



HAL
open science

Reconstitution in vitro des réponses immunitaires initiales dans la dermatite atopique

Adrien Brulefert

► **To cite this version:**

Adrien Brulefert. Reconstitution in vitro des réponses immunitaires initiales dans la dermatite atopique. Dermatologie. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ074 . tel-03510351

HAL Id: tel-03510351

<https://theses.hal.science/tel-03510351v1>

Submitted on 4 Jan 2022

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.

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé
CNRS UPR 3572 I2CT

THÈSE présentée par :
Adrien BRULEFERT

soutenue le : **18 septembre 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Immunologie

**Reconstitution *in vitro* des réponses
immunitaires initiales dans la
dermatite atopique**

THÈSE dirigée par :

M. FLACHER Vincent

Chargé de recherche, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme ADEL-PATIENT Karine

Directrice de recherche, LIAA SPI, Institut Frédéric Joliot

M. SOUMELIS Vassili

Professeur des universités-praticien hospitalier, INSERM U976,
Hôpital Saint-Louis

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme FOURNEL Sylvie

Professeur, CNRS UMR7199, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Au Dr. Karine Adel-Patient, au Pr. Vassili Soumelis et au Pr. Sylvie Fournel,

Merci de me faire l'honneur de votre présence et pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Au Dr. Vincent Flacher,

Merci de m'avoir encadré pour cette thèse. J'ai vraiment apprécié travailler à tes côtés, tu as su me faire confiance rapidement et me laisser évoluer en autonomie. Merci d'avoir supporté mon pessimisme légendaire. Dans le laboratoire ou dans la vie, je pense que tes compétences et tes qualités humaines prouvent ta réussite et font de toi un exemple à suivre.

Au Dr. Christopher Mueller,

Merci de m'avoir accepté au sein de ton équipe et d'avoir cru en moi, malgré mon profil atypique et ma timidité. Tu es aux yeux de tous et de moi-même un chef d'équipe unique que beaucoup jalouent. Tu as une ouverture sur la science, le monde et bien sûr le sens de la fête idéale.

À Quentin et Romain,

Merci de m'avoir très vite intégré à votre groupe, j'ai passé mes plus beaux moments au laboratoire à vos côtés, des pauses repas aux délires en manips ou au bureau. Sans oublier tout ce qu'il y a eu en dehors. Aujourd'hui il est clair que vous êtes beaucoup plus que des collègues, de véritables amis. Vous manquez terriblement à ce laboratoire.

À toute l'UPR3572,

Merci à toute l'unité pour m'avoir accueilli dans ses locaux, une pensée aux personnes de passage et aux permanents. Je garderais un très bon souvenir de mon quotidien au laboratoire pendant ces quelques années avec vous.

À ma famille,

Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Votre soutien dans mes interminables études a été déterminant à chaque épreuve. Je sais que, quel que soit mon choix de vie, vous serez toujours là pour moi. On ne peut pas demander meilleure famille. J'espère qu'un jour la distance ne sera plus un problème afin de partager plus de temps à vos côtés.

À Anaëlle,

L'amour de ma vie, merci de m'avoir accompagné à Strasbourg et pour ton soutien tout au long de cette thèse. Tu m'as permis de garder en tête le principal : la vie avec toi. Ces 4 années alsaciennes ont été un pur bonheur, et ce grâce à toi. Je suis certain que la vie nous réserve le meilleur avec de jolis projets à venir...

ABRÉVIATIONS

7-DHC : 7-déhydrocholestérol

Bcl-6 : *B-cell lymphoma 6*

CCL : *C-C motif chemokine ligand*

CCR : *C-C motif chemokine receptor*

CD : Cluster de différenciation

cDCs : Cellules dendritiques conventionnelles

CDE : Complexe de différenciation épidermique

CDP : Précurseur commun aux cellules dendritiques (*Common dendritic cell precursor*)

CDSN : Cornéodesmosine

CFSE : *Carboxyfluorescein succidiny ester*

CGRP : *Calcitonin gene-related-peptide*

CLDN : Claudine

CLR : Récepteurs de lectines de type C (*C type lectin receptors*)

CM : Fibres C mécano-sensibles

CMH I/II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I/II

CMH : Fibres C sensibles à la chaleur et aux stimuli mécaniques

CMi (His+) : Fibres C mécano-insensibles histamine positive

COX-2 : Cyclooxygénase 2

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CRLR : *Calcitonin receptor-like receptor*

CTS : Corticostéroïdes topiques

CXCL : *C-X-C motif chemokine ligand*

CXCR : *C-X-C motif chemokine receptor*

CYP : Cytochrome P-450

DA : Dermatite atopique

DAMP : Motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (*Damage associated molecular patterns*)

DC-LAMP : *Dendritic cell lysosome-associated membrane protein*

DCs : Cellules dendritiques (*Dendritic cells*)

DMEM : *Dulbecco's modified eagle medium*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DRG : Ganglion de la racine dorsale (*Dorsal root ganglion*)

E12 : Embryon de 12 jours

EASI : *Eczema area and severity index*

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique (*Ethylene-diamine-tetra-acetic acid*)

EFS : Établissement français du sang

EGF : Facteur de croissance épidermique (*Epidermal growth factor*)

EGM 2 : *Endothelial cell growth medium 2*

ELISA : *Enzyme-linked immunoassay*

FcR : Récepteur à la fraction constante (*Fc receptor*)

FGF : Facteur de croissance du fibroblaste (*Fibroblast growth factor*)

FLG : Filaggrine

GM-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

hBD-2 : β -défensine humaine 2 (*human β -defensin 2*)

HBSS : *Hank's balanced salt solution*

HDM : Acariens (*House dust mite*)

HEE : Équivalent d'épiderme humain (*Human epidermis equivalent*)

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HKSA : *S. aureus* inactivé par la chaleur (*Heat killed S. aureus*)

HR : Récepteur à l'histamine (*Histamine receptor*)

HSC : Cellule souche hématopoïétique (*Hematopoietic stem cell*)

HSE : Équivalent de peau humaine (*Human skin equivalent*)

IBMC : Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire

IFN γ : Interféron γ

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ILC2 : Cellules lymphoïdes innées 2 (*Innate lymphoid cells 2*)

INV : Involucrine

iPS : Cellules souches pluripotentes induites (*Induced pluripotent stem cells*)

IV : Ichtyose vulgaire

JAK : Janus kinase

KLK : Kallikréine

LB : Lymphocyte B

LCs : Cellules de Langerhans (*Langerhans cells*)

LDH : Lactate déshydrogénase

LEKTI : *Lympho-epithelial kazal type related inhibitor*

lfTSLP : Forme longue de la TSLP (*Long form TSLP*)

LOEX : Laboratoire d'organogénèse expérimentale

LOR : Loricrine

LPS : Lipopolysaccharide

LT, T : Lymphocyte T

LYVE-1 : *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*

MAMP : Motifs moléculaires associés aux microorganismes (*Microbe associated molecular patterns*)

M-CSF : Facteur stimulant les colonies de macrophages (*Macrophage colony-stimulating factor*)

MLR : Réaction mixte lymphocytaire (*Mixed lymphocyte reaction*)

MonoDCs : Cellules dendritiques dérivées de monocytes

MonoLC : Cellules de Langerhans dérivées de monocytes

MonoMacro : Macrophages dérivés de monocytes

Mrgpr : *Mas-related G protein-coupled receptor*

NGF : Facteur de croissance du nerf bêta (*β -nerve growth factor*)

NK1R : *Neurokinin 1 receptor*

NLR : Récepteurs de type Nod (*Nod-like receptors*)

NMF : Facteurs naturels d'hydratation (*Natural moisturizing factor*)

NS : Non stimulé

OCT : *Optimal cutting temperature*

OLS : Organes lymphoïdes secondaires

OVA : Ovalbumine

P : Passage

PAR2 : Récepteur à protéases 2 (*Protease-activated receptor-2*)

PBMCs : Cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cell*)

PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate-buffered saline*)

PCA : Acide pyrrolidone carboxylique (*Pyrrolidone carboxylic acid*)

PCNA : *Proliferating cell nuclear antigen*

PCR, qPCR : *Polymerase chain reaction, quantitative PCR*

pDCs : Cellules dendritiques plasmacytoïdes

PDPN : Podoplanine

PECAM-1 : *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*

Pen/strep : Pénicilline/streptomycine

PFA : Paraformaldéhyde

PK : Phosphokinase

PL : Phospholipase

PMA : Phorbol myristate acétate

PMCA1b : *Plasma membrane calcium ATPase 1b*

pro-FLG : Pro-filaggrine

PROX-1 : *Prospero-related homeobox 1*

PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern recognition receptor*)

RAMP : *Receptor activity-modifying protein*

RANKL : *Receptor activator of nuclear factor (NF)-kB ligand*

RLR : Récepteurs induits par l'acide rétinoïque (*Retinoic acid-inducible gene-I Like Receptors*)

RPMI : *Roswell park memorial institute medium*

RXR : Récepteur nucléaire X des rétinoïdes

S100 : *S100 calcium-binding proteins*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SCORAD : *Score in atopic dermatitis*

SE : Sérum EDTA

SEA/B : *Staphylococcus* entérotoxine A/B

SEM : Erreur standard de la moyenne (*Standard error of the mean*)

sfTSLP : Forme courte de la TSLP (*Short form TSLP*)

SH : Sérum humain

shRNA : *Small hairpin RNA*

siRNA : *Small interfering RNA*

SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide (*Single-nucleotide polymorphism*)

SP : Substance P

SPINK5 : *Serine peptidase inhibitor kazal-type 5*

SPRR : *Small proline-rich proteins*

SSC : Granularité (*Side scatter*)

STAT : Transducteur de signal et activateur de transcription (*Signal transducer and activator of transcription*)

SVF : Sérum de veau fœtal

Tc : Lymphocyte T cytotoxique

TEWL : Perte insensible en eau (*Transepidermal water loss*)

Tfh : Lymphocyte T folliculaire

TGF- β : Facteur de croissance transformant β (*Transforming growth factor β*)

Th : Lymphocyte T auxiliaire (*T helper*)

TNCB : Trinitrochlorobenzène

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α (*Tumor necrosis factor α*)

Tregs : Lymphocytes T régulateurs

TRM : Lymphocytes T résidents mémoires

TRP : *Transient receptor potential*

UCA : Acide urocanique (*Urocanic acid*)

VDBP : Protéine de liaison à la vitamine D (*Vitamin D binding protein*)

VDR : Récepteur à la vitamine D (*Vitamin D receptor*)

VDRE : Éléments de réponse à la vitamine D (*Vitamin D response elements*)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de la structure épidermique

Figure 2 : Récepteurs sensoriels de la peau

Figure 3 : Origine des DCs et macrophages

Figure 4 : Régulation de la différenciation des sous-populations de LT par les DCs

Figure 5 : Lésions de DA

Figure 6 : Production de TSLP et effet sur les cellules immunitaires

Figure 7 : Principaux mécanismes de la DA

Figure 8 : Prurirécepteurs et modulation de la réponse des fibres nerveuses périphériques cutanées

Figure 9 : Production, métabolisation et mécanisme d'action génomique de la vitamine D₃

Figure 10 : Effets de la vitamine D₃ sur le système immunitaire

Figure 11 : Expression de OX40L par les DCs de la peau

Figure 12 : Morphologie des cellules primaires en culture 2D

Figure 13 : Analyse de la purification des cellules endothéliales

Figure 14 : Caractérisation des cellules dérivées de monocytes *in vitro*

Figure 15 : Immunofluorescence des neurones murins isolés de DRGs

Figure 16 : Immunofluorescence d'un modèle complet obtenu au LOEX

Figure 17 : Schématisation de la construction du modèle de peau complet

Figure 18 : Immunofluorescence d'un derme et épiderme reconstruit

Figure 19 : Immunofluorescence d'une peau normale

Figure 20 : Immunofluorescence d'un modèle vascularisé

Figure 21 : Immunofluorescence d'un modèle immunocompétent

Figure 22 : Production de TSLP

Figure 23 : Production d'IL-8 et IL-6

Figure 24 : Digestion des modèles reconstruits

Figure 25 : MLR avec MonoDCs et DCs d'explant de peau

Figure 26 : MLR avec MonoDCs de peau reconstruite

Figure 27 : Immunofluorescence d'un modèle innervé

Figure 28 : Production d'IL-8 et IL-6 dans le modèle innervé

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification phénotypique des principales DCs et des macrophages

Tableau II : Réactifs utilisés pour la stimulation des modèles

LISTE DES ANNEXES

Annexe a : « *Inhibition of dengue virus infection by mannoside glycolipid conjugates* »

Schaeffer E et al., 2018

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. LA PEAU	1
1. Structure générale.....	1
1.1 L'épiderme.....	1
1.2 Le derme	5
2. Réseaux sanguins et lymphatiques	6
3. Innervation	7
4. Système immunitaire	10
4.1 Maturation des DCs après reconnaissance de signaux de danger.....	10
4.2 Classification des DCs de la peau.....	12
4.3 Origine et développement des DCs	15
4.4 Présentation antigénique aux LT	16
4.5 Classification et polarisation des LT	18
4.6 Rôle des DCs de la peau dans la polarisation des LT.....	20
CHAPITRE II. LA DERMATITE ATOPIQUE	22
1. Définition de l'atopie et de la dermatite atopique.....	22
2. Épidémiologie	22
3. Signes cliniques et diagnostic	23
3.1 Clinique	23
3.2 Diagnostic et système de notation de la maladie	24
4. Physiopathologie	25
4.1 Aspects génétiques	25
4.2 Défaut de barrière	27
4.2.1 Protéines de la barrière.....	27
4.2.2 Protéases	28
4.2.3 Composition lipidique de l'épiderme.....	29
4.2.4 Microbiome / Dysbiose	29
a) Colonisation par <i>Staphylococcus aureus</i>	29
b) Activité des peptides antimicrobiens	31
4.3 Réponse immunitaire.....	32
4.3.1 Caractérisation des lésions	33
4.3.2 Influence des cytokines Th2.....	33
4.3.3 TSLP	34
a) Sources	35
b) Structure de la TSLP et de son récepteur	35

c) Cibles et effets	36
d) Isoforme court et long	39
4.3.4 Autres sources de cytokines Th2.....	39
4.4 Signal du prurit	42
4.4.1 Fibres C et transmission du prurit.....	42
4.4.2 Les prurirécepteurs	43
a) TRP.....	43
b) GPCR	43
c) Récepteurs aux cytokines IL-4R IL-13R IL-31R.....	45
d) TLR	46
4.4.3 Production de neuropeptides	47
5. Prise en charge	48
5.1 Prévention.....	49
5.2 Prise en charge « classique »	49
5.3 Autres traitements.....	50
5.3.1 Topiques.....	50
5.3.2 Systémiques.....	50
5.3.3 Spécifiques	51
CHAPITRE III. MODÈLES <i>IN VITRO</i> DE DERMATITE ATOPIQUE	53
1. Modèles 2D	53
2. Modèles 3D	54
2.1 Explants de peau	54
2.2 Modèles reconstruits.....	55
2.2.1 Principe de construction.....	55
2.2.2 Modélisation de la DA	56
CHAPITRE IV. LA VITAMINE D₃.....	59
1. Découverte	59
2. Production	59
3. Métabolisme.....	60
4. Le récepteur à la vitamine D₃.....	61
5. Activités biologiques	62
5.1 Métabolisme calcique	63
5.1.1 Intestin / Reins.....	63
5.1.2 Les os	63
5.2 Effets extracalciques	64
5.2.1 La peau.....	64
a) Prolifération et différenciation des kératinocytes.....	64
b) Rôle antimicrobien et fonction de barrière	65
5.2.2 Vitamine D ₃ et immunité	66
a) Kératinocytes.....	66
b) Monocytes / Macrophages	67

c) Cellules dendritiques	67
d) Lymphocytes T	69
6. Vitamine D₃ et DA.....	71
6.1 Lien entre DA et concentration sérique en vitamine D ₃	72
6.2 Supplémentation systémique	72
6.3 Supplémentation topique	73
OBJECTIFS DE LA THÈSE	74
PARTIE A : IMPACT DE LA SUPPLÉMENTATION EN VITAMINE D₃ SUR LA PEAU	77
PUBLICATION SOUMISE POUR ÉVALUATION.....	78
RÉSULTATS ET DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE.....	109
PARTIE B : MODÉLISATION DES PHASES INITIALES DE DERMATITE ATOPIQUE.....	114
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	115
1. Isolation des cellules primaires	115
1.1 Kératinocytes	115
1.2 Fibroblastes.....	116
1.3 Cellules endothéliales	116
1.4 Monocytes et différenciation	118
1.5 Neurones murins.....	120
1.6 Lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs	121
2. Construction du modèle de peau	121
2.1 Stérilisation des éponges (Jour -3).....	123
2.2 Colonisation du derme (Jour 0 à 14)	123
2.3 Innervation (Jour 14 à 21).....	123
2.4 Immunocompétence (Jour 21 à 28)	124
2.5 Formation de l'épiderme (Jour 28 à 56)	124
3. Obtention des explants de peau	125
4. Stimulation des modèles	126
4.1 Réactifs	126
4.2 Réaction mixte lymphocytaire.....	127
5. Analyse des modèles.....	127
5.1 Explants de peau et MonoDCs	127
5.2 Modèle de peau reconstruite.....	127
5.3 Analyse statistique	128

RÉSULTATS	129
1. Transfert et reproduction du modèle	129
1.1 Derme et épiderme.....	129
1.2 Vascularisation et immunocompétence	131
2. Mesure de la production de cytokines.....	134
2.1 TSLP.....	134
2.2 IL-8 et IL-6.....	135
3. Analyse du phénotype des DCs	137
4. Orientation de LT CD4+ naïfs	139
5. Innervation	142
DISCUSSION	144
1. Pertinence du modèle de base	144
1.1 Qualité de l'épiderme	144
1.2 Vascularisation et innervation	146
1.3 Immunocompétence.....	147
2. Pertinence du modèle de DA	149
2.1 Production de cytokines.....	150
2.2 Orientation Th2.....	151
3. Perspectives	152
CONCLUSION GÉNÉRALE	157
BIBLIOGRAPHIE	159
ANNEXES.....	183

AVANT-PROPOS

Ce manuscrit est la synthèse d'un travail de 3 ans et 8 mois réalisé au sein de l'UPR3572 à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC) de Strasbourg pour obtenir le grade de Docteur spécialisé en Immunologie. Cette thèse, dirigée par le Docteur Vincent Flacher, est intitulée : « **Reconstitution *in vitro* des réponses immunitaires initiales dans la dermatite atopique** ».

Nous avons souhaité avec ce manuscrit partager une partie des connaissances acquises et des résultats relatifs à la construction de ce modèle. L'introduction sera divisée en 4 chapitres. Le **Chapitre I** donnera une description générale de la peau, afin de comprendre sa structure et la fonction des cellules qui la composent. Dans le **Chapitre II** nous présenterons la dermatite atopique, sa physiopathologie et sa prise en charge, puis dans le **Chapitre III**, les modèles *in vitro* déjà existants. Enfin, dans le **Chapitre IV** nous accentuerons la discussion sur la vitamine D, ses effets sur le système immunitaire, son lien avec la dermatite atopique et pourquoi elle représente une piste intéressante pour la construction de ce modèle.

L'ensemble des résultats de notre étude seront regroupés en deux parties, puis discutés. La version soumise de la publication scientifique : « *Vitamin D3-elicited human skin dendritic cells promote type-2 T helper differentiation independently of thymic stromal lymphopoietin* », réalisée avec Hoste A., Muller Q., Mueller CG. et Flacher V., constitue la première partie de ces résultats et de la discussion (**Partie A**).

Dans la seconde, nous présenterons les étapes du transfert du modèle « de base » dans nos laboratoires, ainsi son application pour la dermatite atopique. Ces résultats seront mis en parallèle avec des expériences contrôles sur des cellules dérivées de monocytes et des explants de peau (**Partie B**).

Les connaissances techniques acquises sur la culture de cellules primaires humaines et l'utilisation d'explants de peau ont permis également ma contribution en tant qu'auteur à deux publications de l'équipe. La première, intitulée « *Inhibition of dengue virus infection by mannoside glycolipid conjugates* », réalisée par Schaeffer E et al., a déjà été publiée dans *Antiviral Research* en 2018 (article disponible en **Annexe a**). La seconde, intitulée « *Recombinant Chikungunya virus envelope protein E2 provides a targeting vector for antigen presentation by human dermal CD14+ cells* » est actuellement en révision (article disponible en **Annexe b**).

Cette thèse a été précédée d'un Doctorat en Pharmacie puis d'un Master Biologie, Santé, Qualité réalisé en 2016 à l'université de Reims, sous la bienveillance du Docteur Aurélie Trussardi-Régnier. Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée : « *Variation of the epidermal expression of glucocorticoid receptor-beta as potential predictive marker of bullous pemphigoid outcome* » réalisée en premier auteur avec l'aide de Le Jan S., Plée J., Durlach A., Bernard P., Antonicelli F., et Trussardi- Régnier A. Ces travaux ont été soumis et révisés en 2017, en parallèle de ma première année de thèse, dans *Experimental Dermatology*.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Chapitre I. La peau

Dans cette première partie de l'introduction, nous allons nous plonger dans l'organe qui est au cœur de cette thèse : **la peau**. La peau constitue la couche externe de l'organisme, représentant une barrière physique avec l'extérieur. Beaucoup plus qu'une simple enveloppe recouvrant notre corps, elle est en effet le siège de nombreuses fonctions. Elle permet notamment de contribuer au maintien de la température corporelle, d'apporter la sensibilité tactile et de protéger notre corps contre les agressions (rayonnements, chocs, infections). C'est sa structure et sa richesse cellulaire qui expliquent comment la peau est capable d'assurer l'ensemble de ses rôles. L'un des premiers enjeux de cette thèse étant de reproduire un modèle de peau (stratifié, vascularisé, innervé et immunocompétent) il paraît essentiel dans un premier temps d'en comprendre sa structure, son fonctionnement et les éléments qui la composent.

1. Structure générale

Par simplicité schématique, la peau peut se représenter en 3 couches : l'épiderme (partie supérieure), le derme (partie centrale) et l'hypoderme (partie inférieure). Les modèles d'études utilisés dans cette thèse (explant de peau et peau reconstruite) ne contenant pas d'hypoderme ou tissu adipeux, il ne sera pas abordé dans les paragraphes suivants.

1.1 L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié, c'est-à-dire formé de plusieurs assises de cellules épithéliales (appelées **kératinocytes**), et pavimenteux, car sa couche la plus externe possède des cellules aplaties, plus larges que hautes. Sous cette couche cornée se trouvent la couche granuleuse, la couche épineuse puis la couche basale (*Mélessopoulos et al., La peau ; Freinkel et al., The Biology of the skin*).

La **couche basale** ou *stratum basale* représente la strate la plus profonde de l'épiderme, posée directement sur le derme (**Figure 1**). Elle est formée d'une seule épaisseur de kératinocytes indifférenciés et cohésifs, rattachés à la fois aux cellules voisines par des structures d'ancrage nommées desmosomes et à la lame basale du derme par des hémidesmosomes. Ces structures sont directement liées au cytosquelette du kératinocyte. Celui-ci est composé d'un réseau de filaments intermédiaires qui correspondent à un assemblage de

protéines, **les kératines**. Le marquage des kératines est communément utilisé en recherche afin de caractériser un épiderme car c'est un reflet de l'état de différenciation du kératinocyte. À ce titre, la couche basale exprime les kératines **K5 et K14**. Cette couche germinative tient son nom à la forte capacité mitotique de ses cellules, unipotentes, générant des cellules filles qui vont soit conserver les propriétés de la cellule mère et intégrer elles aussi la couche basale (division symétrique), soit se différencier et progresser dans les strates supérieures de l'épiderme (division asymétrique). Notons que ces différences s'expliquent par une modification de l'orientation du centrosome (*Muroyama et al., 2012*). La progression du kératinocyte dans les couches supérieures de l'épiderme conduit à un ensemble de changements qui contribuent à sa différenciation. La perte des interactions avec les composants de la membrane basale entraîne une levée d'inhibition de la voie Notch, contrôlant l'expression de marqueurs de différenciation (*Okuyama et al., 2008*). De plus, les kératinocytes sont confrontés à la modification de leur environnement, avec une diminution de l'exposition à des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance du fibroblaste (*Fibroblast growth factor, FGF*) et le facteur de croissance épidermique (*Epidermal growth factor, EGF*). Ces changements se traduisent par une altération profonde des kératinocytes, avec la perte de leur pouvoir mitotique et l'inhibition de l'expression de filaments intermédiaires K5 et K14 (*Fuchs et al., 2002*). Des mélanocytes, cellules responsables de la pigmentation de la peau et de la protection aux rayonnements UV par la production de mélanine, sont également retrouvés entre les kératinocytes basaux, avec des prolongements qui vont s'étendre jusqu'à la couche supra-basale.

Les premiers kératinocytes différenciés vont venir composer la **couche épineuse** ou *stratum spinosum*, qui tient son nom à la présence plus nombreuse de desmosomes, à aspect « épineux ». Contrairement à la couche basale qui est monocouche, en moyenne 5 à 15 assises de kératinocytes vont venir composer cette zone. Ces derniers s'identifient par l'expression des filaments à kératine **K1 et K10**. On va distinguer, mobiles entre les kératinocytes, la présence de cellules immunitaires, les cellules de Langerhans (*Langerhans cells, LCs*), un sous-type de cellules dendritiques (*Dendritic cells, DCs*) spécifique à l'épiderme.

L'avant-dernière couche de kératinocytes, la **couche granuleuse** ou *stratum granulosum*, se caractérise par l'observation de kératinocytes qui s'aplatissent, avec, comme son nom le suggère, un aspect granuleux. Celui-ci s'explique par la présence de grains de kératohyaline dans le cytoplasme qui reflètent la synthèse par le kératinocyte de protéines (**pro-filaggrine (pro-FLG), loricine (LOR), involucrine (INV)**) appartenant au complexe de différenciation épidermique (CDE). Ces protéines seront cruciales à la formation de la dernière strate de l'épiderme (la couche cornée). Elles sont utilisées comme marqueurs tardifs de

différenciation car caractéristiques des couches supérieures de l'épiderme. De plus, on note la présence de corps lamellaires ou kératinosomes, d'origine Golgienne, chargés en substances lipidiques (céramides, stérols, phospholipides) et en enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, glucosidases, phospholipases).

À l'interface entre la couche granuleuse et la **couche cornée** ou *stratum corneum*, le kératinocyte va subir une transformation finale : la cornification. Elle consiste en la libération du contenu du cytoplasme (dégradation des organelles, relargage en Ca^{2+} anciennement stocké) et des corps lamellaires (précurseurs lipidiques et enzymes) pour former le ciment intercornéocytaire. Ce processus conduit à la mort de ces cellules, désormais appelées cornéocytes. Ces derniers, anucléés et aplatis, voient leur cytosquelette de kératine maintenu, solidifié par l'agrégation des molécules de **filaggrine (FLG)**, obtenues après clivage et déphosphorylation de la pro-FLG. C'est cette agrégation aux filaments qui explique l'aplatissement des cellules. Les cornéocytes sont soudés entre eux par des cornéodesmosomes, après fixation de la cornéodesmosine (CDSN) aux desmosomes, eux-mêmes liés au cytosquelette de kératine. Ils sont couverts d'une enveloppe protéo-lipidique, l'enveloppe cornée, formée par le contenu des corps lamellaires et des protéines (LOR, INV). Plus on monte dans la couche cornée, plus la FLG perd son affinité pour la kératine. Elle y sera dégradée en acides aminés libres : l'acide pyrrolidone carboxylique (*pyrrolidone carboxylic acid*, PCA) et l'acide urocanique (*urocanic acid*, UCA), qui composent les facteurs naturels d'hydratation (*natural moisturizing factor*, NMF) à activité hygroscopique. L'ensemble de ces éléments assure l'imperméabilité de l'épiderme (Eckhart et al., 2013 ; Candi et al., 2005).

Parallèlement à la progression des cornéocytes vers la surface, les cornéodesmosomes, responsables de leur cohésion, sont eux aussi dégradés. La perte de ces structures conduit à un phénomène de détachement des cornéocytes appelé **desquamation**. Plusieurs protéases sont impliquées dans ce processus et même si leur identification précise est encore en cours, les **kallikréines (KLK)** représentent la famille la plus décrite. Citons notamment KLK5, KLK7, KLK14 dont le rôle a été démontré dans le clivage de certains composants desmosomiaux, comme la desmocolline 1, la cornéodesmosine et la desmogléine (Caubet et al., 2004 ; Stefansson et al., 2006). Ces sérines protéases initialement inactives sont relarguées à partir des corps lamellaires dans le milieu extracellulaire à l'interface entre couche granuleuse et cornée. Leur activation se fait par clivage selon une cascade d'autoactivation sous l'influence du pH et d'inhibiteurs de protéases, comme le *Lympho-epithelial kazal type related inhibitor*, LEKTI (Prassas et al., 2015).

Il est important de noter également que l'épiderme est sujet à un gradient de calcium extracellulaire, essentiel à la différenciation épidermique. La concentration de calcium, faible dans la couche basale, atteint un maximum au niveau de la couche granuleuse, puis est à nouveau réduite dans la couche cornée. Ce gradient intervient dans la libération du contenu des corps lamellaires à l'interface couche granuleuse / cornée et influence la régulation de l'expression des gènes de la différenciation épidermique, FLG, LOR ou INV par exemple (Elias et al., 2002).

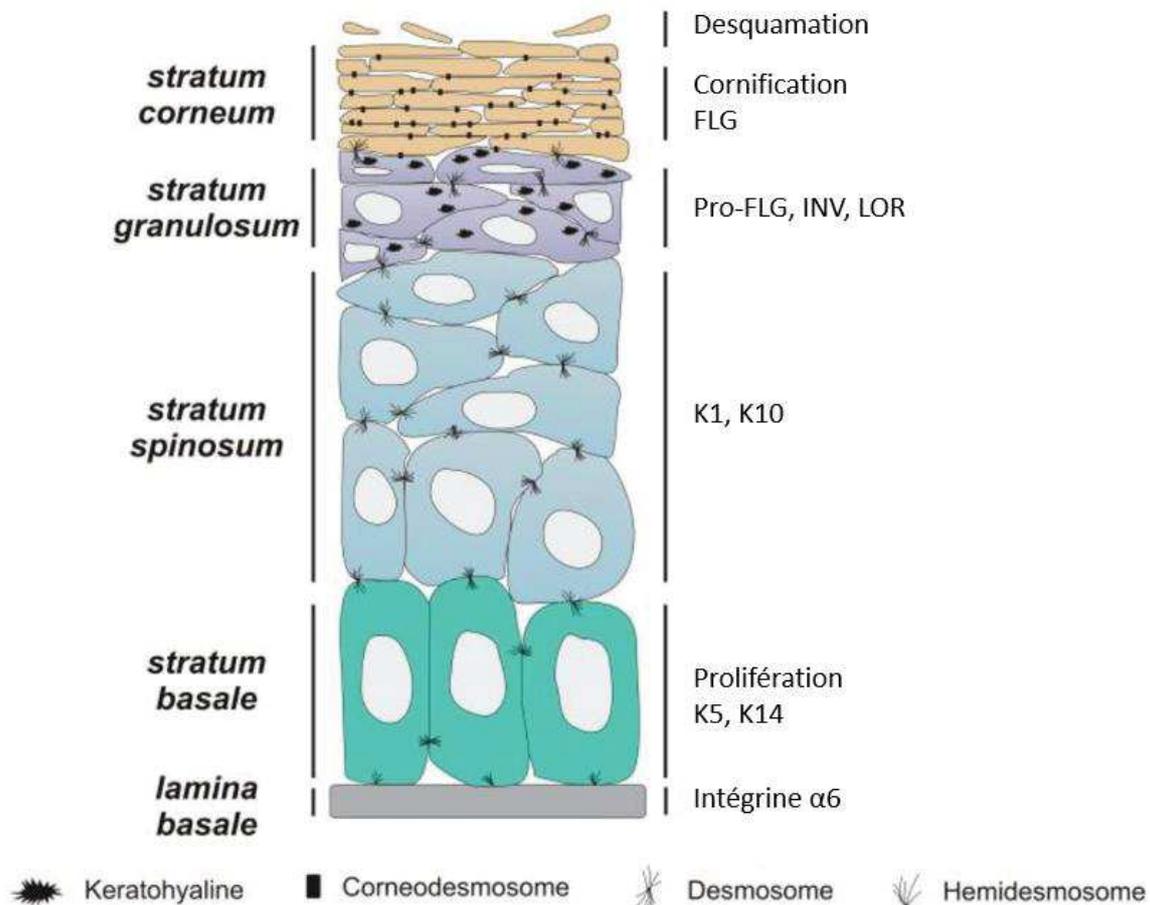


Figure 1 : Représentation de la structure épidermique. L'épiderme peut être schématisé en 4 couches, identifiables par l'expression de marqueurs spécifiques du stade de différenciation du kératinocyte : le *stratum basale* (K5, K14), le *stratum spinosum* (K1, K10), le *stratum granulosum* (pro-FLG, INV, LOR) et le *stratum corneum* (FLG). La cohésion des kératinocytes à la *lamina basale* se fait par l'intermédiaire de structures d'adhésion nommées hémidesmosomes et entre eux par des desmosomes et cornéodesmosomes (couche cornée uniquement pour ces derniers). *Illustration modifiée d'après Denecker et al., 2008.*

L'épiderme est donc un épithélium en perpétuel renouvellement, avec un cycle complet qui dure environ 28 jours. C'est ce qui assure sa cohésion et sa pérennité. Une perturbation de cet équilibre peut donner lieu à l'apparition de pathologies cutanées comme l'ichtyose vulgaire (IV), associée à un défaut de desquamation, et le psoriasis, où l'on observe une hyperprolifération de cellules mal différenciées. Ces maladies reflètent l'importance structurelle de l'épiderme dans sa fonction.

1.2 Le derme

Le derme est un tissu conjonctif, c'est-à-dire faisant office de jonction entre l'épiderme et l'hypoderme sous-jacent, dont les cellules qui le composent sont séparées entre elles par une matrice extracellulaire. Le derme est non stratifié et plus épais que l'épiderme, sa composition cellulaire et moléculaire est variable selon la profondeur par rapport à la surface, et il est soumis à un remodelage régulier. Le derme est vascularisé, contrairement à l'épiderme. On peut distinguer 2 régions : le derme papillaire et le derme réticulaire (*Mélessopoulos et al., La peau ; Freinkel et al., Biology of the skin*).

Le **derme papillaire** est le plus superficiel, il tient son nom des papilles dermiques qui s'imbriquent dans l'épiderme et confèrent un aspect ondulé à la jonction derme-épiderme. Cette zone est riche en fibroblastes, cellules immunitaires, vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle est également innervée par des prolongements nerveux dont les terminaisons peuvent arriver jusqu'à l'épiderme, et par des corpuscules comme les corpuscules de Meissner, récepteurs sensoriels du toucher léger. Tous ces éléments résident dans une substance fondamentale amorphe, constituée de protéoglycannes, de glycoprotéines, d'eau et d'acide hyaluronique.

Le **derme réticulaire** constitue la région inférieure, plus épaisse. Elle accueille plusieurs annexes cutanées comme les glandes sudoripares, les corpuscules de Paccini (sensibles aux vibrations) et de Ruffini (sensibles à la pression). Cet aspect réticulé vient du maillage plus dense de fibres, dont le diamètre augmente en allant vers l'hypoderme.

Les principales fibres constitutives du derme sont des fibres de collagène ou élastiques, à qui il doit ses propriétés mécaniques. Le **collagène** représente le composant constitutif majoritaire du derme. Il renvoie à une famille assez large de protéines, importante dans l'intégrité de nombreux tissus, classée en fonction de son architecture. Le collagène a pour structure générale une triple hélice de trois chaînes alpha, avec répétition de motifs d'acides

aminés glycine et proline. Le derme se constitue en grande partie de collagène de type I et III, classification faite selon la constitution de la chaîne alpha. Ces protéines s'associent en fibrilles puis en fibres, qui confèrent un caractère peu extensible mais résistant à la tension (*Shoulders et al., 2009*). Les fibres élastiques, comme leur nom l'indique, apportent l'élasticité (étirement et relâchement) au derme. Elles sont en relation étroite et complémentaire avec les fibres de collagène aux propriétés mécaniques opposées. Elles résultent de l'association d'une protéine insoluble, l'élastine (90%) avec des microfibrilles de fibrilline (10%). Le collagène et l'élastine du derme sont synthétisés par les fibroblastes. Les **fibroblastes** représentent le type cellulaire majoritaire du derme. Ils interviennent également dans la formation des autres composants de la matrice extracellulaire et sont responsables de leur dégradation via la synthèse de collagénases et de protéases. Ils sont très à l'écoute des signaux de l'environnement et en constante interaction avec les autres cellules. Par exemple, les fibroblastes papillaires, proches de l'épiderme, sont sensibles au facteur de croissance transformant β (*Transforming Growth Factor- β* , TGF- β), libéré après un trauma, qui induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, jouant un rôle essentiel dans la contraction de la plaie lors du processus de cicatrisation (*Li et al., 2011*).

2. Réseaux sanguins et lymphatiques

La peau est un système vascularisé qui regroupe deux circuits, la circulation sanguine et lymphatique. Le sang est indispensable à l'apport en nutriments et oxygène, la lymphe draine les fluides extracellulaires en excès en direction des ganglions lymphatiques. Les deux servent également à la circulation entrante et sortante des cellules immunitaires. Dans la peau, seuls le derme et l'hypoderme sont vascularisés. L'épiderme est uniquement approvisionné par diffusion à partir du réseau capillaire des papilles dermiques.

La **circulation sanguine** de la peau se décompose en trois réseaux anastomotiques de veines et artères interconnectés, parallèles à la surface de la peau. Le premier, sous l'hypoderme, correspond à un réseau de vaisseaux dont partent des branches perpendiculaires qui franchissent l'hypoderme et convergent jusqu'au second réseau, le plexus vasculaire profond, situé dans le derme réticulaire. De celui-ci émergent des collatérales rejoignant les annexes cutanées (glandes sudoripares, sébacées et follicule pileux) et traversant le derme réticulaire jusqu'à son extrémité papillaire pour former le plexus vasculaire superficiel à la jonction derme réticulaire / derme papillaire. Ce dernier réseau donne naissance aux capillaires

qui colonisent les papilles dermiques incrustées dans l'épiderme. Dans la peau, la **circulation lymphatique** suit le même parcours que le réseau artérioveineux, mais avec une organisation uniquement en capillaires et canaux collecteurs (*Braverman et al., 2000*).

Les vaisseaux sanguins et lymphatiques se caractérisent par la présence d'un endothélium composé de **cellules endothéliales**. Cet endothélium représente la couche la plus interne du vaisseau. Il peut être recouvert par d'autres couches (media et intima pour les veines et artères sanguines) ou uniquement par une lame basale (capillaires). La faible épaisseur du capillaire et sa faible vitesse de flux facilitent les échanges avec les tissus. En microscopie, les vaisseaux sanguins et lymphatiques s'identifient par l'expression commune du récepteur transmembranaire d'adhésion, *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), aussi appelé **CD31**. Celui-ci est retrouvé à la jonction entre deux cellules endothéliales et contribue à la migration (entrée, sortie) des leucocytes à travers les capillaires, notamment dans le processus final d'extravasation ou de diapédèse. En effet, les leucocytes expriment également, mais plus faiblement, le CD31, aidant à la reconnaissance et au passage entre deux cellules endothéliales par interaction homophile (*Garrido-Urbani et al., 2008*). Les capillaires sanguins se distinguent des lymphatiques par la présence de péricytes, qui influent sur l'angiogenèse et la régulation du débit sanguin. Notons que les cellules endothéliales lymphatiques expriment d'autres marqueurs d'adhésion comme la Podoplanine (PDPN) et le *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1* (LYVE-1) ce qui rend possible leur distinction en microscopie (*Ribatti et al., 2011*).

3. Innervation

La peau est un organe sensoriel majeur, en contact direct avec l'environnement extérieur, elle peut transmettre des informations multiples concernant notamment le toucher (pression, vibration, chaleur). L'intégration et la transmission de cette modalité sensorielle est effectuée par les neurones. Le derme et l'épiderme (sauf couche cornée) sont innervés par des fibres nerveuses du système périphérique, dont les corps cellulaires sont situés dans les **ganglions de la racine dorsale** (*Dorsal root ganglion, DRG*) le long de la moelle épinière. Les informations perçues seront ensuite centralisées et interprétées par le cerveau (*Hsieh et al., 1997 ; Laverdet et al., 2015 ; Oaklander et al., 2005*).

Il existe 3 types de fibres sensorielles innervant la peau : les **fibres A β , A δ et C**. Ces fibres, ou axones, correspondent à un prolongement cytoplasmique émis à partir du corps cellulaire du neurone, à terminaison nerveuse libre ou connectée avec une structure particulière à l'extrémité (disque, corpuscule). Elles se différencient dans un premier temps par leur structure : les fibres A β (diamètre 12 μ m) et A δ (5 μ m) sont protégées par une gaine de myéline, alors que les fibres C (1 μ m) sont amyélinisées. La **gaine de myéline** correspond à plusieurs enroulements de la membrane plasmique de cellules gliales, les **cellules de Schwann**, qui s'enroulent autour de l'axone. Le cytoplasme de ces cellules est riche en une protéine, la myéline, mais aussi en lipides et cholestérol. Sa composition la rend imperméable aux ions et assure l'isolation électrique des axones. C'est ce qui accroît la vitesse de transmission des influx nerveux par saut entre les zones de l'axone où la gaine est interrompue, ou nœuds de Ranvier, par un mécanisme connu sous le nom de conduction saltatoire. Les cellules de Schwann remplissent d'autres fonctions, c'est pourquoi elles sont aussi retrouvées à proximité des fibres nerveuses de type C non myélinisées. On parle dans ce cas de Schwann non myélinisantes, capables d'interagir grâce à leurs prolongements cytoplasmiques sur plusieurs axones, afin de participer à la croissance et à la régulation de l'équilibre ionique des neurones.

Les fibres A β sont responsables de la transmission de l'information liée au toucher. Contrairement aux terminaisons nerveuses libres des fibres A δ et C, elles nécessitent d'être encapsulées dans des structures particulières (corpuscules de Meissner, Pacini, Ruffini) ou en lien avec des cellules spécialisées (disques de Merkel). Ces récepteurs sont sensibles aux vibrations et à l'intensité de pression en fonction de leur localisation. Les corpuscules de Meissner et Merkel sont proches de l'épiderme, alors que ceux de Pacini et Ruffini sont proches du derme profond (**Figure 2**). Ils permettent l'intégration d'informations multiples allant de la perception des formes et textures aux déplacements sur la peau. Les fibres A δ et C possèdent des terminaisons nerveuses libres sensibles à la douleur et aux variations de température. Il est essentiel de retenir que les fibres C sont les fibres les plus nombreuses dans la peau (70%), qu'elles projettent majoritairement dans l'épiderme et participent notamment à la transmission des signaux à l'origine du prurit.

