturer's instructions. TLRs ligands

(Invivogen, USA) were used as per the supplier's guidelines. Pam3CSK4 (20 µg/mL), HKLM (10<sup>8</sup> cells/mL), Poly (I :C) LMW (20 µg/mL), Poly (I :C) HMW (20 µg/mL), LPS (10 µg/mL), Flagellin (10 µg/mL), Imiquimod (10 µg/mL), ssRNA-40 (10 µg/mL), ODN2006 (5 µM).

### **Flow cytometry**

Skin cell suspensions were stained using anti-human CD1a APC, CD1c PE-Cy7, Epcam FITC, VLA-4 PE-Cy5, E-cadherin PE-Cy7, CD45-FITC or AlexaFluor700 (BD biosciences), CD80 APC-H7, HLA-DR BV785 (Biolegend, London, UK) and Aqua blue Live/Dead fixable dead cell stain (Molecular-Probes, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) as per the manufacturers' instructions. For intracellular staining (23), cells were treated and incubated at indicated time point with brefeldin (0.5 µg/mL, Sigma-Aldrich). Then, a biotinylated anti-human IL-32αβγδ (Biolegend) and streptavidin APC (BD biosciences) and anti CXCL10-PE were used. Cells were run using FACS Canto and Fortessa LSR II (BD biosciences). Samples were analyzed on 5.10<sup>4</sup> VIVID<sup>neg</sup> lived cells approximately using Diva and FlowJo software.

### **Immunohistology**

Treated skin tissue samples and untreated skin, as a negative control, were frozen in OCT compound (Tissue-Tek, Sakura, Leiden, Belgium) for cryopreservation and cryosections of 5 µm were prepared with a Microm HM550 cryostat (Microm Microtech, Brignais, France) and fixed as previously described (15).

Slides of skin sections, epidermal sheets, and epidermal cell, were stained as previously described using: anti-CD1a (Dako products, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), anti-IL-32αβγδ (Biolegend), and anti-human ASC (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) and isotype-matched control antibody in PBS-BSA-0.1% saponin. Slides were washed with PBS 1X followed by Goat anti-mouse IgG1-, IgG2a-Alexa Fluor 488, 594, and 647 (Invitrogen) and goat anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488, and 594 (Invitrogen) incubation and mounted with Vectashield mounting medium containing DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Slides were analyzed using BX51 Olympus and Axio Z1 Zeiss fluorescence microscopes and with respectively image processing and analysis Qimaging and Zen software (Media Cybernetics Inc, Silver Spring, MD, USA). All images were processed using ImageJ software.

**Statistical analysis**

Prism-6 software was used for data handling, analysis, and graphic representations. For statistical analyses, we used non-parametric Wilcoxon matched paired rank test to assess the significance of the modifications induced per individual or unpaired t-test. One-way ANOVA was used before t-test for multiple comparisons. Significance was set at p-value <0.05.

## RESULTS

### **IL-32 produced by MVA-infected KCs contributes to rapid activation of Langerhans cells promoting CXCL10 production**

We have previously demonstrated that epidermal exposure to MVA resulted in dendrites retraction on CD1a<sup>pos</sup> LCs and their activation (15). To further explore the impact of KCs on LC activation, we sorted KCs from the fresh human skin epidermal layer and infected them with MVA (1pfu/cell) 3 h prior to the addition of LCs. We investigated the expression of CD80 co-stimulatory molecules, HLA-DR as well as CXCL10 production which are indicators of LC activation in response to danger signals (12, 14, 24, 25). We observed a significant increase of 2 fold in the percentage of CXCL10-producing LCs along with a slight, but significant increase in CD80 and HLA-DR expression, at 24 h post co-culture of LCs with MVA-treated KCs compared to controls (Figure 1a, n=5 donors, \*p<0.05). These data were confirmed by RT-qPCR and revealed that among CXCR3-binding chemokines (CXCL4, CXCL9, CXCL10 and CXCL11), only CXCL10 was significantly higher in the epidermis (data not shown).

KCs are known to produce pro-inflammatory factors, including IL-32, in atopic dermatitis (10). Using immunofluorescence microscopy, we found that CD1a<sup>neg</sup> KCs produced IL-32 at 4 h post-MVA infection compared to control media (Figure 1b). We did not detect any IL-32 in CD1a<sup>pos</sup> LCs (Figure 1b). The frequency of IL-32 producing KCs were counted and represented in figure 1c. We found a 2-fold increase in IL-32 production by KCs (Figure 1c, n=5 donors, \*p<0.05). This result was confirmed by measurement of IL-32 mRNA expression in epidermal cells as shown in supplemental Figure 1a. Thus, upon MVA stimulation, a modest but significant increase in IL-32 was detectable at both protein and mRNA levels.

In order to block IL-32 production, epidermal cells were treated with small interfering RNA (siRNA) targeting IL-32 or scrambled RNA control, prior to MVA stimulation (Supplemental Figure 1). We found that IL-32 siRNA abrogated IL-32 production at the transcriptional level by RT-qPCR (Supplemental Figure 1a, n=5 donors) and at the protein level on KCs as analyzed by flow cytometry (Supplemental Figure 1b left panel, n=5 donors). IL-32 specific siRNA treatment significantly decreased the proportion of IL-32<sup>pos</sup> KCs in a dose-dependent manner, compared to scrambled siRNA controls using immunofluorescence microscopy (Supplemental Figure 1c-d, n=3 donors). In addition, we confirmed that LCs do not

produce any IL-32 in any condition as assessed by flow cytometry (Supplemental Figure 1b right panel, n=5 donors) and immunofluorescence analyses (Supplemental Figure 1c).