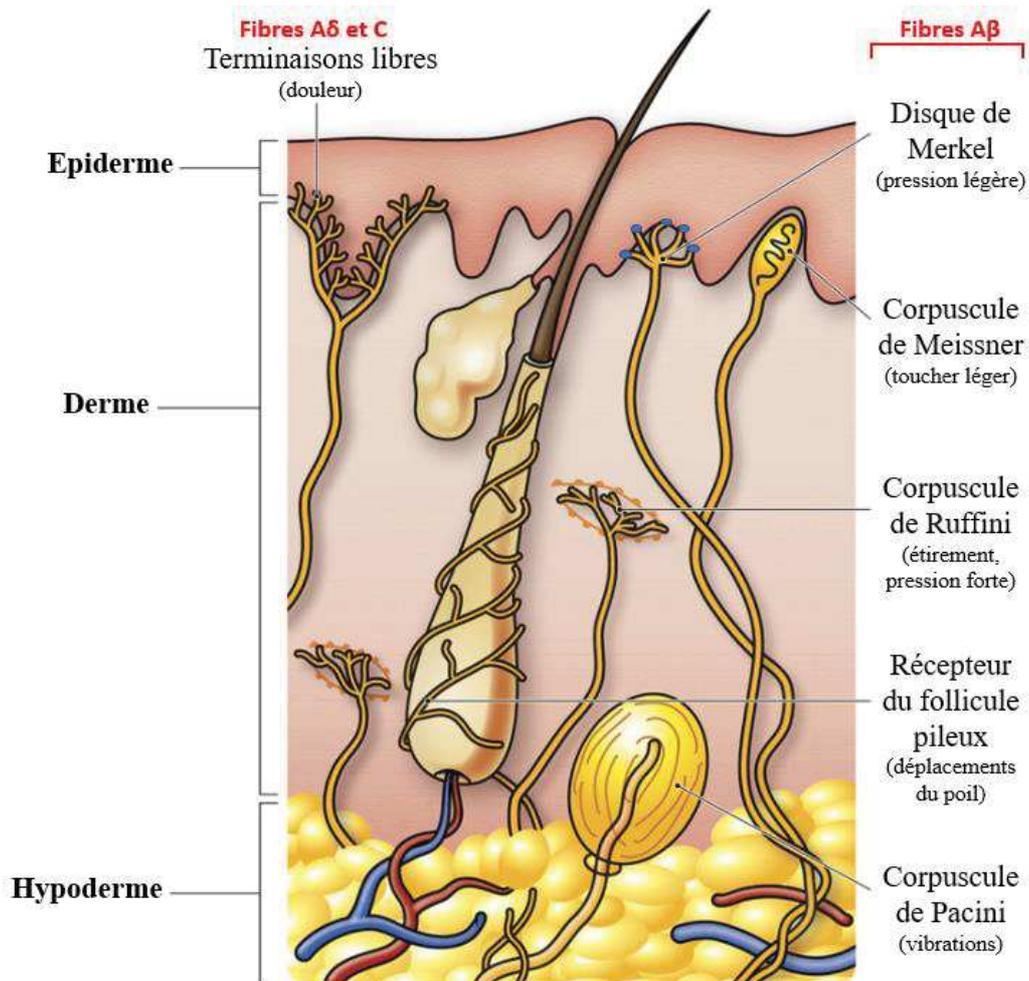


Figure 2 : Récepteurs sensoriels de la peau. Les fibres nerveuses cutanées représentent une population hétérogène de neurones mécanosensoriels, à terminaison nerveuse libre (fibres A δ et C) ou encapsulée (fibres A β) dans des structures spécifiques : disque de Merkel, corpuscule de Meissner, Ruffini, Pacini. La diversité de ces fibres permet la perception de signaux multiples par la peau, allant du toucher, de la pression, à la vibration. *Illustration modifiée d'après Tortora et al., Principes D'anatomie et de Physiologie.*

Certaines fibres nerveuses, en plus de transmettre des informations afférentes, sont capables de contribuer au relargage de médiateurs, cette fois-ci par des voies efférentes : on parle dans ce cas de **fibres peptidergiques**. Ces médiateurs, ou neuropeptides, sont contenus dans des vésicules aux extrémités des terminaisons nerveuses. Ils participent à la réponse inflammatoire locale, par exemple grâce à un effet sur les cellules endothéliales avec induction de la vasodilatation et accroissement de la perméabilité (Weidner et al., 2000). C'est le cas de certaines fibres C, productrices de la **Substance P (SP)** et du **Calcitonin gene-related-peptide (CGRP)**, deux des principaux neuropeptides trouvés dans la peau. Le récepteur de la SP, le récepteur neurokinine 1 (*Neurokinin 1 receptor*, NK1R) est un récepteur couplé à la protéine G (*G protein coupled receptor*, GPCR). Le récepteur de la CGRP est un hétérodimère du

Calcitonin receptor-like receptor (CRLR) et du *Receptor activity-modifying protein* (RAMP). Les récepteurs à SP et CGRP sont largement exprimés, notamment par les cellules de la peau (kératinocytes, cellules immunitaires). La production de neuropeptides par les fibres peptidergiques permet une communication et une coopération avec les cellules de l'environnement, dont les cellules immunitaires.

4. Système immunitaire

La peau par sa fonction de barrière est sujette non seulement à des stress physiques, mais elle est aussi exposée aux substances toxiques ou aux microorganismes potentiellement pathogènes. Le système immunitaire doit donc être préparé à les reconnaître et à les discriminer afin de fournir la réponse appropriée. De façon simplifiée, la première ligne de défense aspécifique est assurée par les cellules phagocytaires de l'immunité innée (macrophages résidants ou neutrophiles recrutés sur le site de l'infection) pour détruire le pathogène endocyté. Une seconde réponse, dite adaptative, spécifique des antigènes présents, est mise en place et complète la réponse innée. Elle est représentée en grande partie par les lymphocytes B (LB) et T (LT ou T) et nécessite une rencontre avec l'antigène. Ce dernier est transporté à partir du site de l'infection, par circulation dans le sang ou la lymphe, vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS), passivement ou grâce à des **cellules présentatrices d'antigène (CPA)**, notamment les DCs. La reconnaissance spécifique de l'antigène par les LB et LT conduit à leur expansion clonale et à la génération de lymphocytes effecteurs et mémoires. Ce procédé est influencé en amont dans la peau, via la libération de médiateurs par les cellules de l'environnement (kératinocytes, fibroblastes, endothéliales) et par d'autres cellules immunitaires présentes (mastocytes, basophiles, éosinophiles). Nous nous focaliserons dans cette partie sur le rôle des DCs, principales CPA migrant de la périphérie vers les OLS, dans la capture et la présentation de l'antigène, la polarisation des LT, ainsi que sur l'influence des signaux perçus par l'environnement lors de ce processus.

4.1 Maturation des DCs après reconnaissance de signaux de danger

Les DCs représentent une famille large et hétérogène de cellules immunitaires qui tiennent leur nom de leurs dendrites, dynamiques afin d'assurer la reconnaissance de pathogènes puis l'interaction avec le lymphocyte T. Les DCs sont circulantes (sang et lymphe) ou résidentes dans la majorité des tissus, dont la peau. Ces dernières, en grande majorité immatures à l'état physiologique, se retrouvent donc à la fois dans le derme et l'épiderme. Immature ne signifie pas inactif, en effet ces cellules ont la capacité de reconnaître directement

grâce à de nombreux récepteurs (*Pattern recognition receptor*, PRR) des motifs moléculaires associés aux microorganismes (*Microbe associated molecular patterns*, MAMP) ou aux dommages cellulaires (*Damage associated molecular patterns*, DAMP). Il existe plusieurs familles de PRR chez les vertébrés, ces derniers peuvent aussi bien être membranaires ou cytosoliques afin d'assurer la reconnaissance de pathogènes (intacts ou fragments de dégradation après internalisation) extracellulaires et intracellulaires (*Janeway et al., Immunobiologie de Janeway 4^e édition ; Owen et al., Immunologie de Janis Kuby 7^e édition ; Gros et al., Atlas d'immunologie*).

Parmi la grande variété de PRR, on peut retenir :

- les **récepteurs de type Toll** ou *Toll-like-receptors* (TLR), dont Jules Hoffmann, co-lauréat du prix Nobel 2011 en physiologie et médecine à Strasbourg, a contribué à la caractérisation. On peut citer par exemple le TLR4, récepteur de surface participant à la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane des bactéries Gram-, ou le TLR7, endosomal, pour l'ARN simple brin viral.

- les **récepteurs de lectines de type C** ou *C type lectin receptors* (CLR) qui lient des glucides à la surface des pathogènes extracellulaires, comme le mannose et le fucose pour CD209. Elles peuvent également reconnaître des complexes immuns via le récepteur à la fraction constante (*Fc receptor*, FcR) des complexes anticorps / antigènes.

- les **récepteurs induits par l'acide rétinolique** ou *Retinoic acid-inducible gene-1 like receptors* (RLR), PRR solubles impliqués comme senseurs de composants viraux.

- les **récepteurs de type Nod** ou *Nod-like receptors* (NLR) qui reconnaissent par exemple des MAMP bactériens.

Si le pathogène est extracellulaire, la liaison du ligand du PRR peut conduire à son internalisation par phagocytose ou macropinocytose (ingestion de fluide environnant la DC) et en l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires selon le PRR engagé. De plus, à l'intérieur de la cellule, l'antigène va être apprêté, c'est-à-dire présenté à la membrane par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Si l'antigène est intracellulaire, comme des particules virales, il sera pris en charge par le protéasome et présenté par le CMH I. Les CMH I sont exprimées par la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme, elles peuvent présenter l'antigène aux LT CD8+. Le CMH II est réservé aux CPA (DCs, macrophages, LB) et présente lui aux LT CD4+, sauf cas particulier de présentation croisée.

De plus, suite aux signaux de danger perçus via les PRR, la DC va maturer, c'est-à-dire augmenter l'expression des molécules de costimulation B7 (B7.1 ou CD80 ; B7.2 ou CD86) et du CMH I et II, afin d'améliorer l'apprêtement des antigènes. Elle va aussi produire de nouvelles cytokines et chimiokines pour influencer son environnement ou recruter des cellules (par exemple le *C-C motif chemokine ligand 18*, CCL18 peut attirer les LT). Grâce à l'expression accrue du *C-C motif chemokine receptor 7* (CCR7) sensible aux chimiokines CCL19 et CCL21 émises par les vaisseaux lymphatiques du derme, les DCs matures sont désormais capables de migrer vers les OLS afin de présenter les antigènes aux lymphocytes T. On peut en outre noter que ces chimiokines sont également produites dans les tissus lymphoïdes et que CCR7 est aussi présent sur les lymphocytes T naïfs qui s'y trouvent, ce qui favorise les interactions entre ces derniers et les DCs en provenance de la périphérie.

4.2 Classification des DCs de la peau

Très tôt dans la littérature ont été mises en évidence des différences phénotypiques entre les DCs, donnant naissance à une classification en perpétuel débat et renouvellement (**Tableau I**, page 14). Ce besoin de classification va aussi refléter des différences fonctionnelles qui seront présentées dans les paragraphes suivants.

Les DCs peuvent se diviser en trois groupes, les DCs conventionnelles (cDCs), les DCs plasmacytoïdes (pDCs) et les DCs dérivées de monocytes (MonoDCs). Elles ont pour point commun l'expression du CMH II, tel que **HLA-DR**. La peau en conditions physiologiques (peau saine, non inflammée) contient une majorité de cDCs mais peu de MonoDCs et pDCs, dont le nombre sera surtout augmenté par recrutement lors de l'inflammation. Chez l'homme, les DCs dites conventionnelles, ou classiques, peuvent être subdivisées en cDC1 (CD141 *high*) et cDC2 (CD1c+). Les sous-populations CD14+ du derme et les cellules de Langerhans (CD207+) ont des propriétés différentes, discutées plus bas (*Collin et al., 2018 ; Boltjes et al., 2014 ; Kashem et al., 2017 ; Malissen et al., 2014*).

Les **cellules de Langerhans (LCs)** sont des DCs spécifiques à l'épiderme, en contact étroit avec les kératinocytes et à activité phagocytaire importante. On vulgarise régulièrement les LCs comme première ligne de défense de la peau, en raison de leur présence dans l'épiderme qui en fait les cellules immunitaires les plus proches du milieu extérieur. Elles sont caractérisées par la présence de granules de Birbeck, des vésicules d'endocytose qui se forment par invagination de la membrane grâce à la langérine (ou CD207). **CD207** est une lectine

transmembranaire de type C qui fonctionne comme un PRR (Valladeau et al., 2000). Afin de les distinguer des autres DCs, on peut noter que les cellules de Langerhans expriment CD1c et des niveaux plus élevés de **CD1a**.

Les **cDC1 (CD141+)** et **cDC2 (CD1c+)** ont elles aussi une activité présentatrice d'antigène, mais leur localisation est exclusivement dermique. L'expression de CD141 est particulièrement forte chez les cDC1, bien que ce marqueur soit également retrouvé chez une partie des cDC2. Pour distinguer les cDC2, on peut se fier à leur expression de **CD1a** et **CLEC10A** (Heger et al., 2018). Les cDC1 expriment quant à elles faiblement le CD11c. De plus, en termes de proportion, les cDC1 sont minoritaires par rapport aux cDC2 dans le derme.

Les cellules **CD14+ dermiques** sont hétérogènes, bien qu'exprimant toutes le marqueur HLA-DR, elles restent encore aujourd'hui difficiles à décrire. Elles comprennent notamment des **macrophages**, qui grâce à une activité phagocytaire importante, contribuent à l'élimination de cellules mortes et débris en condition homéostasique et lors du processus de cicatrisation (Davies et al., 2013). En présence d'un pathogène, l'expression de nombreux PRR fait de ces macrophages des cellules cruciales de l'immunité innée. Comme ils expriment le CMH II, ils peuvent également faire office de CPA, mais de manière beaucoup moins efficace que les cDCs. On suspecte plutôt une contribution à des réponses déjà engagées par les DCs ou un rôle local dans la réactivation de T mémoires (Atri et al., 2018 ; Janeway et al., *Immunobiologie de Janeway 4^e édition*). La mise en culture d'explants de peau a un effet pro-inflammatoire qui entraîne l'activation et la migration des DCs. Cette technique, dite de *crawl-out*, a permis de distinguer des macrophages, sessiles, une population de cellules CD14+ qui migre en dehors de l'explant (comme les autres DCs et LCs). En raison de cette mobilité, ces CD14+ ont été historiquement classées comme des DCs, mais peut-être à tort. En effet, contrairement aux autres DCs migrantes de la peau, elles expriment peu le CCR7 (McGovern et al., 2014), indispensable à la migration vers les vaisseaux lymphatiques via CCL21 (Ohl et al., 2007), et induisent une faible prolifération des T autologues (McGovern et al., 2014). La migration des CD14+, observée uniquement *in vitro* en dehors de l'explant, serait donc un biais apporté par la technique du *crawl-out*. L'équipe de Haniffa M. (Haniffa et al., 2009 ; McGovern et al., 2014) a conduit un travail permettant de différencier phénotypiquement les sous-populations CD14+ entre elles, mais aussi avec les autres DCs dermiques. L'analyse par cytométrie montre une autofluorescence des macrophages qui n'est pas retrouvée chez les autres cellules CD14+ (Haniffa et al., 2009). Toutes les CD14+ possèdent le marqueur **CD163**, mais il est exprimé plus fortement par les macrophages. CD163 n'est pas présent sur les cDC1 et cDC2. De même, **CD209** est plus fort sur les CD14+ que les CD1c+. Les marqueurs LYVE-1 et FXIIIa sont

exprimés par les macrophages et non par les autres CD14+ (McGovern *et al.*, 2014). De plus, la présence de nombreuses vacuoles dans le cytoplasme des macrophages explique une granularité (*Side Scatter*, SSC en cytométrie) plus importante. Ces derniers sont aussi plus adhérents au plastique en culture cellulaire. Par rapport aux DCs CD1c+, l'expression de **CD80** et **CD86** basale (sans stimulation) des CD14+ est plus faible, et elle l'est encore plus pour le CD86 chez les macrophages (Haniffa *et al.*, 2009). Comme déjà évoqué, par culture d'un explant de peau humaine les macrophages migrent très peu contrairement aux DCs CD14+ et CD1c+. Il est plus donc facile de digérer la peau pour les récupérer (Haniffa *et al.*, 2009).

Pour résumer, on peut définir les macrophages comme des cellules avec une autofluorescence forte, exprimant CD14, CD163, FXIIIa, LYVE-1, mais également CD68 et **CD206** (Haniffa *et al.*, 2009). Même s'il existe une réelle proximité avec les macrophages, les autres cellules CD14+ dermiques sont LYVE-1- et FXIIIa *low*. Elles sont aussi CD1c- et CD1a- ce qui les différencie des CD1c+. Dans la suite de ce manuscrit, pour faire la distinction avec les macrophages, nous continuerons par simplicité à les nommer **DCs CD14+**.

	LCs	cDC1 (CD141+)	cDC2 (CD1c+)	DCs CD14+	Macrophage
HLA-DR	+	+	+	+	+
CD209	+	+	+	+	+
CD207	+	-	-	-	-
CD14	-	-	-	+	+
CD141	-	++	-/+	-/+	-
CD1c	+	-	+	-	-
CD1a	++	-	+	-	-
CD163	-	-	-	+	++
CD206	-/+	-	-/+	+	+
CLEC10A	-	-	++	+	+

Tableau I : Classification phénotypique des principales DCs et des macrophages

Ce tableau regroupe les principaux marqueurs que nous utiliserons dans cette étude, essentiels à l'identification des principales DCs et des macrophages retrouvés dans la peau (Kashem *et al.*, 2017 ; Carpentier *et al.*, 2016 ; Haniffa *et al.*, 2009 ; McGovern *et al.*, 2014)

4.3 Origine et développement des DCs

Les **LCs**, contrairement aux **cDCs**, ne dérivent pas d'un précurseur sanguin en provenance de la moelle épinière (**Figure 3**, page suivante). En effet, d'après les informations récoltées des modèles murins, elles proviennent de progéniteurs dérivés de la vésicule vitelline ou de monocytes du foie fœtal et se mettent en place très tôt au cours du développement de la peau (*Chorro et al., 2009*). Cette installation précoce dès le stade embryonnaire a été confirmée chez l'homme (*Elbe-Bürger et al., 2010*). Après la naissance, les LCs présentes dans l'épiderme prolifèrent lentement et sont conservées dans le temps, un mode de vie assez proche des macrophages. Même si elle est réalisable *in vitro*, une dérive de monocytes sanguins en LCs n'est pas encore démontrée *in vivo* chez l'homme (*Merad et al., 2008*), comme c'est pourtant le cas chez la souris (*Ginhoux et al., 2006*).

Comme pour les LCs, les **macrophages** tissulaires se mettent en place au stade embryonnaire et s'automaintiennent indépendamment des monocytes (*Hashimoto et al., 2013*). Au cours de la vie, le pool de macrophages peut être renouvelé et accentué lors d'une inflammation à partir de monocytes sanguins circulants CD14⁺ CD16⁺. On parle dans ce cas de macrophages dérivés de monocytes infiltrant, différenciés dans le tissu.

Les **cDC1** et **cDC2** ont une durée de vie beaucoup plus courte que les LCs. Ils sont fréquemment remplacés par de nouvelles cellules provenant d'un précurseur commun de la moelle, le *Common dendritic cell precursor* (CDP), qui dérive lui-même d'un ou plusieurs précurseurs de la lignée myéloïde et/ou lymphoïde à partir d'une cellule souche hématopoïétique (*Hematopoietic stem cell, HSC*) (*Kashem et al., 2017*).

Les **DCs CD14⁺** semblent avoir une source monocyttaire. En effet, après analyse transcriptomique, elles présentent de fortes similarités transcriptionnelles avec les monocytes sanguins et macrophages. De plus, il a été observé chez des patients subissant un traitement myéloablatif, en prévision d'une transplantation de HSC, que la recolonisation de la peau en DCs CD14⁺ est synchronisée avec celle des monocytes CD14⁺ du sang (*McGovern et al., 2014*). Pour le moment leur origine monocyttaire n'est que suggérée dans cette étude et il persiste des différences phénotypiques et fonctionnelles avec les macrophages. Néanmoins, cette forte proximité a poussé les auteurs de cette étude à définir les DCs CD14⁺ comme des macrophages dérivés de monocytes.

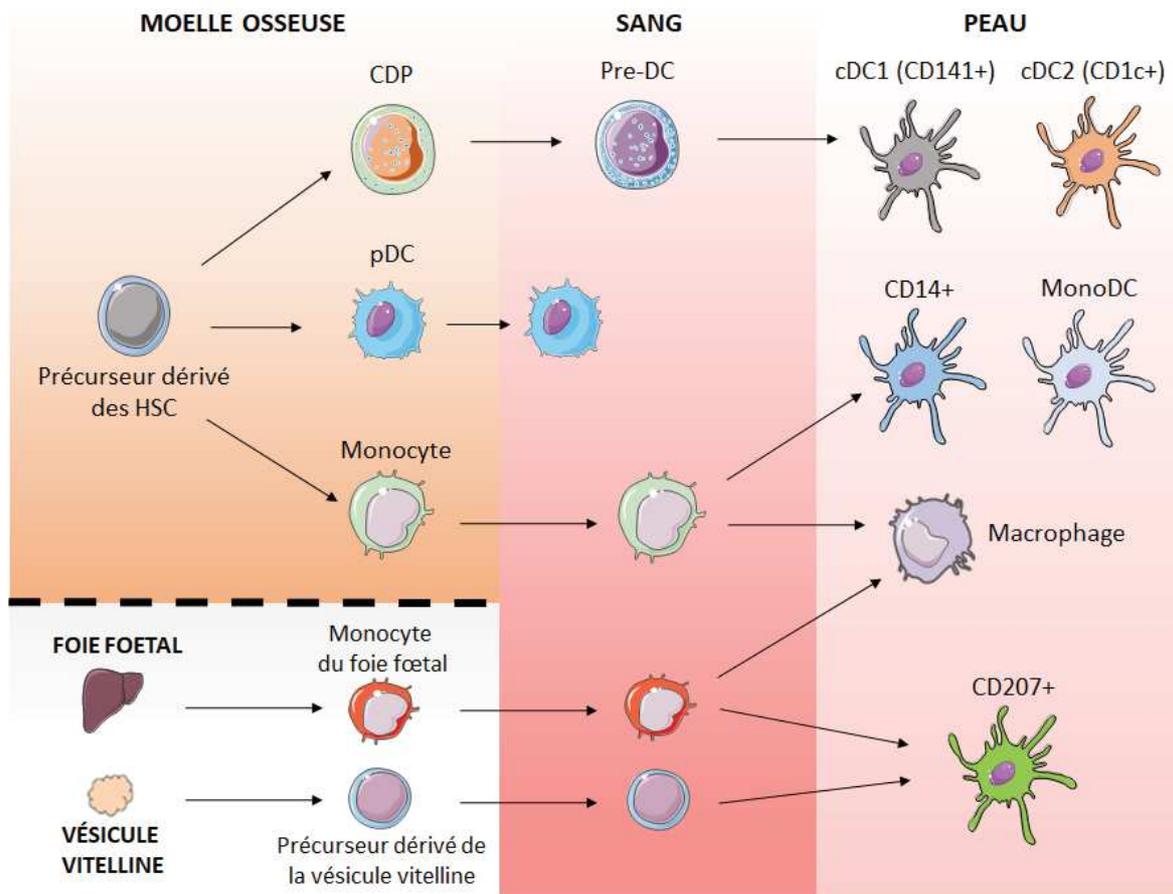


Figure 3 : Origine des DCs et macrophages. Les macrophages et les LCs de la peau s'installent très tôt dans le développement fœtal à partir de précurseurs du foie et du sac vitellin. À longue durée de vie, ils sont assez peu renouvelés. Les monocytes sanguins sont source eux aussi de macrophages et de DCs (CD14+ et MonoDCs). Cependant, la population majoritaire de DCs dans la peau appartient au groupe des cDC1 et cDC2, qui dérivent d'un précurseur sanguin (pre-DC) et osseux (CDP) commun. *Illustration reproduite et modifiée d'après Haniffa et al., 2015.*

4.4 Présentation antigénique aux LT

Comme déjà suggéré brièvement, la fonction de CPA est assurée majoritairement par les DCs, grâce à l'expression d'un panel de récepteurs large qui leur confère la capacité d'ingérer, d'apprêter puis de présenter des fragments d'antigènes aux lymphocytes après migration dans les OLS.

Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ qui quittent le thymus, après sélection positive vis-à-vis des molécules CMH et négative vis-à-vis d'antigènes du soi, sont fonctionnels mais encore naïfs, c'est-à-dire qu'ils n'ont jamais rencontré l'antigène que leur récepteur reconnaît spécifiquement. Chaque lymphocyte T exprime un seul type de récepteur d'antigène qui

provient d'un réarrangement aléatoire de gènes lors de la différenciation thymique. Ils sont mobiles et circulent en permanence dans le sang et la lymphe. Dans la zone paracorticale des OLS, ils peuvent rencontrer les DCs présentant un antigène du non-soi ou repartir si cette rencontre n'a pas lieu.

La reconnaissance d'antigènes par les LT se fait par l'intermédiaire de fragments antigéniques présentés sur le CMH d'une CPA (**Figure 4**). Le LT va pouvoir interagir via son complexe récepteur des cellules T (TCR)/CD3 et fournir le **premier signal** nécessaire à l'activation, à la prolifération et à la rétention du LT dans l'OLS, par diminution de l'expression de sélectines et intégrines. Cette interaction est complétée par la fixation du récepteur CD4 ou CD8 du LT avec un domaine non associé au peptide du CMH de la CPA.

Le **second signal** est donné par l'interaction entre les molécules de costimulation de la DC et les récepteurs spécifiques sur le LT, par exemple CD80/CD86 avec le CD28. Ce signal servirait notamment, en plus d'aider à l'activation, à stabiliser le contact DC/LT et induire la production d'interleukine 2 (IL-2), cytokine qui influence la prolifération du LT.

Le **troisième signal** est fourni par les cytokines dites polarisantes, produites par les CPA, les cellules de l'environnement, les cellules de l'immunité inée, ou les LT eux-mêmes, qui ont reconnu l'antigène ou répondu à un stress. Ces trois signaux sont donc cruciaux et nécessaires pour l'activation du LT. Celle-ci se traduit par l'expansion clonale (prolifération de clones à TCR identique), la différenciation et la polarisation (*Janeway et al., Immunobiologie de Janeway 4^e édition ; Owen et al., Immunologie de Janis Kuby 7^e édition ; Gros et al., Atlas d'immunologie*).

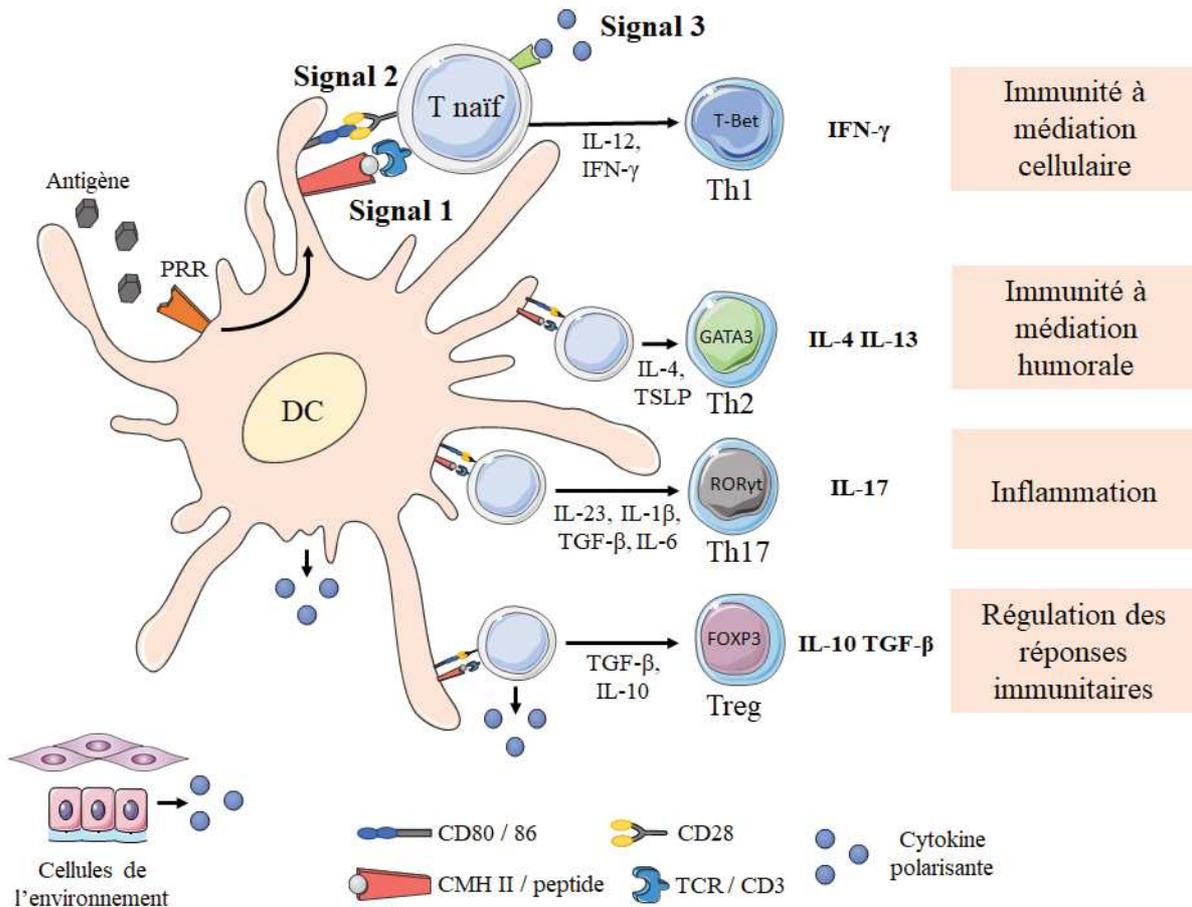


Figure 4 : Régulation de la différenciation des sous-populations de LT par les DCs. Cette figure illustre les événements cellulaires qui font suite à la rencontre entre une DC qui a déjà capturé et présenté l'antigène avec, par exemple, un LT CD4⁺ naïf. L'engagement de ce T vers une lignée requiert 3 signaux : la liaison entre le CMH II/peptide et TCR/CD3 (signal 1) ; l'interaction du LT avec les molécules de costimulation (signal 2) ; la réponse délivrée aux cytokines polarisantes (signal 3). Ces informations produisent une cascade de signalisation dans la cellule T, qui peut l'orienter vers la prolifération et la différenciation en Th1 (producteur d'IFN γ), Th2 (IL-4, IL-13), Th17 (IL-17) ou Treg (IL-10, TFG- β), sous l'influence de facteurs de transcriptions spécifiques de chaque lignée (T-Bet, GATA3, ROR γ t et FOXP3, respectivement). *Illustration reproduite et modifiée d'après Owen et al., Immunologie de Kuby 7^e édition.*

4.5 Classification et polarisation des LT

L'interaction entre une CPA et un LT naïf déclenche une cascade de signalisation qui conduit à la génération de cellules T effectrices et mémoires. Les cellules T effectrices ont une durée de vie assez courte, évaluée en jours ou semaines, afin de gérer la réponse immunitaire immédiate. Contrairement aux LT mémoires qui vont persister au long terme dans le tissu en prévention d'une seconde infection (*Janeway et al., Immunobiologie de Janeway 4^e édition ; Owen et al., Immunologie de Janis Kuby 7^e édition ; Gros et al., Atlas d'immunologie*).

Les cellules T effectrices CD4 et CD8 ont des fonctions auxiliaires (**T helper, Th**) ou cytotoxiques (Tc) respectivement. La population de Th est plus diversifiée que celle des Tc. Les Tc activés migrent vers les tissus après différenciation et activation dans les OLS afin de détruire les cellules infectées. Les Th activés peuvent eux aussi aller vers le tissu incriminé dans le but cette fois de produire des cytokines qui vont influencer les cellules avoisinantes. Les Th sont hétérogènes et fournissent chacun un panel de cytokines qui leur sont propres. Parmi cette grande famille, on peut retenir les **Th1**, qui produisent l'interféron γ (IFN γ) et le facteur de nécrose tumorale α (*Tumor necrosis factor α* , TNF- α), les **Th2** qui secrètent IL-4, IL-5, IL-13, et les **Th17** libérateurs d'IL-17. Le type de cellule Th qui sera généré dépend de l'infection et des signaux reçus par le LT naïf, c'est cette diversité qui assure une réponse immunitaire spécifique. Par exemple, les cytokines IL-12 et IFN- γ aident à la mise en place de la lignée Th1, IL-4 et la TSLP dirigent vers Th2, IL-23, IL1 β , TGF- β et IL-6 vers Th17 (**Figure 4**). Ces cytokines polarisantes induisent la transcription d'un gène régulateur cible (T-bet pour Th1, GATA3 pour Th2, ROR γ T pour Th17) crucial dans ce mécanisme. On peut noter qu'il existe une régulation croisée entre les lignées de LT, c'est-à-dire que la cellule T une fois engagée produit généralement des cytokines qui polarisent sa propre expansion et qui vont inhiber celle des autres lignées. C'est le cas de l'IL-4 libérée par les Th2, qui soutient directement une différenciation Th2 mais aussi indirectement, en réduisant la production d'IL-12 pro-Th1. En pratique, les Th1 contrôlent la réponse à un pathogène intracellulaire par médiation cellulaire, avec stimulation de l'activité phagocytaire des macrophages et cytolytique des Tc. Les Th2 et Th17 sont eux impliqués dans la réponse aux pathogènes extracellulaires. On sait par exemple que les Th2 induisent plutôt une réponse humorale, avec production des **immunoglobulines E (IgE)** par les LB dans l'allergie.

Parmi les LT effecteurs se classent également les **T régulateurs (Tregs)**, induits ou naturels, qui ont la particularité de moduler négativement les réponses T. Les Tregs naturels sont différenciés dans le thymus et ont un TCR qui reconnaît des antigènes du soi pour prévenir la formation de T autoréactifs. Les Tregs induits proviennent eux d'un T naïf polarisé dans l'OLS. Ils ont comme cytokine polarisante TGF- β , et FoxP3 en tant que facteur de transcription. Ils sont producteurs d'IL-10 et de TGF- β à activité immunosuppressive. Ils agissent par diminution de la présentation antigénique en réduisant l'expression du CMH et la prolifération des T par une inhibition de la production d'IL-2. Le but est de prévenir une réponse immunitaire excessive (*Hai Zhao et al., 2017 ; Schmitt et al., 2013*).

Un autre groupe de LT, les **T folliculaires (Tfh)**, a été mis en évidence plus récemment dans la littérature. Producteurs d'IL-21, ils sont localisés dans les OLS à proximité des LB et contribuent au développement et à la différenciation de ces dernières en plasmocytes producteurs d'anticorps. Ils ont comme cytokines polarisantes IL-6, IL-21 et comme facteur de transcription le *B-cell lymphoma 6* (Bcl-6). Ils présentent des similitudes avec les Th, ce qui conduit à distinguer des sous-populations Tfh1, Tfh2 et Tfh17 (Crotty et al., 2014).

Après élimination du pathogène, la grande majorité des T effecteurs meurt par apoptose. Persiste en périphérie une population de **T résidents mémoires (TRM)** qui survivent au long terme dans un état quiescent en attente d'une nouvelle infection par le même antigène (Clark et al., 2015). La peau est en effet le siège de TRM CD4+ (Th1, Th2 par exemple) et CD8+ (Tc). À noter qu'une partie des T mémoires, les T mémoires centraux, se différencient et restent dans l'OLS.

4.6 Rôle des DCs de la peau dans la polarisation des LT

De nombreuses études avec des DCs sanguines et cutanées ont été réalisées *in vitro*, par **réaction mixte lymphocytaire** (*Mixed lymphocyte reaction*, **MLR**) afin de déterminer la capacité de ces cellules à orienter des LT naïfs. La MLR est un protocole qui consiste à mettre en culture des DCs provenant d'un premier donneur avec des LT CD4+ naïfs d'un second donneur. Le TCR du LT va donc reconnaître la poche peptidique du CMH II de la DC allogénique comme un peptide étranger. Ce protocole permet la différenciation des LT naïfs en T *helper* sans présentation d'un antigène spécifique. Ce processus sera influencé à la fois par les molécules de surface coexprimées par les DCs et les cytokines libérées (signal 2 et 3).

À partir de LCs isolées de peau, des résultats variables ont été constatés : induction préférentielle (mais comparable aux cDCs) de Th2 (Klechevsky et al., 2008), Th17 (Mathers et al., 2009), Th22 (Fujita et al., 2009), ou de LT CD8+ (Klechevsky et al., 2008) selon les études. Des différences méthodologiques dans l'isolation des LCs pourraient expliquer ces résultats parfois contradictoires. Dans l'étude de Klechevsky et al., derme et épiderme sont séparés par digestion enzymatique, puis l'épiderme est mis en culture afin de récolter les cellules migrantes. Mathers et al. ont mis en culture directement des explants de peau complète. Alors que Fujita et al. ont entièrement digéré l'épiderme après séparation enzymatique du derme. Le protocole utilisé aura nécessairement un impact sur le phénotype ou la maturation des LCs isolées. D'un

point de vue général, le protocole de MLR *in vitro* suggère une influence multiple des LCs après migration vers le ganglion. Or, la découverte de TRM dans la peau a poussé l'équipe de Kupper TS. (*Seneschal et al., 2012*) à étudier leur interaction avec les LCs. Selon cette étude, en plus d'une proximité certaine dans l'épiderme, les LCs induisent directement la prolifération des TRM autologues, avec une préférence pour les Tregs.

Les **cDC1 (CD141+)** d'explant de peau humaine, après stimulation par un antigène soluble (*hepatitis B surface antigen*), semblent pouvoir cross-présenter via le CMH I préférentiellement aux T CD8+, comme l'atteste la mesure de l'IFN γ (*Haniffa et al., 2012*). Toujours selon cette étude, ces DCs ne sont que faiblement productrices d'IL-12.

Les **cDC2 (CD1c+)** sont équipées de nombreux PRR et impliquées *in vitro* dans l'orientation des LT CD4+ naïfs en T helper (Th1, Th2, Th17 notamment) mais aussi en LT CD8+, suggérant également *in vivo* un rôle complet et multiple dans la réponse immunitaire en fonction du stimulus reçu (*Sittig et al., 2016*).

Les **DCs CD14+** induisent, selon Klechevsky E. et al, des T folliculaires, aidant les LB autologues à la production d'IgM, IgA et IgG (*Klechevsky et al., 2008*). D'après McGovern N. et al, les CD14+ isolées de la peau conduisent à une prolifération de T naïfs allogéniques par MLR 80% plus faible que les cDC2 (CD1c+). De plus, elles sont capables d'induire une production des cytokines IFN γ , IL-4, IL-17, IL-22 par les T mémoires aussi bien que le font les cDC2 et les macrophages (*McGovern et al., 2014*).

Pour conclure cette première partie, il faut garder à l'esprit que la peau est une structure riche et complète. La fonction première de cet organe est d'apporter protection à l'hôte. Mais notamment par sa proximité avec le milieu extérieur, les cellules qui la composent sont susceptibles à une multitude de signaux qui vont influencer leur comportement. La coopération entre ces agents au sein du système immunitaire est au cœur de cette thèse, avec les cellules dendritiques faisant office de véritables sentinelles face aux agressions extérieures. Cependant, ces cellules peuvent aussi être associées avec une rupture de la tolérance périphérique, menant à des pathologies inflammatoires chroniques, telles que la **dermatite atopique (DA)** qui nous intéresse ici particulièrement. En effet, nous avons choisi de construire un modèle de DA *in vitro*, afin d'en éclaircir la physiopathologie qui n'est pas encore totalement comprise. Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous allons donc introduire la maladie, ses mécanismes, ses traitements, pour identifier les points clés utiles à la construction de notre modèle et à l'élaboration de nos objectifs d'étude.

Chapitre II. La dermatite atopique

La DA est une maladie inflammatoire chronique de la peau. Elle affecte communément les enfants et le jeune adulte sous influence de facteurs héréditaires (terrain atopique) et environnementaux. Sa prévalence, en augmentation notamment dans les pays industrialisés, en fait un problème majeur de santé publique. Elle se manifeste cliniquement par l'apparition de lésions cutanées prurigineuses délétères pour la vie du patient (grattage et troubles de l'attention). Son évolution est généralement bonne, même si elle peut représenter dans certains cas la première étape vers d'autres manifestations allergiques comme l'asthme, c'est la notion de **marche atopique**. Les avancées de la recherche ont aidé à comprendre en partie sa physiopathologie, mais sa multifactorialité ne permet pas encore l'existence d'un traitement suffisant, la prise en charge étant majoritairement basée sur la prévention des crises.

Les paragraphes suivants vont avoir pour but de présenter la DA, afin d'appréhender sa complexité et d'évaluer le besoin actuel d'obtenir un modèle *in vitro* cohérent permettant d'élucider certaines pistes de prise en charge de la maladie.

1. Définition de l'atopie et de la dermatite atopique

L'atopie se définit comme une prédisposition génétique personnelle ou familiale à produire des IgE spécifiques en réponse à des antigènes environnementaux communs, auxquels la majorité de la population ne réagira pas, on parle dans ce cas d'**allergènes**. La DA correspond donc en d'autres termes à une atteinte cutanée inflammatoire après exposition à un allergène chez un sujet atopique (*Johansson et al., 2004*). Même si la DA est une affection cutanée, elle est souvent corrélée à des allergies respiratoires (*Belgram et al., 2015*) et/ou alimentaires (*Bergmann et al., 2013*). L'identification précise de ces allergènes et leur implication dans l'exacerbation des symptômes de DA est encore sujette à investigation.

2. Épidémiologie

La DA affecte 15-30% des enfants et 2-10% des adultes. Elle survient en majorité (85% des cas) avant l'âge de 5 ans. Sa prévalence est en continuelle augmentation, en particulier dans les pays industrialisés, où elle a été doublée en 20 ans (*Asher et al., 2006*). Ces chiffres, qui semblent refléter un impact du style de vie et de l'environnement, ont été à l'origine de la **théorie dite « hygiéniste »**, qui suppose que l'amélioration des conditions de santé dans les pays développés, en diminuant l'exposition à des pathogènes bénins, accroît la susceptibilité du

système immunitaire aux allergènes. Cette théorie, apparue dans les années 2000 et largement débattue, tend parfois aujourd'hui à être réfutée (*Scudellari et al., 2017*). Elle évoque déjà la complexité de la physiopathologie de la maladie et un besoin d'éclaircissement.

3. Signes cliniques et diagnostic

3.1 Clinique

Les signes cliniques de la DA sont variables, en partie reliés à l'âge, l'ethnie et à la sévérité de la maladie. Ils se caractérisent de façon générale par l'apparition de **lésions prurigineuses**, avec une **densité nerveuse accrue** (hyperinnervation) (*Urashima et al., 1998*), sur un fond de **sécheresse cutanée** (xérose). La morphologie et la distribution des lésions varient en fonction de l'âge de la population atteinte (**Figure 5**) (*Weidinger et al., 2018*).

Chez le nourrisson et le jeune enfant (jusqu'à 2 ans), les lésions peuvent apparaître dès la première année, majoritairement lors des 3 premiers mois de vie. Le développement de rougeurs érythémateuses le plus souvent aiguës, mal limitées, sur une peau rugueuse doit suggérer une DA. Le grattage chez le nourrisson n'étant pas clairement identifiable, l'étude de son comportement (agitation, troubles du sommeil, frottements contre les draps ou les vêtements) peut se révéler utile dans le diagnostic. Ces lésions, largement distribuées, vont se retrouver de façon symétrique sur le visage, mais aussi atteindre les membres dans les formes les plus étendues. Le cuir chevelu peut être touché par des plaques séborrhéiques et jaunâtres communément appelées « croutes de lait ». Chez l'enfant de plus de 2 ans, les lésions cutanées vont avoir tendance à se trouver sur des parties définies, comme les zones de flexion et les plis (cou, coudes, genoux). La xérose est importante, notamment en hiver. Dans des cas rares, quand les lésions d'eczéma persistent jusqu'à l'âge adulte ou qu'elles se déclarent seulement à partir de cet âge plus tardif, elles atteignent non seulement les zones de flexion, le visage et le cou, mais également les mains. Elles prennent un aspect lichénifié car la peau s'épaissit avec le grattage.