We then examined CXCL10 production as a marker of LC activation, after IL-32-specific siRNA treatment of epidermal cells. We found a significant decrease of CXCL10-producing LCs after IL-32-specific siRNA treatment at 24 h following MVA infection compared to scrambled siRNA by flow cytometry analysis (Figure 1d, n=5 donors, \*p<0.05).

Thus, the modest IL-32 production by KCs induced LC activation as assessed by CXCL10 production, which is abrogated by IL-32 siRNA treatment.

### **IL-32 induces detachment of Langerhans cells from the epidermis layer allowing their migration**

We then evaluated the impact of human recombinant IL-32 $\gamma$  protein (rhIL-32 $\gamma$ ) and MVA treatment compared to PBS treatment of epidermis on LC morphology using immunofluorescence microscopy (Figure 2a, representative immunofluorescence imaging). Both rhIL-32 $\gamma$  and MVA stimulation of epidermis compared to PBS treatment, significantly induced shortening of CD1a<sup>pos</sup> LCs dendrite size at 4 h post-transcutaneous (t.c.) application or intradermal (i.d.) injection (Figure 2a, n= 3 donors, 5 fields, \*\*\*\*p<0.0001, \*\*p<0.01, \*p<0.05). We have previously demonstrated that such shape-changes represent an early activation step prior to LCs migrating to the dermis and draining lymph nodes for CD8<sup>pos</sup> T cell priming (15).

A critical step in this process is the regulation of adhesion molecules on the surface of the LCs, permitting their detachment from the KC layers. As shown in Figure 2b, IL-32 $\gamma$  induced a significant down-regulation of LCs surface expression of EpCam (Figure 2b, left panel, n=5 donors, \*p<0.05) and VLA-4 expression (Figure 2b, right panel, n=5 donors, \*p<0.05) at 4 h post-rhIL-32 $\gamma$  treatment of epidermal cells. We did not observe any modulation of these adhesion molecules on KCs (data not shown). E-cadherin expression on KCs and LCs were also analyzed however without any significant changes (data not shown).

Collectively, we demonstrated that IL-32 $\gamma$  plays a crucial role in the activation of Langerhans cells, expression of adhesion molecules and morphological modifications allowing the acquisition of ‘en route LCs’ phenotype.

## **Innate sensors induce IL-32 production by KCs together with LCs morphological changes and CXCL10 production**

We found that MVA treatment was significant but modest on IL-32 production. Thus, we examined the effect of TLR-agonists on IL-32 production by KCs (Figure 3a) and consequently on LC morphological modification (Figure 3b). Surprisingly, TLR-1/2 (Pam3CSK4), TLR-2 (HKLM), TLR-7 (Imiquimod), and TLR-9 (ODN 2006) agonists treatment induced a significant and very high production of IL-32 by KCs using flow cytometry analysis (Figure 3a, n=5 donors, \* $p < 0.05$ ). These TLR agonist induced average of 3 to 20-fold increase in IL-32 production by KCs. Of note, MVA and TLR-4 (LPS) agonist stimulation induced similar level of IL-32 production by KCs. IL-32 production was lower after Flagellin, ssRNA, and (Poly(I:C)) stimulation (Figure 3a). In addition, both Pam3CSK4 and Imiquimod induced a significant increase of number of round-shape LCs (Figure 3b, n=3 donors, 5 fields, \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). However, one cannot exclude the direct effect of TLR agonists on LC during epidermal layer treatments. The fact that IL-32 $\gamma$  treated epidermis also induced LC morphological changes as shown in Figure 2a strongly suggest that TLR-Ligand effect on IL-32 production on KCs would in turn activate LCs.

In order to test the impact of TLR agonists treated KC on LC activation, we sorted KCs and LCs prior treatment (Figure 3c). CXCL10 production by LCs was modest however significantly higher when KCs are treated Pam3CSK4 compared untreated control (Figure 3c, n=5 donors, \* $p < 0.05$ ). The percent of CXCL10 expression LCs is similar to MVA treatment (Figure 1). These results indicate that IL-32 production by KCs and subsequent LC activation may be elicited by specific PAMPs receptor activation as well as MVA infection and could be a feature of skin reaction to innate sensors.

## DISCUSSION

Inflammatory skin disorders such as atopic dermatitis, alopecia areata and hidradenitis suppurativa have observed IL-32 production in skin suggesting that IL-32 production plays a critical role in skin diseases (10, 11, 26). To improve the comprehension of molecular mechanisms allowing LCs activation in the epidermal layers, we have investigated the role of IL-32 in the epidermis. We first showed that the major cell population producing IL-32 in the skin, are KCs. We demonstrated for the first time that stimulation of KCs by MVA and several TLR agonists induce IL-32 production that in turn promotes LC activation as assessed by CXCL10 production, morphological changes and down-regulation of cellular adhesion molecules. We showed that IL-32-specific siRNA in KCs strongly inhibited IL-32 expression and consequently LC activation. As proposed by others (27), LC production of CXCL10 due to IL-32 stimulation may condition the local microenvironment skin-resident T cells skin tissue positioning. Other pro-inflammatory cytokines including TNF- $\alpha$ , IL-12p70 and IFN- $\gamma$ , have been observed at latter time points in Vaccinia virus (VV) infection of human primary KCs (12, 28). Thus, we proposed IL-32 as the initial link between KCs and LCs in the response to pathogens that could be exacerbated in pathological skin disorders.

In addition, IL-32 is known to be produced but not secreted by KCs (26, 27). Under these circumstances, induced cell death may serve to release IL-32 into the local microenvironment (31). Interestingly, we found that MVA infection of KCs up-regulates apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) that could contribute to the release of IL-32 (Supplemental Figure 2, n=5 donors, \*p<0.05). Through the expression of innate receptors, KCs and LCs are able to sense pathogen penetration and danger signals (32). MyD88-deficiency in KCs directly impairs LCs migration after antigen exposure (33) demonstrating that LCs migration to the dermis is directly dependent of the MyD88/NF- $\kappa$ B pathway in KCs. In accordance, we found that several TLR agonists (such as Pam3CSK4/TLR1-2 and Imiquimod/TLR-7) induced IL-32 production by KCs and LC activation including LC morphological modification.

Finally, IL-32 exists in four main isoforms that originate from the splicing of the  $\gamma$  isoform (31, 32). Most studies on IL-32 have been performed on blood cells as illustrated by the effect of IL-32 upon blood-derived DC populations in upregulation of co-stimulatory molecules (36). Although the  $\gamma$  and  $\beta$  isoforms have been associated with anti-inflammatory functions including reduced cell activation and proliferation, cytotoxic function in the blood (37), and

increased IL-10 production (38), the majority of studies define a pro-inflammatory character for IL-32 (36, 39, 40). Finally, IL-32 has been proposed as a biomarker of skin inflammation in Atopic Dermatitis (AD), alopecia areata, and hidradenitis suppurativa (10, 11, 26). The analysis of IL-32 isoforms mRNA expression in skin biopsies from three skin disorders (hidradenitis suppurativa, psoriasis and AD) compared to healthy donors, revealed that all main IL-32 isoforms are expressed in skin but in different levels depending on skin disorders origins (11). Further studies are required to analyze the contribution of each isoforms in LC activation. Meyer et al. also showed that high serum levels of IL-32 correlate with disease severity, highlighting its potential relevance in skin immunity (10). Here, we demonstrated the role of IL-32 in LC activation, bringing new insight into the cross-talk between KCs and LCs and linking innate to adaptive immunity.

## **Acknowledgements**

We thank Pierre-Emeric Payet and Diana Milicevic for their technical help and Mia Rozenbaum (T'Saisque) for English editing.

## REFERENCES

1. Nestle, F. O., P. Di Meglio, J.-Z. Qin, and B. J. Nickoloff. 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* .
2. Maintz, L., and N. Novak. 2011. Modifications of the Innate Immune System in Atopic Dermatitis. *J. Innate Immun.* 3: 131–141.
3. Romani, N., B. E. Clausen, and P. Stoitzner. 2010. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev.* 234: 120–141.
4. Pastore, S., E. Fanales-Belasio, C. Albanesi, L. M. Chinni, A. Giannetti, and G. Girolomoni. 1997. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J. Clin. Invest.* 99: 3009.
5. Dieu-Nosjean, M.-C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, W.-H. Fridman, and C. Caux. 2001. IL-10 Induces CCR6 Expression During Langerhans Cell Development While IL-4 and IFN- $\gamma$  Suppress It. *J. Immunol.* 167: 5594–5602.
6. Fujita, H., A. Shemer, M. Suárez-Fariñas, L. M. Johnson-Huang, S. Tintle, I. Cardinale, J. Fuentes-Duculan, I. Novitskaya, J. A. Carucci, J. G. Krueger, and E. Guttman-Yassky. 2011. Lesional dendritic cells in patients with chronic atopic dermatitis and psoriasis exhibit parallel ability to activate T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128: 574–582.e12.
7. Yoshida, K., A. Kubo, H. Fujita, M. Yokouchi, K. Ishii, H. Kawasaki, T. Nomura, H. Shimizu, K. Kouyama, T. Ebihara, K. Nagao, and M. Amagai. 2014. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134: 856–864.
8. Miyano, K., S. Matsushita, T. Tsuchida, and K. Nakamura. 2016. Inhibitory effect of a histamine 4 receptor antagonist on CCL17 and CCL22 production by monocyte-derived Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 43: 1024–1029.
9. Richmond, J. M., D. S. Bangari, K. I. Essien, S. D. Currimbhoy, J. R. Groom, A. G. Pandya, M. E. Youd, A. D. Luster, and J. E. Harris. 2016. Keratinocyte-derived chemokines orchestrate T cell positioning in the epidermis during vitiligo and may serve as biomarkers of disease. *J. Invest. Dermatol.* .
10. Meyer, N., M. Zimmermann, S. Bürgler, C. Bassin, S. Woehrl, K. Moritz, C. Rhyner, P. Indermitte, P. Schmid-Grendelmeier, M. Akdis, G. Menz, and C. A. Akdis. 2010. IL-32 is

expressed by human primary keratinocytes and modulates keratinocyte apoptosis in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 858–865.e10.

11. Thomi, R., D. Yerly, N. Yawalkar, D. Simon, C. Schlapbach, and R. E. Hunger. 2017. Interleukin-32 is highly expressed in lesions of hidradenitis suppurativa. *Br. J. Dermatol.* .

12. Berthier-Vergnes, O., F. Bermond, V. Flacher, C. Massacrier, D. Schmitt, and J. Péguet-Navarro. 2005. TNF- $\alpha$  enhances phenotypic and functional maturation of human epidermal Langerhans cells and induces IL-12 p40 and IP-10/CXCL-10 production. *FEBS Lett.* 579: 3660–3668.

13. Peiser, M., J. Koeck, C. J. Kirschning, B. Wittig, and R. Wanner. 2008. Human Langerhans cells selectively activated via Toll-like receptor 2 agonists acquire migratory and CD4+T cell stimulatory capacity. *J. Leukoc. Biol.* 83: 1118–1127.

14. Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P. S. Wasan, X.-N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R. F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J. K. Y. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* 37: 60–73.

15. Liard, C., S. Munier, A. Joulin-Giet, O. Bonduelle, S. Hadam, D. Duffy, A. Vogt, B. Verrier, and B. Combadière. 2012. Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *J. Invest. Dermatol.* 132: 615–625.