La DA est une **affection chronique**, avec des phases de poussées et de rémission. De manière générale, les lésions aiguës s'identifient par un aspect rouge vif, œdémateux, avec de petites vésicules qui évoluent par suintement puis éclatement. La phase de réparation est sujette à l'apparition de croutes. Les lésions chroniques ont un aspect lichénifié, avec épaissement ou acanthose, la peau paraît quadrillée par des sillons avec des excoriations.

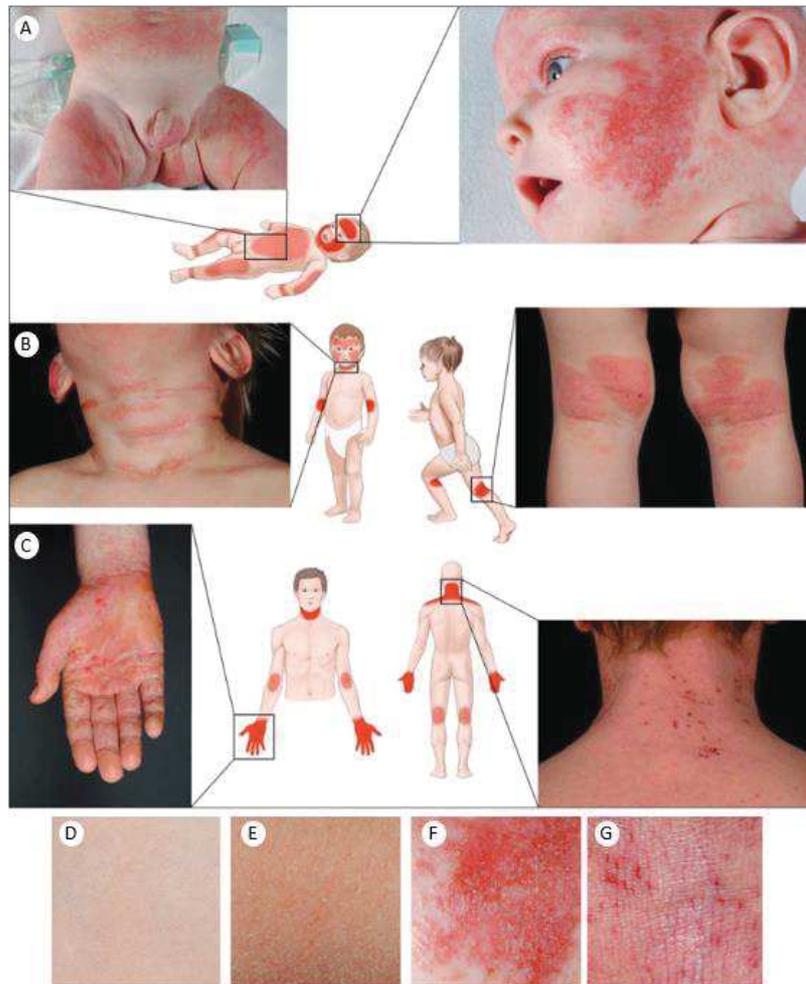


Figure 5 : Lésions de DA. (A) Chez le nourrisson et l'enfant d'âge inférieur à 2 ans, les lésions érythémateuses et vésiculeuses sont prédominantes au niveau du visage et des membres. (B) Chez l'enfant de plus de 2 ans, les zones de flexion et plis sont particulièrement atteints. (C) Chez l'adolescent et l'adulte jeune, les plaques lichénifiées et excoriées peuvent se localiser sur le tronc supérieur et les mains. Les images suivantes sont représentatives d'une (D) peau saine, (E) peau non lésionnelle, (F) lésion aiguë et (G) lésion chronique. *Illustration modifiée d'après Weidinger et al., 2016.*

3.2 Diagnostic et système de notation de la maladie

Le phénotype clinique des patients, qui repose sur la morphologie des lésions et leur distribution selon l'âge, est le principal élément diagnostique de la DA. L'étude phénotypique est complétée par un interrogatoire, à la recherche de chronicité, d'antécédents familiaux et d'un allergène suspecté (environnement, habitudes alimentaires). Plusieurs outils sont à la disposition des cliniciens afin de faciliter la reconnaissance et le diagnostic de la DA, comme la table de Hanifin et Rajka (*Brenninkmeijer et al., 2008*).

De façon non systématique (mauvaise réponse au traitement ; symptômes évocateurs d'une allergie associée type asthme ; suspicion de dermatite de contact) la recherche de l'allergène peut être accompagnée par la réalisation d'un bilan allergologique avec un dosage

sanguin des IgE et un test cutané dit « *prick test* ». Celui-ci consiste en l'application d'un allergène sur la peau, le test est positif s'il y a apparition de rougeur ou papule.

La sévérité de la maladie peut être évaluée par différents systèmes de notation, tels que le **Score in atopic dermatitis (SCORAD)**, qui existe sous la forme d'une fiche que le médecin peut remplir à chaque consultation afin d'obtenir une note de 0 à 13. Il prend en compte l'intensité des symptômes constatés (localisation des lésions, apparence) et rapportés par le patient (démangeaisons, insomnie). Ce système permet ainsi de suivre plus facilement l'évolution de la maladie. L'**Eczema area and severity index (EASI)**, plus répandu en dehors de l'Europe, se base sur un principe similaire. Ces échelles sont utilisées à la fois par le médecin, mais font aussi office de référence dans les essais cliniques et nombreuses publications scientifiques (*Schmitt et al., 2014*).

4. Physiopathologie

La DA est une affection chronique inflammatoire de la peau qui débute, dans la majorité des cas, très tôt dans la vie de l'individu. Notre compréhension de la physiopathologie de la DA a largement progressé ces dernières années. Comme nous allons le discuter dans les paragraphes suivants, il est maintenant clair qu'elle associe à la fois un défaut de barrière et une perturbation immunitaire sous influence de facteurs environnementaux et génétiques. Cependant, l'interaction possible entre ces différents aspects de la physiopathologie fait qu'il persiste encore certaines zones d'ombres (*Weidinger et al., 2018 ; Dainichi et al., 2018*).

4.1 Aspects génétiques

Pourquoi développe-t-on un eczéma ? La réponse à cette question n'est pas simple et il est difficile d'identifier un élément déclencheur précis. Néanmoins, nous savons qu'une partie de cette réponse se trouve dans le patrimoine génétique du patient. En effet, l'importance des facteurs génétiques dans la DA est clairement suggérée par la définition même de l'atopie. Les études épidémiologiques font de la présence d'un antécédent familial d'allergie (DA, mais aussi asthme, rhinite allergique) le principal facteur de risque de la maladie (*Apfelbacher et al., 2011*). Au fil des ans, un très grand nombre de gènes candidats ont été identifiés comme associés à la DA. Ces gènes codent soit pour des protéines de la structure épidermique, soit pour des éléments majeurs du système immunitaire.

De nombreux gènes assurant l'homéostasie et la différenciation épidermique se situent dans une région nommée complexe de différenciation épidermique (CDE) sur le chromosome 1q21. Cette région est considérée comme une zone « chaude » sujette à des mutations. On y trouve avec une forte proximité les gènes codant pour les S100 *calcium-binding proteins* (S100), les *small proline-rich proteins* (SPRR), l'involucrine, la loritrine et la **pro-filaggrine (pro-FLG)**. À titre d'exemple, plus d'une vingtaine de mutations, dont les plus décrites R501X et 2282del4, ont été référencées à ce jour pour la pro-FLG. Ce sont pour la plupart des mutations de type *single-nucleotide polymorphism* (SNP) qui créent une pro-FLG tronquée ne pouvant pas être clivée en monomères de FLG (Brown *et al.*, 2012 ; McAleer *et al.*, 2013). On constate que le spectre des mutations retrouvé est différent d'une population à l'autre, parfois sur le même continent. Ces distributions spécifiques de populations ont été regroupées dans la revue de Thyssen JP. *et al.* (Thyssen *et al.*, 2013). D'un point de vue général, la prévalence de mutations FLG est estimée à 8% chez les Européens et 3% chez les Asiatiques. Un lien entre la présence de ces mutations et un risque trois fois supérieur de développer une DA a rapidement été mis en évidence (Brown *et al.*, 2012). Cependant, seulement environ 20% des patients avec une DA modérée présentent des mutations FLG, à l'inverse plus de 50% des individus avec une mutation FLG ne sont pas malades (Weidinger *et al.*, 2008). De plus, si on fait le parallèle avec les patients souffrants d'ichtyose vulgaire (IV), porteurs d'une double mutation avec perte de fonction totale de la FLG, on remarque qu'ils ne sont pas systématiquement atteints de DA (Thyssen *et al.*, 2013). Ces données prouvent que les mutations FLG ne sont pas suffisantes pour causer la DA.

Une seconde région, cette fois située sur le chromosome 5q31-33, contient des clusters de gènes impliqués dans la physiopathologie de cette maladie. On y retrouve notamment le gène ***Serine peptidase inhibitor kazal-type 5 (SPINK5)*** qui code pour la protéine LEKTI, un inhibiteur de protéases à sérine exprimé à la surface de la peau. Sa mutation conduit à la déficience en LEKTI et donc une hyperactivité des protéases (comme les KLK) avec perte de l'intégrité épidermique. Les études épidémiologiques à la recherche d'une corrélation entre le polymorphisme du gène SPINK5 et la DA ont révélé des résultats controversés. On trouve un lien chez les populations asiatiques (Zhao *et al.*, 2012) et britanniques (Walley *et al.*, 2001), mais pas sur la population française (Hubiche *et al.*, 2007).

Ce même cluster contient également les gènes codant pour les cytokines **Th2 IL-4 et IL-13**, dont certains polymorphismes ont été décrits comme associés à la DA. D'autres gènes potentiellement impliqués sont regroupés dans Al-Shobaili HA. *et al.* (Al-Shobaili *et al.*, 2016).

4.2 Défaut de barrière

La peau du sujet atteint de DA se caractérise par une sécheresse cutanée, aussi bien en lésionnel qu'en non lésionnel, associée à un défaut de la capacité de barrière. Ce dernier s'observe directement chez les patients par une augmentation de la **perte insensible en eau** (*Transepidermal water loss*, TEWL) et ce indépendamment du statut FLG (*Jakasa et al., 2011*). Comme décrit dans la première partie introductive de ce manuscrit, l'intégrité de la peau est assurée par la couche la plus externe de l'épiderme, le *stratum corneum*, qui maintient la cohésion, prévient des pertes en eau et des infections. Cette dysfonction est cruciale dans la pathogenèse de la DA, si bien que sa place dans la chronologie de la maladie est vivement débattue. Le défaut de barrière est-il primaire et déclencheur de la maladie, ou une conséquence ?

4.2.1 Protéines de la barrière

Bien qu'il n'y ait pas de réponse établie à l'heure actuelle. Plusieurs pistes viennent étayer ces deux hypothèses. Le rôle de la génétique dans la fonction de barrière a déjà été évoqué dans le paragraphe précédent. Toutefois, même en l'absence de mutations délétères, une **déficiencia en FLG** est aussi retrouvée chez les patients atteints de DA (analyse de biopsies par immunohistochimie : *Howell et al., 2009*). Cette observation suggère une influence de médiateurs libérés dans l'environnement des kératinocytes qui peuvent modifier l'expression de la FLG (*Thyssen et al., 2014*). Celle-ci peut par exemple être modulée par les cytokines surexprimées dans la peau des patients DA, comme les cytokines Th2 IL-4 et IL-13 (*Howell et al., 2009*). La déficiencia en FLG génétique ou induite a pour conséquence d'altérer l'architecture de l'épiderme par perturbation de l'organisation des filaments de kératine et des corps lamellaires (*Gruber et al., 2011*). Cependant, elle accroît aussi la sécheresse de la peau par réduction des facteurs naturels d'hydratation et perte en eau (*Kezic et al., 2008*), ce qui augmente le pH (*Gruber et al., 2011*).

D'autres protéines de la barrière cornéocytaire sont affectées dans la DA, on peut citer la lorocrine (LOR) et l'involucrine (INV) qui contribuent à la formation de l'enveloppe cornée (*Kim et al., 2008*), et la cornéodesmosine (CDSN) qui constitue les cornéodesmosomes (*Lee et al., 2017*). L'analyse de l'expression de ces protéines, par immunohistochimie et *Polymerase chain reaction* (PCR), est trouvée réduite en lésionnel et non lésionnel sur la peau des patients DA en comparaison à de la peau saine. De plus, d'après ces mêmes études et comme c'est le

cas pour la FLG, l'expression de ces protéines est diminuée par les cytokines Th2 IL-4 et IL-13 (analyse de kératinocytes primaires cultivés en 2D). L'atteinte de la barrière est aussi possible plus bas dans les couches épidermiques, en effet, la claudine 1 (CLDN-1) qui rentre dans la constitution des jonctions serrées, est réduite dans la DA (*De Benedetto et al., 2011*).

En résumé, le défaut de barrière peut donc dépendre de plusieurs protéines (FLG, INV, LOR, CDSN, CLDN-1) dont l'expression est également sous le contrôle de cytokines, Th2 en particulier, présentes dans la DA (*McPherson et al., 2010*).

4.2.2 Protéases

La barrière peut aussi être altérée par une activité protéolytique de surface accrue, s'expliquant par une augmentation de la fonction de certaines protéases, dont la source peut être exogène (pathogène) ou endogène. Ces dernières, représentées notamment par les **kallikréines (KLK)** à activité sérine protéase, sont celles qui, en conditions physiologiques, assurent la desquamation par clivage des cornéodesmosomes. Une action excessive des KLK a pour conséquence une desquamation trop importante qui peut se révéler pathologique, comme l'attestent les patients atteints du syndrome de Netherthon. Dans cette affection, on retrouve une diminution de l'expression de l'inhibiteur de protéases LEKTI, par mutation du gène SPINK5, conduisant ainsi à un défaut de barrière accentué et une inflammation cutanée proche des lésions atopiques (*Chavanas et al., 2000*). La proximité clinique entre le syndrome de Netherthon et la DA a suggéré l'étude de ces protéases dans cette dernière. On y constate une expression plus importante des KLK dans la couche cornée en comparaison à des donneurs sains (*Komatsu et al., 2007*). Cette différence peut s'expliquer par deux facteurs : la fonctionnalité des KLK étant pH-dépendante, la basification du pH observée dans la DA est concomitante avec une augmentation de l'activité des KLK (chez la souris : *Jang et al., 2015*). De plus, comme les KLK sont sous le contrôle de l'inhibiteur LEKTI, le polymorphisme de son gène SPINK5 (**Chapitre II, 4.1**) pourrait être impliqué. Si la cause exacte de cette hyperactivité est encore sous discussion, la conséquence est, elle, mieux décrite. En effet les KLK, en plus d'accroître la desquamation et donc le défaut de barrière (*Caubet et al., 2004*), sont aussi activatrices du **récepteur à protéases 2** (*Protease-activated receptor-2, PAR2*), impliqué dans l'induction de la production de *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP ; alarmine pro-Th2, **Chapitre II, 4.3.3**) par les kératinocytes et l'apparition de lésions type DA (chez la souris Netherthon : *Briot et al., 2009* ; chez la souris DA : *Jang et al., 2015*).

4.2.3 Composition lipidique de l'épiderme

La couche cornée se caractérise par la présence d'un ciment intercornéocytaire lipidique hydrophobe (céramides, acides gras libres, cholestérol) qui assure le maintien de l'hydratation et qui est nécessaire à la fonction de barrière cutanée. Une altération de la composition des céramides de la couche cornée a été mise en évidence dans la DA chez l'homme. Il y est décrit une diminution de l'expression des céramides à longues chaînes et une augmentation de ceux à courtes chaînes (*Ishikawa et al., 2010*). Janssens M. et al. ont établi une corrélation entre ces modifications et la sévérité de la DA, ainsi qu'avec la déshydratation cutanée par mesure de la perte insensible en eau (TEWL) (*Janssens et al., 2012*). L'atteinte des céramides pourrait s'expliquer plus précisément par une perturbation de la libération du contenu des corps lamellaires du kératinocyte lors de la cornification (*Fartasch et al., 1992*) ou par la modification de l'expression des enzymes qui interviennent dans leur métabolisation (*Hara et al., 2000*).

4.2.4 Microbiome / Dysbiose

La peau est colonisée par un certain nombre de microorganismes qui constituent le microbiome de surface (*Grice et al., 2011*). Une bonne homéostasie requiert un équilibre constant entre ces hôtes. Ainsi, une perturbation de cette balance affecte aussi bien la fonction de barrière de la peau que les réponses immunitaires.

a) Colonisation par *Staphylococcus aureus*

Le patient DA se caractérise par une colonisation prédominante par le genre *Staphylococcus*, en particulier par *Staphylococcus aureus (S. aureus)*, concomitante avec une perte des espèces potentiellement bénéfiques. Celle-ci est, de plus, associée à la sévérité de la maladie. Il a été décrit que *S. aureus* est retrouvé dans 20-30% de la population normale, 70% des lésions DA et plus rarement en non lésionnel (*Totté et al., 2016 ; Fyhrquist et al., 2019*). Il est donc intéressant de se demander pourquoi la peau DA est plus sujette à ce déséquilibre et quelles en sont les éventuelles conséquences sur la peau (*Geoghegan et al., 2018 ; Blicharz et al., 2019*).

Dans la DA, la peau présente un **pH plus élevé** (pH normal entre 4 et 6). Cette altération peut s'expliquer notamment par la déficience en FLG, source des NMF qui influent sur l'hydratation de la peau et son pH. Cet environnement, neutre à basique, est favorable directement à la prolifération de *S. aureus*, mais aussi à l'inhibition de l'efficacité de peptides

antibactériens (*Rippke et al., 2004*). Comme l'homéostasie de la peau repose sur un équilibre entre les espèces du microbiome, la prédominance de *S. aureus* contrebalance sur celle des autres (*S. epidermidis* par exemple), retrouvées en effet moins présentes dans les lésions DA (*Byrd et al., 2017*). Or, il a été démontré que ces souches contribuent dans la peau normale à diminuer la prolifération de *S. aureus* par production de substances bactéricides ou de toxines (*Nakatsuji et al., 2017*). De plus, les souches de *S. aureus* isolées de sujets DA montrent une facilité d'adhésion à la peau de patients, en comparaison à une peau saine. Cette fixation serait préférentielle aux cornéocytes et se ferait notamment par liaison à la fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire, dont l'expression est supérieure dans la cornée de peau DA. Ce sont les dommages à l'épithélium, caractéristiques de la DA, qui conduiraient à l'induction de ces protéines d'adhésion (*Cho et al., 2001*).

Après avoir mis en évidence la colonisation de la peau DA par *S. aureus*, la littérature s'est intéressée à déterminer la place de cette bactérie au sein de la physiopathologie de la maladie. Ainsi sa présence a rapidement été décrite comme facteur aggravant. Les études ont montré qu'elle est capable d'altérer la fonction barrière par augmentation de l'expression de protéases endogènes, diminution de la FLG (stimulation de kératinocytes primaires 2D : *Williams et al., 2017*) et de la CLDN-8 (analyse transcriptomique de biopsies DA : *Fyhrquist et al., 2019*). *S. aureus* peut aussi induire une réponse immunitaire pro-Th2 par induction de la production de TSLP (*Vu et al., 2010*) ou directement d'IL-13 (*Fyhrquist et al., 2019*). Ces actions s'expliquent par la présence d'un certain nombre de facteurs de virulence, comme :

- des **entérotoxines** (*Staphylococcus* entérotoxine A et B, SEA/B) qualifiées de superantigènes, c'est-à-dire des antigènes capables d'induire une forte réponse T par fixation directe, sans apprêtement au CMH II de la CPA ou au TCR du T. SEB par exemple, montre une induction préférentielle des T en Th2 IL-31+ après stimulation d'explant de peau DA (*Sonkoly et al., 2006*), et contribue à la synthèse d'IgE (*Orfali et al., 2015*).

- des **protéases** (staphopaine, V8 serine protéase) qui peuvent accroître le défaut de barrière et faciliter la pénétration de *S. aureus*, comme démontré dans un modèle de peau reconstruite et chez la souris (*Nakatsuji et al., 2016*), mais également protéger des peptides antimicrobiens par dégradation de la cathélicidine LL37 (*Sieprawska-Lupa et al., 2004*).

- des **toxines** (δ -toxine) qui conduisent à la dégranulation de mastocytes (*Nakamura et al., 2013*).

La colonisation par *S. aureus*, qui a longtemps été envisagée comme simple facteur aggravant de la DA, tend aujourd'hui à être perçue comme un élément contribuant à l'initiation de la maladie. En ce sens, une étude de cohorte a démontré la prédominance de *S. aureus* chez des enfants qui ont développé une DA en grandissant (Meylan et al., 2017).

b) Activité des peptides antimicrobiens

La présence de **peptides antimicrobiens** (*Antimicrobial peptides, AMPs*) à la surface de la peau conditionne le microbiome et la réponse immunitaire innée. Les AMPs, souvent considérés comme une barrière soluble sur la peau, sont de petites protéines cationiques produites en majorité par les kératinocytes mais également par les mastocytes ou neutrophiles infiltrants après une inflammation. Ils présentent une activité antimicrobienne directe par perméabilisation de la membrane du pathogène et indirecte par recrutement de cellules inflammatoires via la libération de cytokines et chimiokines (Braff et al., 2005 ; Kopfnagel et al., 2013).

Les peptides antimicrobiens peuvent se subdiviser en plusieurs familles, dont les plus décrites sont les **β -défensines** (comme la *human β -defensin 2*, hBD-2) et les **cathélicidines** (par exemple LL37). La colonisation par *S. aureus* a longtemps laissé penser à une réduction de l'expression des AMPs dans la DA. Cependant, même si celle-ci est plus faible que dans le psoriasis (De Jongh et al., 2005), en comparaison avec une peau normale, elle est plus élevée. Pourtant IL-4 et IL-13, prédominantes dans la peau DA, réduisent les AMPs *in vitro* (Nomura et al., 2003). La présence de ces cytokines ne serait donc pas suffisante *in vivo* pour inhiber les AMPs.

La corrélation entre la présence d'AMPs et l'infection par *S. aureus* est controversée : elle n'existe pas selon Harder J. et al. (mesure par immunofluorescence sur biopsie et par *Enzyme-linked immunoassay*, ELISA sur le liquide de lavage d'échantillons de peau *in vivo* : Harder et al., 2010) en désaccord avec Fyhrquist et al. (analyse transcriptomique de biopsies DA : Fyhrquist et al., 2019). Si les AMPs ne sont pas induits par *S. aureus*, certains ont suggéré qu'ils pourraient l'être par le défaut de barrière. En effet, par desquamation mécanique induite *in vivo*, on observe un accroissement de l'expression des AMPs (Harder et al., 2010).

Devant ces données, on peut imaginer quelques hypothèses. L'augmentation des AMPs dans la DA pourrait perturber l'équilibre du microbiome, avec une inhibition préférentielle des souches autres que *S. aureus*, leur libérant ainsi une niche de croissance. Ces AMPs pourraient

également rendre *S. aureus* non invasif. En effet, l'infection reste locale dans la DA, sa forme généralisée n'est présente que dans les cas les plus sévères, et ce malgré le défaut de barrière constant (Benenson et al., 2005). À l'inverse, même si les AMPs sont là, on peut supposer que leur activité est affectée. Comme les protéases sont modulées dans la DA (**Chapitre II, 4.2.2**), il s'agit peut-être d'une anomalie de clivage de leurs précurseurs inactifs.

4.3 Réponse immunitaire

La DA est une maladie allergique et inflammatoire qui fait intervenir à la fois les composants du système immunitaire inné et du système adaptatif. D'une façon simplifiée, chez ces patients atopiques, la réponse immunitaire à un stress fourni par l'environnement peut se définir comme anormalement excessive. Leur susceptibilité accrue et multiple rend l'identification précise de ce stress complexe. Il peut à la fois être local (bactéries, irritants) ou mécanique. Mais il peut aussi provenir d'un allergène alimentaire (noix, lait, œufs) ou respiratoire (pollen, acariens, poils, fumée). En effet, le défaut de barrière, décrit uniquement sur la peau dans le paragraphe précédent, serait également retrouvé dans la paroi respiratoire ou intestinale (Zhu et al., 2018). Il influe donc très probablement sur la pénétration de ces allergènes au niveau de l'ensemble des barrières épithéliales, même si les mécanismes par lesquels les symptômes cutanés apparaissent sont encore mal connus. La peau pourrait rester la voie principale d'entrée de ces allergènes, notamment avec certains aliments, comme évoqué dans des revues récentes (Ong et al., 2019 ; Tordesillas et al., 2017).

Dans la pratique, on va distinguer 2 formes de DA. La majorité des malades (environ 80%) présentent un taux élevé d'IgE total dans le sérum, c'est la **forme extrinsèque** de la maladie (Akdis et al., 2003). Ces IgE sont spécifiques à des allergènes communs (Reefer et al., 2001). Comme dans la plupart des allergies, dont l'asthme, les IgE sont libérées par les LB durant la phase de sensibilisation sous l'influence des Th2. Elles se mettent en place à la surface des cellules exprimant le récepteur à la fraction constante FcεRI, notamment les DCs et les mastocytes, et aident à une réponse plus rapide après nouveau contact avec l'allergène.

À l'inverse, une minorité (20% des cas) n'exprime pas plus d'IgE qu'un contrôle sain, on parle de **forme intrinsèque** (Akdis et al., 2003). Cette forme de DA IgE-indépendante suppose que le rôle des IgE et des allergènes n'est pas toujours crucial dans le développement de la maladie. A contrario, le point commun retrouvé dans les deux formes de DA est la présence d'un infiltrat de cellules T en lésionnel et en non lésionnel, à **prédominance Th2** (Hamid et al., 1994 ; Suárez-Fariñas et al., 2013).

4.3.1 Caractérisation des lésions

Dans la DA, l'infiltrat de lymphocytes T évolue en fonction du stade de la maladie. En effet, par PCR et immunofluorescence sur biopsie de peau DA, il a été constaté que la peau lésionnelle aiguë se démarque par l'expression des cytokines **Th2** (IL-4, IL-13, IL-31). En période de chronicité, la lésion progresse vers un profil mixte **Th17** (IL-17) et **Th1** (IFN γ). L'influence des Th1 et Th17 à ce stade est encore floue. L'IL-17 pourrait notamment influencer la production d'IgE par les LB humains *in vitro* (Milovanovic et al., 2010). Mais *in vivo* on suppose une influence majoritaire de la cytokine IL-22, qui prédomine en comparaison à IL-17 dans les lésions de DA (Nogales et al., 2009). Le récepteur de l'IL-22 est exprimé par les kératinocytes, et très peu par les cellules immunitaires (Wolk et al., 2004). L'IL-22 a été décrit comme réduisant l'expression de la FLG (Gutowska-Owsiak et al., 2011) et inhibant la différenciation terminale du kératinocyte (Eyerich et al., 2009). Ceci suggère un rôle principal de cette cytokine dans la fonction de barrière et dans l'épaississement de l'épiderme caractéristique des lésions chroniques. De même, on peut supposer un rôle des Th1 dans l'épaississement de l'épiderme, car l'IFN- γ favorise l'apoptose des kératinocytes (Rebane et al., 2012). Les Th2 vont acquérir au stade chronique une expression significative d'IL-5, synchronisée avec le recrutement des éosinophiles. Les kératinocytes, susceptibles aux signaux de dangers, produisent des alarmines (IL-1 α , IL-25, IL-33, TSLP) et des chimiokines (CCL17/TARC, CCL22/MDC) qui participent à la réponse Th2, indirectement grâce aux DCs et à la présentation antigénique, et directement par recrutement (Hamid et al., 1994 ; Gittler et al., 2012 ; Weidinger et al., 2018). L'émergence de nouvelles thérapeutiques ciblant les cytokines Th2 semblent prometteuses dans le traitement de la DA, contrairement aux antihistaminiques fréquents dans la prise en charge de l'allergie, mais peu utilisés ici (**Chapitre II, 5.2**). Ces données suggèrent donc le rôle crucial de la réponse Th2 dans la physiopathologie de la DA.

4.3.2 Influence des cytokines Th2

Les Th2 sont présents en permanence dans les lésions aiguës et chroniques. Comme déjà évoqué, ses principales cytokines, **IL-4 et IL-13**, influent à plusieurs niveaux dans la physiopathologie de la DA : le défaut de barrière (baisse de l'expression de FLG, LOR, INV), la baisse des AMPs, une orientation Th2 autocrine, la production d'IgE, l'activation des neurones sensoriels (**Chapitre II, 4.4**) et le recrutement d'éosinophiles (Paul et al., 2010). Ces deux cytokines présentent des fonctions souvent similaires. Cette proximité s'explique par le

fait que leur récepteur partage une chaîne commune, l'IL-4R α , avec une signalisation identique par l'intermédiaire des Janus kinases 1 et 3 (JAK1, JAK3) et l'activation du transducteur de signal et activateur de transcription 6 (*Signal transducer and activator of transcription 6*, STAT6) (Mueller et al., 2002). IL-13 est tout de même suspecté dans la littérature récente d'avoir un rôle prédominant dans la DA (Bieber et al., 2020). Elle est majoritaire dans les lésions (Tsoi et al., 2019) et induite préférentiellement par la TSLP (**Chapitre II, 4.3.3c**).

Les Th2 sont aussi source d'IL-31. Cette cytokine a pris place au centre des débats suite à sa découverte et sa mise en évidence au sein des lésions DA (Sonkoly et al., 2006). Son récepteur est exprimé par certaines cellules immunitaires (éosinophiles, basophiles, cellules dendritiques), les kératinocytes et les fibres nerveuses cutanées (Nakashima et al., 2018). Des expériences *in vitro* de stimulation par IL-31 sur les DCs CD1c+ sanguines (Horejs-Hoeck et al., 2012) ou sur des kératinocytes primaires en 2D (Dillon et al., 2004) montrent la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-8) et de chimiokines (comme CCL22/MDC) capables d'influer sur la migration des Th2. Sur modèle 3D de peau reconstruite, elle peut aussi affecter la barrière et réduire l'expression en FLG (Cornelissen et al., 2012). Comme nous le verront bientôt, IL-31 est aussi impliquée dans le prurit de la DA (**Chapitre II, 4.4**).

4.3.3 TSLP

Dans la continuité de cette introduction, une question se pose : comment expliquer cette orientation Th2 préférentielle ? Les lésions de DA se caractérisent par l'expression prédominante de l'alarmine TSLP par les kératinocytes différenciés des couches supra-basales en lésionnel, aiguë et chronique (Soumelis et al., 2002). La TSLP a émergé comme un initiateur clé dans la réponse Th2 et les manifestations allergiques de la DA, mais aussi dans l'asthme (Liu et al., 2006). Chez la souris, un modèle surexprimant TSLP induit une affection cutanée type eczéma, avec un infiltrat inflammatoire et une concentration élevée dans le sérum en IgE (Yoo et al., 2005). De plus, à nouveau chez la souris, l'application de vitamine D₃ déclenche la synthèse de TSLP et certains symptômes de la DA (Li et al., 2006). TSLP est aussi retrouvée dans les voies respiratoires des patients asthmatiques, en lien avec la sévérité de la maladie et la présence de Th2 (Ying et al., 2005 ; Zhou et al., 2005 ; Shikotra et al., 2012).

a) Sources

La TSLP est produite principalement par les **cellules épithéliales** au niveau des barrières (peau, muqueuse respiratoire, intestinale) de manière constitutive ou induite en réponse à des facteurs environnementaux et/ou endogènes. Parmi les inducteurs de TSLP, on peut retenir :

- des cytokines Th2 (IL-4, IL-13), TNF- α (Bogiatzi et al., 2007), ou IL1 β (Bernard et al., 2017)
- des ligands TLR : les acariens ou *House dust mite*, HDM (Kuroda et al., 2017 ; Landheer et al., 2013), *S. aureus* (ligand TLR2) (Vu et al., 2010).
- des protéases endogènes, exogènes ou synthétiques (SLIGKV) par activation du récepteur PAR2 (Wilson et al., 2013).
- la vitamine D₃ chez la souris (Li et al., 2006).

De plus, *in vivo* chez l'homme, la reproduction d'un défaut de barrière comme celui observé dans la DA, par application d'irritant (sodium lauryl sulfate) ou par desquamation mécanique induite (*tape stripping*) sur de la peau saine, conduit à la production de TSLP (Angelova-Fischer et al., 2010).

D'autres types cellulaires peuvent aussi dans une moindre mesure être source de TSLP, comme les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les mastocytes et les DCs (Takai et al., 2012). Les DCs ne sont pas initialement pas définies comme productrices de TSLP, mais une étude de Kashyap M. et al. a réussi à mettre en évidence une induction de TSLP par des stimuli activant les TLR, le LPS (TLR4) et le zymosan (TLR2), sur des MonoDCs (données confirmées avec des DCs myéloïdes de souris) (Kashyap et al., 2011). Les DCs étant susceptibles à la TSLP, cette synthèse suggère une éventuelle stimulation autocrine formant une boucle d'autostimulation.

b) Structure de la TSLP et de son récepteur

D'un point de vue structural, TSLP présente des similarités conformationnelles avec la cytokine IL-7. Ainsi TSLP se lie à la fois à la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (IL-7R α) et à une chaîne transmembranaire γ -like, le TSLPR (Pandey et al., 2000). Par simplicité dans les publications, le terme TSLPR évoque généralement l'hétérodimère IL-7R α /TSLPR. L'engagement de la TSLP sur son récepteur conduit à la phosphorylation de STAT5 par l'intermédiaire de JAK 1 et 2 (étude sur des LT CD4⁺ de souris et humains : Rochman et al., 2010).

c) Cibles et effets

TSLP agit préférentiellement sur les DCs en modifiant leur phénotype :

- **sur les DCs CD11c⁺ isolées du sang**, population qui regroupe à la fois les CD1c⁺ et les CD14⁺ : il induit une augmentation de l'expression de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD1a, CCR7 et OX40L (*Ito et al., 2005 ; Soumelis et al., 2002*).
- **sur les LCs** : des différences sont observées entre LCs obtenues après digestion enzymatique de l'épiderme (tri CD1a) et les LCs isolées après migration d'un explant de peau humaine (technique du *crawl out*). Sur les LCs de peau digérée, puis stimulées 48h avec la TSLP, on retrouve des résultats conformes aux DCs CD11c⁺ immatures du sang (*Soumelis et al., 2002*), c'est-à-dire plus de HLA-DR, CD83 et CD86 mais pas d'augmentation de l'expression de CD40 et CD80. Sur les LCs migrantes (explant de peau stimulé 3 jours), même si TSLP accroît leur mobilité, cette fois, il n'y a pas de différence d'expression de CD83, OX40L, CD86 et CCR7. Selon les auteurs, l'absence d'effet de la TSLP s'explique par le fait que les LCs migrantes sont déjà matures car la culture d'explant est un modèle pro-inflammatoire (*Ebner et al., 2007*). Dans la DA, uniquement en lésionnel, on retrouve par analyse en immunofluorescence de biopsies DA plus de LCs dans le derme, exprimant le marqueur d'activation DC-LAMP (*Dendritic cell lysosome-associated membrane protein*), concomitant avec plus de TSLP (*Soumelis et al., 2002 ; Ito et al., 2005*).

En plus de modifier le phénotype des DCs, TSLP change également leur fonctionnalité :

- **sur les DCs CD11c⁺ isolées du sang** : après stimulation par la TSLP puis MLR, on observe très peu d'IFN γ par ELISA et cytométrie, donc peu de Th1. Cet effet s'explique par la baisse de production d'IL-12 par les TSLP-DCs (*Soumelis et al., 2002*). On retrouve en majorité une réponse Th2 IL-5⁺ et IL-13⁺. Il est intéressant de retenir pour un futur parallèle avec mes expériences que ces Th2 libèrent aussi de l'IL-4, mais de façon beaucoup moins importante que l'IL-13. Ces T diffèrent des Th2 « conventionnels » obtenus sous influence de l'IL-4, car ils produisent du TNF- α et peu d'IL-10, on utilise alors le terme de **Th2 « inflammatoires »** (*Soumelis et al., 2002 ; Ito et al., 2005*). Le TNF- α , qui n'est pourtant pas une cytokine Th2 classique, serait impliqué dans l'asthme (*Berry et al., 2007*). Comme son récepteur est présent sur un grand nombre de cellules, il pourrait aussi favoriser l'inflammation cutanée. IL-10, à l'inverse, présente plutôt une activité anti-inflammatoire. L'étude de Ito T. et al. a démontré l'importance de l'**interaction OX40L / OX40** dans l'orientation en Th2 médiée par la TSLP. OX40L est exprimé par les DCs et augmenté par la stimulation TSLP, OX40 lui est retrouvé

sur les LT. Un blocage de OX40L avec un anticorps monoclonal empêche la différenciation en Th2. L'absence de production d'IL-12 par les TSLP-DCs est cruciale à cet effet (*Ito et al., 2005*). En sa présence, les cytokines Th2 sont perdues, mais TNF- α est conservé. OX40L contribuerait donc, avec ou sans IL-12, à la production de TNF- α et à la réduction d'IL-10. La génération de Th2 correspondrait à un mécanisme « par défaut ». La présence d'IL-4, autre cytokine pro-Th2, est dispensable, mais accentue et maintient ce mécanisme (*Ito et al., 2005*). Comme attendu, la peau lésionnelle DA présente, après analyse par immunofluorescence de biopsies, une majorité de cellules exprimant OX40L et OX40 (*Ilves et al., 2013*). Preuve de son importance, le blocage de l'axe OX40L / OX40 semble être une nouvelle piste de traitement intéressante dans la DA, contrairement au blocage direct de la TSLP (**Chapitre II, 5.3**). Selon un protocole similaire, Pattarini L. et al. ont démontré que les CD11c⁺ induisent également de façon dépendante de OX40L une population de Tfh IL-21⁺ (TNF- α ⁺, CXCR5⁺, CXCL13⁺, PD1⁺ ou ICOS⁺) proches des Tfh2. De plus, ces T sont fonctionnels car ils aident à la sécrétion d'IgE par les LB. Dans la peau DA on retrouve très peu d'infiltrat Tfh, cependant cette étude montre tout de même que ces Tfh2 sont plus présents dans le sang des patients (*Pattarini et al., 2017*).

- **Sur les LCs** : même si les LCs migrantes de l'explant de peau stimulé par TSLP n'ont pas une expression d'OX40L augmentée, après MLR elles induisent comme les CD11c⁺ du sang des Th2 inflammatoires IL-13⁺, TNF- α ⁺ avec peu d'IL-10 (*Ebner et al., 2007*).

Les CD11c⁺ du sang (*Soumelis et al., 2002*) et les LCs (*Ebner et al., 2007*) produisent également sous influence de la TSLP les chimiokines CCL17/TARC et CCL22/MDC, connues comme attractives des Th2 sur le site de l'inflammation, ainsi que l'IL-8 et l'éotaxine 2 pour recruter des éosinophiles et neutrophiles (*Liu et al., 2006*).

Comme précisé dans ce paragraphe, TSLP agit préférentiellement sur les cellules de la lignée myéloïde (*Reche et al., 2001*), mais d'autres études portent sur des fonctions étendues à d'autres types cellulaires (résumées en **Figure 6**). Il existe néanmoins une certaine dichotomie entre ses effets chez l'homme et la souris. La TSLP a été initialement décrite comme facteur de croissance pour les LB murins, en induisant la prolifération et la différenciation de ses précurseurs (*Friend et al., 1994*). De même, uniquement chez la souris, TSLP peut agir directement sur les LT CD4⁺ naïfs pour induire des Th2 lorsque leur TCR est engagé (*Omori et al., 2007*). Chez l'homme, elle favorise la dégranulation des mastocytes (*Saluja et al., 2016*) et le recrutement des éosinophiles (*Wong et al., 2010*). Ces différences s'illustrent également

à travers les effets de la TSLP sur les basophiles. En effet, chez la souris, TSLP est directement responsable du recrutement et de l'activation des basophiles (*Siracusa et al., 2011*) via TSLPR/IL-7R α , et ce indépendamment de la libération d'IL-3. En revanche, chez l'homme, malgré de récentes controverses (*Salter et al., 2015*), il semble finalement que les basophiles de sujets sains et allergiques n'expriment pas l'IL-7R α et donc ne répondent pas à la TSLP (*Salabert-Le Guen et al., 2018*). Toutefois, un effet indirect, via la production d'IL-3 par les LTs influencés par la signalisation OX40L/OX40, démontrée cruciale pour la réponse Th2 chez la souris (*Leyva-Castillo et al., 2013*), reste envisageable chez l'homme.

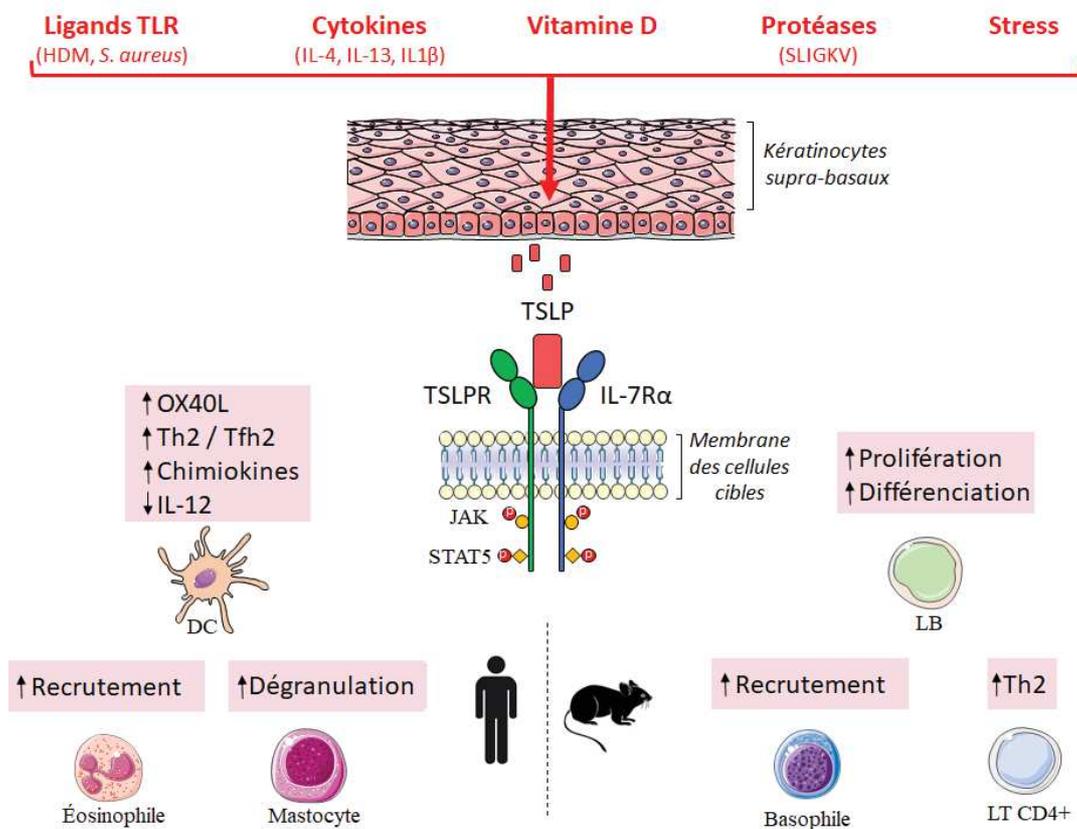


Figure 6 : Production de TSLP et effet sur les cellules immunitaires. TSLP est une cytokine clé de la DA. Sa synthèse est induite par les kératinocytes supra-basaux après perception d'un signal de danger (ligand TLR, cytokines, vitamine D₃, protéases, stress environnemental). Son récepteur, le TSLPR/IL-7R α , est un hétérodimère exprimé par une grande majorité des cellules immunitaires impliquées dans la physiopathologie de la DA, mais il existe à l'heure actuelle une dichotomie entre ses effets sur les modèles humains et murins.

d) Isoforme court et long

Il a longtemps été pensé à une structure unique de la TSLP. En réalité, il existe deux isoformes, une **forme longue (lfTSLP)** de 159 aminés et une **forme courte (sfTSLP)** de 63 acides aminés qui correspond à la partie C-terminale du fragment long. La différence ne proviendrait pas d'un épissage alternatif du même transcrit, mais les deux isoformes seraient contrôlés par un promoteur distinct (*Tsilingiri et al., 2017 ; Varricchi et al., 2018*).