16. Aiba, S., S. Nakagawa, H. Ozawa, K. Miyake, H. Yagita, and H. Tagami. 1993. Up-regulation of alpha 4 integrin on activated Langerhans cells- analysis of adhesion molecules on Langerhans cells relating to their migration from skin to draining lymph nodes..pdf. *J. Invest. Dermatol.* .

17. Gaiser, M. R., T. Lammermann, X. Feng, B. Z. Igyarto, D. H. Kaplan, L. Tessarollo, R. N. Germain, and M. C. Udey. 2012. Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: E889–E897.

18. Puttur, F. K., M. A. Fernandez, R. White, B. Roediger, A. L. Cunningham, W. Weninger, and C. A. Jones. 2010. Herpes Simplex Virus Infects Skin T Cells before Langerhans Cells and Impedes Migration of Infected Langerhans Cells by Inducing Apoptosis and Blocking E-

Cadherin Downregulation. *J. Immunol.* 185: 477–487.

19. Vogt, A., B. Combadiere, S. Hadam, K. M. Stieler, J. Lademann, H. Schaefer, B. Aufran, W. Sterry, and U. Blume-Peytavi. 2006. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, Nanoparticles Enter Epidermal CD1a+ Cells after Transcutaneous Application on Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 126: 1316–1322.

20. Mahe, B., A. Vogt, C. Liard, D. Duffy, V. Abadie, O. Bonduelle, A. Boissonnas, W. Sterry, B. Verrier, U. Blume-Peytavi, and others. 2009. Nanoparticle-based targeting of vaccine compounds to skin antigen-presenting cells by hair follicles and their transport in mice. *J. Invest. Dermatol.* 129: 1156–1164.

21. Combadière, B., A. Vogt, B. Mahé, D. Costagliola, S. Hadam, O. Bonduelle, W. Sterry, S. Staszewski, H. Schaefer, S. van der Werf, C. Katlama, B. Aufran, and U. Blume-Peytavi. 2010. Preferential Amplification of CD8 Effector-T Cells after Transcutaneous Application of an Inactivated Influenza Vaccine: A Randomized Phase I Trial. *PLoS ONE* 5: e10818.

22. Levin, C., O. Bonduelle, C. Nuttens, C. Primard, B. Verrier, A. Boissonnas, and B. Combadière. 2017. Critical role for skin-derived migratory DCs and Langerhans cells in T FH and GC responses after intradermal immunization. *J. Invest. Dermatol.* .

23. Soria, A., D. Boccara, L. Chonco, N. Yahia, M. Dufossée, S. Cardinaud, A. Moris, C. Liard, A. Joulin-Giet, M. Julithe, M. Mimoun, B. Combadière, and H. Perrin. 2014. Long-term maintenance of skin immune system in a NOD-Scid IL2r  $\gamma$  null mouse model transplanted with human skin. *Exp. Dermatol.* 23: 850–852.

24. Zeitvogel, J., A. Dalpke, B. Eiz-Vesper, M. Kracht, O. Dittrich-Breiholz, T. Werfel, and M. Wittmann. 2012. Human Primary Keratinocytes Show Restricted Ability to Up-regulate Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)3 Protein Compared with Autologous Macrophages. *J. Biol. Chem.* 287: 9923–9930.

25. Iram, N., M. Mildner, M. Prior, P. Petzelbauer, C. Fiala, S. Hacker, A. Schoppl, E. Tschachler, and A. Elbe-Burger. 2012. Age-related changes in expression and function of Toll-like receptors in human skin. *Development* 139: 4210–4219.

26. Fuentes-Duculan, J., N. Gulati, K. M. Bonifacio, N. Kunjraiva, X. Zheng, M. Suárez-Fariñas, A. Shemer, E. Guttman-Yassky, and J. G. Krueger. 2016. Biomarkers of alopecia areata disease activity and response to corticosteroid treatment. *Exp. Dermatol.* 25: 282–286.

27. Hickman, H. D., G. V. Reynoso, B. F. Ngudiankama, S. S. Cush, J. Gibbs, J. R. Bennink, and

- J. W. Yewdell. 2015. CXCR3 Chemokine Receptor Enables Local CD8<sup>+</sup> T Cell Migration for the Destruction of Virus-Infected Cells. *Immunity* 42: 524–537.
28. Liu, L., Z. Xu, R. C. Fuhlbrigge, V. Pena-Cruz, J. Lieberman, and T. S. Kupper. 2005. Vaccinia Virus Induces Strong Immunoregulatory Cytokine Production in Healthy Human Epidermal Keratinocytes: a Novel Strategy for Immune Evasion. *J. Virol.* 79: 7363–7370.
29. Netea, M. G., T. Azam, E. C. Lewis, L. A. B. Joosten, M. Wang, D. Langenberg, X. Meng, E. D. Chan, D.-Y. Yoon, T. Ottenhoff, S.-H. Kim, and C. A. Dinarello. 2006. Mycobacterium tuberculosis Induces Interleukin-32 Production through a Caspase-1/IL-18/Interferon- $\gamma$ -Dependent Mechanism. *PLoS Med.* 3: e277.
30. Nold-Petry, C. A., M. F. Nold, J. A. Zepp, S.-H. Kim, N. F. Voelkel, and C. A. Dinarello. 2009. IL-32–dependent effects of IL-1 $\beta$  on endothelial cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 3883–3888.
31. England, H., H. R. Summersgill, M. E. Edye, N. J. Rothwell, and D. Brough. 2014. Release of Interleukin-1 $\alpha$  or Interleukin-1 $\beta$  Depends on Mechanism of Cell Death. *J. Biol. Chem.* 289: 15942–15950.
32. Miller, L. S. 2008. Toll-Like Receptors in Skin. *Adv. Dermatol.* 24: 71–87.
33. Didovic, S., F. V. Opitz, B. Holzmann, I. Förster, and H. Weighardt. 2016. Requirement of MyD88 signaling in keratinocytes for Langerhans cell migration and initiation of atopic dermatitis-like symptoms in mice: Innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 46: 981–992.
34. Joosten, L. A. B., B. Heinhuis, M. G. Netea, and C. A. Dinarello. 2013. Novel insights into the biology of interleukin-32. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 3883–3892.
35. Heinhuis, B., M. I. Koenders, F. A. van de Loo, M. G. Netea, W. B. van den Berg, and L. A. Joosten. 2011. Inflammation-dependent secretion and splicing of IL-32 $\gamma$  in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 4962–4967.
36. Qu, Y., J. L. Taylor, A. Bose, and W. J. Storkus. 2011. Therapeutic effectiveness of intratumorally delivered dendritic cells engineered to express the pro-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-32. *Cancer Gene Ther.* 18: 663–673.
37. Smith, A. J., C. M. Toledo, S. W. Wietgreffe, L. Duan, T. W. Schacker, C. S. Reilly, and A. T. Haase. 2011. The Immunosuppressive Role of IL-32 in Lymphatic Tissue during HIV-1 Infection. *J. Immunol.* 186: 6576–6584.
38. Kang, J.-W., S.-C. Choi, M.-C. Cho, H.-J. Kim, J.-H. Kim, J.-S. Lim, S.-H. Kim, J.-Y. Han,

and D.-Y. Yoon. 2009. A proinflammatory cytokine interleukin-32 $\beta$  promotes the production of an anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Immunology* 128: e532–e540.

39. Kim, S.-H., S.-Y. Han, T. Azam, D.-Y. Yoon, and C. A. Dinarello. 2005. Interleukin-32. *Immunity* 22: 131–142.

40. Nold, M. F., C. A. Nold-Petry, G. B. Pott, J. A. Zepp, M. T. Saavedra, S.-H. Kim, and C. A. Dinarello. 2008. Endogenous IL-32 Controls Cytokine and HIV-1 Production. *J. Immunol.* 181: 557–565.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: MVA-infected KCs producing IL-32 induces rapid activation of Langerhans cells.**

(a) KCs and LCs were separately sorted. KCs were treated with MVA (1 pfu/cells) or medium as indicated for 3 h and washed before co-cultured with LCs for an additional 24 h. The percentages of CXCL10<sup>pos</sup>, CD80<sup>pos</sup> and HLA-DR<sup>pos</sup> LCs (vivid<sup>neg</sup> CD45<sup>pos</sup>CD1c<sup>pos</sup> cells) were measured by flow cytometry (mean±SEM, n=5 donors). Paired rank test, \**p* < 0.05. (b) IL-32 (red), CD1a (green) and DAPI nuclear stain (blue) immunofluorescent staining of epidermal cells (scale bars=10 μm, n=5 donors). (c) Percentage of IL-32<sup>pos</sup> KCs (vivid<sup>neg</sup> CD45<sup>neg</sup>) at 4 h post-MVA infection of epidermal cells analyzed by flow cytometry (mean±SEM, n=5). Paired rank test, \**p* < 0.05. (d) Fold change in percentage of CXCL10<sup>pos</sup> LCs (vivid<sup>neg</sup> CD45<sup>pos</sup>CD1c<sup>pos</sup> cells) at 24 h post-MVA infection of epidermal cells treated with siRNA (10 nM) or scrambled control (10 nM) by flow cytometry analysis (mean±SEM, n=5 donors), paired rank test, \**p* < 0.05.

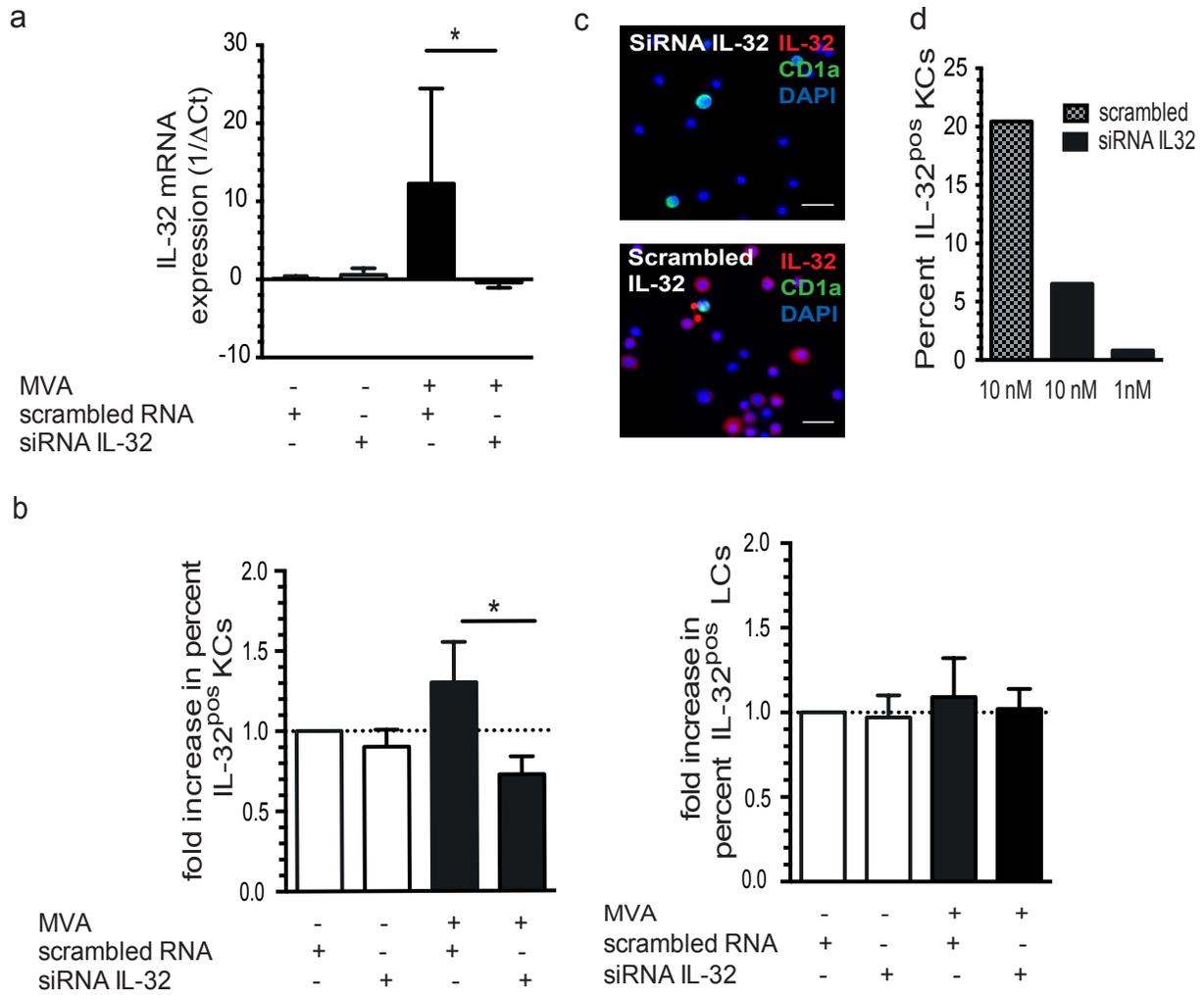
### **Figure 2: IL-32γ promotes rounding of LCs and down-regulation of EpCam and VLA-4 expression on LCs.**