La sfTSLP est exprimé de manière constitutive alors que la lfTSLP est induit après stimulation, notamment par des ligands TLR sur des kératinocytes primaires (*Xie et al., 2012*). La stimulation par les cytokines Th2 IL-4 et IL-13 induit également l'expression de la forme longue. Dans cette même étude et dans celle de Fornasa G. et al. (*Fornasa et al., 2015*), l'ajout de vitamine D₃ pendant 24h sur des kératinocytes primaires induit une augmentation de l'ARNm du sfTSLP mais pas de sa forme protéique.

Existe-t-il pour autant une différence d'activité biologique entre ces deux isoformes ? *In vitro*, on suspecte l'isoforme courte d'avoir une activité anti-inflammatoire. En effet, sur des cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) de donneurs sains, un traitement avec la sfTSLP induit moins de production d'IFN γ qu'un traitement avec la lfTSLP. De même sur des MonoDCs, on observe moins d'IL-12 avec la sfTSLP, mais pas de différence dans la maturation. Après MLR, les LT ne produisent pas de TNF- α si les MonoDCs sont stimulées avec la forme courte, contrairement à la longue. La signalisation du sfTSLP diffèrerait de celle de l'isoforme longue, avec peu de contribution du TSLPR/IL-7R α (*Fornasa et al., 2015*) mais aucune voie de signalisation alternative n'a été proposée à ce jour. Dans la DA, de façon attendue, la peau lésionnelle présente plus de lfTSLP et moins de sfTSLP en comparaison au donneur sain (*Fornasa et al., 2015*).

4.3.4 Autres sources de cytokines Th2

Il est important de garder en mémoire que les Th2 sont les principaux producteurs, mais pas la seule source de cytokines Th2. En effet, les ILC2, éosinophiles, basophiles et mastocytes présents également dans les lésions en sont potentiellement responsables lors de la réponse immunitaire innée.

Dans la peau des patients DA, on va retrouver en nombre supérieur à une peau saine des **Innate lymphoid cells 2 (ILC2)** (*Salimi et al., 2013*). Ces dernières sont des cellules immunitaires innées de la lignée lymphoïde situées en périphérie mais très peu présentes dans

les ganglions, qui s'activent sans reconnaissance d'un antigène. Elles sont très proches des Th2 car elles expriment également le facteur de transcription GATA-3 et produisent principalement les cytokines IL-5 et IL-13. Elles s'identifient par l'expression des marqueurs CRTH2 et IL-7R α /CD127 (Klose *et al.*, 2016). Les ILC2 d'explant de peau s'activent après stimulation par les cytokines épithéliales IL-25, IL-33 et TSLP (Salimi *et al.*, 2013). De plus dans cette étude, chez la souris traitée 4 jours par le calcipotriol, un analogue synthétique de la vitamine D₃, on constate une accumulation d'ILC2. Même si la proportion d'ILC2 dans la peau est plus faible que celle des Th2, elles peuvent contribuer à la DA, en particulier dans les mécanismes allergènes indépendants.

Les **basophiles** sont une potentielle source d'IL-4 et IL-13 et sont retrouvés majoritairement dans la peau, mais pas dans le sang, de patients DA (Mashiko. *et al.*, 2017). Les **éosinophiles** sont également plus nombreux dans la peau lésionnelle aiguë et chronique de DA (Kiehl *et al.*, 2001). Cette arrivée d'éosinophiles dans la peau peut se corrélérer à l'attrait exercé par IL-5, produite notamment par l'infiltrat Th2. Comme les basophiles, les éosinophiles sont aussi producteurs d'IL-4 et IL-13 (Gessner *et al.*, 2005).

Les **mastocytes** ne se limitent pas à la libération d'histamine, bien connue dans l'allergie mais peu impliquée dans la DA (Kawakami *et al.*, 2009). En effet, ils peuvent libérer des médiateurs pruritogènes par des voies histamino-indépendantes, comme IL-31 ou les cytokines Th2 (**Chapitre II, 4.4**). Ils sont peu présents en peau lésionnelle aiguë, mais plutôt en phase chronique (Soter *et al.*, 1989).

La **Figure 7** en page suivante résume le rôle des principales cellules impliquées dans la réponse immunitaire de la DA.

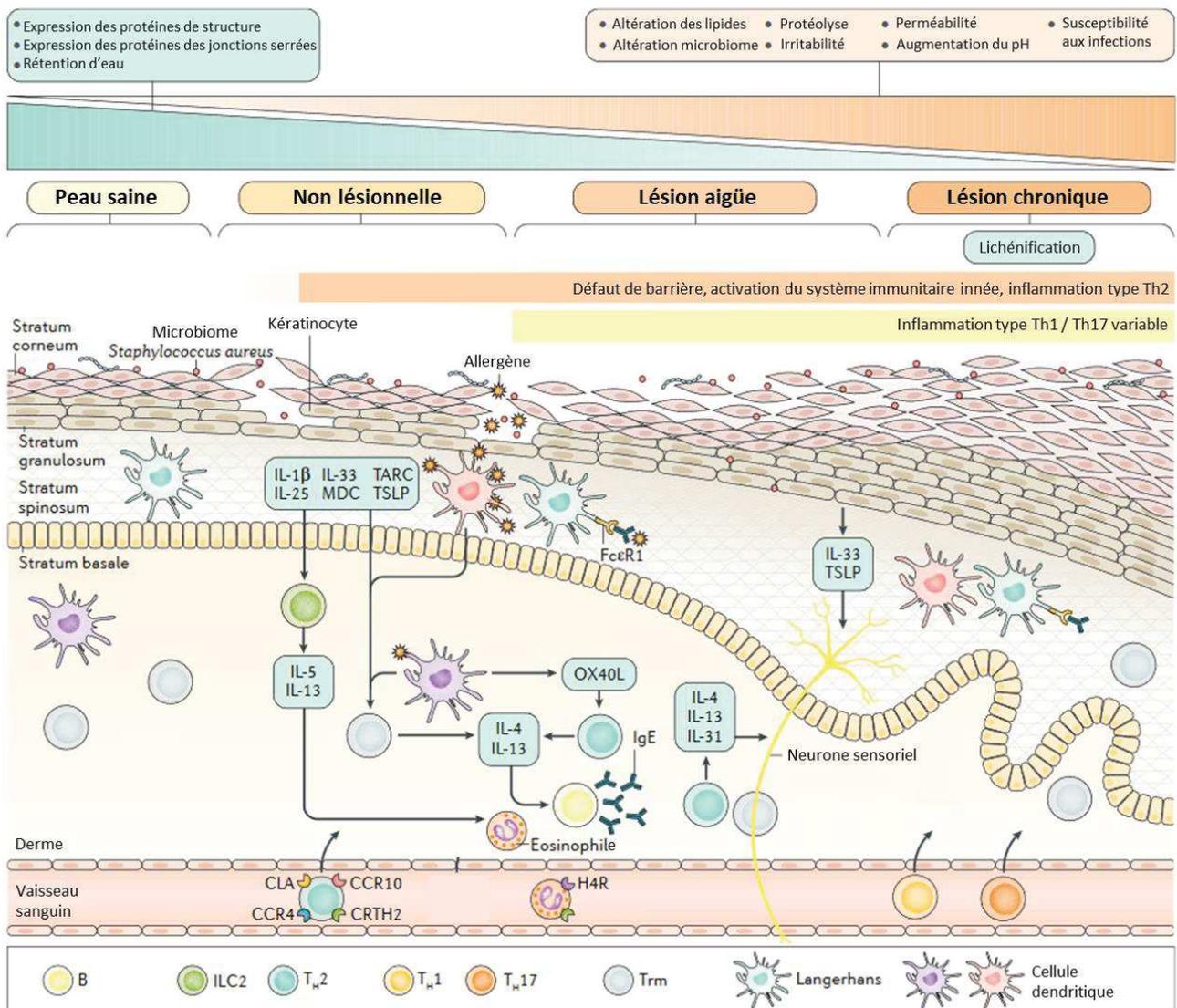


Figure 7 : Principaux mécanismes de la DA. Le défaut de barrière facilite le stress des kératinocytes par exposition accrue aux signaux de danger. La stimulation de ces cellules induit l'expression de chimiokines (CCL17/TARC, CCL22/MDC) et de cytokines (IL-1 β , IL-25, IL-33, TSLP) qui influent sur la réponse des ILC2 et des Th2. De plus, TSLP augmente l'expression de OX40L par les DCs, qui après migration vers les ganglions, se lie à OX40 des T CD4⁺ naïfs et contribue à l'orientation en Th2, producteurs d'IL-4 et IL-13. Ces Th2 vont aider à la synthèse d'IgE par les LB. Les Th2 sont attirés dans la peau par expression des récepteurs CRHT2, CLA, CCR4 et CCR10. Des éosinophiles sont aussi rapatriés sur le site par IL-5 notamment. La génération de TRM et l'expression du récepteur Fc ϵ RI par les DCs facilite la capture des antigènes et une seconde réponse allergique plus rapide. Les cellules de la peau communiquent par l'intermédiaire de TSLP et des cytokines Th2 avec les neurones sensoriels cutanés pour exacerber le prurit. En phase chronique, l'infiltrat évolue vers un profil mixte Th1/Th17 variable, mais toujours avec la présence de Th2. *Illustration modifiée d'après Weidinger et al., 2018.*

4.4 Signal du prurit

Les patients atteints de DA souffrent d'un prurit récurrent. Celui-ci s'explique en partie par une susceptibilité accrue aux signaux présents dans l'environnement des neurones cutanés, mais aussi par une innervation plus dense en lésionnel (*Gaspar et al., 2016*). Le prurit se définit comme une sensation désagréable qui conduit au désir de se gratter. Il génère un stress et des troubles de l'attention avec pour conséquence une altération non négligeable de la qualité de vie. L'initiation du prurit démarre généralement à partir de la peau ou des muqueuses après réception d'un signal pruritogène par les fibres nerveuses cutanées. Prurit et douleur font partie intégrante des informations capables d'être transmises par la peau. Alors que ces sensations étaient supposées partager des voies neuronales communes (*Davidson et al., 2010*), il a été découvert récemment que le prurit dispose de voies et récepteurs qui lui sont propres, décrits dans les paragraphes suivants.

4.4.1 Fibres C et transmission du prurit

Les **fibres C**, amyelinisées, furent les premières décrites comme capables de recevoir et transmettre des signaux pruritogènes. Il en existe de nombreux sous-types qui se définissent généralement par le signal qui les excite. À titre d'exemple, 80% des fibres C sont polymodales et mécano-sensibles (fibres CM). Le pruritogène le plus utilisé dans la littérature, l'histamine, induit la génération d'un potentiel d'action sur un autre sous-type de fibres C, insensible à la chaleur et aux stimuli mécaniques (fibres C mécano-insensibles histamine positive, CMi (His+)) (*Schmelz et al., 2003*). L'utilisation du Pois mascate, *Mucuna pruriens*, *cohwage* en anglais, a montré le ciblage de fibres C encore différentes de celles stimulées par l'histamine, sensibles à la chaleur et aux stimuli mécaniques (fibres CMH) (*Johanek et al., 2008*). Pour simplifier, il faut retenir que ces données suggèrent l'utilisation de fibres C différentes selon le pruritogène perçu. En outre, les fibres C peuvent aussi répondre à d'autres signaux que le prurit, comme des stimuli nociceptifs (bradykinine, capsaïcine). Le rôle des fibres A β , A δ dans la transmission du prurit a été moins étudié, même si elle semble possible pour les A δ .

Il existe une réelle complexité d'identification des voies précises utilisées par les signaux du prurit car plusieurs axes sont stimulés et les neurones conduisent aussi plusieurs signaux. Néanmoins, dans tous les cas, la perception d'un pruritogène dans la peau est rendue possible grâce à l'expression au niveau des terminaisons des neurones sensoriels de récepteurs dits **prurirécepteurs** (**Figure 8**, page 48).

4.4.2 Les prurirécepteurs

Le système nerveux périphérique fonctionne en convertissant un stimulus sensitif cutané en un signal électrique (potentiel d'action). Les terminaisons nerveuses en périphérie expriment des récepteurs capables de réaliser cette traduction, c'est le cas de certains prurirécepteurs, comme les canaux *Transient receptor potential* (TRP). Contrairement à ces derniers, les prurirécepteurs couplés aux protéines G (GPCR), dits récepteurs métabotropiques, ne peuvent pas générer seul un potentiel d'action, ils vont donc devoir entraîner l'activation des TRP, coexprimés à proximité, après une signalisation intracellulaire spécifique (*Wilson et al., 2014 ; Oetjen et al., 2018*).

a) TRP

Les **TRP** sont une famille de canaux cationiques principalement calciques, exprimés par de nombreux types cellulaires. Ils peuvent par exemple être présents sur les kératinocytes comme démontré pour les *transient receptor potential vanilloïde 3 et 4* (TRPV3, TRPV4) chez la souris (*Chung et al., 2004*). Cependant, ils sont majoritairement décrits pour leur présence en périphérie sur les neurones sensoriels, notamment sur les fibres C_{Mi} et A δ . On dénombre six familles de TRP chez l'humain : TRPC (*Canonical*), TRPV (*Vanilloïd*), TRPM (*Melastatin*), TRPML (*Mucolipins*), TRPP (*Polycystins*) et TRPA1 (*Ankyrin repeat*) seul membre de sa propre famille. Cette classification s'explique par une structure différente, avec modification de l'extrémité N et C terminale, et un panel d'activateurs chimiques et moléculaires varié (chaud et capsaïcine pour TRPV1, froid et menthol pour TRPM8). Ce sont tous des thermosenseurs, c'est-à-dire qu'ils s'ouvrent à une température spécifique. Le prurit est transmis majoritairement par **TRPA1, TRPV1 et TRPM8** (*Imamachi et al., 2009 ; Wilson et al., 2014*).

b) GPCR

Les **GPCR** sont des récepteurs membranaires couplés à la protéine G avec une structure en hélice qui traverse 7 fois la membrane. Ils sont dénommés ainsi car ils sont couplés à des protéines liant le GTP. Ce signal se traduit notamment par l'activation de kinases comme la phosphokinase A (PKA) et C (PKC). Sur les neurones sensoriels périphériques, de nombreux pruritogènes s'associent à des récepteurs de type GPCR. Leur liaison ne génère pas de potentiel d'action en soi, mais comme ils sont souvent en relation étroite avec un canal TRP, l'activation des kinases induit la phosphorylation intracellulaire et l'ouverture de ces TRP (*Veldhuis et al., 2015*).

Les **récepteurs à l'histamine** (*Histamine receptor*, HR) appartiennent à la famille des GPCR. À l'heure actuelle, quatre récepteurs sont décrits, **H1R**, H2R, H3R et **H4R**. Les anti-H1R ont été les premières cibles de traitement antiprurigineux, avec une préférence pour les anti-H1R de seconde génération avec moins d'effets indésirables, comme la cétirizine et la loratadine (*Simons et al., 2004*). L'histamine est bien connue pour son rôle dans le déclenchement du prurit. En effet, elle est libérée majoritairement par les tissus suite à la dégranulation des mastocytes et basophiles après une première sensibilisation par un allergène. Elle est responsable notamment d'un influx de Ca²⁺ dans les ganglions de la racine dorsale (DRG). Cet influx nécessite la présence d'un TRPV1 fonctionnel : la souris TRPV1 KO n'a pas de mobilisation de Ca²⁺ dans les neurones sensoriels et moins de prurit. L'interaction entre H1R et TRPV1 passe par la phospholipase C (PLC) qui va activer le TRPV1 pour générer le potentiel d'action (*Shim et al., 2007*). Les fibres CMi, ainsi que certaines CMH, sont les plus répondeuses à l'histamine (*Schmelz et al., 2003*). Les anti-H1R sont bénéfiques dans de nombreuses manifestations allergiques, comme la rhinite allergique, l'asthme, l'urticaire, mais ils sont peu efficaces dans la DA (*Yosipovitch et al., 2003*), ce qui suggère l'utilisation de voies différentes. Une preuve supplémentaire vient étayer ces données : le prurit déclenché par le Pois mascate n'est pas inhibé par les antihistaminiques (*Johanek et al., 2007*). Ces voies, regroupées sous le terme de **voies histamino-indépendantes**, seront détaillées dans les paragraphes suivants.

Parmi elles, on trouve les signaux engagés par les **récepteurs à protéases**, comme les PAR. Il existe 4 types de PAR, PAR 1 à 4. Ils sont activés après clivage protéolytique de leur extrémité N-terminale. Celui-ci a pour conséquence l'exposition d'une séquence peptidique capable d'agir sur ce même récepteur, on parle d'autoactivation. Ils sont clivés par des sérine-protéases, par exemple la thrombine pour PAR1, la tryptase et la trypsine pour PAR2. Ces protéases peuvent provenir soit de sources exogènes (pathogènes) ou endogènes (mastocytes). Dans la littérature, des séquences peptidiques synthétiques identiques à celles libérées après clivage sont fréquemment utilisées pour déclencher l'activation des récepteurs PAR. L'administration d'agonistes peptidiques des PAR1-4, comme **SLIGKV** ou **SLIGRL**, a permis de conclure que PAR1, PAR2 et PAR4 sont impliqués dans les démangeaisons. PAR2 en particulier semble engagé directement dans le prurit par un mécanisme histamino-indépendant, car le prurit déclenché par PAR1 et 4 est réduit par les antihistaminiques (*Tsujii et al., 2008*). Chez l'homme, l'administration intracutanée du peptide agoniste SLIGKV induit, après une douleur brève, un prurit dans les 2 à 5 minutes (*Steinhoff et al., 2003*).

PAR2 est exprimé par de nombreux types cellulaires, notamment les kératinocytes et les fibres nerveuses amyélinisées de la peau. Son expression par analyse immunohistochimique est décrite comme plus importante en non lésionnel et en lésionnel chez des patients DA (Steinhoff *et al.*, 2003). Sa liaison agit directement sur les neurones sensoriels via TRPV1 (Amadesi *et al.*, 2006) et TRPV4 (Grant *et al.*, 2007) et induit la libération de neuropeptides SP et CGRP chez le rat (Steinhoff *et al.*, 2000). En plus d'effets directs sur les neurones, l'activation de PAR2 peut agir indirectement sur ces derniers par l'intermédiaire des kératinocytes. En effet, son activation par les protéases conduit à la production de **TSLP** chez la souris et sur des kératinocytes humains en culture 2D (Wilson *et al.*, 2013). TSLP peut aider à l'orientation Th2 et contribuer à la libération d'IL-4 et IL-13, deux cytokines elles-mêmes pruritogènes (**Chapitre II, 4.4.2 c**). De plus, l'étude de Wilson SR. *et al.* a mis en évidence un effet direct et rapide de la TSLP, par administration intradermique, sur une population de neurones TRPA1+ dans le déclenchement du prurit 5 minutes après injection (Wilson *et al.*, 2013). La TSLP peut donc lui aussi agir sur le prurit de façon directe ou indirecte.

Les *Mas-related G protein-coupled receptor (Mrgpr)* dont MrgpA3, MrgprD et MrgprC11 ont été décrits plus récemment comme membres des GPCR impliqués dans le prurit histamino-indépendant. MrgpA3 est également connu pour être le récepteur à la chloroquine, drogue anti-malarique créant comme effet indésirable un prurit. La souris MrgprA3 déficiente ne répond plus à la chloroquine, mais encore à l'histamine, suggérant l'existence de voies indépendantes. L'agoniste endogène à ce récepteur n'a toujours pas été découvert (Liu *et al.*, 2009). L'activation de MrgprA3 interagit avec le canal TRPA1 comme première voie de signalisation pour l'initiation du prurit (Wilson *et al.*, 2011).

c) Récepteurs aux cytokines IL-4R IL-13R IL-31R

Comme déjà discuté dans les paragraphes précédents, les cytokines Th2 sont des médiateurs inflammatoires clés dans la dermatite atopique. Le concept de communication neuro-immune prend ici complètement son sens. En effet, les récepteurs IL-4R et IL-13R sont exprimés par les DRGs et sont même directement activables par **IL-4** et **IL-13**, comme démontré par mesure du flux calcique sur des DRGs souris et humains (Oetjen *et al.*, 2017), avec induction de prurit *in vivo* chez la souris (Campion *et al.*, 2019). L'étude de modèles TRPV1 KO confirme que la signalisation semble dépendante de TRPV1 (Oetjen *et al.*, 2017).

Une autre cytokine Th2, l'**IL-31**, est aussi impliquée dans la genèse du prurit. IL-31 est surexprimé dans la peau DA chez l'homme en lésionnel et non lésionnel, en termes d'ARNm et de protéine (Sonkoly et al., 2006). La surexpression d'IL-31 chez la souris transgénique génère du prurit (Dillon et al., 2004). Hawro T. et al. (Hawro et al., 2014) ont pu réaliser des tests d'administration cutanée d'IL-31 sur des donneurs DA et n'ont pas mis en évidence de prurit rapide, comme le fait l'histamine, mais un prurit tardif après 150 minutes suggérant une action par des intermédiaires produits par les kératinocytes par exemple. Par-delà un effet sur le prurit, l'étude de Feld M. et al. (Feld et al., 2016) a montré qu'IL-31 pouvait influencer la croissance neuronale. Par immunofluorescence, il a été observé chez la souris transgénique surexprimant IL-31 une densité en fibres nerveuses cutanées plus importante. Dans cette même étude, l'administration d'IL-31 pendant 14 jours sur une souris sauvage induit une densité à nouveau plus forte que la souris contrôle. Ces résultats furent confirmés avec la culture de DRGs de souris *in vitro* en présence d'IL-31. Ces données suggèrent qu'IL-31 peut augmenter la sensibilité des terminaisons neuronales de la peau aux autres stimuli (Feld et al., 2016), en concordance avec l'hyperinnervation caractéristique de la DA (Gaspar et al., 2016).

d) TLR

Les **TLR** seraient également impliqués dans l'initiation d'un prurit. L'application topique d'imiquimod, un agoniste du **TLR7** utilisé en clinique comme antiviral et antitumoral, peut induire comme effet indésirable un prurit chez l'homme (VIDAL 2019). Chez la souris, l'imiquimod est administré en intradermique pour générer des démangeaisons (Liu et al., 2011 ; Kim et al., 2011). Liu T. et al. (Liu et al., 2010) ont utilisé un modèle de souris TLR7 KO qui ne répond pas à l'imiquimod et aux pruritogènes non histaminergiques (chloroquine, SLIGRL), mais qui, à l'inverse, est toujours répondeuse au prurit déclenché par l'histamine. Dans cette même étude, le marquage des fibres nerveuses montre une certaine proximité entre TRPV1 et TLR7, même si la souris TRPV1 KO reste sujette au prurit induit par l'imiquimod (Liu et al., 2011). À l'inverse, l'étude de Kim S.J et al. conclut à un mécanisme d'action de l'imiquimod indépendant de TLR7 sur les neurones, c'est-à-dire passant uniquement par des neurones TRPV1. Les discordances entre ces deux études sorties à 3 mois d'intervalle sont discutées dans l'article de Kim S.J. et al. (Kim et al., 2011). D'autres TLR comme TLR3 et TLR4 sont exprimés par les DRGs murins et aussi proposés dans le prurit (Taves et al., 2015).

4.4.3 Production de neuropeptides

Après perception et assimilation d'un signal spécifique, les fibres C peptidergiques peuvent communiquer avec les cellules avoisinantes en produisant des neuropeptides. Les deux plus décrits, **SP** et **CGRP** peuvent avoir une influence dans la DA. Le nombre de fibres positives à ces neuropeptides est accru dans la peau lésée (*Järvikallio et al., 2003*). Leurs récepteurs respectifs NK1R et l'hétérodimère CRLR/RAMP sont exprimés par la plupart des cellules de la peau, dont les kératinocytes, DCs, LT et mastocytes. SP et CGRP peuvent déclencher le relargage de l'histamine par les mastocytes (*Columbo et al., 1996 ; Forsythe et al., 2000*). De plus, CGRP influe également sur la réponse T en induisant une différenciation Th2 chez la souris. Après stimulation des LCs par CGRP, celles-ci, en plus de produire CCL17/TARC et CCL22/MDC, aident après MLR à obtenir des Th2 IL-4+ (*Ding et al., 2008*). Dans un modèle de peau reconstruite, Roggenkamp D. et al. ont démontré le rôle d'un traitement par CGRP dans la prolifération des kératinocytes et la morphogenèse de l'épiderme, avec l'obtention d'un épiderme plus épais (*Roggenkamp et al., 2013*).

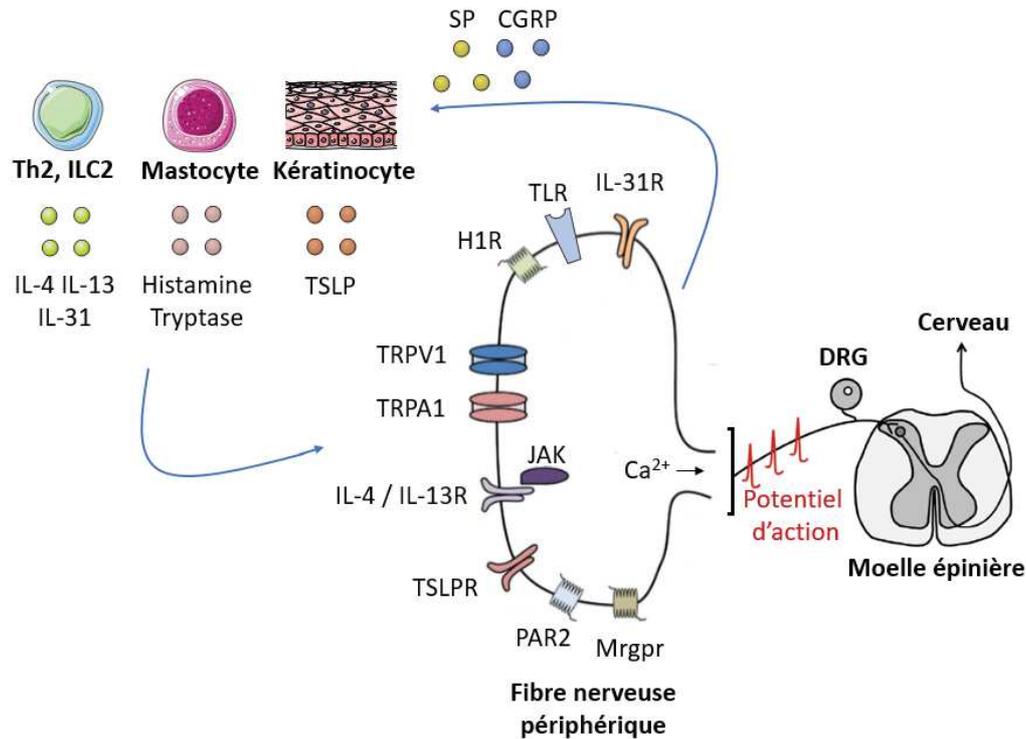


Figure 8 : Prurirécepteurs et modulation de la réponse des fibres nerveuses périphériques cutanées.

La peau est un organe densément innervé. Les fibres nerveuses périphériques perçoivent des signaux à la fois des cellules immunitaires (Th2, ILC2, mastocytes) et de l'environnement (kératinocytes). L'information relative au prurit est diffusée à l'aide de nombreux récepteurs exprimés par les terminaisons nerveuses, comme les TRP, GPCR (H1R, Mrgpr, PAR2) et les récepteurs aux cytokines (IL-4R, IL-13R, IL-31R, TSLPR). Le potentiel d'action généré en conséquence permet de transmettre l'information de la périphérie jusqu'au DRG de la moelle épinière, puis au cerveau. De plus, certaines de ces fibres peuvent produire des neuropeptides comme la CGRP ou la SP pour influencer à leur tour sur les cellules de la peau et donc indirectement sur ce processus. *Illustration modifiée d'après Kittaka et al., 2017 ; Oetjen et al., 2018.*

Comme évoqué dans cette partie sur la physiopathologie de la DA, la multiplicité des acteurs et mécanismes décrits offre un panel conséquent de cibles thérapeutiques potentielles.

5. Prise en charge

La DA est une maladie d'origine multifactorielle. La prise en charge « classique », majoritairement symptomatique, consiste à prévenir du risque de crise et à en atténuer l'intensité. L'objectif est de contrôler la maladie avec une réduction du prurit suffisante pour permettre un confort à la maison, à l'école et au travail. Cette prise en charge passe typiquement par une approche en plusieurs étapes qui consistent à éviter les facteurs déclenchants, améliorer la barrière de la peau, réguler la dysbiose cutanée et atténuer l'inflammation.

5.1 Prévention

Les stratégies de prévention secondaire se basent sur **l'éviction et l'élimination des facteurs déclenchants**, c'est-à-dire des facteurs environnementaux susceptibles d'initier des crises chez des individus « sensibles ». L'exposition à des irritants (pollution, fumée de cigarette) est fréquente et susceptible d'accentuer la perception de signaux de danger. L'implication de certains aliments est connue (*Bergmann et al., 2013*), cependant, comme les allergies alimentaires ne persistent pas toutes en grandissant, elle peut évoluer avec l'âge. La modification du régime alimentaire chez l'enfant peut être bénéfique mais est à envisager avec précaution (*Grimshaw et al., 2017*). De plus, il faut prendre en considération que la place centrale des IgE est encore parfois débattue dans la DA avec l'existence de formes IgE-indépendantes. Il faut dans tous les cas prioriser en premier lieu un processus continu d'accompagnement et d'éducation du patient et/ou des parents.

5.2 Prise en charge « classique »

La prise en charge se base sur l'âge, la sévérité de la maladie, la localisation des lésions, la facilité d'observance et la présence de comorbidités. Entre les crises, la lutte contre la xérose cutanée doit être réalisée quotidiennement via l'utilisation d'**agents émoullissants**, qui adoucissent la peau, et **humectants** qui attirent l'eau. Ces traitements se font de préférence après le bain, sur peau légèrement humide, avec 2 applications par jour. Ces soins réguliers s'accompagnent par un choix pertinent des produits d'hygiène corporelle, de préférence sans savons et non irritants. La finalité est de réduire le risque d'apparition des crises en augmentant la barrière cutanée. Le traitement des crises s'effectue par l'application de **corticostéroïdes topiques (CTS)**. Ils représentent la première ligne thérapeutique et sont bénéfiques par leur fonction anti-inflammatoire (*Brunner et al., 2016*). Ils sont regroupés en 4 classes de I à IV, symbole d'une activité forte à faible, déterminées par mesure de la vasoconstriction. Les CTS à activité faible (classe IV) ne sont pas prescrits car peu efficaces dans la DA (*VIDAL 2019*). Ceux à activité modérée (classe III) sont préconisés chez l'enfant et le nourrisson, même pour les lésions dans des zones délicates (faciales, paupières et flexurales). L'utilisation intermittente de CTS présente des risques assez faibles d'effets indésirables cutanés, cependant un usage inapproprié peut être à l'origine d'atrophie et d'amincissement de la peau, réversibles à l'arrêt du traitement. Ils sont généralement à prendre en une application par jour jusqu'à disparition des lésions. Les effets systémiques sont beaucoup plus rares. L'utilisation de CTS à activité forte (classe II) est possible chez l'enfant quand celle-ci est justifiée (lésions très inflammatoires ou lichénifiées),

mais demande un contrôle plus strict de la durée de traitement et des quantités appliquées (*Callen et al., 2007*). Les CTS à activité très forte (classe I) sont à proscrire chez l'enfant dans la DA (*VIDAL 2019*).

5.3 Autres traitements

5.3.1 Topiques

Des traitements topiques alternatifs peuvent être utilisés, comme les **inhibiteurs de la calcineurine** (tacrolimus, pimécrolimus). Ils sont conseillés chez l'adulte et l'enfant à partir de 2 ans, en général pour soigner des zones anatomiques où le risque d'effets indésirables des CTS est plus fort (visage, zones de flexion) car ces derniers ne présentent pas les inconvénients des stéroïdes, comme l'atrophie cutanée notamment. Cependant, d'après les revues d'essais cliniques randomisés, l'utilisation des inhibiteurs de la calcineurine est plus limitée. En effet, ils ont une efficacité similaire aux CTS de type III, et, même s'ils ne possèdent pas leurs effets indésirables, une sensation de brûlure ou prurit peut être observée lors de la première semaine de traitement (*Chen et al., 2010*). Le coût et l'existence de conditionnements plus petits sont aussi limitants. Le manque de recul sur les risques de cancer cutané pour une utilisation à long terme explique leur second choix face aux CTS.

Les **antihistaminiques anti-H1R** présentent une efficacité sur le soulagement du prurit très faible dans la DA. Cependant, chez les patients avec des troubles du sommeil importants secondaires aux démangeaisons, l'utilisation d'antihistaminiques sédatifs comme l'hydroxyzine peut se révéler bénéfique (*VIDAL 2019*).

L'administration d'un antiseptique local n'est pas conseillée de manière systématique car ils peuvent accroître la xérose. Néanmoins, en cas de surinfection constatée des lésions, leur prescription est possible pendant 15 jours (*VIDAL 2019*).

5.3.2 Systémiques

Si les traitements topiques ne sont pas suffisants pour soulager les crises. Il existe la possibilité de réaliser une **photothérapie** sur court-terme (4 à 8 semaines) dans les formes modérées à sévères de DA. Celle-ci consiste à exposer les patients à des rayons ultraviolets (UV) UVA et/ou UVB selon la stratégie d'irradiation, à raison de 2 à 3 fois par semaine sur une vingtaine de séances. L'efficacité sur les lésions, chroniques majoritairement, est retrouvée dans plusieurs essais cliniques (*Rodenbeck et al., 2016*). Le mécanisme par lequel ces rayonnements

peuvent être bénéfiques n'est pas encore clairement identifié. L'implication de la vitamine D₃ peut être imaginée et pourrait être corrélée à l'amélioration possible des lésions pendant l'été chez les patients. Cependant, il existe des malades qui ne répondent pas au traitement et pour qui le soleil peut aggraver les lésions. De plus, l'impact des rayonnements sur le système immunitaire, indépendamment de la vitamine D₃, est démontré et doit être pris en compte (*Hart et al., 2011*).

L'usage d'**immunosuppresseurs systémiques** non spécifiques (ciclosporine, méthotrexate, azathioprine, mycophénolate mofétil) est réservé aux formes sévères et réfractaires aux autres options thérapeutiques. Elle est possible après vérification de l'observance au traitement topique, du bon diagnostic et éviction des allergènes/irritants. Malgré l'efficacité démontrée, l'utilisation doit être limitée dans sa prescription et dans le temps avec maximum 1 ou 2 ans de thérapie, en raison de sa potentielle toxicité (néphrotoxicité pour la ciclosporine notamment). La prise de **CTS systémiques** est elle aussi restreinte et à concevoir uniquement en dernière ligne de traitement.

5.3.3 Spécifiques

Les récents progrès dans la connaissance de la physiopathologie de la DA ont permis le développement de nouvelles thérapies anti-inflammatoires ciblées. Ces traitements consistent à moduler des médiateurs ou mécanismes identifiés dans la DA, comme les cytokines Th2, avec pour espoir d'avoir une efficacité plus spécifique et des effets indésirables moindres.

Le **dupilumab** est la première de ces drogues approuvée pour une utilisation clinique après des essais concluants sur la réduction du prurit et la survenue d'infections (*Simpson et al., 2016*). Il s'agit d'un anticorps monoclonal humain, dirigé contre la chaîne alpha du IL-4R, commune à IL-13R également et donc inhibiteur de l'action de ces 2 cytokines. Il s'administre par voie injectable en sous-cutané avec 1 dose initiale puis 1 dose toutes les 2 semaines, uniquement dans les formes réfractaires à la ciclosporine orale (non-efficacité ou contre-indication). Il est associable avec un traitement CTS topique (*Simpson et al., 2016*).

Le **nemoluzimab** est un anticorps monoclonal anti-IL-31R qui a été testé en essai clinique de phase II (sur 50 patients avec une DA modérée à sévère et administration en sous-cutané pendant 12 semaines) avec des résultats encourageants, mais encore non significatifs, sur la réduction du prurit visualisé par diminution du score EASI. Comme l'efficacité sur le sommeil est meilleure, une amélioration globale de la qualité de vie a été constatée (*Ruzicka et al., 2017*).

D'autres traitements spécifiques sont en essai clinique (phase II et III) et semblent pertinents d'après les résultats préliminaires (diminution du score EASI) (*Weidinger et al., 2018*) :

- Inhibition de la voie JAK : anti-JAK1, 2 et 3, topiques ou systémiques.
- Inhibition Th2 : anti-IL-13, anti-OX40 systémiques.
- Antiprurigineux : anti-H4R, anti-NK1R systémiques.

Il peut être intéressant de noter que les essais cliniques avec le **tezepelumab**, bloquant la TSLP, ont été négatifs, n'apportant pas d'amélioration significative du score EASI après 12 semaines de traitement (*Simpson et al., 2019*). Ces résultats pourraient remettre en cause la place centrale de la TSLP dans la physiopathologie de la DA, mais de telles conclusions sont encore à nuancer. En effet, les patients inclus dans l'étude ont été traités en parallèle par des corticostéroïdes topiques, ce qui pourrait masquer l'effet du tezepelumab sur le prurit. De plus, on peut noter que les patients choisis dans l'étude présentent en majorité des formes modérées de DA. Enfin, le choix de la dose administrée (280mg toutes les 2 semaines) et la durée de l'étude (12 semaines) seraient également des paramètres ajustables.

Malgré l'inefficacité des anti-H1R, la découverte plus récente du récepteur H4R a ouvert de nouvelles pistes thérapeutiques. En effet, H1R et H4R semblent utiliser des voies indépendantes : un anti-H1R n'est pas efficace contre un prurit déclenché par un agoniste H4R et inversement. Les anti-H4R présentent une certaine efficacité chez la souris (*Dunford et al., 2007*) et l'homme, avec un essai clinique en cours (*Werfel et al., 2019*).

En conclusion, s'il faut dresser un portrait de la DA à l'heure actuelle, nous pouvons retenir que cette maladie s'explique par une prédisposition génétique indéniable, mais multiple, sous influence de facteurs environnementaux secondaires complexes. L'exposition à un stress (prurit, allergènes, microbes) facilitée par un défaut de la barrière cutanée exacerbe la réponse immunitaire Th2 dans les phases initiales. Les interactions entre ces mécanismes sont à l'origine d'une boucle inflammatoire et du caractère chronique de la DA. La prise en charge actuelle n'est pas curative, mais reste principalement symptomatique (réduction de l'inflammation, hydratation de la peau) et préventive (éviction des allergènes, éducation). L'émergence de nouvelles thérapeutiques est possible grâce à la compréhension plus précise de sa physiopathologie. C'est pourquoi il existe aujourd'hui un réel besoin pour le développement de modèles humain *in vitro*, mimant au plus près la peau, afin de reproduire certes artificiellement, mais de façon contrôlée, certains éléments clés de la maladie.

Chapitre III. Modèles *in vitro* de dermatite atopique

La DA est une maladie complexe et multifactorielle. Son expansion en termes de prévalence reflète un besoin grandissant d'établir des modèles fiables, afin de fournir à la recherche l'opportunité de tester des hypothèses sur la physiopathologie et d'évaluer l'efficacité d'innovations thérapeutiques. La finalité est de comprendre le développement des lésions et d'élaborer dans le cadre d'études précliniques, de nouveaux traitements.

L'utilisation de **modèles animaux** (souris principalement) permet de reproduire de manière adéquate les principaux symptômes de la DA, l'inflammation et le prurit notamment. Ces modèles ont été comparés dans une publication de Jin H. et al. (*Jin et al., 2009*) et plus récemment dans celle de Kim D. et al. (*Kim et al., 2019*). Brièvement, il faut retenir que ces modèles peuvent se scinder en 3 groupes :

- les modèles induits par sensibilisation exogène, comme les haptènes : trinitrochlorobenzène (TNCB) et l'oxazolone ; les allergènes : ovalbumine (OVA), acariens (HDM) ; la vitamine D₃.
- les modèles transgéniques : surexpression des cytokines Th2, de TSLP ou sous expression de la FLG.
- les modèles qui développent spontanément une DA : souris NC/Nga.

Même si l'usage des animaux a facilité de nombreuses avancées et est aujourd'hui toujours pertinent, dans ce manuscrit nous allons nous focaliser sur les modèles *in vitro* humains. Ces derniers offrent une alternative importante pour réduire les doutes sur la validité interspèces des résultats. De plus, le développement de ces modèles s'inscrit dans la continuité des restrictions croissantes relatives aux modèles animaux.

Les modèles *in vitro* permettent la reproduction d'une ou plusieurs caractéristiques de la DA. Comme ce fut le cas pour notre étude, les limites imposées par chaque modèle obligent à faire des choix. Les publications de ces 10 dernières années se focalisent principalement sur le défaut de barrière et sur les perturbations immunitaires.

1. Modèles 2D

La culture 2D est un moyen simple et rapide pour étudier un mécanisme précis en rapport avec une maladie. Les cellules s'obtiennent par culture d'une lignée établie ou par isolation de cellules primaires de donneurs (biopsie de peau, prise de sang). Ces modèles

permettent soit la reproduction de réponses observées dans la maladie par un stimulus donné, soit de comparer le profil de cellules témoins et pathologiques. Par-delà la monoculture d'un type cellulaire unique, l'approche 2D comprend également la coculture d'au moins 2 types différents.

Pour l'étude de l'inflammation dans la DA par exemple, la culture de cellules immunitaires (LT, DC, éosinophile ou mastocyte) a aidé à la caractérisation de l'infiltrat et à l'analyse de la capacité de DCs isolées à orienter des LT naïfs en T *helper* (Soumelis et al., 2002). Jiao D. et al. (Jiao et al., 2016) ont réalisé des cocultures entre des fibroblastes et des éosinophiles humains en réponse à *S. aureus* pour mettre en évidence leur coopération dans le relargage de médiateurs inflammatoires (IL-6, CXCL8, CCL4). La culture de kératinocytes primaires en monocouche a permis d'avancer dans la compréhension du défaut de barrière par l'étude de l'effet de cytokines surexprimées dans la DA (IL-4, IL-13) sur les marqueurs de différenciation comme la FLG (Howell et al., 2009). Le caractère uniquement indifférencié des kératinocytes cultivés en 2D ne permet pas une fidélité totale à la situation *in vivo*, mais cette différenciation peut être mimée par obtention de la confluence ou modification de la concentration calcique dans le milieu de culture.