(a) Skin explants were treated with rhIL-32γ, MVA (10<sup>7</sup> pfu/cm<sup>2</sup> of skin) or PBS via i.d. or t.c routes for 4 h. Epidermal layers were then separated and stained for CD1a (red) (scale bars= 20 μm) and percent of round CD1a<sup>pos</sup> LCs was assessed (n= 3 donors with 5 fields for each donor). Unpaired test, \*\*\*\**p*<0.0001, \*\**p*<0.01, \**p*<0.05 (b) EpCam and VLA-4<sup>pos</sup> LCs (vivid<sup>neg</sup> CD45<sup>pos</sup>CD1a<sup>pos</sup> cells) and KCs (vivid<sup>neg</sup> CD45<sup>neg</sup> cells) percent were analyzed by flow cytometry, 4 h after *in vitro* treatment with rhIL-32γ (mean±SEM, n=5 donors). Results are represented in percent control. Paired rank test, \**p* < 0.05.

### **Figure 3: Innate sensors induce IL-32 production by KCs, rounding LCs and CXCL10 production by LCs.**

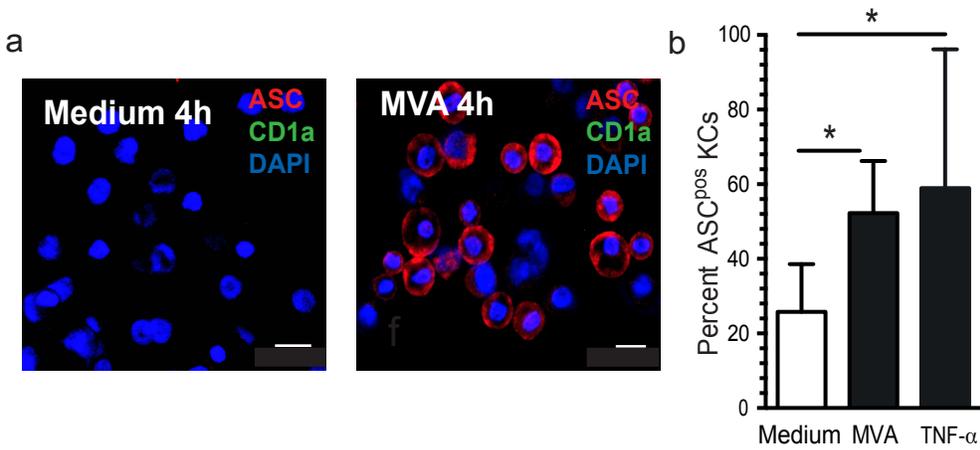
(a) Flow cytometry analysis of IL-32 production by KCs (vivid- CD45- cells) at 4 h post *in vitro* TLR-ligands stimulation of epidermal cells (mean±SEM; n=5 donors). Data are represented in fold increase. (b) CD1a (red) immunofluorescent staining of human epidermal layers at 4 h after i.d or t.c treatment with Imiquimod and Pam3CSK4, as indicated (scale bars= 20 μm). Percent of round CD1a<sup>pos</sup> LCs was assessed (n= 3 donors, 5 fields for each donor). Unpaired test, \*\*\*\**p*<0.0001, \*\*\**p*<0.001 (c) Isolated KCs were treated with Imiquimod, Pam3CSK4 or medium and washed before co-culture with LCs. CXCL10<sup>pos</sup>

producing LCs (vivid- CD45+CD1c+ cells) were analyzed at 24 h by flow cytometry (mean±SEM, n=5 donors), Paired rank test, \* $p < 0.05$ .