Bien entendu, en connaissance de la complexité de la maladie, il reste difficile de parvenir à trouver un bon modèle de DA avec si peu d'acteurs, qui ne tient pas compte de l'intégrité de la peau et des interactions entre les multiples types cellulaires. D'où le développement de structures 3D, qui tendent à devenir de plus en plus complètes.

2. Modèles 3D

La DA étant une maladie cutanée, les modèles 3D mis en place consistent donc à l'utilisation d'explant de peau ou à la reconstruction par ingénierie tissulaire de peau *in vitro*.

2.1 Explants de peau

Les **explants de peau** ont l'avantage d'être complets (même si les terminaisons nerveuses, sectionnées, ne sont plus fonctionnelles) et de provenir directement d'un unique donneur. Ils sont cultivables sur une période courte, ce qui permet l'application de stimuli pour étudier la réponse engagée après récolte du surnageant ou des cellules migrantes. Les expériences sur explants de peau ont mis en évidence certains inducteurs de TSLP comme IL-4, IL-13 (Bogiatzi et al., 2007), IL-1 β (Bernard et al., 2017) ou HDM (Landheer et al., 2013). Ils peuvent provenir d'une peau saine ou d'une biopsie, lésionnelle ou non, réalisée sur le

patient, afin de permettre une étude comparative de la qualité de l'épiderme, de la barrière, l'expression des marqueurs de différenciation et la caractérisation de l'infiltrat inflammatoire. Les explants de patients sont bien évidemment plus pertinents, mais se limitent aux difficultés d'obtention de tels échantillons. Néanmoins, il faut prendre en considération que la section consécutive à l'obtention des explants de peau peut déclencher des signaux inflammatoires influençant les résultats. Une étude récente (*Vostálová et al., 2019*) a démontré que l'intégrité structurelle d'un explant de peau après 7 jours de culture n'est pas affectée, malgré une libération accrue d'IL-6, d'IL-10 et de cyclooxygénase 2 (COX-2). Ces signaux envoyés par l'explant pourraient correspondre à ceux intervenant lors du processus de cicatrisation. C'est pourquoi des modèles décrits comme plus proches des conditions physiologiques, sans signal de danger lié à l'acte chirurgical, sont nécessaires. Ils sont obtenus par ingénierie tissulaire après isolation des différents types cellulaires et réintégration sur une matrice. Selon leur degré de complexité, on peut les regrouper en 2 catégories : les équivalents d'épiderme humain (*Human epidermis equivalent*, HEE) et les équivalents de peau humaine (*Human skin equivalent*, HSE).

2.2 Modèles reconstruits

2.2.1 Principe de construction

Les **HEE** se limitent à la culture exclusive de kératinocytes sur un insert ou un filtre type polycarbonate qui, après prolifération et exposition à l'interface air-liquide dans un milieu de culture adéquat, peuvent reproduire un épiderme stratifié et différencié fidèle à un épiderme « normal ». Les HEE sont utiles pour déterminer des paramètres propres aux kératinocytes ou confirmer l'approche 2D, comme effectué par Bernard M. et al. (*Bernard et al., 2017*) avec la production de TSLP induite par IL1 β .

Les **HSE** sont eux plus complets car ils vont reproduire une plus forte épaisseur de la peau, en incluant une structure dermique, établie en amont de l'ajout de kératinocytes. Ce derme peut être obtenu selon plusieurs stratégies. Couramment, on cherche àensemencer des fibroblastes sur un support biocompatible synthétique ou naturel à base de composants de la matrice extracellulaire, dont le collagène est le principal représentant. Toutefois, la composition est variable selon les modèles : on ajoute parfois du chitosan ou de la chondroïtine sulfate pour améliorer la résistance mécanique de la matrice. Le contrôle de la porosité reste un enjeu clé de cette synthèse. La plupart de ces supports ont pour but de permettre l'adhésion et la prolifération des fibroblastes, facilitant ensuite la sécrétion de leur propre matrice extracellulaire. Sur ce principe, des modèles sans support ont aussi été imaginés (*Saba et al., 2018*). Des fibroblastes

cultivés 28 jours sur pétri peuvent former une épaisseur suffisante de matrice, manipulable et empilable, créant ainsi une structure 3D qui peut se surélever à l'interface air-liquide pour la formation de l'épiderme après ajout de kératinocytes (*Auxenfans et al., 2009*).

2.2.2 Modélisation de la DA

Plusieurs stratégies ont été utilisées pour étudier la DA avec ces modèles 3D (HEE et HSE). Certains groupes ont généré des peaux reconstruites avec des kératinocytes contrôles stimulés par un cocktail de cytokines, d'autres ont choisi des kératinocytes modifiés génétiquement ou bien des cellules de patients (*Leman et al., 2019 ; De Vuyst et al., 2017 ; Eyerich et al., 2019*).

Comme les explants de peau, les cocktails de stimulation utilisés dans ces modèles contiennent souvent les cytokines **IL-4 et/ou IL-13**. En effet, ces deux cytokines Th2 sont retrouvées dans la DA et permettent la reproduction *in vitro* à la fois de la sécrétion de TSLP et du défaut de barrière, par diminution de l'expression des marqueurs de différenciation, observation d'une hyperplasie épidermique et accroissement de la perméabilité (*Danso et al., 2014 ; Kamsteeg et al., 2011*). La construction de modèle avec des cellules de patients est possible pour étudier la réponse des kératinocytes à des stimuli. Comme l'ont fait Bernard M. et al. avec des kératinocytes DA stimulés par **IL1 β** pour libérer de la TSLP (*Bernard et al., 2017*). On peut probablement reprocher à ces modèles de provoquer des symptômes de DA avec des facteurs déjà présents dans la peau lésionnelle des malades et non pas en essayant d'induire leur expression.

La peau de patient DA se caractérise par un défaut de barrière. Le rôle de la FLG dans ce symptôme est crucial, mais de manière surprenante, ce défaut est présent même en non lésionnel et indépendamment du statut génétique de la FLG (**Chapitre II, 4.2**). La construction de modèles avec des cellules modifiées génétiquement, notamment avec des **kératinocytes déficients en FLG**, par transfection de *small interfering RNA* (siRNA) ou *small hairpin RNA* (shRNA), a été très largement utilisée dans la littérature. Dans ces modèles, l'évaluation de la qualité de barrière s'effectue par analyse de la structure épidermique (présence des strates, épaisseur, expression des marqueurs de différenciation type K1, K10, LOR, INV) et par étude de la perméabilité (*lucifer yellow*, TEWL). Les résultats sont controversés : une augmentation de la perméabilité est décrite dans certaines publications (*Pendaries et al., 2014 ; Kùchler et al., 2011*), mais pas dans d'autres (*van Drongelen et al., 2013*) ou bien elle est constatée sans

altération de l'épiderme (Mildner et al., 2010). Cette variabilité s'explique peut-être par différents protocoles de fabrication et diverses techniques de *silencing* (Niehues et al., 2017). De plus, aucun de ces modèles n'est développé avec des kératinocytes FLG^{-/-} ou ^{+/-}. Ils sont en effet conçus avec des cellules transfectées et donc avec une diminution incomplète (de 70% à 90%) de la FLG. Seuls des modèles avec des kératinocytes d'ichtyose vulgaire (FLG^{-/-}) permettent une absence totale d'expression de la protéine. Cependant, encore une fois, les résultats sont variables selon les études. Sur ce principe, des HEE ont été fait par Niehues H. et al. (Niehues et al., 2017) qui ne retrouvent aucune différence en termes de développement de l'épiderme (morphologie, stratification) et perméabilité (*lucifer yellow* et TEWL). L'équipe de Dubrac S. (Blunder et al., 2017) a utilisé à la fois des kératinocytes de patients IV (FLG^{-/-}), DA (FLG^{+/+}) et DA hétérozygote (FLG^{+/-}) pour construire des HEE comparés à des contrôles sains. Dans les modèles malades, ils ont observé une altération de la structure de la couche cornée (altération de la composition lipidique, notamment dans la structure des corps lamellaires) et ce indépendamment du statut FLG du patient. Aucune différence n'est faite pour les marqueurs de différenciation comme la LOR et il n'y a pas d'augmentation du défaut de barrière après mesure à la *lucifer yellow*.

Dans la tendance actuelle, les modèles semblent évoluer par l'**intégration de cellules immunitaires et de neurones**. En effet, le prurit est un symptôme important de la DA et la peau atopique présente une hyperinnervation et une sensibilité accrue aux dangers. Ces modèles peuvent se prêter à l'étude des interactions entre les neurones, les cellules immunitaires ou avec les cellules de l'environnement (fibroblastes, kératinocytes). Gschwandtner M. et al. (Gschwandtner et al., 2013) ont cultivé des HSE en présence d'histamine. Cette équipe observe une diminution de l'expression des marqueurs de différenciation et un défaut barrière si l'histamine est ajoutée pendant les 7 jours de formation de l'épiderme. Si le modèle est entièrement construit puis stimulé 3 jours avec l'histamine, aucune différence n'est constatée. Roggenkamp D. et al. (Roggenkamp et al., 2012) ont établi un modèle de HSE avec des neurones de DRGs porcins associés à des fibroblastes et kératinocytes DA. Dans ce modèle, la densité des neurones est plus élevée que dans le contrôle avec des cellules saines. De plus, la production de CGRP y est plus importante. Enfin, l'épiderme est également plus épais. Ces modèles suggèrent donc l'influence des neurones et des neuropeptides sur la croissance de l'épiderme, et inversement l'influence des kératinocytes et fibroblastes sur la croissance neuronale.

L'équipe de Berthod F. (Laboratoire d'organogénèse expérimentale, LOEX, Québec, Canada) est parvenue à produire un modèle de peau reconstruite regroupant des kératinocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales et des neurones sensoriels (*Blais et al., 2014*). Même s'il a pour vocation d'être entièrement humain, avec la mise en place récente de neurones humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (*Induced pluripotent stem cells*, iPS), celui-ci a été initialement mis au point avec des DRGs de souris BALB/c. Nous avons pu collaborer avec cette équipe pour renforcer leur modèle en y ajoutant des cellules immunitaires dérivées de monocytes. Un objectif important de cette thèse est d'élaborer un modèle *in vitro* de DA en utilisant ce protocole de peau reconstruite, associant pour la première fois un nombre important de types cellulaires différents. Nous avons fait le choix de nous focaliser dans un premier temps sur la reproduction des phases initiales de DA, comme la libération de TSLP et la réponse Th2. Après étude de la littérature, nous avons sélectionné différents inducteurs connus de TSLP (**Matériel et méthodes Partie B, 4.1**) pour stimuler notre modèle. Parmi ceux-ci, la vitamine D₃ a particulièrement attiré notre attention. En effet, chez la souris, elle est capable à elle seule d'induire une DA (*Li et al., 2006*). Nous nous sommes rendu compte que chez l'homme, les effets de la vitamine D₃ sur la peau sont plus controversés, et ce malgré sa place centrale dans notre santé, avec sa synthèse quotidienne via les rayonnements et son utilisation fréquente en clinique. C'est pourquoi, en parallèle de la construction du modèle de DA, nous avons décidé d'éclaircir l'influence de la vitamine D₃ sur la peau et le système immunitaire : ce qui est connu, ce qui est débattu et ce qui reste à découvrir.

Chapitre IV. La vitamine D₃

La vitamine D est venue au centre de l'attention dans de nombreuses publications ces dernières années. En effet, bien plus qu'une hormone connue pour son rôle dans le métabolisme phosphocalcique, elle prétend gérer des fonctions bien plus étendues, comme sur le système cardiovasculaire, sur les muscles, mais également sur le système immunitaire. Identifier et comprendre l'ensemble de ces effets a été, depuis sa découverte il y a une centaine d'années, un véritable enjeu scientifique.

1. Découverte

Après avoir déjà contribué à l'identification de la vitamine A et de la vitamine B, Elmer Verner McCollum (1879-1967), célèbre biochimiste américain, établit en 1922 un premier lien entre le régime alimentaire et le développement du rachitisme chez le rat. Il s'aperçoit, après avoir testé un très grand nombre de programmes nutritionnel, que la prise d'huile de foie de morue par les animaux améliore leur état de santé, et ce encore plus efficacement avec une exposition au soleil. Il en conclut la présence bénéfique d'un facteur liposoluble qu'il baptise vitamine D, faisant suite aux vitamines A, B et C découvertes un peu plus tôt. Des observations similaires furent également remarquées chez de jeunes enfants atteints de rachitisme. Ces travaux, une fois publiés, ont permis à un futur prix Nobel allemand, le chimiste Adolf Windaus (1876-1959) de caractériser cette substance. Il parvient en effet à l'isoler en 1932 sous sa forme d'origine végétale, la vitamine D₂ (ergocalciférol) et sous sa forme d'origine animale, la vitamine D₃ (**cholecalciférol**) en 1936.

La vitamine D fut rapidement redéfinie non pas comme une simple vitamine, mais comme une **prohormone** avec un apport alimentaire minoritaire et une synthèse élevée dans la peau (vitamine D₃ uniquement). Les publications dans les années 1960-1970 furent consacrées à l'étude de ses précurseurs dérivés du cholestérol et métabolites actifs, comme le calcitriol. La vitamine D₂ ne pouvant pas être produite par l'homme et l'apport alimentaire étant mineur, elle ne sera plus abordée dans les paragraphes suivants (*DeLuca et al., 2014 ; Bikle et al., 2000*).

2. Production

La synthèse de la vitamine D₃ dans la peau est initiée par l'action des rayonnements UVB du soleil (longueur d'onde comprise entre 280 et 320nm) sur son précurseur, le 7-déhydrocholestérol (7-DHC), qui sera converti en pré-vitamine D₃ par ouverture du cycle B des

stéroïdes (liaison C9-C10) (**Figure 9**, page 62). Ceci explique sa classification en tant que **sécostéroïde**, indiquant que l'un de ses cycles est « cassé ». La pré-vitamine D₃ suit alors un réarrangement conformationnel thermo-induit pour donner la vitamine D₃. Sa production dépend à la fois de la durée et de l'intensité d'exposition au soleil. Si celle-ci est trop courte ou à l'inverse trop longue, plusieurs systèmes de protection existent. Premièrement, l'isomérisation de la pré-vitamine D₃ en vitamine D₃ est un processus lent, une exposition lumineuse même brève suffit. De plus, elle s'accompagne par la génération de métabolites inactifs, le tachystérol et le lumistérol, rétroconvertibles en pré-vitamine D₃ et servant de réservoir en cas d'ajustement nécessaire. Si l'exposition est prolongée, la conversion de la pré-vitamine D₃ en vitamine D₃ atteint un niveau maximum, mais la production en métabolites inactifs sera plus importante. La pigmentation de la peau peut aussi interférer dans ce mécanisme. En effet, la mélanine, induite par les UV, en absorbant les rayonnements peut réduire l'efficacité de la synthèse de vitamine D₃, ce qui explique les différences géographiques en vitamine D₃ sérique (*Christakos et al., 2011 ; DeLuca et al., 2014 ; Bikle et al., 2000*).

3. Métabolisme

La vitamine D₃ elle-même n'est pas biologiquement active. En effet, deux étapes d'hydroxylation sont nécessaires. Elles sont réalisées en dehors de la peau grâce à son transport dans le sang par la protéine de liaison à la vitamine D (*Vitamin D binding protein*, VDBP). Dans le foie, elle sera hydroxylée en position C25 par une enzyme à activité vitamine D-25-hydroxylase (25-OHase) en 25-hydroxyvitamine D₃ (25(OH)D₃). Plusieurs enzymes mitochondriales et microsomales du cytochrome P-450 (CYP), incluant CYP2R1, CYP27A1 et CYP2D25, sont suggérées comme candidates dans ce processus (*Cheng et al., 2004*). Le dérivé formé, aussi nommé **calcidiol, forme circulante principale** de la vitamine D₃, est fréquemment dosé dans le sang pour définir le statut en vitamine D₃ d'un patient. La seconde étape de métabolisation de la vitamine D₃ est réalisée par l'enzyme mitochondriale principalement rénale CYP27B1, dont l'expression est contrôlée par la parathormone, à activité 25(OH)D-1-OHase, résultant en l'ajout d'une fonction -OH en C1 sur le cycle A du stérol. Il se crée ainsi le **calcitriol**, ou 1,25 dihydroxyvitamine D₃ (1,25(OH)₂ D₃), **forme biologiquement active** de la vitamine D₃. La présence d'une mutation délétant le gène CYP27B1 conduit à un rachitisme vitamine D₃-dépendant, ce qui confirme son rôle crucial dans le métabolisme de la vitamine D₃ (*Kitanaka et al., 1998*). Il est à noter que d'autres cellules, comme les kératinocytes et certaines cellules immunitaires (DCs, macrophages) possèdent aussi cette activité

enzymatique, bien que minime, et sont donc capables de métaboliser la forme active de vitamine D₃ pour influencer localement les réponses immunitaires (*Sigmundsdottir et al., 2007*). La dégradation du calcitriol ou du calcidiol en dérivés inactifs est effectuée par l'enzyme **CYP24A1**, à activité 24-hydroxylase, ce qui fournit un mécanisme de protection supplémentaire quand la concentration sérique en vitamine D₃ circulante est trop importante.

4. Le récepteur à la vitamine D₃

Le récepteur principal au calcitriol, le **Vitamin D receptor (VDR)**, est un facteur de transcription membre de la famille des **récepteurs hormonaux nucléaires**. Sa présence est très répandue dans différents organes, dont les cellules de la peau. Le VDR se lie au calcitriol dans le cytosol puis se transloque dans le noyau, il va ensuite s'hétérodimériser avec son unique corécepteur, le récepteur nucléaire X des rétinoïdes (RXR). Ce complexe rejoint le promoteur de ses séquences d'ADN cibles, aussi nommés éléments de réponse à la vitamine D (*Vitamin D Response Elements, VDRE*) (*Pike et al., 2014*). L'activité transcriptionnelle du complexe VDR/RXR est, comme de nombreux récepteurs nucléaires, sous le contrôle de coactivateurs et de corépresseurs. L'association avec le RXR a été démontrée comme améliorant l'affinité pour les séquences cibles VDRE. Elle serait aussi responsable d'un maintien possible du VDR dans le noyau en l'absence de ligand. La fixation du ligand du RXR, l'acide rétinoïque 9 cis, présente des effets controversés sur la transcription des gènes cibles de la vitamine D₃ (*Prüfer et al., 2000*).

La forme active de la vitamine D₃ exerce également des effets biologiques rapides, indépendamment de son récepteur nucléaire, on parle de **mécanisme non génomique**. Elle agit selon un récepteur membranaire cavéolaire, présent dans de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, ostéoclastes et cellules épithéliales. L'ensemble des cibles déjà référencées et des voies intracellulaires connues ont été résumées dans la publication de Mizwicki MT. et al. (*Mizwicki et al., 2009*). Les premières hypothèses de mécanismes induits par un récepteur membranaire ont été faites suite à l'observation d'effets trop rapides pour impliquer une action génomique. L'un des premiers exemples découvert, appelé transcaltachie, correspond au transport par les cellules intestinales du calcium dans un délai très bref de quelques minutes (*Nemere et al., 1984*). La structure particulière du calcitriol (1,25(OH)₂ D₃), ouverte sur son cycle stérol B, lui confère une conformation flexible, sujette aux rotations (forme 6-s-trans ou 6-s-cis) ce qui déterminerait la préférence pour le VDR génomique ou membranaire respectivement (*Norman et al., 1997*).

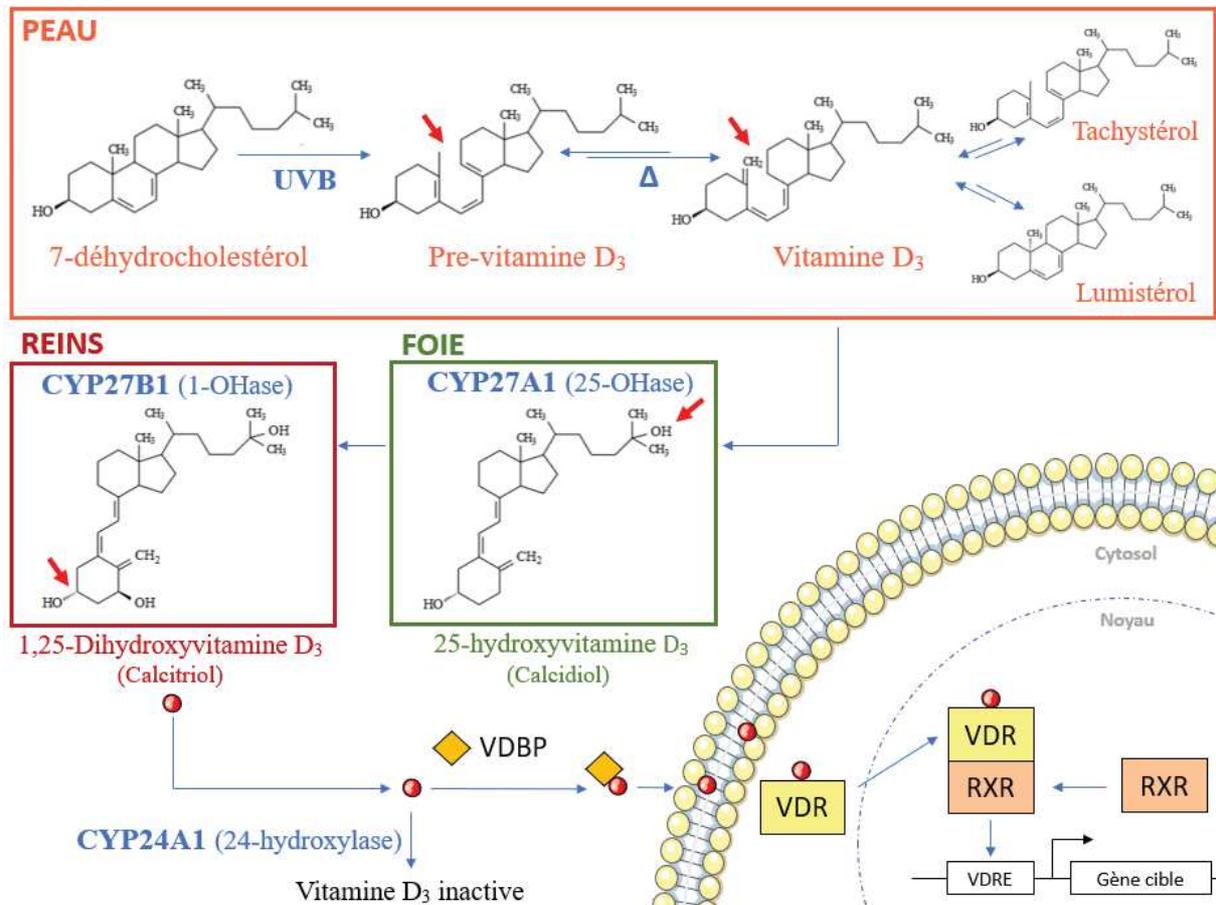


Figure 9 : Production, métabolisation et mécanisme d'action génomique de la vitamine D₃. La synthèse de vitamine D₃ s'effectue dans l'épiderme par les kératinocytes. Elle est initiée à partir d'un dérivé du cholestérol, le 7-déhydrocholestérol. Les rayonnements UVB du soleil, par ouverture du noyau stérol, forment la pré-vitamine D₃, qui par un mécanisme thermo-induit est convertie en vitamine D₃, encore inactive. Une irradiation continue conduit en parallèle à la synthèse de lumistérol et de tachystérol, réversibles. L'activation finale de la vitamine D₃ nécessite deux étapes d'hydroxylation par CYP27A1 et CYP27B1, respectivement dans le foie et le rein, afin de créer le calcitriol, transporté dans le sang par le VDBP. Sur ses cellules cibles, la vitamine D₃ se lie majoritairement à son récepteur nucléaire, le VDR, qui après translocation et hétérodimérisation avec le RXR lie des séquences types VDRE en amont de la région codante cible. En cas d'excès, une nouvelle hydroxylation du calcitriol sera effectuée par CYP24A1 et suivie d'une élimination dans les urines. *Illustration réalisée avec l'aide de Jeon et al., 2018 ; DeLuca et al., 2014.*

5. Activités biologiques

La vitamine D₃ est une hormone bien connue pour ses effets sur le métabolisme du calcium. Elle présente une activité **hypercalcémiante** par augmentation de l'absorption intestinale et rénale du calcium et par sa mobilisation au niveau des os.

5.1 Métabolisme calcique

5.1.1 Intestin / Reins

La paroi cellulaire de l'intestin est formée par des cellules épithéliales spécialisées, les entérocytes, collés entre eux à leur pôle apical par des jonctions serrées. Le passage du calcium provenant de l'alimentation entre deux cellules épithéliales s'effectue par un **mécanisme passif paracellulaire**, selon un gradient électrochimique qui intervient quand les apports calciques alimentaires sont importants. La vitamine D₃ peut faciliter ce mécanisme en augmentant l'expression des claudines 2 et 12, protéines transmembranaires des jonctions serrées, qui aident au transport calcique. Cet effet a été démontré sur des Caco-2, lignée tumorale humaine d'origine intestinale, isolées d'un adénocarcinome colique (*Fujita et al., 2008*). À l'inverse, le mode d'absorption **actif transcellulaire** se met en place quand les apports alimentaires en calcium sont faibles. Ce mode fait intervenir 3 étapes régulées par le calcitriol (*Christakos et al., 2011*) : 1) une entrée de calcium par le côté apical de l'entérocyte par l'intermédiaire du canal calcique TRPV6, 2) sa diffusion dans la cellule liée à la calbindin-D9k, 3) sa sortie basolatérale vers la circulation par le transporteur intestinal *Plasma membrane calcium ATPase 1b* (PMCA1b) selon un mécanisme actif. La vitamine D₃ est capable de réguler ces étapes avec ses effets génomiques par augmentation de l'expression des gènes codants pour TRPV6, la calbindin-D9k et PMCA1b (étude chez la souris : *Van Cromphaut et al., 2001*).

Le calcium circulant dans le sang et non redistribué va converger vers les reins. Le sang y sera filtré par le glomérule rénal, mais la majorité du calcium sera réabsorbé par le tubule proximal et distal. Seulement 1 à 2% du calcium filtré se retrouve dans l'urine. La réabsorption dans le tubule proximal (environ de 70%) est paracellulaire et passive, suivant un gradient de sodium, alors que celle dans le tubule distal implique un mécanisme transcellulaire actif similaire à celui observé dans l'intestin et toujours régulé par la vitamine D₃ (*Blaine et al., 2015 ; Christakos et al., 2016*).

5.1.2 Les os

Les os étant le principal réservoir de calcium dans le corps, l'influence de la vitamine D₃ sur le développement et le maintien de la masse osseuse a été rapidement définie comme cruciale. Sa fonction bénéfique pour les os passe par ses effets hypercalcémiant, via l'augmentation de l'absorption intestinale et de la réabsorption rénale du calcium, disponible pour la calcification des os. Ainsi, de nombreuses études épidémiologiques ont démontré qu'une déficience en vitamine D₃, définie comme une concentration sérique en calcidiol

inférieure à 20ng/mL (Ross *et al.*, 2011), est associée à une faible densité minérale osseuse et à un risque accru de fractures. Ce sont les signes du rachitisme chez l'enfant et de l'ostéomalacie chez l'adulte (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2004 ; Cauley *et al.*, 2008). Cette déficience peut se produire par insuffisance d'apports (carence alimentaire, défaut d'exposition au soleil) ou défaut de production (mutation des enzymes responsables de la formation de ses métabolites actifs). La question de l'utilité clinique d'un dosage sérique en vitamine D₃ a donc été soulevée et son intérêt démontré chez des populations à risque de carence, notamment les personnes âgées susceptibles aux fractures et les habitants de zones géographiques à exposition solaire faible.

Ces effets indirects sont complétés par l'observation d'un effet direct de la vitamine D₃ sur les os. En effet, le VDR est exprimé par les ostéoblastes et ostéoclastes, qui synthétisent aussi le CYP27B1, enzyme nécessaire pour donner le métabolite actif de la vitamine D₃. Or, l'intégrité structurelle des os repose sur un équilibre entre formation osseuse par les ostéoblastes et résorption osseuse par les ostéoclastes. Cette balance est dépendante de la calcémie. En cas de déséquilibre, le calcium des os est redistribué dans la circulation grâce à la vitamine D₃, sous contrôle de la parathormone. L'activation du VDR dans les ostéoblastes exerce un effet sur l'expression du gène codant pour le *receptor activator of nuclear factor (NF)-kB ligand* (RANKL), à activité ostéoclastogénique. La liaison du RANKL à son récepteur RANK, présent sur les précurseurs des ostéoclastes, augmente leur action et ainsi la libération de calcium par les os (Takeda *et al.*, 1999).

5.2 Effets extracalciques

La vitamine D₃ joue un rôle important dans la peau. Les kératinocytes, capables de synthétiser la vitamine D₃ à partir de son précurseur, le 7-DHC, sont aussi équipés de l'entière machinerie enzymatique (CYP27A1 et CYP27B1) nécessaire à sa métabolisation en forme active. Comme ils expriment le VDR, ils sont également répondeurs à ses métabolites actifs de manière autocrine et paracrine. Cette production locale de vitamine D₃ influence également les cellules immunitaires de la peau, directement ou indirectement grâce à des médiateurs libérés par les kératinocytes, comme la TSLP (Sigmundsdottir *et al.*, 2007).

5.2.1 La peau

a) Prolifération et différenciation des kératinocytes

In vitro, la vitamine D₃ possède des effets dose-dépendants sur la culture de kératinocytes humains. À une concentration inférieure à 1nM le calcitriol induit la prolifération,

alors qu'à une concentration supérieure à 10nM elle l'inhibe et induit la différenciation (*Itin et al., 1994*). Ces données ont permis le développement et la mise sur le marché d'analogues synthétiques de la vitamine D₃ à activité hypercalcémiant limitée, comme le **calcipotriol** (MC903, Daivonex®). Ils sont utilisés à des fins thérapeutiques dans le psoriasis, dont les malades se caractérisent par une hyperprolifération des kératinocytes et un défaut de différenciation.

Les études *in vivo* chez ces patients montrent qu'après plusieurs jours d'application de calcipotriol ou de calcitriol sous forme de crème (*Reichrath et al., 1997*), l'analyse immunohistochimique de marqueurs de prolifération (*Proliferating cell nuclear antigen*, PCNA ; Ki67) et de différenciation (INV, K10, FLG) provoque un retour à la normale en comparaison avec des contrôles sains. L'effet antiprolifératif de la vitamine D₃ est encore mal connu, mais il pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression de c-myc (*Matsumoto et al., 1990*), facteur de transcription impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, et par l'augmentation d'inhibiteurs de ce cycle (p21^{cip} et p27^{kip}) (*Liu et al., 1996*). La stimulation de la différenciation par la vitamine D₃ est en lien avec la concentration de calcium. En effet, comme la vitamine D₃ facilite son entrée dans la cellule, il pourra induire de nombreux changements dans le kératinocyte par accroissement du contact intercellulaire, induction de l'expression de marqueurs de différenciation et réarrangement des filaments d'actine (*Bikle et al., 2013*).

b) Rôle antimicrobien et fonction de barrière

La synthèse de **peptides antimicrobiens (AMPs)** par la peau constitue l'un des premiers mécanismes de défense contre les pathogènes. Comme discuté (**Chapitre II, 4.2.4 b**), les patients atteints de DA présentent une expression plus importante des AMPs.

En cas de lésions ou d'infections, la production des peptides antimicrobiens est augmentée. L'un des mécanismes régulant cette expression est dépendant de la vitamine D₃. En effet, les principaux représentants des AMPs, les cathélicidines et β-défensines, en sont des cibles transcriptionnelles directes. La présence de séquences VDRE sur le promoteur des gènes responsables de leur synthèse explique l'augmentation de l'expression de ces peptides observée après traitement par le calcitriol sur des cellules humaines *in vitro* (*Wang et al., 2004*) et *in vivo* chez l'homme (*Heilborn et al., 2010*). Un processus similaire intervient de manière naturelle après une lésion tissulaire.

De plus, la vitamine D₃ pourrait aussi moduler positivement la capacité de barrière. La souris VDR KO présente une diminution de l'expression de certains marqueurs de

différenciation (INV, LOR, pro-FLG) (Xie *et al.*, 2002). Le traitement topique d'une souris BALB/c par un agoniste VDR sur une courte durée induit une augmentation de l'expression de ces mêmes marqueurs (Hartmann *et al.*, 2012). On peut aussi imaginer une influence indirecte via le système immunitaire.

5.2.2 Vitamine D₃ et immunité

a) Kératinocytes

Les kératinocytes peuvent contribuer à l'élaboration d'un signal d'alarme pour le système immunitaire après perception d'un danger (rupture de barrière, infection, irritation). Cette aide se traduit par la libération de cytokines capables d'influencer la réponse immunitaire. TSLP par exemple, par action sur les cellules dendritiques, conduit à une orientation Th2. Ce mécanisme est caractéristique de la réponse allergique de l'asthme et de la DA (Soumelis *et al.*, 2002).

Une application locale de 4nM de calcipotriol en crème sur l'oreille d'une **souris** pendant 4 jours induit une production de **TSLP** (ARNm et protéine). Sur 16 jours, des symptômes de DA, comme la rougeur et le prurit, apparaissent (Li *et al.*, 2006).

Des études ont tenté de reproduire des résultats similaires chez l'homme. Premièrement, sur une lignée de cellules épithéliales bronchiques (16HBE), de la TSLP est observée après 1h de stimulation avec 10nM de calcitriol. La distinction par PCR des deux isoformes sTSLP et lTSLP a montré leur présence dans des proportions équivalentes, mais uniquement significative avec le sTSLP (Dong *et al.*, 2016). Ces données furent retrouvées sur des **cultures 2D de kératinocytes** primaires (Xie *et al.*, 2012) ou de la lignée HaCat (Fornasa *et al.*, 2015) (ARNm seulement, pas de TSLP détecté en ELISA). Landheer J. *et al.* (Landheer *et al.*, 2015) n'ont pas confirmé ces résultats ni observé de production de TSLP sur des explants de peau saine et DA, après traitement avec 100nM de calcipotriol ou application de calcitriol en crème. Pour l'application topique, on peut noter que la crème a été déposée seulement pendant 30 minutes à 37°C avant de remettre en culture l'explant pendant 1 à 3 jours sans vitamine D₃. Dans une autre étude, cette fois sur des patients atteints de psoriasis, un traitement combiné par la vitamine D₃ et un stéroïde topique de 1 mois à 1 an induit une production locale de TSLP (Sato-Deguchi *et al.*, 2012). Toutefois, la concomitance de ces deux traitements ne permet pas de conclure à un effet spécifique de la vitamine D₃. En effet, les corticostéroïdes peuvent réduire la production de TSLP (Surjit *et al.*, 2011). De plus, il a été plus récemment démontré que la TSLP est aussi exprimée dans le psoriasis non traité et contribue à la physiopathologie de la maladie par induction de l'IL-23 (Volpe *et al.*, 2014).

b) Monocytes / Macrophages

Les macrophages sont des cellules immunitaires résidentes à forte capacité phagocytaire, constituant l'une des premières lignes de défense contre les pathogènes. Cette propriété leur confère un véritable rôle de cellules « éboueurs » suite à la détection d'une perturbation de l'intégrité tissulaire, de type dommage ou infection. Ils interviennent ainsi dans la clairance des cellules mortes et débris associés, mais éliminent aussi directement des pathogènes identifiés par des PRR. En cas d'inflammation, des monocytes CD14⁺ sanguins circulants peuvent être recrutés sur place et générer des macrophages. L'influence de la vitamine D₃ sur ce processus a été mise en évidence (*Xu et al., 1993*) et son effet décrit comme stimulant la différenciation de précurseurs monocytaires en macrophages matures à capacité phagocytaire accentuée.

Les macrophages possèdent en outre une activité de CPA. La vitamine D₃ peut réduire l'expression des marqueurs de surface et molécules de costimulation HLA-DR, CD80 et CD86 (*Xu et al., 1993*), ayant pour conséquence d'altérer leur capacité à stimuler des lymphocytes T. De plus, la vitamine D₃ module le panel de cytokines exprimées par les macrophages et monocytes, en réduisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires IL1 β , IL-6, IL-12 et TNF α (*Zhang et al., 2013 ; Neve et al., 2014 ; Almerighi et al., 2009*). Ces observations peuvent amener à conclure à un effet de la vitamine D₃ sur les macrophages comme aidant à la prévention des infections et limitant une inflammation excessive.

c) Cellules dendritiques

Les DCs, qui forment un réseau performant de CPA, sont également sensibles à la vitamine D₃ et expriment le VDR (*Brennan et al., 1987*). La vie d'une cellule dendritique se sépare en deux étapes distinctes sur un plan phénotypique et fonctionnel. Les DCs ont un stade immature où elles seront très actives en termes de capture des antigènes et d'apprêtement par le CMH. Elles ont aussi un stade mature, induit par des signaux de dangers, où elles diminuent leur capacité de capture d'antigène et migrent vers les OLS afin de remplir leur fonction de présentatrices d'antigènes.

De nombreuses études ont été menées sur des cellules dendritiques dérivées *in vitro* à partir de monocytes (**MonoDCs**), obtenues après 5 jours de traitement avec de l'IL-4 et du GM-CSF. L'exposition à la vitamine D₃ pendant ce processus promeut la conservation d'un phénotype immature par diminution de l'expression des CMH et des molécules de

costimulation CD80, CD86 ainsi qu'une baisse du CD1a et une augmentation du marqueur monocytaire / macrophagique CD14 (Berer et al., 2000 ; Piemonti et al., 2000 ; Sommer et al., 2015). L'expression de cytokines est aussi affectée, IL-12 est diminuée alors qu'IL-10 et TNF- α sont accrues. Avec ce protocole, la vitamine D₃ génère des DCs dites tolérogéniques, réduisant la prolifération des LT, diminuant la polarisation en Th1 et induisant des Tregs (van der Aar et al., 2011).

L'influence de la vitamine D₃ sur d'autres types de DCs déjà différenciées, comme les **DCs sanguines** (myéloïdes et plasmacytoïdes) est un peu moins représentée dans la littérature. Penna G. (Penna et al., 2007) après stimulation de 24-48h a montré une expression diminuée de HLA-DR, CD80 et CD86 sur les DCs myéloïdes humaines. De plus, la vitamine D₃ peut augmenter leur production de CCL22/MDC (Penna et al., 2007), chimiokine qui peut recruter préférentiellement des Th2 et Tregs exprimant le CCR4 (Imai et al., 1999 ; Iellem et al., 2001). Les DCs myéloïdes stimulées par la vitamine D₃ sont capables de réduire l'orientation Th1 en diminuant l'IL-12 et d'induire aussi des Tregs. À l'inverse, les DCs plasmacytoïdes non pas montrées de réponse (Penna et al., 2007). Chez la souris, la stimulation des DCs spléniques induit quant à elle directement une orientation Th2 (Boonstra et al., 2001).

L'équipe de Esther C. de Jong (van der Aar et al., 2011 ; Bakdash et al., 2013) s'est intéressée à travers deux publications aux **DCs de la peau**. Dans la première de ces publications, l'équipe a travaillé avec des DCs et LCs isolées après digestion d'explants puis stimulées 48 heures avec la vitamine D₃. Dans la seconde, la vitamine D₃ est injectée en intradermique sur des explants de peau humaine *in vitro*. Dans ces deux papiers, la vitamine D₃ réduit sur toutes les DCs l'accroissement de l'expression de CD83 et CD86 induite par différents cocktails de maturation (IL1 β et TNF α pour Van der Aar et al. ; LPS pour Bakdash et al.). De plus, la synthèse d'IL-10 est accentuée. L'analyse des cellules migrantes en dehors de l'explant a révélé une augmentation du pourcentage et du nombre de DCs CD14+, interprétée comme une migration accrue de cette sous-population. D'un point de vue fonctionnel, les auteurs ont choisi d'étudier l'influence de la vitamine D₃ sur la capacité de ces LCs et DCs matures (maturation obtenue avec les cocktails précédemment décrits) à orienter des LT. Ils observent ainsi des Tregs FoxP3+ pour les LCs et des Tregs IL-10+ pour les DCs, avec une diminution de la production d'IFN γ et pas de différence en IL-4.

Il est aussi important de prendre en compte que les DCs, tout comme les monocytes et macrophages, sont capables de générer l'enzyme CYP27B1 sous le contrôle de signaux inflammatoires ($\text{IFN}\gamma$, TLR2). CYP27B1 est responsable de la conversion du calcidiol ($25(\text{OH})\text{D}_3$) en calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), permettant à la cellule une synthèse locale de vitamine D_3 biologiquement active et disponible pour agir sur les cellules environnantes et la DC elle-même (Adams *et al.*, 2015).

d) Lymphocytes T

Comme décrit dans les paragraphes précédents, la vitamine D_3 est capable de moduler le comportement des LT de manière indirecte via une influence sur le phénotype et la fonction des CPA. Cependant, la présence du VDR dans les cellules T activées indique qu'elles sont aussi une cible potentielle directe de la vitamine D_3 .

L'expression du VDR sur les LT CD4^+ humains isolés du sang est plus faible que sur les CD8^+ . Les cellules T non activées expriment peu le VDR, néanmoins l'exposition à des signaux d'activation comme la combinaison Phorbol myristate acétate (PMA) et ionomycine (Veldman *et al.*, 2000), la phytohémagglutinine (Provvedini *et al.*, 1989) ou les anticorps agonistes anti- $\text{CD3}/\text{CD28}$ (Baeke *et al.*, 2010) induit une augmentation de l'expression du VDR et des enzymes métabolisant la vitamine D_3 , accentuant donc leur susceptibilité. Ces études suggèrent la nécessité pour un LT d'être préalablement activé pour répondre directement à la vitamine D_3 .

Chez la souris, Boonstra A. *et al.* ont démontré, après culture de LT avec des anticorps agonistes anti- $\text{CD3}/\text{CD28}$ et en présence de vitamine D_3 , une augmentation de cellules productrices d'IL-4, IL-5 et d'IL-10, mais avec moins d' $\text{IFN}\gamma$. Ces LT présentent majoritairement une signature Th2 exprimant le facteur de transcription GATA-3. Toujours d'après cette étude, le blocage de l'IL-4 annule cet effet (Boonstra *et al.*, 2001). Selon un protocole similaire, la vitamine D_3 semble également inhiber la différenciation en Th17 (Palmer *et al.*, 2011). Staeva-Vieira TP. *et al.* n'arrivent pas à retrouver de libération d'IL-4 et observent même une réduction après prétraitement des T naïfs dans un milieu pré conditionné Th2 avec de l'IL-4 et de l'anti-IL-12 (Staeva-Vieira *et al.*, 2002).

Chez l'homme, la vitamine D₃ présente la capacité de moduler directement la prolifération de lymphocytes T préactivés, par diminution de la production d'IL-2 sur des T totaux CD4⁺ et CD8⁺ isolés du sang (*Rigby et al., 1987*). Même si d'après Jeffery LE. et al., travaillant uniquement sur les CD4⁺ totaux, si l'IL-2 est bien réduite, elle n'affecte pas la prolifération. Borgogni E. et al. ont démontré par ELISA, également sur les CD4⁺ totaux, une augmentation d'IL-4 et d'IL-5 ainsi qu'une baisse d'IFN γ et de TNF α (*Borgogni et al., 2008*). Jeffery LE. et al. concluent à une augmentation d'IL-10 et FoxP3 et à la réduction d'IFN γ et IL-17 (*Jeffery et al., 2009*). Sur des CD4⁺ naïfs cette fois, Franck J. Barrat a démontré que la vitamine D₃ induit la synthèse d'IL-10 et non d'IL-4, IL-5 et IFN γ (*Barrat et al., 2002*).

Pour résumer, d'après l'ensemble de ces publications, la vitamine D₃ inhibe indirectement via les DCs et directement sur les LT l'orientation Th1 (IFN γ ⁺) et Th17 (IL-17⁺) et augmente celle en Tregs (FoxP3⁺ ou IL-10⁺). L'effet sur les Th2 (IL-4⁺) est quant à lui plus controversé, à la fois chez la souris et l'homme. L'influence de la vitamine D₃ sur l'immunité (kératinocytes, DCs, macrophages) est schématisée page suivante (**Figure 10**).

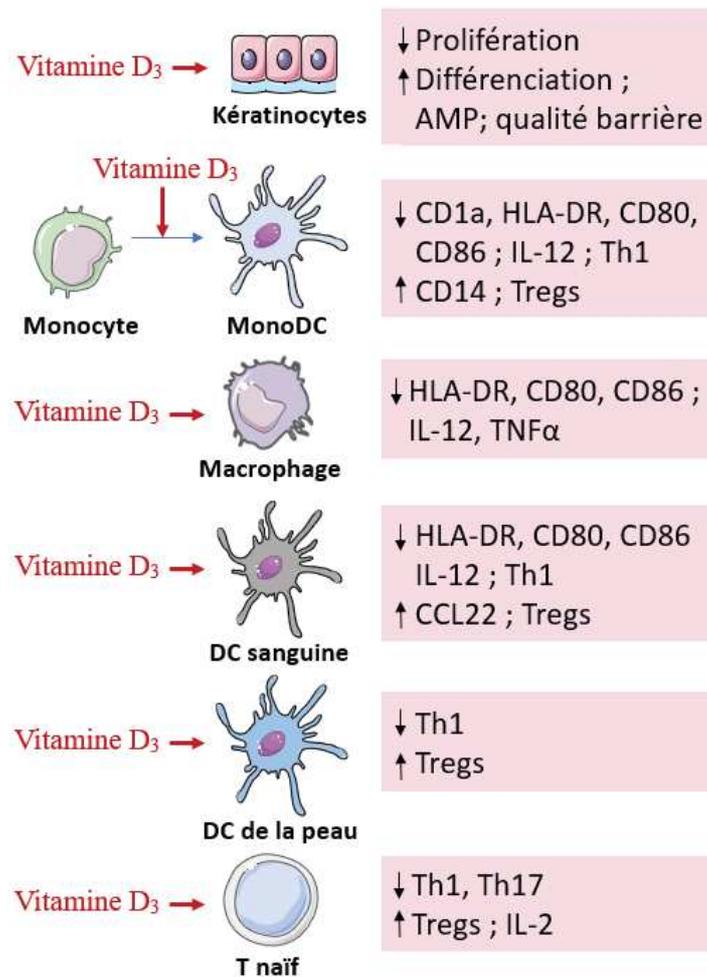


Figure 10 : Effets de la vitamine D₃ sur le système immunitaire. La vitamine D₃ affecte avec diversité les cellules de la peau : sur les kératinocytes elle réduit la prolifération, induit la différenciation et contribue à la fonction de barrière ; si elle est ajoutée pendant le processus de différenciation de monocytes en MonoDCs ou directement sur les DCs sanguines immatures elle va inhiber leur maturation et la capacité d'apprêtement antigénique. Que ce soit directement sur le T naïf, ou indirectement via les DCs, la vitamine D₃ semble orienter vers une réponse Tregs avec inhibition des réponses Th1.

Comme présenté dans le **Chapitre II**, la DA est une maladie caractérisée par un défaut de barrière et une perturbation immunitaire à dominance Th2. Nous venons de voir que la vitamine D₃ a un effet sur l'un comme sur l'autre. Deux questions évidentes sont donc soulevées : peut-on faire un lien entre la vitamine D₃ et la DA ? Est-elle bénéfique ou néfaste dans cette maladie ?

6. Vitamine D₃ et DA

De nombreuses études épidémiologiques sont réalisées chez l'homme depuis plusieurs années afin d'essayer d'établir un lien entre la concentration sérique en vitamine D₃ et le développement d'allergies, dont la DA, ainsi que les effets de la supplémentation en vitamine D₃ sur ces symptômes (Kim *et al.*, 2016 ; Huang *et al.*, 2018).

6.1 Lien entre DA et concentration sérique en vitamine D₃

Une étude de cohorte réalisée sous forme de questionnaires sur deux groupes d'enfants de 6-7 ans et 13-14 ans situés dans différentes zones géographiques (56 pays et 6 continents, 500 000 enfants) a mis en avant que ceux vivants dans des zones à hautes latitudes, sous-exposés au soleil et donc moins producteurs de vitamine D₃, ont aussi une plus forte prévalence de DA, soulevant l'influence potentielle du climat dans le développement des allergies (Weiland *et al.*, 2004). C'est pourquoi plusieurs études à différents endroits du monde se sont consacrées à comparer la concentration sérique en vitamine D₃ entre malades et individus sains. Parmi la bibliographie, les résultats sont variables et parfois contradictoires. Néanmoins, s'il faut dégager une tendance générale, les données suggèrent une concentration sérique en vitamine D₃ plus faible chez les enfants DA (entre 2-12 ans en moyenne) (Huang *et al.*, 2018). Des observations similaires ont été notées chez l'adulte, mais de manière non significative dans ces études (Kim *et al.*, 2016). De même, un lien entre la sévérité de la maladie et une plus faible concentration sérique en vitamine D₃ est difficile à établir.

6.2 Supplémentation systémique

L'effet d'une supplémentation orale en vitamine D₃ chez des patients DA a montré une diminution des scores EASI ou SCORAD (Iran, États-Unis, Mongolie) sur des enfants et adultes (Kim *et al.*, 2016). Cependant, d'autres études (Suède, Finlande) suggèrent que plus la supplémentation durant la première année de vie est importante, plus le risque de développer une DA les années suivantes est grand (Hyppönen *et al.*, 2004 ; Bäck *et al.*, 2009). Des études complémentaires sur l'effet de l'alimentation maternelle pendant la grossesse ou l'allaitement sont également nécessaires. L'âge à laquelle la vitamine D₃ est donnée semble donc crucial et pourrait expliquer ces différences, même si la géographie est aussi à considérer.

La littérature décrit un lien entre la concentration sérique en vitamine D₃ et la DA, et évoque l'amélioration des symptômes par l'administration systémique de vitamine D₃. Pourtant, les résultats de ces études épidémiologiques sont difficiles à interpréter. Il semble encore une fois évident que la situation géographique, l'âge des patients et les critères de sélection des études sont à prendre en compte et compliquent l'analyse de ces données. De plus, il peut parfois avoir une variabilité entre les outils de mesure SCORAD et EASI. Ces effets font suite à une administration systémique, mais existe-t-il des différences lors d'une application locale ? La fréquence d'application, aiguë ou chronique, a-t-elle une influence ?

6.3 Supplémentation topique

In vivo, chez la souris, une application prolongée (1 à 2 semaines) et locale de vitamine D₃ sous forme de crème conduit à l'apparition de rougeurs et démangeaisons. Ce modèle est fréquemment utilisé dans la littérature pour induire une DA chez la souris (*Moosbrugger-Martinz et al., 2017*).

Chez l'homme, la vitamine D₃ n'est pas reconnue dans le traitement des lésions de DA. Son utilité est limitée aux lésions psoriasiques en association avec des CTS. Dans la pratique, la grande majorité des patients répondent bien à ce traitement, mais il en existe 1 à 10% chez qui la vitamine D₃ va aggraver les lésions (*VIDAL 2019*). Un rapport de cas (*Turner et al., 2013*) a décrit l'histoire d'un enfant atteint de DA diagnostiqué à tort comme un psoriasis, chez qui la vitamine D₃ topique a considérablement accentué les symptômes. De plus, on sait que son application sur une peau, saine cette fois, peut entraîner des effets indésirables rares, mais proches de la DA, comme des rougeurs, une irritation locale et des démangeaisons (*VIDAL 2019*).

En conclusion, la vitamine D₃, issue d'une production endogène cutanée ou d'un apport exogène systémique, est essentielle à notre organisme. Sa participation cruciale dans le métabolisme calcique en est l'une des explications principales. Cependant, la vitamine D₃ gère des fonctions bien plus étendues grâce à l'expression partagée de son récepteur VDR par de multiples types cellulaires. Son influence sur le système immunitaire, bien qu'au cœur de nombreuses investigations, est encore controversée selon les études et plus particulièrement au niveau des DCs de la peau. Son utilité clinique dans le psoriasis est la preuve que la vitamine D₃ a un impact important sur ces cellules. Pour d'autres pathologies, comme la DA, il semble exister une dichotomie entre les effets de sa supplémentation systémique et topique. Notre étude va donc se consacrer à éclaircir la fonction de la vitamine D₃ sur de la peau saine et à déterminer si celle-ci peut être utilisée, parmi d'autres inducteurs, pour modéliser la DA *in vitro*.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Cette thèse a pour objectif de reproduire *in vitro* les mécanismes initiaux de la pathogenèse de la dermatite atopique. Afin d'y parvenir, nous disposons au laboratoire d'une bonne connaissance des cultures d'explants de peau, ainsi que d'un modèle de peau reconstruite innovant, associant pour la première fois des kératinocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules immunitaires dérivées de monocytes et des neurones murins.

Dans cette introduction, nous avons revu la structure et les fonctions d'une peau normale humaine (**Chapitre I**). Ces notions seront nécessaires pour caractériser notre modèle de peau reconstruite et en juger la fidélité. L'intérêt d'un tel modèle, par-delà la prouesse technologique apportée par sa complexité cellulaire, est bien évidemment de le mettre à l'usage de la compréhension de nouveaux mécanismes relatifs à une maladie donnée. L'apprentissage de la physiopathologie de la DA (**Chapitre II**) nous a permis de croire en la pertinence de ce modèle pour reconstruire *in vitro* une peau atopique. Cette idée a déjà été initiée dans la littérature (**Chapitre III**), chaque auteur faisant le choix d'une caractéristique précise à reproduire (défaut de barrière, inflammation ou prurit) mais rarement de toutes à la fois. Or, notre modèle qui présente les principales cellules impliquées dans ces mécanismes, en a la capacité. Dans la pratique, avec ce projet ambitieux, il nous a fallu nous aussi faire un choix et poser les bonnes questions. En effet, comment initier *in vitro* une DA ? Nous ne savons pas encore clairement si le défaut de barrière est primaire ou secondaire, ni comment l'inflammation ou les neurones y participent. Devant le nombre de modèles 3D reproduisant uniquement le défaut de barrière, nous avons voulu tirer profit de l'originalité du nôtre en nous intéressant à la production de TSLP, afin d'en observer les conséquences sur les cellules immunitaires (réponse Th2 ?) ou les neurones (signal d'activation du prurit ?). Nous avons décidé de ne pas directement ajouter la TSLP dans le modèle, mais de l'induire, comme c'est probablement le cas dans l'initiation de la DA. Nous avons donc cherché dans la littérature un inducteur de TSLP et de réponses Th2 pouvant fonctionner dans notre modèle. Chez la souris, la vitamine D₃ répond à ces critères. Pourtant, chez l'homme, même si elle tient une place importante dans la physiologie de la peau, la vitamine D₃ présente des effets plus controversés sur le système immunitaire (**Chapitre IV**).

C'est pourquoi nous avons tenté d'éclaircir ces mécanismes à l'aide d'explants de peau humaine et de MonoDCs en 2D. Nous avons décidé de regrouper ces résultats dans une publication scientifique, actuellement en cours d'évaluation, qui sera intégrée et discutée dans la **Partie A** de ce manuscrit. Ces résultats nous permettront également de savoir si le choix de

la vitamine D₃ est pertinent pour envisager une adaptation de notre modèle de peau reconstruite en modèle de DA (**Partie B**). Nous nous focaliserons dans un premier temps sur sa construction générale. Puis, la vitamine D₃ sera testée sur ce modèle en comparaison avec plusieurs autres inducteurs de TSLP choisis dans la littérature. Ils seront aussi évalués sur des cultures de MonoDCs en 2D et sur des explants de peau complète, afin de vérifier la concordance de ces modèles. Nous discuterons enfin des difficultés rencontrées et des pistes intéressantes à suivre pour aboutir dans un futur proche à une modélisation complète des phases initiales de DA.

PARTIE A

Impact de la supplémentation
en vitamine D₃ sur la peau

PARTIE A : Impact de la supplémentation en vitamine D₃ sur la peau

Dans cette première partie, nous allons vous présenter notre étude, soumise pour publication, des effets de la vitamine D₃ sur les réponses immunitaires initiées dans la peau humaine. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la capacité de DCs d'explant, sous influence directe de la vitamine D₃ ou indirecte par libération de TSLP, à orienter des T CD4⁺ naïfs. Ces résultats pourraient se révéler utiles pour déterminer si la vitamine D₃ peut mimer *in vitro* certaines caractéristiques initiales de la dermatite atopique. Ils représentent également une avancée dans la compréhension des effets bénéfiques de la vitamine D₃ topique dans la prise en charge de certaines pathologies, comme le psoriasis.

PUBLICATION SOUMISE POUR ÉVALUATION

Vitamin D3-elicited CD14+ human skin dendritic cells promote thymic stromal lymphopoietin-independent type 2 T-helper responses

Short title: Vitamin D3 directs human skin DCs to prime Th2

Adrien Brulefert, Astrid Hoste, Quentin Muller, Jean-Daniel Fauny, Christopher G. Mueller, Vincent Flacher.

Affiliation: Laboratory CNRS UPR3572 Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry (I²CT) / LabEx Medalis, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Address correspondence to: Vincent Flacher

Laboratory CNRS UPR3572 Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire

2 Allée Konrad Roentgen, 67084 Strasbourg Cedex, France

Tel: +33 (0)3 88 41 70 98; Fax: +33 (0)3 88 61 06 80

Email: v.flacher@ibmc-cnrs.unistra.fr

Acknowledgements

The authors wish to thank the Cabinet de Chirurgie Esthétique de Strasbourg (Drs. Blez, Blucher, Breton, and Kadoch) for their supply of human skin explants. The authors declare no competing interests. AH, JDF, CGM and VF are employees of the Centre National de la Recherche Scientifique. AB was supported by Université of Strasbourg, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-PERM-0001). QM was supported by Agence Nationale de la Recherche (Program "Investissements d'Avenir" ANR-10-LABX-0034 MEDALIS) and Région Grand-Est. CGM and VF are recipients of funding from Agence Nationale de la Recherche (Program "Investissements d'Avenir" ANR-10-LABX-0034 MEDALIS and ANR-11-EQPX-022). VF obtained funding from European Union Marie-Slodowska-Curie Career Integration Grant (PCIG12-GA-2012-334011 – DERMACRO) and Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-PERM-0001 BATMAN).

Author contributions

VF and AB conceived the study, designed experiments, and analyzed data. AB performed experiments, with the assistance of AH and QM for explant culture preparations. Quantifications of immunofluorescence microscopy images were performed by JDF. AB, CM and VF wrote the manuscript.

Word count: 3736 words

Abstract (249 words)

Background

Immune modulation by vitamin D3 through dendritic cells (DCs) remains controversial. Human DCs exposed in vitro counteract type-1 T-helper (Th1) differentiation and induce regulatory T cells. However, cutaneous application on mice promotes Th2-driven inflammation resembling atopic dermatitis and relying on Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) from keratinocytes and T-cell orientation by TSLP-stimulated skin DCs. We studied the effects of vitamin D3 in human skin, focusing on TSLP production and the role of skin DCs in T-cell differentiation.

Methods

Human healthy skin explants were exposed in vitro to vitamin D3 analogs. Migrating DCs were analyzed and TSLP quantified in the supernatant. Allogeneic naïve CD4+ T cells were cocultured with DCs to assess their proliferation and cytokine production.

Results

Vitamin D3 induced skin DCs to differentiate Th2 cells producing IL-4 and IL-13. Vitamin D3 triggered TSLP release in ~30% of skin explants, correlating with IL-13 detection in Th2 cells. In these donors, blocking TSLP receptor during skin explant cultures abrogated IL-13 production, yet IL-4+ Th2 cells were unaffected. Among skin DCs emerged CD14+ cells that had responded directly to vitamin D3 and differed from classical CD14+ dermal emigrants. Vitamin D3-elicited CD14+ DCs sufficed to promote IL-4+ Th2 cells in a TSLP-independent manner.

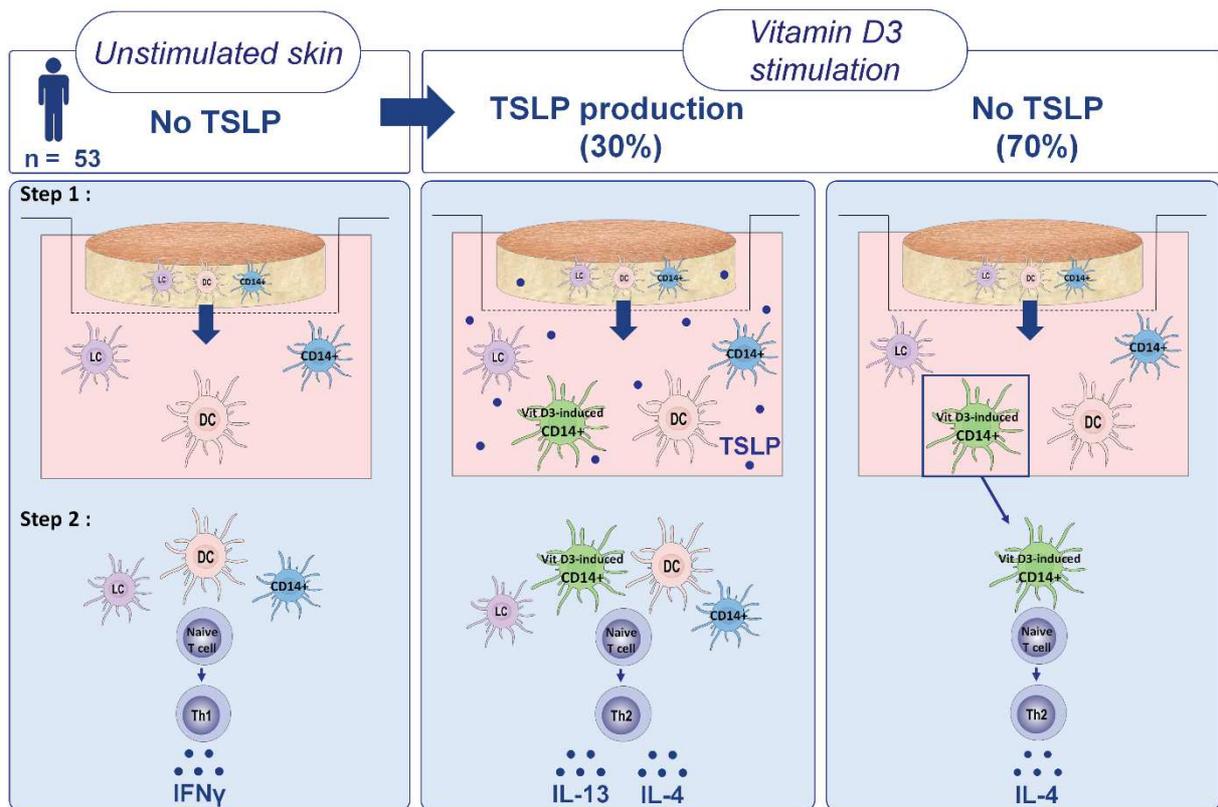
Conclusion

Vitamin D3, despite inducing TSLP in some donors, had a direct influence on skin DCs, affecting their phenotype and ability to drive Th2 responses independently of TSLP. Our findings pave the way towards in vitro systems that accurately model human cutaneous Th2 responses, notably involved in atopic dermatitis.

Keywords (5)

Atopic dermatitis, Dendritic cell, T helper 2, Thymic stromal lymphopoietin, Vitamin D3.

Graphical abstract



Vitamin D3-elicited human skin DCs promote thymic stromal lymphopietin-independent Th2 responses

- Vitamin D3 induce TSLP production in ~30% of human skin explant samples and alters the phenotype of skin-emigrating DC towards a CD14+ phenotype.
- Skin DC from TSLP-producing donors shift naïve T cells into IL-13+/IL-4+ Th2 cells.
- CD14+ cells from no TSLP-producing donors are sufficient to generate IL-4+ Th2 cells.

(50 words)

DC: Dendritic cell

IL: Interleukin

LC: Langerhans cell

Th2 : T helper 2

TSLP: Thymic stromal lymphopietin

Abbreviations

vitD3: Vitamin D3

cDCs: conventional dendritic cells

DCs: Dendritic cells

LCs: Langerhans cells

MLR: Mixed leukocyte reaction

MonoDCs: Monocyte-derived dendritic cells

Th: T helper

Treg: Regulatory T cell

TSLP: Thymic stromal lymphopoietin

TSLPR: Thymic stromal lymphopoietin receptor

VDR: Vitamin D receptor

CYP24A1: Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1

UVB: type B ultraviolet light

FCS: Fetal calf serum

FVD: Fixable Viability Dye

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

LPS: Lipopolysaccharide

PMA: Phorbol Myristoyl Acetate

CFSE: Carboxyfluorescein succidiny ester

HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

SEM: Standard error of the mean

INTRODUCTION

Bioactive 1,25-dihydroxy-vitamin D3 (calcitriol) triggers nuclear translocation and DNA binding of the vitamin D receptor (VDR), an ubiquitous transcription factor notably involved in the regulation of calcium and phosphate storage¹. In psoriasis, antiproliferative effects of calcitriol on keratinocytes have been harnessed to counteract acanthosis.

Immunoregulatory functions of vitamin D3 (vitD3) are a consequence of modulated gene expression in immune cells, in particular dendritic cells (DCs). Most studies have focused on the influence of vitD3 during *in vitro* differentiation of monocytes into monocyte-derived DCs (MonoDCs) with GM-CSF and IL-4²⁻⁶. The resulting CD1a^{low} CD14^{high} MonoDCs displayed low levels of MHC class II, CD80 and CD86 upon maturation and produced anti-inflammatory IL-10 rather than the type 1 T-helper (Th1)-driving cytokine IL-12²⁻⁶. Such features likely explain why they showed a primarily tolerogenic influence, yielding poor T-cell proliferation, limited Th1 polarization and an increase in regulatory T cell (Treg) differentiation^{4;7;8}.

Human skin harbors several subsets of DCs with distinct phenotypes and functions. Danger signals trigger their maturation, which is required for migration to lymph nodes and T-cell stimulation. The epidermis contains exclusively CD14⁻ CD207⁺ Langerhans cells (LCs), whereas CD14⁻ dermal DCs comprise CD1c⁺ type 2 conventional DCs (cDC2) and a smaller population of CD141⁺ cDC1^{9;10}. Part of dermal CD14⁺ cells exhibit some motility and thus can be harvested from skin explant cultures together with other DC subsets. However, they strongly resemble sessile CD14⁺ macrophages and lack the chemokine receptor CCR7 that allows cDCs and LCs to colocalize with naive T cells in lymph nodes^{11;12}. When exposed to maturation factors in the presence of vitD3, both dermal DCs and epidermal LCs promoted a moderate increase in Treg differentiation^{7;13}.

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is a proinflammatory soluble factor released mainly by suprabasal keratinocytes^{14;15}. The most commonly investigated form of TSLP is undetectable in healthy human skin¹⁶, although a shorter, alternatively-spliced TSLP variant might be present¹⁷. Within atopic dermatitis lesions, a basal expression of TSLP can be found¹⁶ and it can be induced in nonlesional skin by house dust mite extracts¹⁸.

In the mouse, cutaneous application of the vitD3 analog calcipotriol (MC903) promotes VDR-dependent TSLP expression as well as a Th2-driven inflammatory condition that mimicks many features of atopic dermatitis¹⁹. In both human and mouse models, TSLP stimulates DCs to support the development of Th2 responses^{16;20;21}. Despite this, there have been reports of in

vivo Treg induction reminiscent of experiments with human DCs^{22;23}. Other discrepancies need to be addressed, such as poor TSLP production from human keratinocytes of healthy or nonlesional atopic skin upon stimulation with vitD3¹⁸, whereas calcitriol ointment has recently been shown to induce TSLP expression in lesional psoriasis skin²⁴.

Here, we applied vitD3 to human skin explants and investigated the consequences in terms of TSLP production, the phenotype of skin DCs and their functional ability to promote T-helper responses.

METHODS

Human skin explants

Skin specimens were obtained from anonymized healthy subjects undergoing abdominal reduction, with written informed consent and institutional review board approval, in agreement with the Helsinki Declaration and French legislation. 4cm², ~1mm-thick biopsies were placed at air-liquid interface onto a 40µm cell strainer (Biologix) in 6mL RPMI1640 medium supplemented with 10µg/mL gentamycin, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin, 10mM HEPES (Lonza) and 10% FCS (Dutscher). After 3 days, migrating cells were harvested and analyzed by flow cytometry and immunofluorescence. If necessary, CD14⁺ and CD14⁻ migrating cells were separated using CD14 MicroBeads (Miltenyi-Biotec). Where indicated, 50ng/mL TSLP, 1µg/mL anti-human TSLPR neutralizing antibody, or polyclonal goat IgG (R&D Systems) were added during the culture.

Generation of MonoDCs

Human monocytes were purified from buffy coats of healthy blood donors (EFS, Strasbourg, France) by successive Ficoll and Percoll gradients (Sigma-Aldrich). MonoDCs were differentiated from monocytes in 5 days with 200ng/mL GM-CSF (Schering-Plough) and 10ng/mL IL-4 (ImmunoTools), and characterized as CD14^{low} CD1a^{high} DC-SIGN^{high}.

Vitamin D3 treatment

200nM calcitriol (R&D Systems) was added to the culture medium of skin explant (3 days), MonoDCs (24h), or skin migrating cells (24h). Alternatively, using a commercially available vitD3 ointment (Daivonex 50µg/g, Leo Pharma), 100mg of calcipotriol was applied onto the skin surface during the whole culture period (3 days).

Mixed leukocyte reaction

Naive CD4⁺ T cells (purity >95%) were isolated from peripheral blood mononuclear cells using human naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi-Biotec). To determine the stimulatory capacity of vitD3-stimulated DCs, 2x10⁵ naive CD4⁺ T cells were cocultured with 2x10⁴ skin DCs in 200µL RPMI1640+10% pooled human sera (Corning) in 96-well U-bottom plates (Falcon). After 7 days, T cells were restimulated with 1µg/mL PMA and 1µM ionomycin (Sigma-Aldrich) in the presence of 10µg/mL brefeldin and 1µM monensin (BD-Biosciences) and analyzed by flow cytometry for intracellular expression of IFN-γ, IL-13 and IL-4. T-cell

proliferation was determined by labelling naive CD4⁺ T cell with CFSE (Invitrogen) before starting the coculture.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Supernatants of skin explant cultures or MonoDCs were collected and analyzed for TSLP (eBioscience) and soluble CD14 (R&D Systems) production, respectively. After MLR, 10⁵ T cells were restimulated with PMA/ionomycin for 1 day and supernatants were evaluated for IL-4 production (BD-Biosciences). ELISA were performed in duplicates according to the manufacturer's recommendations. The absorbance was detected at 450nm using a Thermo Fisher Scientific Multiskan FC Microplate Photometer.

Flow cytometry

Cells were incubated for 20 min at 4°C with the following antibodies: CD86-FITC (clone FUN-1), CD83-APC (HB15e), DC-SIGN/CD209-PerCP-Cy5.5 (DCN46), CD1a-PE (HI149), CD3-AF700 (UCHT1), CD206-FITC (19.2), CD163-PE (GHI/61), OX40L/CD252-PE (ik-1) from BD-Biosciences; CD4-APCviolet770 (REA623), CD141-APCviolet770 (AD5-14H12) and CD1c FITC (AD5-8E7) from Miltenyi-Biotec; CLEC10A-PE (H037G3) and TSLPR-APC (1B4) from Biolegend; HLA-DR-AF700 (L203, R&D Systems), CD207-PE (DCGM4, Beckman Coulter); CD14-PE or -APC (MEM-18, Immunotools). For intracellular staining, T cells were fixed and permeabilized with BD Fixation/Permeabilization Solution Kit then stained for 45 min at 4°C with IFN- γ -APC (B27), IL-4-PE (8D4-8) and IL-13-PE (JES10-5A2) (BD-Biosciences). Cells were collected using a Beckman-Coulter Gallios flow cytometer, and analyzed with FlowJo (Tree Star). Dead cells stained by Fixable Viability Dye-eFluor450 (eBioscience) were excluded from analysis.

RNA isolation, reverse transcription and qPCR

Total RNA of MonoDCs, skin CD14⁺ or CD14⁻ DCs was isolated and purified with NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel). cDNA was synthesized by extension of oligo(dT) with ImPromITM reverse-transcriptase (Promega) on a T100 thermal cycler (Bio-Rad). qPCR reactions were performed on a StepOnePlusTM thermocycler (Applied Biosystems) using the RT2SYBR Green ROX qPCR Master Mix (Qiagen). Relative expression levels were calculated with the comparative Ct method using the proprietary software. HPRT1 and GAPDH were chosen as housekeeping gene for normalization. Following primer sequences (forward/reverse) were designed with the Primer-BLAST software: HPRT1 (5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT-

3'; 5'-AGACG TTCAGTCCTGTCCATAA-3'), GAPDH (5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'; 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'), CYP24A1 (5'-GATTTTCCGCATGAAGTTGGGT-3'; 5'- CCTTCCACGGTTTGATCTCCA-3').

Statistics

Data are presented as Mean \pm SEM. After testing normality with d'Agostino-Pearson test, paired Student's t-tests (normally distributed population) or Wilcoxon's test (non-parametric) were performed with Prism software (GraphPad); p-values below 0.05 were considered significant.

RESULTS

Vitamin D3-exposed skin DCs induce Th2 polarization.

To study the effect of vitD3 on cutaneous immune responses, we stimulated skin explants at the onset of ex vivo culture by adding calcitriol (200ng/mL) to the medium or by topical application of calcipotriol ointment (100mg). After 3 days, immune cells of untreated explants spontaneously migrate into the supernatant, including CD4⁺ and CD8⁺ resident memory T cells²⁶ and different subsets of HLA-DR⁺ DCs. With vitD3-treated skin, the viability of DCs was slightly increased (**Figure S1A**). To address the influence of vitD3 on T cell-priming capacities of DCs, we harvested total emigrating DCs without further stimulation and cultured them with CFSE-labelled allogeneic naïve CD4⁺ T cells (>95% viable, **Figure S1B**). After 7 days of mixed leukocyte reaction (MLR), T-cell proliferation and intracellular cytokine production were quantified by flow cytometry upon restimulation. No difference was observed in DC survival following MLR (**Figure S1C**). VitD3 exposure of DCs weakly altered their capacity to stimulate T-cell proliferation (**Figure 1A**), and this was not related to decreased T-cell survival (**Figure S1D**). However, calcitriol and calcipotriol consistently led DCs to promote differentiation of more IFN- γ - IL-13⁺/IL-4⁺ Th2 cells than DCs of untreated skin (**Figure 1B-E**). Th2 cells were detected only among proliferative cells (**Figure 1D-E**) and released IL-4 (**Figure 1F**). Conversely, the generation of IFN- γ ⁺ Th1 cells was slightly reduced in the presence of vitD3-exposed DCs (**Figure 1G**). DCs collected from vitD3-treated skin did not generate FoxP3⁺ Treg or support IL-10 production by T cells (**Figure 1H-I**).

TSLP from vitamin D3-treated human skin favors IL-13⁺ Th2 induction by DCs.

Epithelial TSLP is widely described as Th2 inducer through its effect on DCs^{16;27}. DCs migrating from skin explants stimulated with TSLP promoted differentiation of IFN- γ - IL-13⁺ Th2 cells, although this did not generate more IL-4⁺ Th2 cells (**Figure 2A**). Thus, we evaluated TSLP production by human skin samples cultured in the presence or absence of vitD3. Overall, TSLP was detected at significantly higher levels in the culture supernatant after either calcitriol or calcipotriol treatments (**Figure 2B**). Nevertheless, the TSLP concentrations of different donors were spread across a large range. To acknowledge this variability, we defined thresholds based on the Mean-minus-SEM for TSLP concentrations obtained in vitD3-treated skin. Accordingly, donors were split into two groups: those that showed strong TSLP production upon vitD3 exposure (responding: [TSLP]>Mean-SEM) and those that responded poorly or not at all (non-responding: [TSLP]<Mean-SEM). With thresholds set at 56.63pg/mL for calcitriol

and 62.73pg/mL for calcipotriol, the rates of responding donors were 29.4% and 32.1%, respectively.

We took advantage of this dichotomy to evaluate the importance of TSLP for Th2 orientation. We reanalyzed the corresponding data from T-helper polarization assays (**Figure 1**). As compared with untreated skin, IL-13⁺ Th2 cells were significantly augmented when DCs from TSLP-producing skin were used, which was not the case for DCs from non-responding skin (**Figure 2C**). On the other hand, vitD3 did increase the capacity of skin DCs to promote IL-4⁺ Th2 cells, but this occurred even with donors that showed poor response in terms of TSLP production (**Figure 2D**). This suggested that only IL-13 production is positively influenced by TSLP-exposed skin DCs.

To confirm the role of TSLP, we introduced an antagonistic anti-TSLPR antibody into the supernatant of skin explant cultures, in order to block potential effects of TSLP on skin DCs as early as possible. As expected, this did not alter the rate of IL-13⁺ Th2 cells obtained with vitD3-exposed DCs from non-responding skin (**Figure 2E, left**). Yet, blocking TSLPR abrogated the capacity of DCs from vitD3-treated, TSLP-producing skin explants to stimulate the generation of IL-13⁺ Th2 cells (**Figure 2E, right**). With respect to IL-4⁺ Th2 cells, no significant effect of TSLPR blocking could be observed with either non-responding or responding skin samples (**Figure 2F**). This demonstrates a link between the presence of TSLP in the supernatant of skin explants and IL-13 production by Th2 cells induced by vitD3-treated DCs.

Vitamin D3 alters the proportions of skin DC subsets but not their migration

To explore how vitamin D3 exposure affects cutaneous antigen-presenting cells, we studied in detail the phenotype of emigrating HLA-DR⁺ skin DCs by flow cytometry. The proportion and absolute numbers of CD207⁻ CD14⁺ DCs were markedly increased by vitamin D3 treatment (**Figure 3A**), in agreement with previous work¹³. Microscopic analysis of emigrating cells supported that most of them coexpressed HLA-DR and CD14 (**Figure S3A**). Conversely, CD207⁺ CD14⁻ Langerhans cells and CD207⁻ CD14⁻ dermal DCs (**Figure 3A**) were decreased as compared to untreated skin. Within CD14⁻ dermal DC population, we investigated the CD207⁻ CD14⁻ CD141⁺ cDC1 (**Figure 3B**) and found that DCs with this phenotype were also missing from the supernatant of vitamin D3-treated skin. Of note, the increase of CD14⁺ cells was independent of TSLP, as it remained evident when only non-responding skin samples were evaluated (**Figure 3C**).

Then, we questioned whether vitamin D3 potentiates emigration of CD14⁺ dermal cells, as previously proposed¹³, or rather increases the expression of CD14 on CD14⁻ DC subsets. We first noticed that identical numbers of total HLA-DR⁺ cells migrated from untreated and vitamin D3-treated skin explants (**Figure 3D**). Cryosections of skin samples were stained for HLA-DR and CD14 after 3 days of ex vivo culture, in order to look for double-positive cells that did not emigrate. We did not observe any obvious decrease in CD14⁺ cell density in the skin after vitamin D3 treatment, in comparison with unstimulated skin (**Figure S3B**), suggesting that there is no dramatic increase in the migratory capacity of CD14⁺ dermal cells.

Vitamin D3 affects the phenotype of skin DCs and MonoDCs

We thus suspected that vitD3 promoted phenotypical modifications of CD14⁻ DCs, including increased expression of CD14. To identify the cellular targets of vitD3 among skin DCs, we quantified mRNA of calcitriol 24-hydroxylase (CYP24A1), which degrades calcitriol into excreted calcitroic acid and is expressed under the control of VDR-mediated transcriptional activation¹. CYP24A1 was absent from all DCs migrating from untreated skin. However, following vitD3 treatment, a clear expression of CYP24A1 appeared, which was specific of CD14⁺ cells (**Figure 4A**). Therefore, the CD14⁺ population emigrating from vitD3-treated explants includes cells that had their gene expression directly modulated by vitD3 and that are different from bona fide CD14⁺ dermal cells of untreated skin.

To substantiate our hypothesis, we set out to analyze well-known markers of human skin DC subsets (**Figures 4 and S4**). CD14⁺ cells recovered from vitD3-treated skin explant cultures had a decreased expression of typical markers of macrophages and CD14⁺ macrophage-like cells (CD209, CD163, CD206), which are poorly expressed by CD14⁻ cDC2 of untreated skin. Nevertheless, vitD3-elicited CD14⁺ cells did not gain markers of cDC2 (CLEC10A, CD1c), and they increased CD141. As expected¹¹, CD14⁺ cells emigrating from untreated skin did not express CD86, as opposed to mature CD14⁻ DCs (**Figure 4B**). However, after vitD3 treatment, CD86 and CD83 were both present on CD14⁺ cells (**Figure 4B-C**). HLA-DR levels did not change in CD14⁺ cells but increased in CD14⁻ DCs (**Figure S4**, bottom panel). CD14⁺ cells from vitD3-treated skin had higher TSLPR surface levels (**Figure 4D**) and decreased OX40L expression (**Figure 4E**). Overall, the phenotype of CD14⁺ cells showed significant variations upon vitD3 treatment, whereas the remaining CD14⁻ cells were unaltered as compared to untreated skin (**Figure 4F**), in line with their lack of CYP24A1 expression. Therefore, CD14⁺ cells induced by vitD3 do not only comprise CD14⁺ macrophage-like cells

found in untreated skin, but also transitional, vitD3-elicited CD14⁺ DCs. They may stem from CD14⁻ DCs, which are the main cells expressing CD86 and TSLPR in untreated skin¹¹.

An elevated CD14 expression has been consistently reported for MonoDCs exposed to vitD3 throughout their differentiation from monocytes²⁻⁶. To verify whether vitD3 also affects fully differentiated cells such as skin DCs, MonoDCs generated with GM-CSF and IL-4 were stimulated for 24h with calcitriol. They showed a dose-dependent upregulation of CYP24A1 mRNA (**Figure S5A**), supporting that MonoDC gene expression is directly modulated by vitD3. Furthermore, CD14 upregulation by MonoDCs (**Figure S5B**) sustained the notion that this represents a primary effect of vitD3. The increased surface expression of CD14 did not reflect an impaired shedding of this receptor, since soluble CD14 was rather detected in higher amounts in the supernatant of vitD3-treated MonoDCs (**Figure S5C**).

Vitamin D3-elicited CD14⁺ skin DCs are TSLP-independent inducers of IL-4⁺ Th2 differentiation.

Based on the above-described phenotypic analyses of emigrating cells, we propose that vitD3 directly affects skin DCs, eliciting a new subset of transitional DCs displaying high CD14 levels. Thus, we asked whether these vitD3-elicited CD14⁺ DCs might contribute to TSLP-independent Th2 polarization. Choosing only non-responding donors to exclude any contribution of TSLP, CD14⁺ cells were isolated with anti-CD14 magnetic beads from total emigrating DCs. The enrichment procedure itself did not influence the maturation of positively selected CD14⁺ cells, as verified by their CD86 expression (data not shown). The resulting CD14⁺ and CD14⁻ subsets were then separately cocultured with allogeneic naïve T cells. CD14⁺ DCs from vitD3-exposed skin induced less proliferation of total T cells than the CD14⁺ dermal cells of untreated skin (**Figure 5A**), without affecting T-cell viability (**Figure S1E**). As expected for a TSLP-independent process, untreated and vitD3-treated CD14⁺ cells had a similar capacity to promote IL-13⁺ Th2 cells (**Figure 5B**). However, both calcitriol and calcipotriol conferred to transitional CD14⁺ DCs a superior ability to induce the differentiation of IL-4⁺ Th2 cells (**Figure 5C-D**), and they did not support Th1 polarization (**Figure 5E**). On the other hand, CD14⁻ DCs were unaffected by vitD3 for their influence on T-cell proliferation (**Figure 5F**) and polarization (**Figure 5G-J**), despite a slightly decreased T-cell viability in the calcitriol-treated condition (**Figure S1F**). Altogether, our findings indicate that CD14⁺ DCs arising in vitD3-treated skin acquire the capacity to induce IL-4⁺ Th2 responses independently of TSLP.

DISCUSSION

In the here presented study, topically applied and soluble vitD3 potently affected the phenotype and function of cutaneous human DCs. In particular, in skin donors that presented the strongest capacity for TSLP production upon vitD3 treatment, TSLP-exposed DCs enhanced the production of IL-13 by Th2 cells. Nevertheless, vitD3 also promoted direct effects, eliciting CD14+ DCs that differed from the well-described CD14+ dermal cells of untreated skin¹¹ and supported TSLP-independent differentiation of IL-4+ Th2 cells.

VitD3 consistently drives DCs to inhibit Th1 polarization²⁻⁴, similarly to our findings. With skin DCs, it was proposed that differentiation of Treg could explain this outcome^{7;13}, which we could not confirm. A Th2-inducing bias that opposes Th1 differentiation appears to be the most likely explanation for the lack of Th1 cells in our experimental settings. In previous investigations involving human skin DCs, vitD3 was provided in addition to LPS¹³ or IL-1 β +TNF- α ⁷. When used alone, such potent maturation factors are known to favor Th1 priming²⁸. Furthermore, we noted that mature skin DCs did not sense vitD3 (data not shown). For these reasons, we focused on culturing untreated or vitD3-treated explants in the absence of additional adjuvants, which is sufficient to achieve spontaneous migration of DCs. With either method, DCs appeared similarly mature and capable of naïve T cell priming, yet functional differences are expected that very likely explain differences between our findings and published studies^{7;13}.

In mouse models, cutaneous exposure to calcipotriol has been convincingly demonstrated to induce TSLP *in vivo*²⁰, but a similar outcome had yet to be proven in human skin. In our assays, vitD3 induced potent TSLP production in only ~30% of skin samples, which could explain why this has been previously overlooked¹⁸. Differences in sensitivity to and/or consequences of vitD3 exposure may stem from the origin of human skin samples. Since they were collected as surgical waste, the clinical history of donors could not be traced back, in accordance with our current ethical agreement. Therefore, the reasons for TSLP production variability remains unclear. Our samples might have included patients with atopic skin disorders. However, we obtained only healthy skin with no apparent atopic lesion, and atopic patients display TSLP staining within their active lesions but not in perilesional skin¹⁶. We may also suspect skin phenotype differences that modify the half-life of experimentally applied bioactive vitD3²⁹.

Segregating our data according to TSLP levels allowed us to reveal that skin DCs from TSLP-producing donors were more prone to shift Th2 differentiation towards IL-13+ cells.