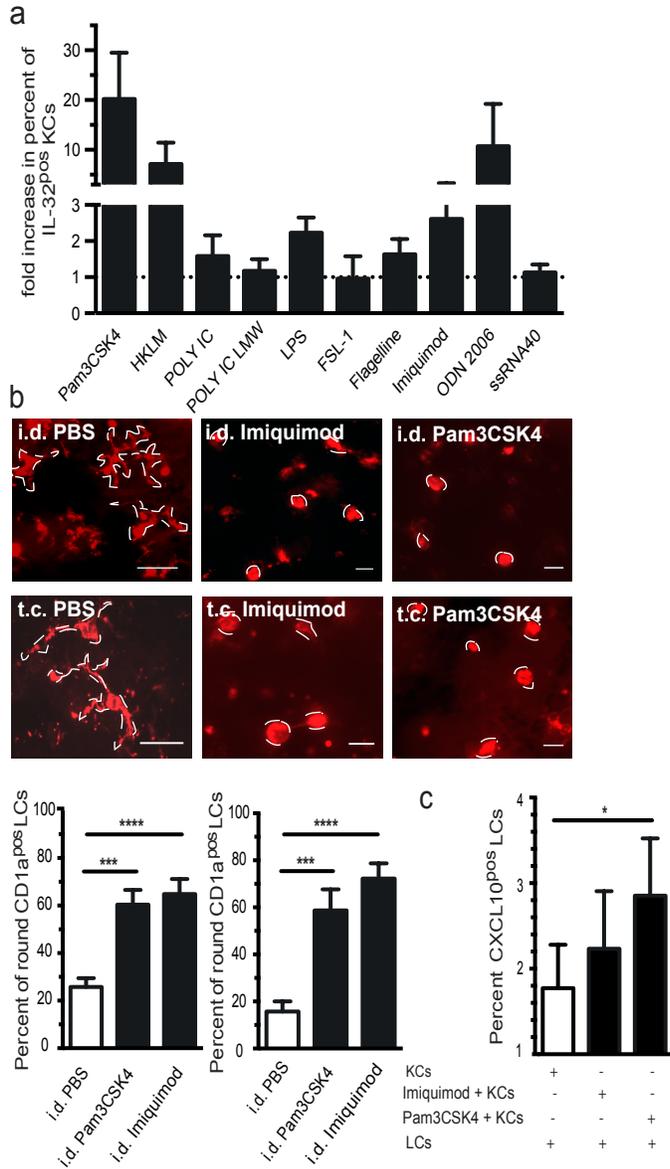
**Supplemental Figure 1: Inhibition of IL-32 expression and production in human skin cells after IL-32-specific siRNA treatment**

(a) Skin cells were pre-treated with either siRNA IL-32 or scrambled control prior 4 h exposure to MVA. IL32 mRNA expression was measured by qPCR in 5 donors. Results are shown in 1/ΔCt. Paired rank test, \*  $p < 0.05$ . (b) Fold increase in IL-32 cytokine production was measured in KCs (left histogram) and LCs (right histogram) in siRNA IL-32 treated samples compared to scrambled control (mean±SEM, n=6). Paired rank test, \*  $p < 0.05$ . (c) Immunofluorescent staining of MVA infected epidermal cells using IL-32 (red) and CD1a (green) (1 pfu/cells) after IL-32 siRNA or scrambled control treatment (scale bars= 0.01 μm, n=3 donors). (d) Percentage of IL-32<sup>pos</sup> KCs at 4 h after MVA (1 pfu/cells) infection of epidermal cells after either IL-32 siRNA (1 nM, 10 nM) or scrambled control (10 nM) (n=3 donors).



**Supplemental Figure 2: MVA epidermal cells infection induces apoptosis in KCs** (a) ASC (red) and CD1a (green) immunofluorescent staining of epidermal cells 4 h after MVA infection (scale bars= 10  $\mu$ m) (n=5 donors). (b) Immunofluorescent microscopy percentage of ASC<sup>pos</sup> KCs observed 4 h post *in vitro* MVA infection and TNF- $\alpha$  positive control (mean $\pm$ SEM, n=5 donors). Paired rank test, \* $p < 0.05$ .

Gonnet et al., Figure 3



## SUPPLEMENTARY MATERIAL & METHOD

### Immunohistology

Isolated epidermal cells were stained as previously described, using anti-human CD1a (Dako products, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) and anti-ASC (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) and isotype-matched control antibody in PBS-BSA-0.1% saponin. Slides were washed with PBS 1X followed by Goat anti-mouse IgG1 594 and IgG2a 488 (Invitrogen) and mounted with Vectashield mounting medium containing DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

### Reverse transcription and real time PCR

For *ex vivo* transcriptional analysis, skin epidermal cell suspensions were obtained from 1cm<sup>2</sup> i.d and t.c exposed MVA skin samples, after enzymatic process as explained previously. In parallel, untreated and i.d or t.c PBS-exposed skin samples were performed as negative controls. For *in vitro* analysis, 2.10<sup>5</sup> skin cells were analyzed after *in vitro* siRNA IL-32 or scrambled control treatment. Cell suspensions were washed then frozen to form a dry pellet. RNA was extracted from skin cells suspension with RNeasy Mini KIT (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified using a Nanodrop 3000 (Plateforme P3S, site Jussieu, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France). RT-qPCR was performed in two steps; Reverse transcription of RNA was performed using VILO KIT (Life Technologies, Saint-Aubin, France). RNAs were incubated for 10 minutes at 25°C, then 1 h at 60°C followed by 5 minutes at 85°C. Real-Time PCR were performed with 5 or 20 ng of template cDNAs added into the Power master mix Sybergreen. Each sample was run in duplicate with 2 negative controls and a sample control included in each PCR run. IL-32 (QT00199766) primers were purchased from Qiagen. Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH) and actine B were used as house-keeping genes and PCR data was normalised against the mean of GAPDH and actine B.

Actin B and GAPDH sequence primers (Eurogentec, Liege, Belgium) used are:

Actin B F: 5' TCCTTCCTGGGCATGGAGT 3'

R: 5' AGCACTGTGTTGGCGTACAG 3'

GAPDH F: 5' GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA 3'

R: 5' GTTGCTGTAGCCAATTCGTTGT 3'

***ANNEXE 2 : CONSENTEMENT POUR L'UTILISATION  
D'EXPLANTS DE PEAU DANS UN PROJET DE  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE***

**CONSENTEMENT POUR L'UTILISATION D'EXPLANTS DE PEAU DANS UN PROJET DE  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**A compléter et signer en 3 exemplaires**

**(un pour le donneur, un pour le dossier médical, un pour l'équipe de recherche)**

**Madame, Monsieur**

**Avec votre accord, à la suite de votre opération chirurgicale, un résidu cutané sera recueilli, afin d'être utilisé dans un projet de recherche mené dans l'Unité de Recherche INSERM U945 « Immunité et Infection », à l'Hôpital La Pitié-Salpêtrière, 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 PARIS.**

**Ceci ne présente aucun risque ni aucune modification du déroulement de votre opération. Aucun geste chirurgical supplémentaire ne sera fait sur vous. Le projet de recherche ne comporte pas d'étude génétique. Par ailleurs, ce projet de recherche satisfait aux exigences scientifiques et éthiques en vigueur dans notre pays. L'échantillon de peau ne sera en aucun cas utilisé à visée thérapeutique ou commerciale.**

**Certaines données (sexe et date de naissance) vous concernant seront transmises à l'équipe de recherche. Toutefois, votre identité sera gardée confidentielle, dans le respect absolu du secret médical.**

**Votre consentement à ce don est un acte libre et volontaire et nous vous en remercions.**

**Votre refus sera sans aucune conséquence sur les soins qui vous seront prodigués.**

**Je soussigné(e) (NOM, prénom du donneur)**

.....

**Accepte qu'un échantillon de peau recueilli à la suite de ma chirurgie soit utilisé pour le projet de recherche cité ci-dessus.**

**Je certifie avoir lu attentivement ce formulaire et compris les informations fournies par ..... dans le Service de Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique du Professeur Mimoun de l'Hôpital Saint-Louis, auquel j'ai pu poser toutes les questions que je souhaitais.**

**Inscrire la mention "lu et approuvé et donne mon accord" : .....**

.....

**A Paris, le .....**

**Signature:.....**

**En fin d'intervention, avant d'être est placée dans des pots stériles remplis de sérum physiologique à température ambiante, la peau réséquée est sommairement dégraissée aux ciseaux. L'acheminement au laboratoire est ensuite immédiatement réalisé par un transporteur agréé. Une fois prélevés, il est essentiel de greffer les explants dans les 6 heures afin de limiter la lyse cellulaire.**

***ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE STANDARDISATION DE LA  
TECHNIQUE DE GREFFE***

## **PROTOCOLE DE STANDARDISATION DE LA TECHNIQUE DE GREFFE**

- 1. Récupération des explants cutanés :**
  - 1.1 Dépôt d'un dossier au comité d'éthique de l'hôpital Saint Louis (PARIS, France).**
  - 1.2 Choix du patient : nous avons exclus tous les patients porteurs d'infections virales pour éviter tout risque lors des manipulations. Nous avons inclus des patients bénéficiant de plasties abdominales, brachiales, et mammaires.**
  - 1.3 Obtention du consentement éclairé des patients sélectionnés**
  - 1.4 Prélèvement au bloc opératoire des explants cutanés**
  - 1.5 Dégraissage primaire au bloc opératoire de la graisse sous-cutanée des explants en préservant l'hypoderme**
  - 1.6 Mise en condition des prélèvements dans un flacon stérile. Immersion dans du sérum physiologique à température ambiante.**
  - 1.7 Expédition au laboratoire via un transporteur agréé.**
  
- 2. Préparation des explants :**
  - 2.1 Dégraissage fin aux ciseaux de Ragnell des explants en respectant le derme papillaire après mise sous tension de greffe à l'aide de 4 pinces de Kocher.**
  - 2.2 Découpage des explants en patch de 1 cm<sup>2</sup>.**
  - 2.3 Lavage puis immersion des patches cutanés dans du sérum physiologique à température ambiante.**
  
- 3. Préparation de la souris :**
  - 3.1 Anesthésie de la souris par injection intra-péritonéale de 200 à 300 µL d'un mélange de kétamine 8 % (Imalgen 1000, Merial, Lyon, France) et xylazine 2 % (Bayer AG, Leverkusen, Germany) dans du NaCl sterile, suivant le poids de l'animal.**
  - 3.2 Rasage de la région inter-scapulaire sur 1,5 cm<sup>2</sup>**
  - 3.3 Antiseptie cutanée à la bétadine dermique 10%**
  - 3.4 Avulsion cutanée de la région inter-scapulaire sur 1,5 cm<sup>2</sup>**
  
- 4. Réalisation de la greffe :**
  - 4.1 Mise en place de la greffe sur la zone receveuse avulsée**
  - 4.2 Fixation de la greffe par 6 points séparés de Nylon 4/0, répartis sur le pourtour de la greffe.**
  - 4.3 Mise en place du pansement siliconé sur la greffe, recouvert d'une compresse stérile**
  - 4.4 Maintien du pansement à l'aide d'une bandelette élastique et cohésive**
  
- 5. Soins post-opératoires :**
  - 5.1 Ouverture du pansement à J4**
  - 5.2 Hydratation de la greffe avec de la vaseline**
  - 5.3 Réfection du pansement tous les 5 jours, jusqu'à cicatrisation (15jours environ)**