IL-13 expression by T cells can be provoked by TSLP directly in the mouse³⁰ or via human MonoDCs¹⁶ and LCs³¹. In line with this, we observed a strong bias for IL-13 production when DCs were collected from TSLP-exposed skin explants. A dominant IL-13 production has been proposed as a hallmark of pathogenic Th2 cells³², notably because IL-13R α is particularly present on epithelial cells and impairs expression of the epidermal barrier constituents³³.

Despite this clear TSLP-dependent promotion of IL-13⁺ cells, the poor correlation between TSLP amounts and the capacity of skin DCs to generate IL-4⁺ Th2 cells suggested a TSLP-independent effect. Among other consequences, an increase in the rate of CD14⁺ cells emigrating from skin explants was observed upon treatment with vitD3. This prominent effect has been presumed to result from increased migration of CD14⁺ dermal cells^{7;13}. Our interpretation differs because (1) total numbers of emigrating DCs were not modified by vitD3 treatment, (2) the massive increase in CD14⁺ cells in the supernatant did not correlate with a decrease of CD14⁺ cells remaining in the dermis and (3) immature MonoDCs exposed to vitD3 showed a consistent upregulation of CD14. The latter effect has been repeatedly pointed out upon vitD3 treatment of monocytes during in vitro differentiation into DCs^{2;3;5}. We confirmed that vitD3 led terminally differentiated MonoDCs to upregulate both surface and soluble CD14. Moreover, immature LCs and dermal DCs sorted from human skin and exposed to vitD3 also upregulate CD14 to some extent⁷. Therefore, we propose that vitD3 does not promote emigration of the well-described CD14⁺ dermal cells but rather leads skin DCs to phenotypical changes. Although we gathered strong evidence supporting this, CD14⁺ DCs that dominate migratory cell suspensions after vitD3 treatment remain of unclear origin. They do not express macrophage-like markers, but they also lack other typical features of dermal CD14⁺ cDC2. These complex alterations, which were independent of TSLP but may not be only due to vitD3, result in a yet undescribed phenotype for skin DCs and, importantly, bring a strong bias in their T-cell priming function. Indeed, vitD3-elicited CD14⁺ DCs appeared sufficient to efficiently generate IL-4⁺ Th2 cells. Nevertheless, our phenotypic analyses did not reveal which alterations could be responsible for this function. The hallmark of vitD3 exposure, CD14, is unlikely to play a role in T-cell differentiation. OX40L, a known Th2 inducer^{16;20;21}, is rather decreased, and TSLPR, although increasing, should not be involved in skin explants that release little TSLP. Altogether, this intriguing differentiation pathway may be involved in the regulation of IL-4/IL-13 balance in the skin and should be further investigated for its potential to harness a relevant therapeutic approach limiting the atopic march and inflammation in skin allergies.

Overall, our findings provide several interesting insights for clinical research. Topical application of calcipotriol ointment is a well-established treatment for psoriasis¹. In addition to limiting keratinocyte proliferation and promoting their differentiation, this treatment induces TSLP in lesional psoriatic skin²⁴. A shift towards Th2 responses may be beneficial in this Th17/Th22-driven disease. Of note, dermatitis, erythema and xerosis, which are hallmarks of atopic dermatitis, may develop in 1-10% of patients as a side effect of the DaivonexTM calcipotriol cream (Medscape). Moreover, a case report pointed out that erroneous prescription of this drug to an atopic patient results in a dermatitis flare³⁴. Finally, we demonstrate the potential of using vitD3 in the design of human skin models reproducing early immune responses in atopic dermatitis³⁵. This strategy, aiming at reducing animal use and ameliorating the safety of clinical trials, currently represents an important goal in drug discovery.

References

1. Tremezaygues L, Reichrath J. Vitamin D analogs in the treatment of psoriasis: Where are we standing and where will we be going? *Dermatoendocrinol* 2011;3:180-186.
2. Berer A, Stöckl J, Majdic O et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Experimental Hematology* 2000;28:575-583.
3. Piemonti L, Monti P, Sironi M et al. Vitamin D₃ affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:4443-4451.
4. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N et al. 1,25-dihydroxyvitamin d₃ selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2007;178:145-153.
5. Sommer A, Fabri M. Vitamin D regulates cytokine patterns secreted by dendritic cells to promote differentiation of IL-22-producing T cells. *PLoS One* 2015;10:e0130395.
6. Pedersen AW, Holmstrom K, Jensen SS et al. Phenotypic and functional markers for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2009;157:48-59.
7. van der Aar AM, Sibiryak DS, Bakdash G et al. Vitamin D₃ targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1532-1540.
8. Nikolic T, Roep BO. Regulatory multitasking of tolerogenic dendritic cells - lessons taken from vitamin d₃-treated tolerogenic dendritic cells. *Front Immunol* 2013;4:113.
9. Bigley V, McGovern N, Milne P et al. Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c⁺ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141^{high} XCR1⁺ dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2015;97:627-634.
10. Haniffa M, Shin A, Bigley V et al. Human Tissues Contain CD141(hi) Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103(+) Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* 2012;37:60-73.
11. McGovern N, Schlitzer A, Gunawan M et al. Human dermal CD14(+) cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity* 2014;41:465-477.
12. Banchereau J, Thompson-Snipes L, Zurawski S et al. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood* 2012;119:5742-5749.

13. Bakdash G, Schneider LP, Van Capel TM, Kapsenberg ML, Teunissen MB, De Jong EC. Intradermal application of vitamin D3 increases migration of CD14⁺ dermal dendritic cells and promotes the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Hum Vaccin Immunother* 2013;9:250-258.
14. Liu Y-J, Soumelis V, Watanabe N et al. TSLP: An Epithelial Cell Cytokine that Regulates T Cell Differentiation by Conditioning Dendritic Cell Maturation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:193-219.
15. Varricchi G, Pecoraro A, Marone G et al. Thymic Stromal Lymphopoietin Isoforms, Inflammatory Disorders, and Cancer. *Front Immunol* 2018;9:1595.
16. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002;3:673-680.
17. Xie Y, Takai T, Chen X, Okumura K, Ogawa H. Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2012;66:233-237.
18. Landheer J, Giovannone B, Sadekova S et al. TSLP is differentially regulated by vitamin D3 and cytokines in human skin. *Immun Inflamm Dis* 2015;3:32-43.
19. Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:11736-11741.
20. Li M, Hener P, Zhang Z, Ganti KP, Metzger D, Chambon P. Induction of thymic stromal lymphopoietin expression in keratinocytes is necessary for generating an atopic dermatitis upon application of the active vitamin D3 analogue MC903 on mouse skin. *J Invest Dermatol* 2009;129:498-502.
21. Pattarini L, Trichot C, Bogiatzi S et al. TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. *J Exp Med* 2017;214:1529-1546.
22. Ghoreishi M, Bach P, Obst J, Komba M, Fleet JC, Dutz JP. Expansion of antigen-specific regulatory T cells with the topical vitamin d analog calcipotriol. *J Immunol* 2009;182:6071-6078.
23. Leichner TM, Satake A, Harrison VS et al. Skin-derived TSLP systemically expands regulatory T cells. *J Autoimmun* 2017;79:39-52.
24. Sato-Deguchi E, Imafuku S, Chou B, Ishii K, Hiromatsu K, Nakayama J. Topical vitamin D(3) analogues induce thymic stromal lymphopoietin and cathelicidin in psoriatic skin lesions. *Br J Dermatol* 2012;167:77-84.

25. Berg S, Kutra D, Kroeger T et al. ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat Methods* 2019;16:1226-1232.
26. Clark RA, Chong BF, Mirchandani N et al. A novel method for the isolation of skin resident T cells from normal and diseased human skin. *J Invest Dermatol* 2006;126:1059-1070.
27. Leyva-Castillo JM, Hener P, Michea P et al. Skin thymic stromal lymphopoietin initiates Th2 responses through an orchestrated immune cascade. *Nat Commun* 2013;4:2847.
28. Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG et al. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:1279-1288.
29. Carlberg C, Haq A. The concept of the personal vitamin D response index. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018;175:12-17.
30. Rochman Y, Dienger-Stambaugh K, Richgels PK et al. TSLP signaling in CD4(+) T cells programs a pathogenic T helper 2 cell state. *Sci Signal* 2018;11.
31. Ebner S, Nguyen VA, Forstner M et al. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen presenting cells that induce pro-allergic T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:982-990.
32. Ito T, Wang YH, Duramad O et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005;202:1213-1223.
33. Bieber T. Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis. *Allergy* 2020;75:54-62.
34. Turner MJ, Dasilva-Arnold SC, Yi Q, Mehrotra P, Kaplan MH, Travers JB. Topical application of a vitamin D analogue exacerbates atopic dermatitis and induces the atopic dermatitis-like phenotype in Stat6^{VT} mice. *Pediatr Dermatol* 2013;30:574-578.
35. Bernard M, Carrasco C, Laoubi L et al. IL-1 β induces thymic stromal lymphopoietin and an atopic dermatitis-like phenotype in reconstructed healthy human epidermis. *J Pathol* 2017;242:234-245.

FIGURES

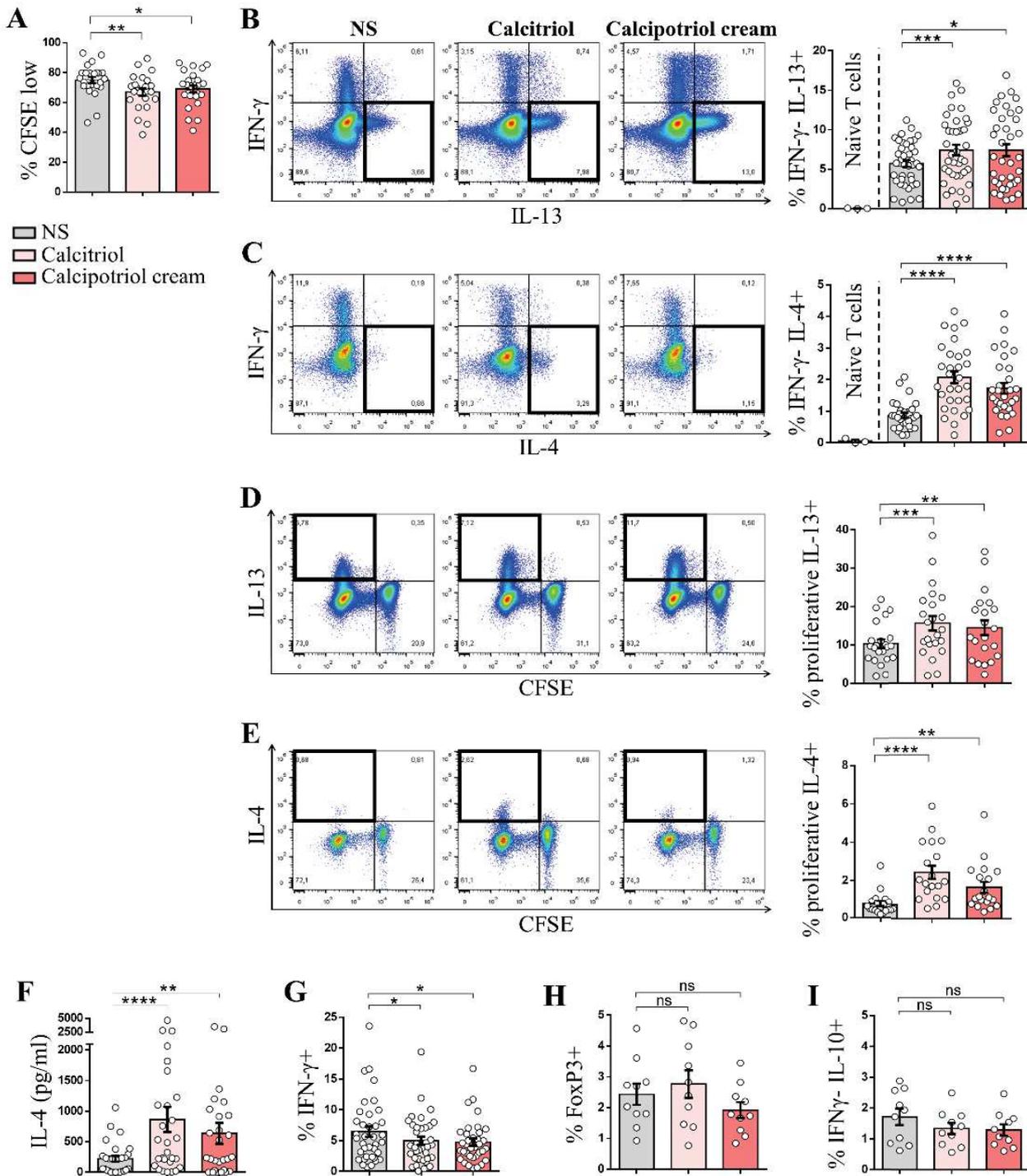


Figure 1: Vitamin D3-exposed skin DCs induce Th2 responses. Human skin explants were stimulated 3 days with 200nM soluble calcitriol (into the medium) or 100mg topical calcipotriol. Emigrating skin DCs were collected and cultured with CFSE-labelled allogeneic naïve CD4⁺ T cells. Intracellular cytokines were detected by flow cytometry upon restimulation with PMA+Ionomycine. (A) Percentage of proliferative (CFSE^{low}) T cells after 7 days of MLR with total cells emigrating from untreated or vitamin D3-exposed skin explants (n=26). Representative dot plots and percentages of cells in thick-lined gates define Th2 subsets: (B) IFN- γ -IL-13+ (n=40) (C) IFN- γ -IL-4+ (n=30) (D) proliferating IL-13+ (n=23) or (E) proliferating IL-4+ cells (n=19). (F) IL-4 released in 24h-restimulated MLR supernatant (n=28). (G) Percentages of IFN- γ + Th1 cells (n=37) (H) FoxP3+ Treg (n=10) and (I) IFN- γ -IL-10+ T cells (n=10). Data are presented as Mean \pm SEM. n= total number of skin explant donors. ns: non-significant, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 (paired Student's t-tests except (F) Wilcoxon non-parametric tests).

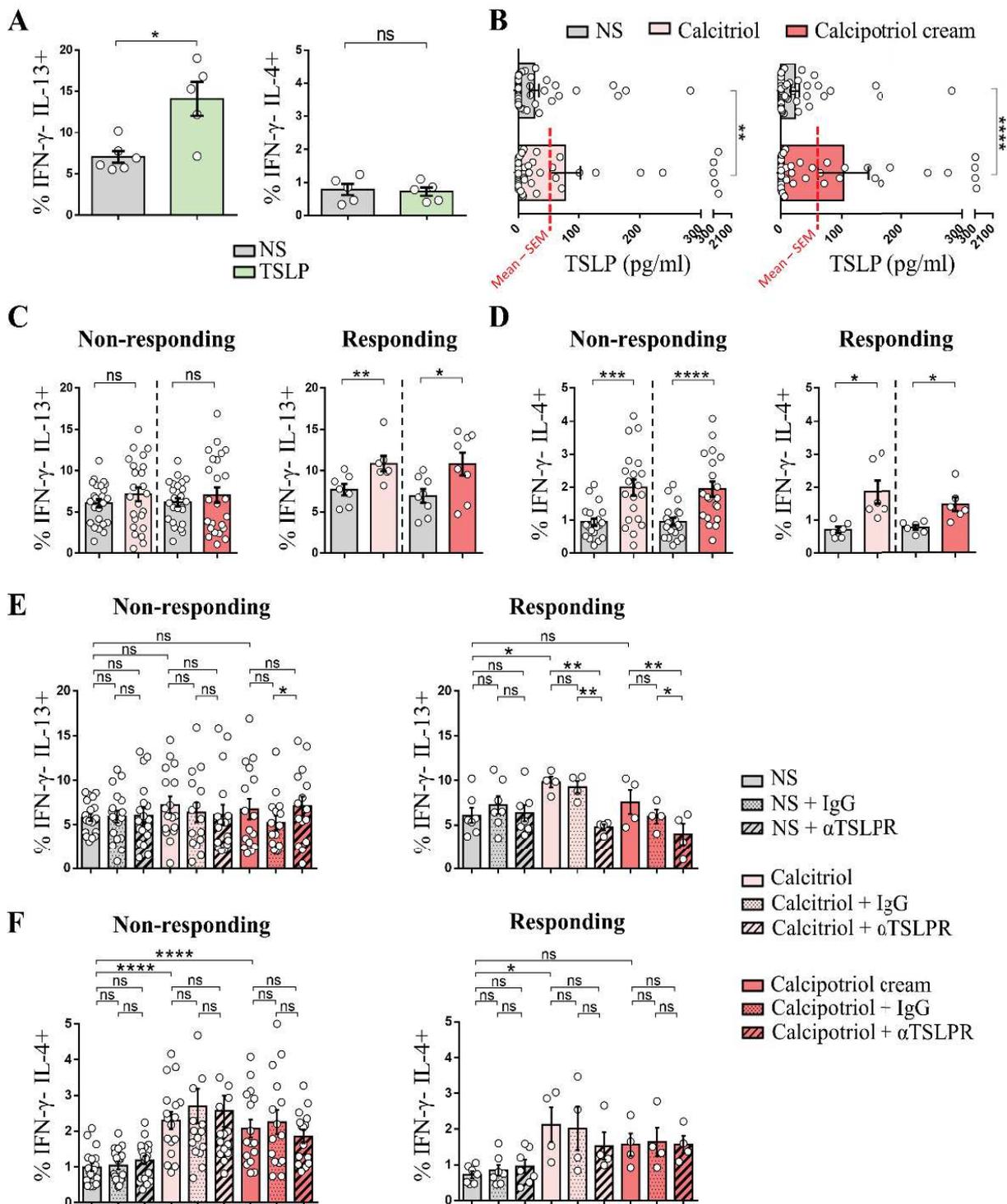


Figure 2: TSLP production in vitamin D3-treated human skin regulates the capacity of Th2 cells to produce IL-13. (A) Percentages of IFN- γ - IL-13 $^{+}$ (n=6) and IFN- γ - IL-4 $^{+}$ (n=5) CD4 $^{+}$ T cells after MLR with emigrating DCs from TSLP-stimulated skin explants (B) TSLP released after 3 days of skin explant culture (n=53). Dashed lines depict thresholds defined from Mean-SEM values, allowing to split donors into responding and non-responding populations. (C) IFN- γ - IL-13 $^{+}$ Th2 percentages for MLR with skin DCs from non-responding (n=24) or responding (n=8) donors. (D) IFN- γ - IL-4 $^{+}$ Th2 percentages for MLR with skin DCs from non-responding (n=20) or responding (n=6) donors. (E, F) Anti-TSLPR antibody or isotype control were added into the supernatant during skin explant cultures. (E) IFN- γ - IL-13 $^{+}$ and (F) IFN- γ - IL-4 $^{+}$ (n=19 for non-responding, n=7 for responding). Data are presented as Mean \pm SEM. n= total number of skin explant donors. ns: non-significant, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 (paired Student's t-tests except (F) Wilcoxon non-parametric tests).

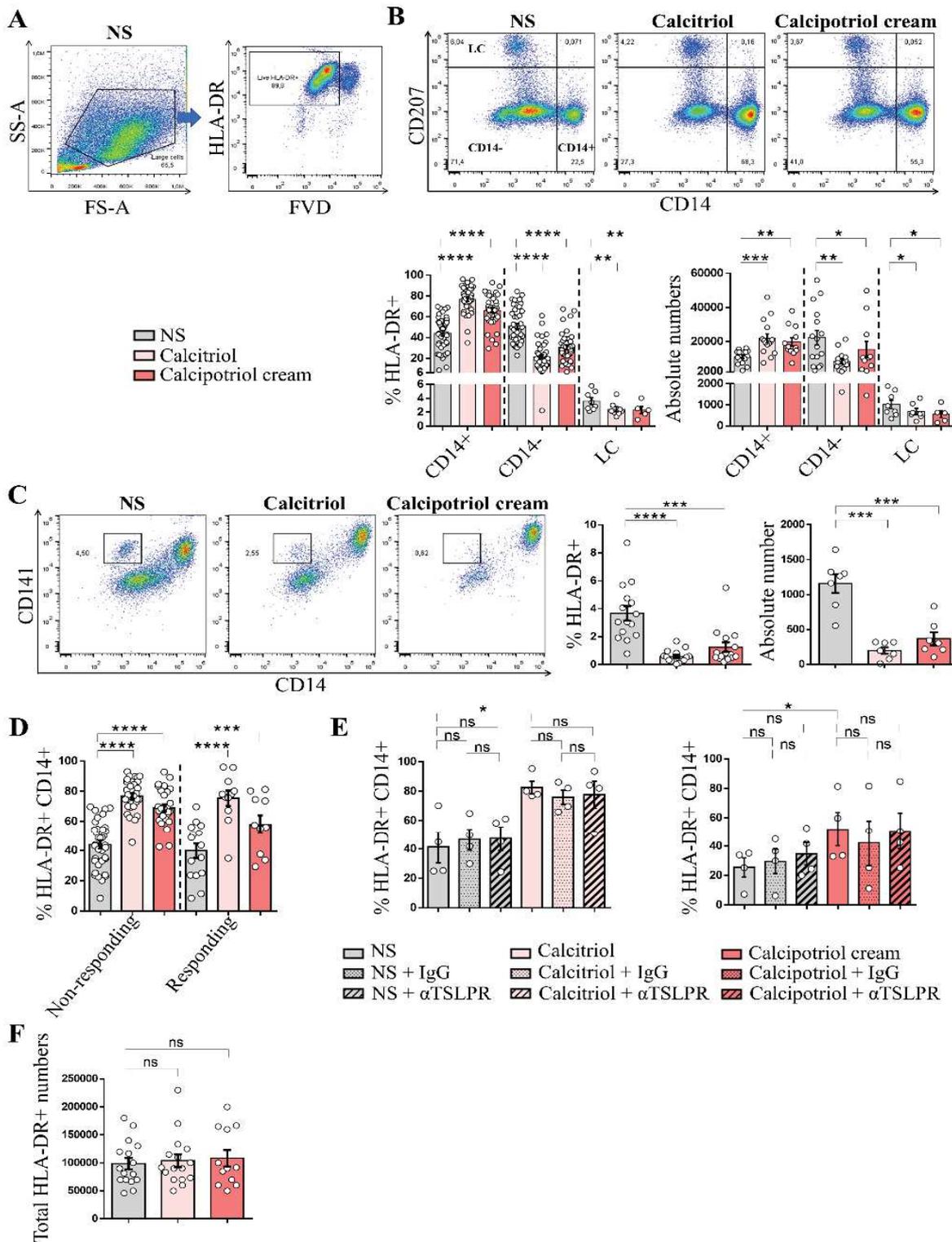


Figure 3: Vitamin D3 alters DC populations emigrating from skin explants. (A) Gating strategy to determine the phenotype of emigrating HLA-DR+ cells by flow cytometry. Representative dot plots and quantification are shown for (B) CD14+ CD207-, CD14- CD207- (n=44 for percentages, n=16 for absolute numbers), CD14- CD207+ LCs (n=8 for both) and (C) CD14- CD207- CD141+ cDC1s (n=15 for percentages, n=7 for absolute numbers). (D) Percentages of CD14+ cells emigrating from non-responding (n=36) and responding skin explants (n=15). (E) Percentages of CD14+ cells emigrating from calcitriol- or calcipotriol-responding skin with or without anti-TSLPR antibody or isotype control (n=4) (F) Total number of migrating cells for one skin explant (n=16). Data are presented as Mean \pm SEM. n= total number of skin explant donors. ns: non-significant, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 (paired Student's t-tests).

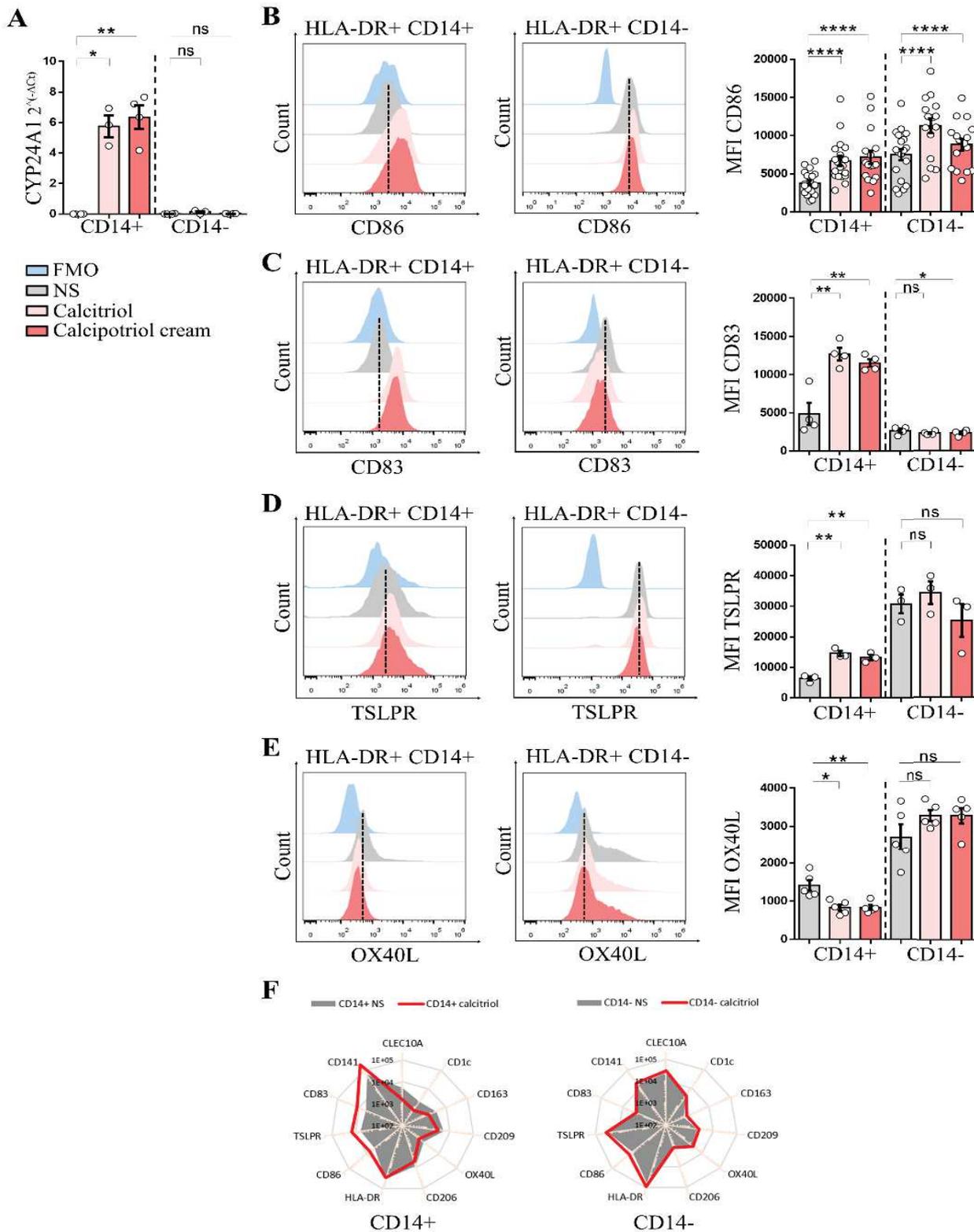


Figure 4: Vitamin D3 induces phenotypic modifications of skin DCs into a CD14+ subset. (A) Relative expression levels for CYP24A1 mRNA in CD14+ and CD14- emigrating subsets (n=4). (B) Representative histogram overlays and mean fluorescence intensities (MFI) for CD86 (n=19). (C) Representative histogram overlays and MFI for CD83 (n=4). (D) Representative histogram overlays and MFI for TSLPR (n=4). (E) Representative histogram overlays and MFI for OX40L (n=5). (F) Radar plots depicting the average MFI of all tested donors for CD1c, CD141, CD86, CD163, CD209, TSLPR, CLEC10A, CD83, HLA-DR, OX40L and CD206 for CD14+ and CD14- populations (see detailed analysis in Figure S4). Data are presented as Mean ± SEM. n= total number of skin explant donors. ns: non-significant, * p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 (paired Student's t-tests).

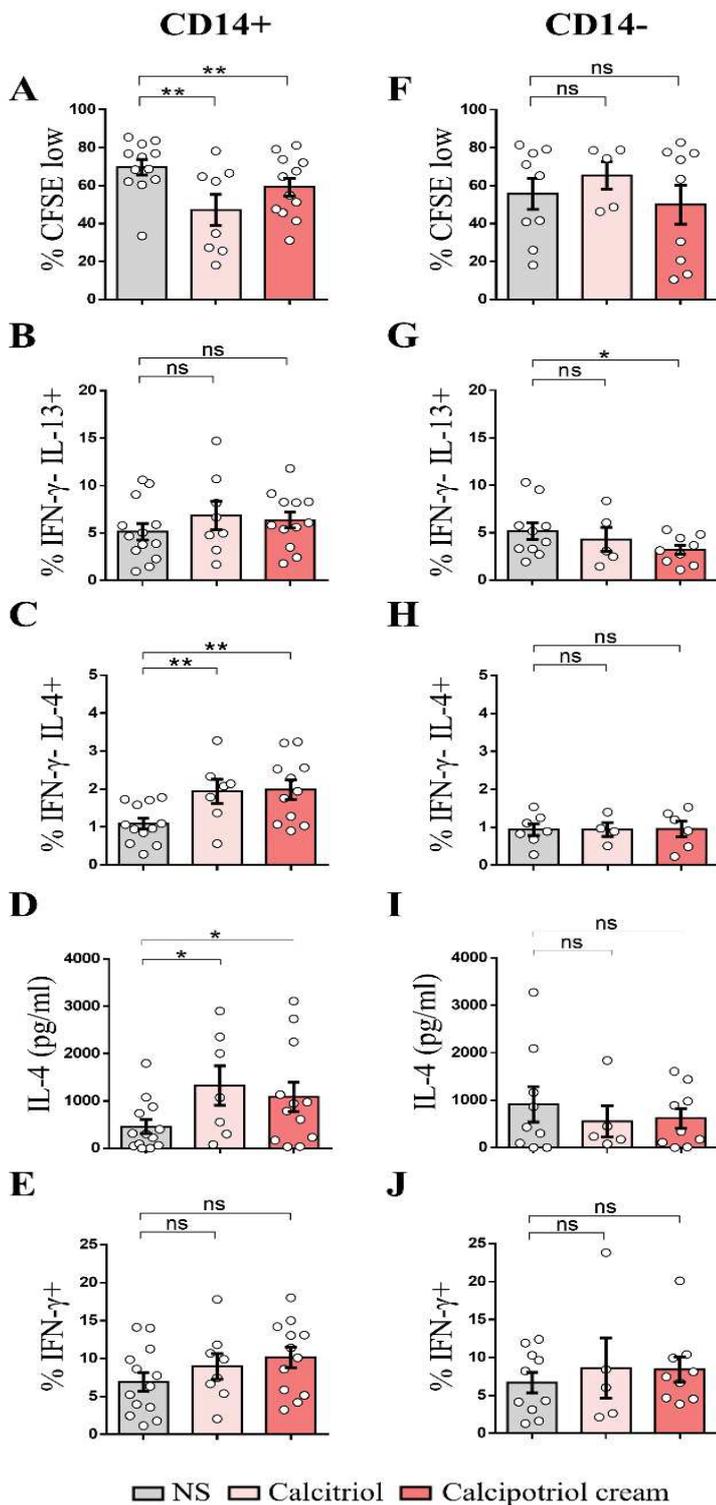


Figure 5: Vitamin D3-elicited CD14+ cells induce IL4+ Th2 cells independently of TSLP. Magnetically separated CD14+ and CD14- cells from untreated or vitamin D3-exposed skin explants were cocultured with allogenic naïve T cells. Data presented here only shows results from skin explants that did not respond to vitamin D3 by TSLP production (non-responding donors). (A-J) Percentages of (A, F) proliferative (CFSE^{low}) T cells (n=12 for CD14+, n=9 for CD14-), (B, G) IFN- γ - IL-13+ (n=13 for CD14+, n=10 for CD14-) or (C, H) IL-4+ Th2 cells (n=12 for CD14+, n=7 for CD14-). (D, I) IL-4 in 24h restimulated supernatants (n=13 for CD14+, n=9 for CD14-). (E, J) Percentages of IFN- γ + Th1 cells (n=13 for CD14+, n=10 for CD14-). Data are presented as Mean \pm SEM. n= total number of skin explant donors. ns: non-significant, *p<0.05, **p<0.01 (paired Student's t-tests).

SUPPORTING INFORMATION

Supplementary methods

Immunofluorescence microscopy

Skin explant samples were frozen embedded in O.C.T Compound (CellPath) and 16µm sections were prepared, mounted on SuperFrost-Plus™ glass slides (Thermo Scientific), fixed in cold acetone for 20min and air-dried. Sections were incubated overnight at 4°C with antibodies against HLA-DR (L203) and CD14 (AB383) (R&D Systems), diluted in PBS-10% FCS. Thereafter, they were incubated 2h at room temperature with DAPI (100ng/mL) and their corresponding secondary antibody: Donkey anti-Mouse IgG AlexaFluor 555 (Molecular Probes, A31570) and Donkey anti-Goat IgG AlexaFluor 647 (Jackson ImmunoResearch, 705-605-147). Sections were then mounted with Fluoromount G medium (EBioscience, 00-4958-02). Images were acquired on a Zeiss Axio-Observer Z1 epifluorescent inverted microscope driven by the Metamorph software, using a 10x EC Plan Neofluar objective. Quantification was based on 85 images obtained from 11 different donors. Nuclei prediction maps were realized using the pixel classification module in Ilastik software²⁵ on the DAPI staining channel. Based on this prediction maps, the object classification module of Ilastik was used to train the software to determine to which of the 4 following classes belongs each nuclei: epidermal cells, HLA-DR+ cells, HLA-DR+ CD14+ cells, unstained cells. We then determined the number of nuclei for each class using the ImageJ software.

Skin-emigrating DCs were fixed with paraformaldehyde and stained as described above. Images were acquired with a spinning disk confocal head (Yokogawa, CSU-X1), using a 100x Plan Apochromat oil immersion NA1.4 objective and analyzed with ImageJ software.

Supplementary figures:

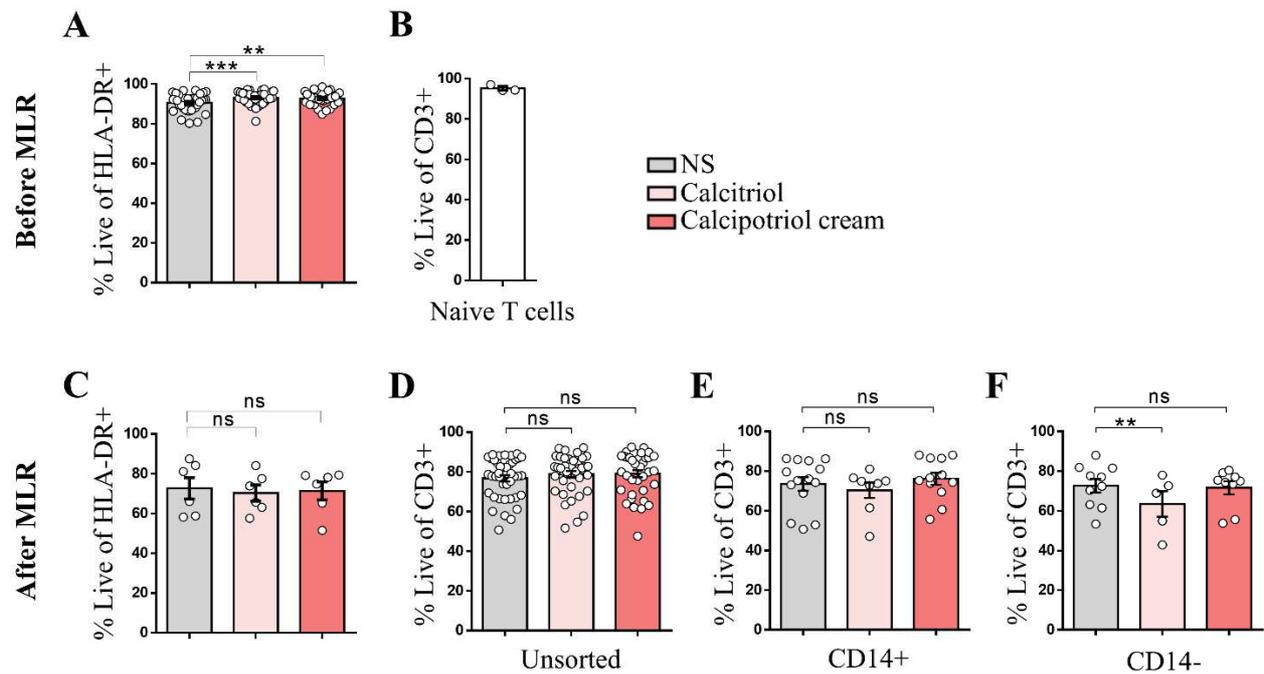


Figure S1: Vitamin D3 weakly alters viability of skin DCs and T cells. (A-F) Survival of HLA-DR+ or CD3+ cells before (A,B) and after (C-F) MLR. Data are presented as Mean \pm SEM. n= total number of skin explant donors. ns: non-significant, **p<0.01, ***p<0.001 (paired Student's t-tests).

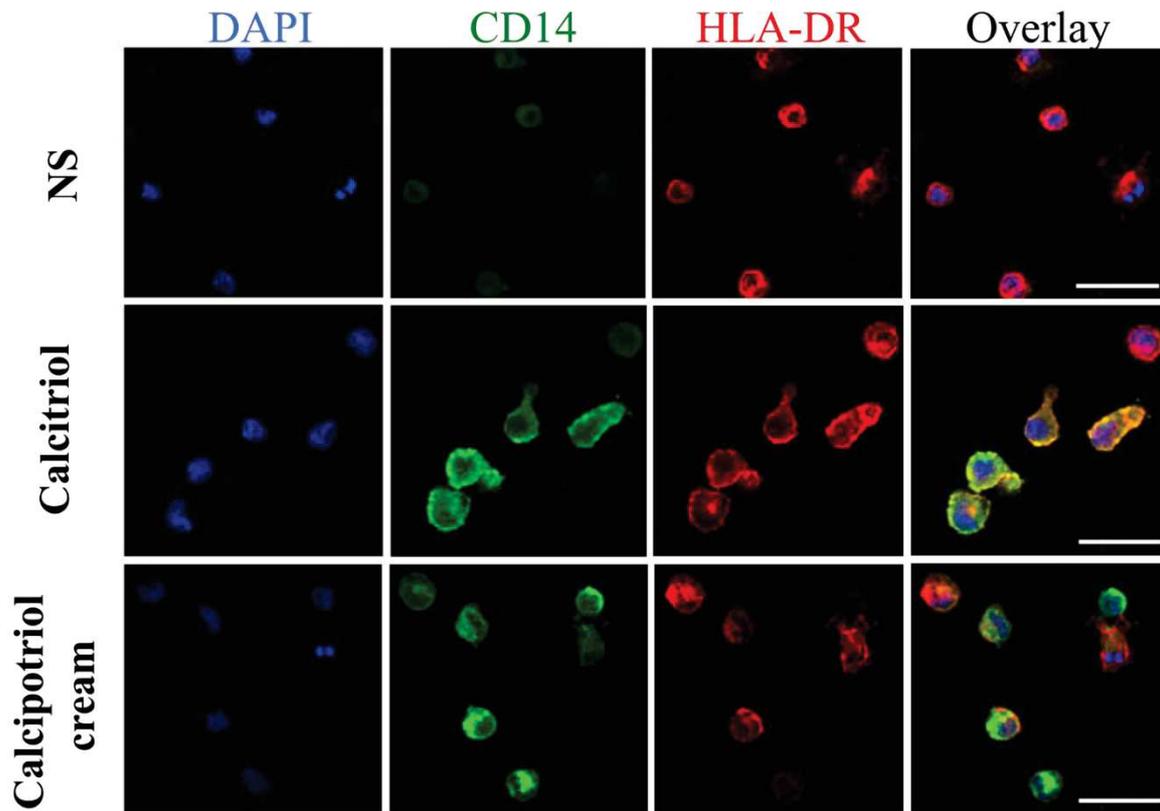


Figure S2: Vitamin D3 alters emigrating skin DC populations. Representative immunofluorescence of cells emigrating from untreated, calcitriol- or calcipotriol-treated skin explant (3 days). Scale bars: 25 μ m. Cells were stained with DAPI (blue), anti-CD14 (green) and anti-HLA-DR (red) (n=2).

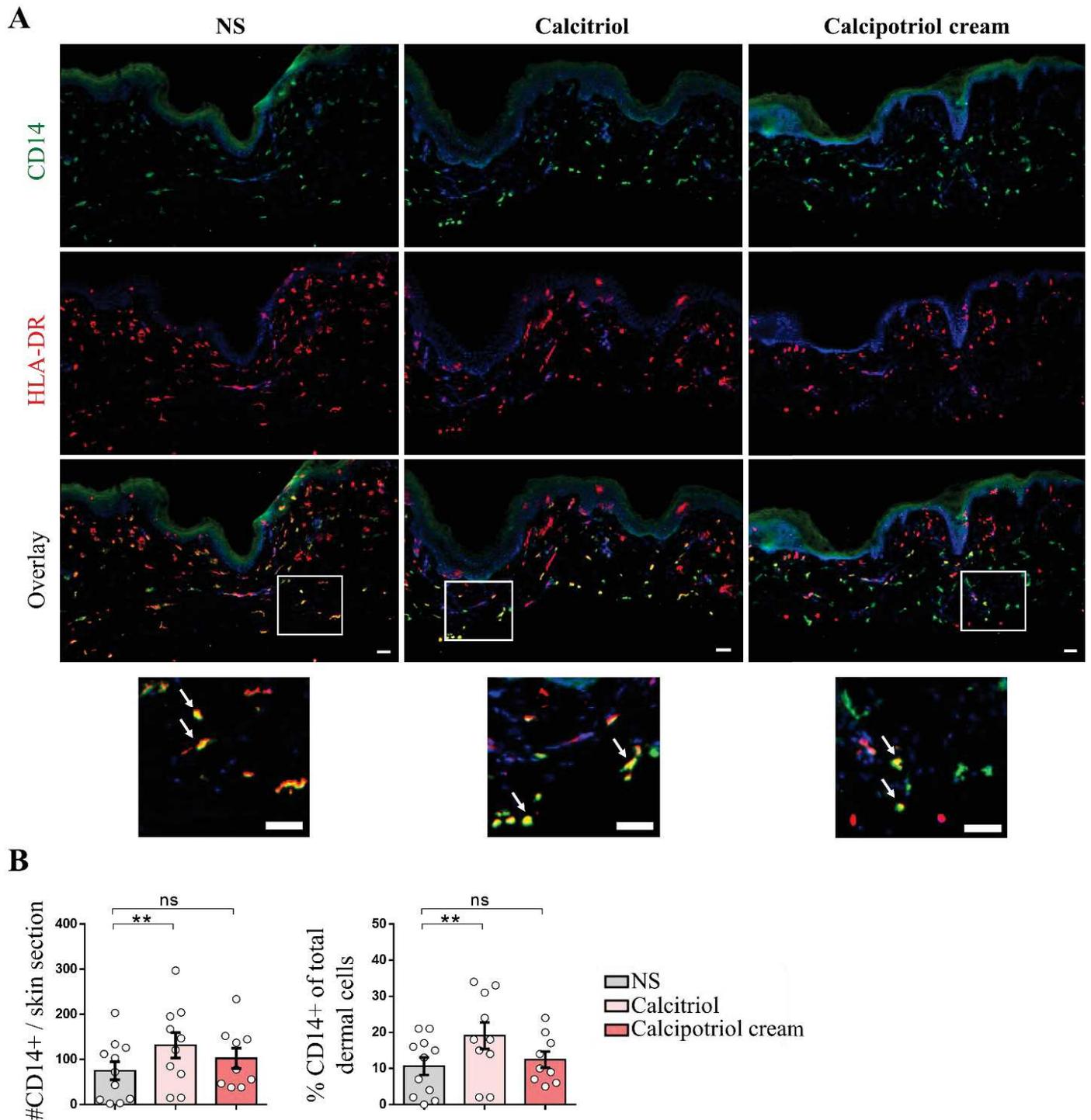


Figure S3: CD14+ cells are not depleted from the dermis after skin explant culture with vitamin D3.

(A) Representative immunofluorescence images of skin explants after 3 days of culture. Cryosections were stained with DAPI (blue), anti-CD14 (green) and anti-HLA-DR (red) monoclonal antibodies. Insets correspond to the regions highlighted in the larger images. Arrows point to HLA-DR+ CD14+ (yellow) cells. HLA-DR+ CD14- (red) and HLA-DR low CD14+ (green) are also visible. Scale bars: 50µm. (B) Numbers of CD14+ cells in skin sections and percentages of CD14+ cells among total dermal cells (n=11). Data are presented as Mean ± SEM. n= total number of skin explant donors. ns: non-significant, **p<0.01 (paired Student's t-tests).

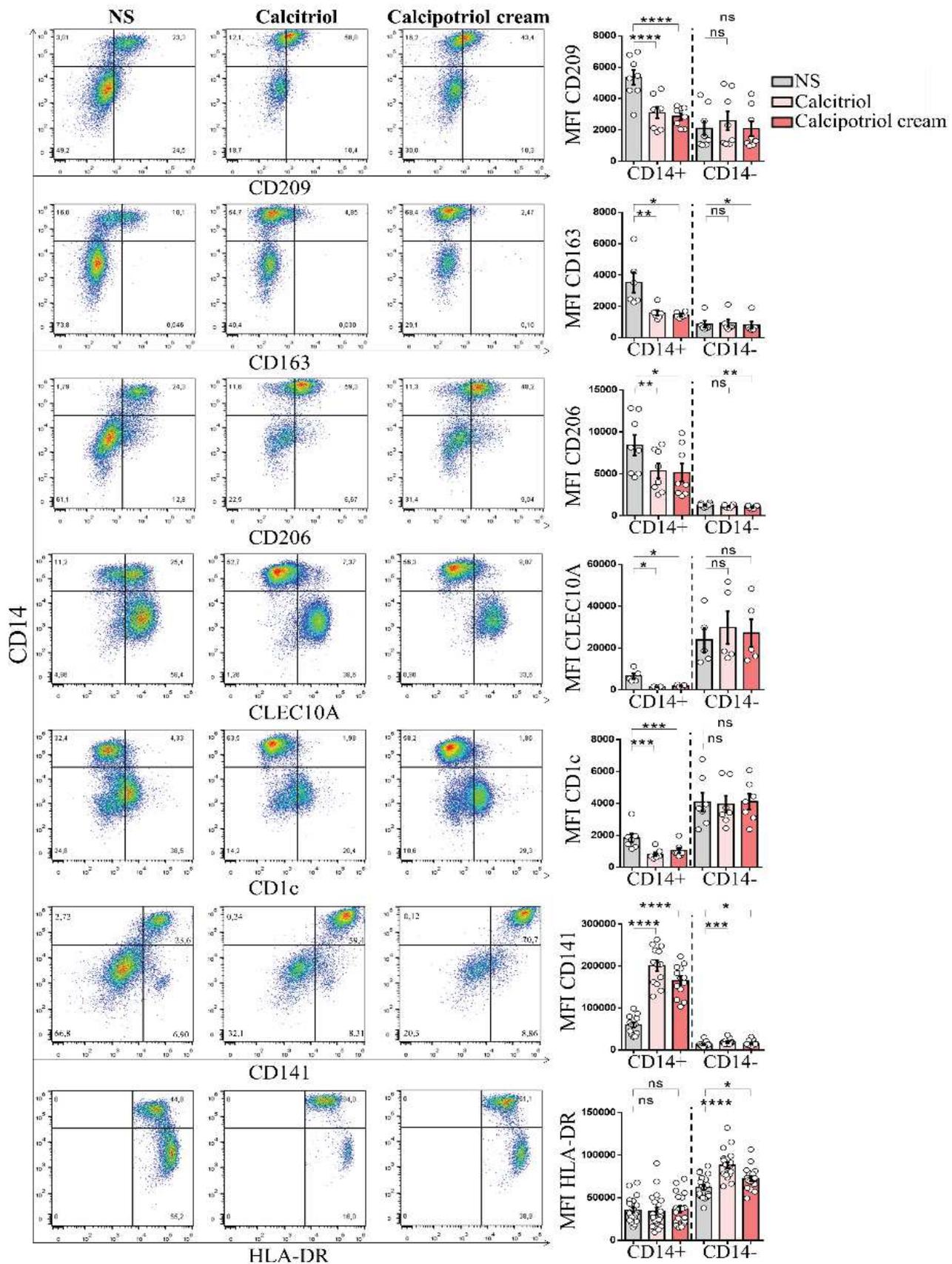


Figure S4: Vitamin D3 alters the phenotype of skin-emigrating HLA-DR+ cells. Representative dot plots and MFI quantification of CD209 (n=8), CD163 (n=6), CD206 (n=8), CLEC10A (n=5), CD1c (n=7), CD141 (n=13), HLA-DR (n=20) expression on emigrating CD14+ and CD14- cells. Data are presented as Mean \pm SEM. n= total number of skin explant donors. ns: non-significant, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001 (paired Student's t-tests).

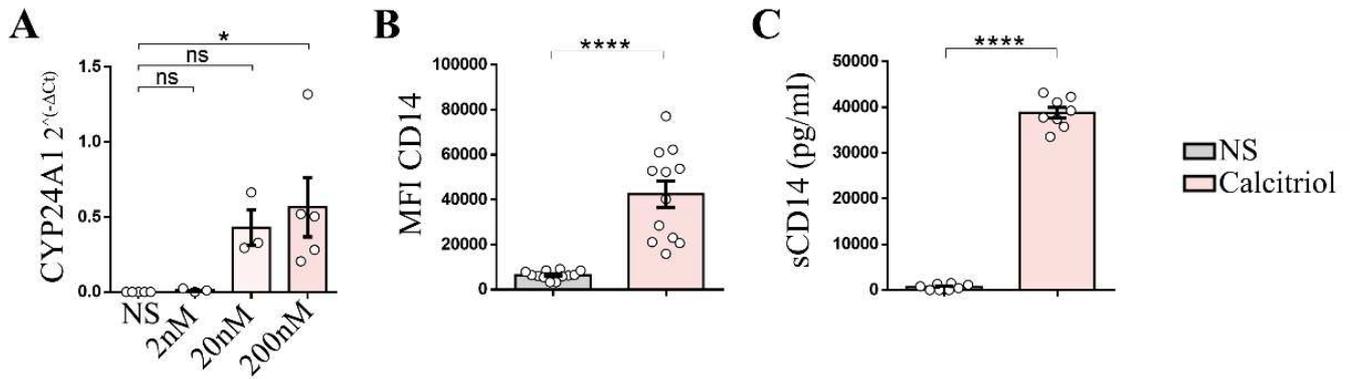


Figure S5: Vitamin D3-treated MonoDCs upregulate CD14 expression. Immature MonoDCs were stimulated for 24h with vitamin D3 or left untreated. **(A)** Relative expression of CYP24A1 after 24h-stimulation with different doses of calcitriol: 2nM, 20nM (n=3) and 200nM (n=5). **(B)** Mean fluorescence intensity of CD14 after 200nM calcitriol treatment (n=12). **(C)** soluble CD14 release (n=5). Data are presented as Mean \pm SEM. n= total number of skin explant donors. ns: not significant, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ (paired Student's t-tests).

RÉSULTATS ET DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE

Dans cette publication, nous avons démontré que la supplémentation en vitamine D₃ conduit à un réel bouleversement de la réponse immunitaire dans la peau. Premièrement, elle induit sur près d'un tiers des donneurs testés une réponse de l'épiderme similaire à celle d'un signal de danger, par libération de l'alarmine TSLP. De plus, elle engage des modifications phénotypiques profondes sur les DCs, caractérisées, entre autres, par l'augmentation du CD14. Ces DCs acquièrent un profil qui ne correspond à aucun autre sous-type de DC connu. D'un point de vue fonctionnel, l'ensemble des DCs récoltées sont capables de favoriser l'orientation de T CD4⁺ naïfs en Th2 (IL-4⁺, IL-13⁺) et d'inhiber celle en Th1 (IFN γ ⁺). Nous avons démontré que la vitamine D₃ facilite la génération de Th2 IL-13⁺ de façon dépendante de la TSLP, qui n'affecte en revanche pas les Th2 IL-4⁺. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. En effet, sur des DCs du sang, la stimulation par la TSLP aide à la différenciation de Th2 IL-13⁺ qui produisent peu d'IL-4 (*Soumelis et al., 2002*). Après purification des CD14⁺ induites par la vitamine D₃ et en l'absence de TSLP, nous avons observé que ces cellules sont responsables spécifiquement de l'orientation en Th2 IL-4⁺. Cependant, leur responsabilité dans la production d'IL-13 n'apparaît pas clairement.

Dans d'autres modèles, l'interaction OX40 / OX40L, entre le T et la DC respectivement, apparaît cruciale pour la polarisation Th2 médiée par la TSLP. En effet, TSLP accroît l'expression d'OX40L sur les DCs du sang et son blocage réduit l'efficacité de l'orientation Th2 (*Ito et al., 2005*). Afin d'approfondir l'implication potentielle de cet axe dans l'orientation Th2 sous influence de la vitamine D₃, nous avons étudié l'expression d'OX40L sur les DCs de la peau. Les explants ont été stimulés 3 jours par la vitamine D₃ (calcitriol 200nM, calcipotriol crème) puis les DCs migrantes ont été récoltées et analysées. Une stimulation TSLP (50ng/ml), susceptible d'augmenter OX40L sur les DCs de la peau a été réalisée en parallèle (**Figure 11**).

On peut observer qu'en l'absence de vitamine D₃, l'expression d'OX40L est retrouvée en majorité sur les DCs CD14⁻ et peu sur les CD14⁺. L'addition de TSLP ne modifie pas significativement cette expression (**Figure 11A,B**). Ce résultat est attendu pour la population CD14⁺, qui ne présente qu'une faible expression du TSLPR, mais plus surprenant pour les DCs CD14⁻, qui expriment fortement le TSLPR (**Publication Partie A, Figure 4C**). Pour ces dernières, OX40L semble augmenter, mais de manière non significative. Après stimulation des explants par la vitamine D₃, les DCs sont majoritairement CD14⁺. Les CD14⁻ restantes, que nous supposons non affectées par la vitamine D₃, ne modifient pas leur expression d'OX40L (**Figure 11B**). À l'inverse, elle est réduite à la surface des DCs CD14⁺ (**Figure 11A**).

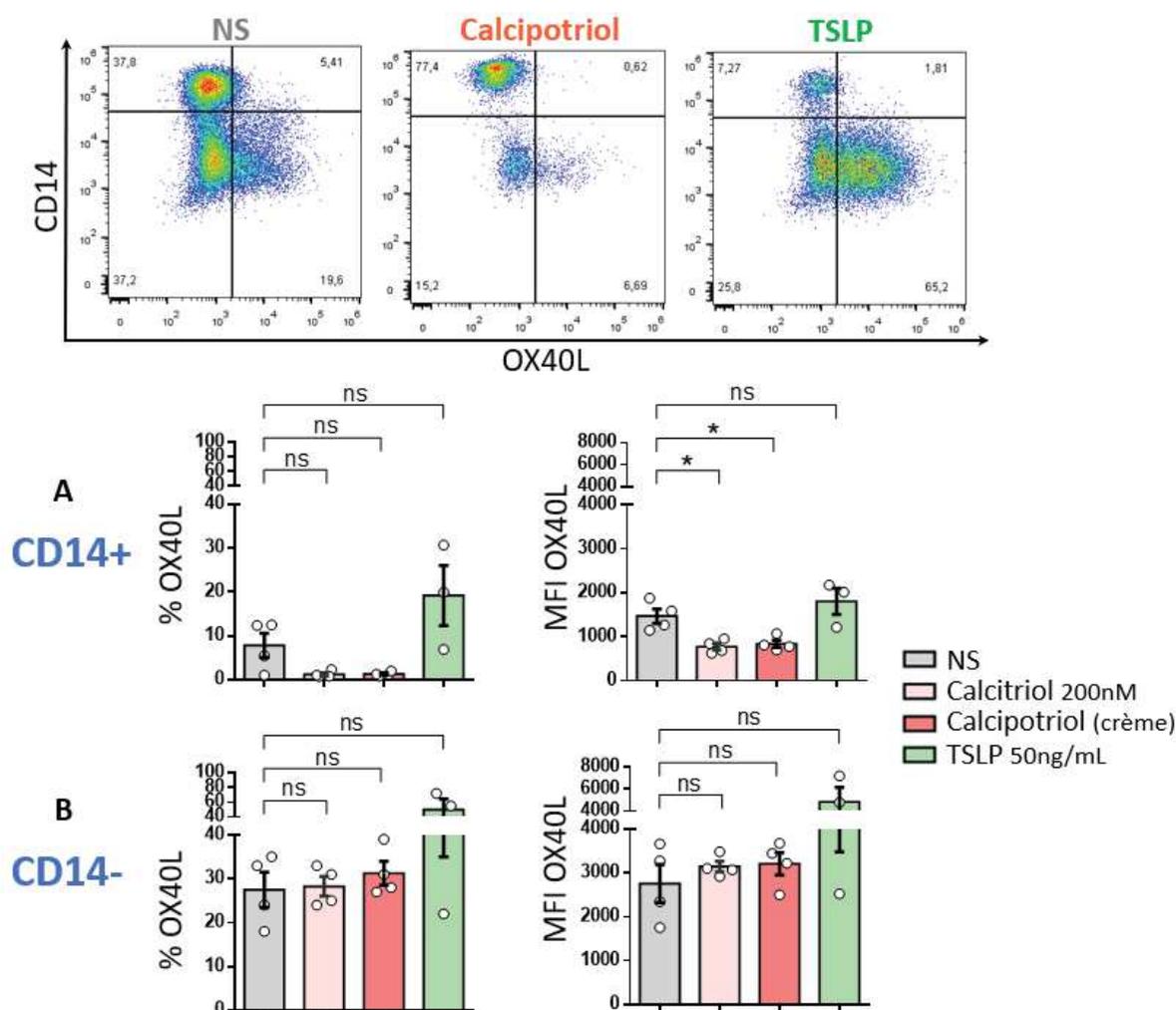


Figure 11 : Expression de OX40L par les DCs de la peau. Cette figure illustre l’analyse par cytométrie en flux de l’expression d’OX40L par les CD14⁺ et CD14⁻ DCs après migration d’un explant de peau stimulé 3 jours avec le calcitriol, le calcipotriol ou la TSLP. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. Les tests statistiques sont réalisés en fonction du contrôle non stimulé (NS). ns (non significatif), * $p < 0,05$ selon le test de t de Student.

Nous ne sommes pas réellement surpris que les CD14⁺, sensibles directement à la vitamine D₃ (expression de CYP24A1, **Publication Partie A, Figure 4A**) semblent pouvoir se passer d’OX40L pour leurs effets fonctionnels. En effet, elles sont capables d’induire une orientation en Th2 IL-4⁺ sans TSLP et donc sans OX40L. À ce stade, comme les DCs CD14⁻ expriment OX40L, nous faisons l’hypothèse que ces cellules, insensibles aux effets directs de la vitamine D₃ (pas de CYP24A1), pourraient être influencées indirectement par la libération de TSLP et soutenir la différenciation de Th2 IL-13⁺. Le mécanisme permettant ce soutien reste cependant à clarifier, et nous ne pouvons exclure définitivement un rôle d’OX40L, en raison du faible nombre de donneurs analysés.

Pour approfondir ce mécanisme et pallier la minorité de donneurs producteurs de TSLP, nous prévoyons de stimuler les explants de peau à la fois par la vitamine D₃ et la TSLP. Nous pouvons également envisager des expériences avec un anticorps bloquant OX40 sur les LT, le GBR830 (Glenmark Pharmaceuticals), qui semble avoir des effets positifs prometteurs sur des patients DA (*Guttman-Yassky et al., 2019*).

Certains points non abordés dans l'article seraient également à étudier dans la suite de ce projet. Nous avons démontré que la stimulation de l'explant avec la vitamine D₃ induit une production significative de la TSLP. La découverte d'une forme longue (lfTSLP) et courte (sfTSLP), aux propriétés vraisemblablement opposées (**Chapitre II, 4.3.3.d**) (*Fornasa et al., 2015*) reflète l'intérêt de les distinguer dans nos futures expériences.

CCR7 est un des principaux récepteurs exprimés par les DCs et responsable de leur migration vers les vaisseaux lymphatiques après maturation (*Ohl et al., 2007*). De plus, son expression est également induite après stimulation TSLP de DCs sanguines (*Soumelis et al., 2002*). Les cellules CD14⁺ du derme présentes à l'état physiologique sont non migrantes et l'expriment peu (*McGovern et al., 2014*). Nous avons démontré que la vitamine D₃ semble induire un phénotype nouveau sur les DCs de peau, avec notamment induction de l'expression du CD14 parmi d'autres modifications phénotypiques profondes. Nous devons donc vérifier si ces DCs induites par la vitamine D₃ expriment le CCR7 et si son expression est influencée par la présence de TSLP. En effet, dans nos expériences de MLR *in vitro*, les DCs sont directement apportées aux T naïfs en culture afin de les polariser. Or, pour exercer une influence sur les T naïfs *in vivo*, les DCs doivent migrer pour les rejoindre au niveau des ganglions lymphatiques. Une analyse plus profonde du transcriptome des DCs CD14⁺ induites par la vitamine D₃ pourrait être envisagée à plus long terme.

Une des limites de notre étude est due au fait que nous manquons d'informations clinique sur les donneurs d'explants. La collecte des échantillons en tant que déchets opératoires ne nous permet pas de demander ces données. Il serait tout de même possible de caractériser les explants en tenant compte de paramètres comme la couleur de peau ou la période de l'année, reflétant l'exposition au soleil, et de corrélérer ces résultats à nos expériences. Ces informations pourraient mettre en évidence de potentielles différences entre les patients non répondeurs et répondeurs. Nous pouvons en outre envisager d'analyser plus en détails l'expression du VDR chez nos donneurs, en supposant des modifications de conformation qui feront écho à la publication récente de l'équipe de Carlberg C. et son concept d'index de réponse à la vitamine D₃ (*Carlberg et al., 2018*).

En conclusion, avec cette publication, nous avons apporté un éclaircissement des fonctions de la vitamine D₃ sur l'immunité cutanée humaine. Son application topique est capable d'induire la production de TSLP chez des patients répondeurs, et donc d'entraîner les DCs de peau à orienter des T naïfs en Th2 de façon directe et indirecte. Nous allons dans la suite de ce manuscrit, décrire la construction de notre modèle de peau 3D et tenter de reproduire ces données afin de mimer les phases initiales de la dermatite atopique. De plus, la vitamine D₃ sera mise en parallèle avec d'autres inducteurs de TSLP décrits dans la littérature, testés eux aussi à la fois sur le modèle, les explants et des MonoDCs en culture 2D.

PARTIE B

Modélisation des
phases initiales
de dermatite atopique

PARTIE B : Modélisation des phases initiales de dermatite atopique

Nous allons nous focaliser dans cette partie sur la construction générale du modèle de peau reconstruite. Puis nous allons tenter de l'appliquer à la modélisation de la DA, en particulier sur son initiation par induction de TSLP. En effet, nous avons vu que cette cytokine est au cœur de la physiopathologie de la maladie, notamment via l'orientation Th2. Différents inducteurs, dont la vitamine D₃, peuvent provoquer sa production par les kératinocytes. Il existe aujourd'hui un réel besoin de développer un modèle humain de DA *in vitro*, permettant de reproduire au plus près les interactions intercellulaires, notamment neuro-immunes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les références des réactifs déjà présentés dans la section « Matériel et méthodes » de la publication en **Partie A** ne seront pas détaillés dans les paragraphes suivants.

1. Isolation des cellules primaires

Les cellules cutanées (kératinocytes, fibroblastes, endothéliales) sont extraites à partir de déchets opératoires issus d'abdominoplastie dans le cadre d'une chirurgie esthétique. Les donateurs, adultes, signent avant l'opération un consentement écrit en accord avec les règles éthiques en vigueur. Aucune information (sexe, âge, état de santé) ne nous est communiquée. La récupération du prélèvement est effectuée immédiatement à la fin de l'acte chirurgical et celui-ci est transporté par nos soins dans la glace pour une prise en charge rapide, inférieure à 2 heures après l'opération, au sein de notre laboratoire.

1.1 Kératinocytes

Dès son arrivée, la surface de la peau est lavée à plusieurs reprises avec du tampon phosphate salin (*Phosphate-buffered saline*, PBS ; Lonza) et une solution antiseptique de Dakin®. À l'aide d'un dermatome de Goulian, la peau est pelée afin de récupérer des bandes de 1mm d'épaisseur, correspondantes à l'intégralité de l'épiderme et une partie du derme superficiel. Ces morceaux sont ensuite placés en boîte de pétri, découpés en fines lamelles, baignés dans une solution de trypsine 0,5% (VWR) et incubés 2 heures à 37°C, 5% CO₂. La trypsine est une protéase à sérine qui clive les composants de la jonction dermo-épidermique. Elle permet donc, après digestion enzymatique, de séparer l'épiderme du derme. L'épiderme est mis sous agitation dans l'incubateur avec une solution 35mL *Roswell park memorial institute medium* (RPMI), 10mL sérum de veau fœtal (SVF ; Corning), 5mL DNase I (Roche) pendant 30 minutes. Ce temps est suffisant pour observer sa dissociation complète. La suspension cellulaire est passée à travers un filtre aux pores de 70µm puis lavée 3 fois en *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) F12 (Lonza). Par lavage, on entend une centrifugation à 200g de 5 minutes puis une resuspension dans du milieu neuf.

30 millions de cellules sontensemencées dans une flasque de culture de 75cm² (T75) dans du milieu CnT-PR (CellnTec) supplémenté avec 100U/mL de pénicilline/streptomycine (pen/strep) et 10µg/mL de gentamicine. Celui-ci est changé quotidiennement les 3 premiers jours pour éliminer les kératinocytes non proliférants, déjà différenciés. Par la suite, un

changement tous les 2 jours est suffisant. Les kératinocytes primaires ont la particularité de pousser en îlots, qui finissent progressivement par croître et fusionner. Pour éviter la confluence complète et donc la différenciation, la culture doit être surveillée régulièrement et stoppée à 70% de confluence. À ce stade, les kératinocytes au passage 1 (P1) sont réensemencés à 500 000 cellules par T75 et amplifiés. Si nécessaire, une congélation est réalisée en SVF supplémenté avec 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO ; Sigma). Les cellules sont alors conservées 48 heures à -80°C dans une boîte de congélation puis plongées en azote liquide (-196°C). Les kératinocytes sont cultivables jusqu'à P3, passage maximal pour obtenir des kératinocytes aptes à former un épiderme.

1.2 Fibroblastes

Un morceau de 8x8cm de derme profond, soit la partie non pelée au dermatome, est coupé en petits morceaux de quelques millimètres au scalpel puis placé sous agitation dans un bécher contenant une solution de 30mL RPMI, 1mL de DNase I et 330µL de collagénase I (Gibco) une nuit dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, la moitié de ce derme digéré (l'autre est à réserver pour l'extraction des cellules endothéliales) est passée à travers un filtre 70µm. Elle est lavée 3 fois en DMEM (Lonza). La suspension cellulaire obtenue est ensemencée à 50 millions par T75 dans du milieu DMEM complet, c'est-à-dire supplémenté avec 10% SVF, 100U/ml de pen/strep et 10µg/mL de gentamicine. Après 7 jours de culture et confluence à 100%, les passages suivants s'effectueront à 800 000 cellules par T75. Les fibroblastes se gardent jusqu'à maximum P6 et peuvent être congelés dès P1.

1.3 Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales s'obtiennent elles aussi à partir du derme profond. La fraction digérée non utilisée pour l'isolation des fibroblastes est lavée et reprise en PBS avec 2% SVF et 5mM d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (*Ethylene-diamine-tetra-acetic acid*, EDTA ; Sigma) ou solution sérum EDTA (SE) à 10 millions de cellules dans 60µL. Elles sont incubées 15 minutes avec un anticorps anti-CD31 (Miltenyi) couplé à des billes magnétiques. Après ce délai, la suspension est lavée avec du SE en excès. Elle est reprise à 500µL et déposée en colonne LS (Miltenyi) préalablement rincée et fixée sur un aimant. Les cellules d'intérêt CD31+ couplées aux billes, sont retenues par la colonne. Après passage de la suspension, puis 3 lavages avec 3mL de SE, la fraction non marquée s'écoule. La colonne est détachée de l'aimant et flushée avec 5mL de SE dans un tube, on récupère ainsi nos cellules endothéliales.

Les cellules fraîchement isolées sont comptées et ensemencées à 3 millions en T75. La culture des cellules endothéliales nécessite un enrobage en gélatine 0,5% (ThermoFisher) préparée dans de l'eau puis autoclavée. Avant enrobage, il faut chauffer la solution de gélatine 0,5% en amont, puis en verser dans la flasque en excès (5mL par T25, 15mL par T75) et la laisser prendre une nuit à 4°C. Après avoir retiré le surplus de gélatine, la flasque est prête à l'usage. Les cellules endothéliales se cultivent dans du milieu *Endothelial cell growth medium* 2 (EGM 2 ; Promocell) supplémenté avec 100U/mL de pen/strep et 10µg/mL de gentamicine. Elles sont entretenables, comme les fibroblastes, jusqu'à P6. Elles atteignent la confluence en 1 semaine après ensemencement à 500 000 cellules / T75. La **Figure 12** suivante regroupe des photographies prises au microscope optique de cellules primaires en culture.

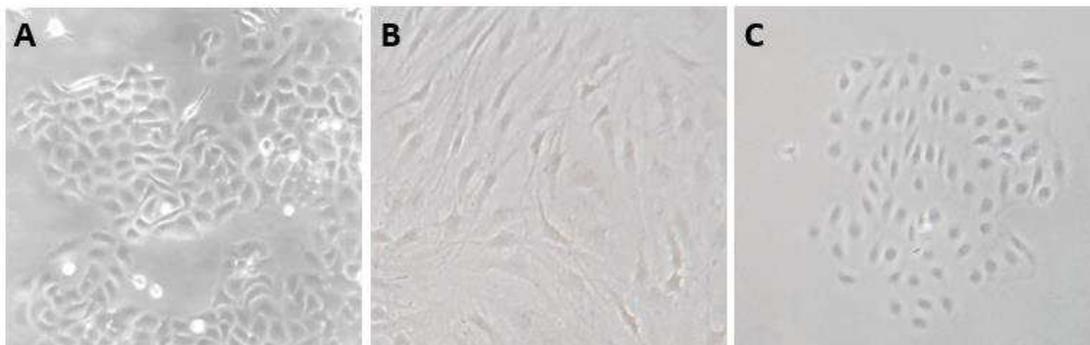


Figure 12 : Morphologie des cellules primaires en culture 2D. (A) Kératinocytes, (B) fibroblastes, et (C) cellules endothéliales visualisés au microscope optique (x20) après 1 semaine de culture.

L'efficacité de la purification magnétique est vérifiée par cytométrie en flux. Celle-ci est considérée comme suffisante à partir de 70% de cellules endothéliales CD31+. Les 30% restants représentent majoritairement une contamination fibroblastique (**Figure 13**). La difficulté majeure dans la culture des cellules endothéliales réside dans l'équilibre entre l'espace occupé dans la flasque par ces fibroblastes, qui peuvent soit rester minoritaires, soit prendre le dessus car ils survivent très bien en EGM 2. La culture de ce type cellulaire a donc nécessité une surveillance régulière et une longue optimisation des différentes étapes (digestion du derme, purification, enrobage de la flasque en gélatine).

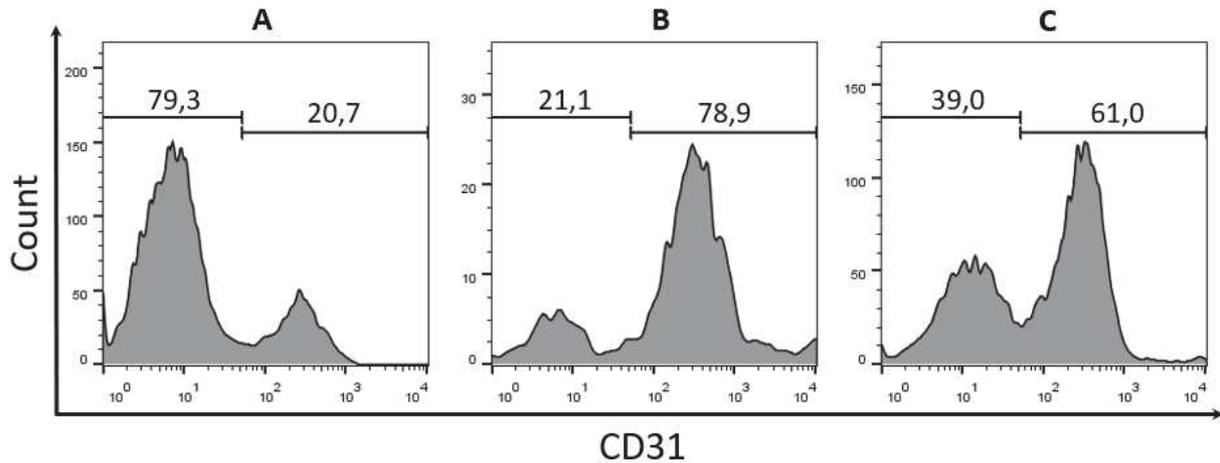


Figure 13 : Analyse de la purification des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales obtenues après digestion du derme sont purifiées sur colonne puis passées en cytométrie en flux. Les cellules vivantes sont analysées selon l'expression du marqueur CD31 : (A) avant tri, (B) après tri, (C) après 1 semaine de culture.

1.4 Monocytes et différenciation

Les monocytes sont extraits à partir de dons de sang obtenus auprès de l'établissement français du sang (EFS). Ces prélèvements y sont ultracentrifugés afin de séparer le plasma et les érythrocytes de la fraction contenant les plaquettes et leucocytes. Cette dernière est celle que nous récupérons pour en isoler les monocytes sanguins. Le protocole d'extraction repose sur une première séparation en fonction de la densité par gradient Ficoll (Sigma). 30mL de sang dilué au demi dans du PBS est ajouté progressivement sur 15mL de Ficoll. Après centrifugation (20 minutes, 1200g, sans accélération ni décélération) la phase contenant les monocytes est identifiable par un anneau blanchâtre, l'anneau des PBMCs, contenu entre la phase supérieure (plasma) et les phases inférieures (Ficoll et culot de globules rouges). Les PBMCs sont récupérées et lavées 3 fois en PBS. Les cellules sont comptées et reprises à 100 millions pour 3mL de SE. Elles sont ensuite coulées sur 6mL de Percoll (Sigma) 52% dilué en PBS et centrifugées 20 minutes à 1200g. À nouveau 4 phases sont visibles : le SE, l'anneau de monocytes, le Percoll et le culot de PBMCs. Après récupération, les monocytes sont lavés 3 fois puis congelés et/ou mis en différenciation.

La différenciation des monocytes en DCs dérivées de monocytes (MonoDCs) s'effectue en 5 jours. Les cellules sont suspendues dans 4mL de RPMI complet (10% SVF, 100U/ml pen/strep, 10µg/ml gentamycine, 5ml d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique, HEPES) supplémenté avec 200ng/mL de facteur stimulant les colonies de

granulocytes et de macrophages (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) et 10ng/mL d'IL-4. 3 millions de cellules sontensemencées par puits d'une plaque 6 puits. Au jour 3, 1mL de RPMI frais, avec du GM-CSF et de l'IL-4 en concentrations équivalentes, est ajouté dans chaque puits. Au jour 5, les MonoDCs différenciées sont non adhérentes, avec un ratio de 1 million par puits. Contrairement aux types cellulaires précédents, elles ne sont pas congelables et doivent être utilisées le jour même. À ce stade, elles sont majoritairement immatures. Le pourcentage de cellules exprimant le marqueur d'activation CD86, estimé par cytométrie en flux, doit être inférieur à 10%. Il correspond à des cellules spontanément matures. De plus, à l'inverse des monocytes, les MonoDCs expriment faiblement le CD14 et plus fortement le CD1a et le CD209 (**Figure 14A**).

À partir de monocytes, il est également possible d'obtenir des cellules de Langerhans dérivées de monocytes (MonoLCs) et des macrophages dérivés de monocytes (MonoMacros). Les MonoLCs s'obtiennent selon un protocole très similaire aux MonoDCs, non pas en 5 jours, mais en 1 semaine. En plus du GM-CSF et de l'IL-4, du TGF- β 1 (Peprotech) est rajouté à 10ng/mL au jour 3 et 5. Au jour 7, les MonoLCs se reconnaissent par expression du CD1a et du CD207. Avec ce protocole entre 15 et 35% maximum de cellules CD207+ sont attendues (**Figure 14B**) (*Protocole adapté de Bechetoille et al., 2006*).

Les MonoMacros s'obtiennent eux après culture des monocytes en RPMI complet avec 10ng/mL de facteur stimulant les colonies de macrophages (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF ; R&D), 20ng/mL d'IL-10 (Peprotech) et 20ng/mL de GM-CSF. Au jour 3, le milieu est rafraîchi avec 1mL de RPMI complet avec additifs, sauf M-CSF qui est à retirer. Ces cellules expriment les marqueurs CD14, CD163 et CD209 tout comme les macrophages primaires extraits de derme humain (**Figure 14C**) (*Protocole adapté de Kwan et al., 2008*).

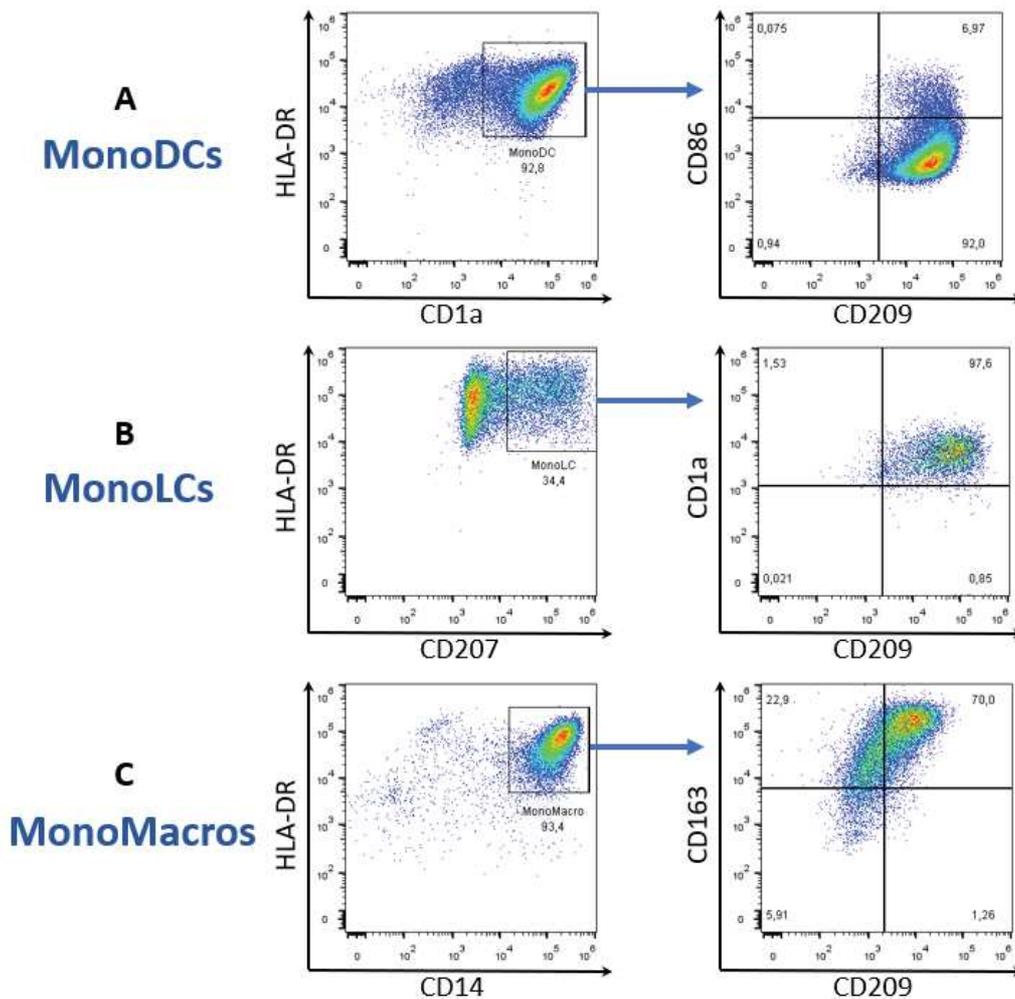


Figure 14 : Caractérisation des cellules dérivées de monocytes *in vitro*. La culture *in vitro* de monocytes sanguins selon différents processus de différenciation permet d'obtenir des (A) MonoDCs (HLA-DR+, CD1a+, CD209+), (B) MonoLCs (HLA-DR+, CD207+, CD1a+, CD209+) ou (C) MonoMacros (HLA-DR+, CD14+, CD163+) représentés ici par analyse de cytométrie.

1.5 Neurones murins

Les neurones sensoriels murins sont obtenus à partir des DRGs d'embryons de souris BALB/c gestantes. Après accouplement, les souris avec bouchon vaginal sont surveillées quotidiennement et pesées pour confirmer la grossesse. Au 12^{ème} jour (stade E12), les mères sont sacrifiées par élongation cervicale. Après ouverture en boutonnière, le chapelet d'embryons isolé est placé au frais en PBS. À l'aide d'une loupe binoculaire, chaque embryon est sorti rapidement de sa poche placentaire. La tête est sectionnée et la moelle épinière extraite du dos, en veillant à retirer la peau. Après éclaircissement de la moelle des débris, les ganglions vont devenir visibles. Avec une pince et un scalpel, ces derniers sont détachés progressivement.

Après collecte, ils sont lavés puis placés dans une solution avec 1mL de RPMI complet, 2mL d'*Hank's balanced salt solution* (HBSS ; Lonza) et 2mg/mL de papaine (Sigma).

La digestion s'effectue au bain-marie à 37°C sous agitation manuelle pendant 20 minutes. Immédiatement après, 0,5mL de DNase I est ajouté au mélange. Par aller-retour à l'aide d'une pipette, une trituration mécanique est réalisée pendant 5 minutes. La suspension obtenue est comptée, avec une moyenne à 1 million de neurones par souris, puis mise en culture. Si celle-ci se fait en 2D, le plastique doit être recouvert d'un enrobage en poly-D-lysine (Sigma) à 1µg/mL et le milieu DMEM supplémenté avec le facteur de croissance du nerf bêta (*β-nerve growth factor*, NGF ; Peprotech) à 10ng/mL. Tout comme les MonoDCs, ces cellules ne sont pas congelables ni amplifiables. Les neurones se caractérisent en imagerie par l'expression de la β 3-tubuline (**Figure 15**).

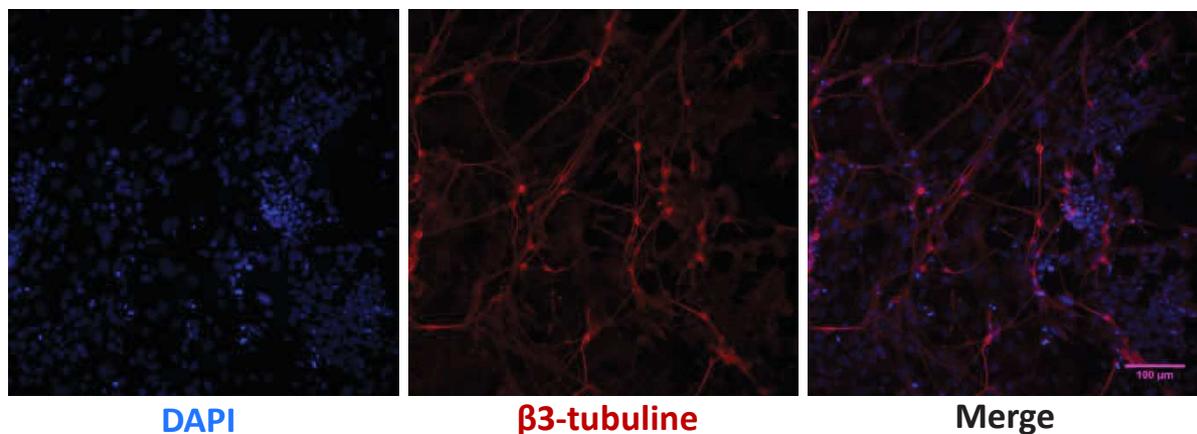


Figure 15 : Immunofluorescence des neurones murins isolés de DRGs. Ces images représentent des neurones murins isolés de DRGs d'embryons de souris BALB/c au stade E12 mis en culture en plaque enrobée en poly-D-lysine. Bleu : DAPI (noyaux) ; Rouge : β 3-tubuline (neurones).

1.6 Lymphocytes T CD4+ naïfs

Les LT CD4+ naïfs sont obtenus à partir de poches de sang récupérées à l'EFS. Après Ficoll, les T sont compris dans l'anneau de PBMCs. Ces cellules sont comptées, lavées, puis purifiées à l'aide d'un kit T CD4+ naïfs (Miltenyi) selon un protocole similaire au kit CD31+ utilisé pour l'isolation des cellules endothéliales.

2. Construction du modèle de peau

Le modèle de peau reconstruite est basé sur une matrice, communément appelée éponge, de collagène bovin de type I et III non glyqué à 9µg/mL (Symatase) et de chitosan de type II faiblement acétylé à 2,5µg/mL (CD Bioparticles). Ces matrices nous ont été fournies par nos collaborateurs du Laboratoire d'organogénèse expérimentale (LOEX) dirigé par le Dr François Berthod à Québec, au Canada. Le protocole de construction du modèle a été mis au point par

ce groupe et transmis par Quentin Muller, doctorant en cotutelle dans notre équipe, qui en a fait l'objet de sa thèse (Muller Q., Thèse de Doctorat Universités de Strasbourg, France, et Laval, Québec ; 2018). Ce modèle a pour finalité de contenir un derme peuplé de fibroblastes, des pseudo-vaisseaux de cellules endothéliales, une innervation sensorielle apportée par les neurones murins, une immunocompétence assurée par des DCs dérivées de monocytes et un épiderme stratifié de kératinocytes. Chaque type cellulaire provient d'un donneur différent dans une même série et ils sont régulièrement renouvelés entre les séries. Les images de la **Figure 16** représentent un modèle complet obtenu au LOEX. Avec l'aide de Quentin Muller, mon premier objectif a été de parvenir à réaliser le transfert technologique de ce modèle dans nos locaux à Strasbourg. Le protocole général de fabrication sera décrit dans les paragraphes suivants et représenté schématiquement en **Figure 17** (page 125).

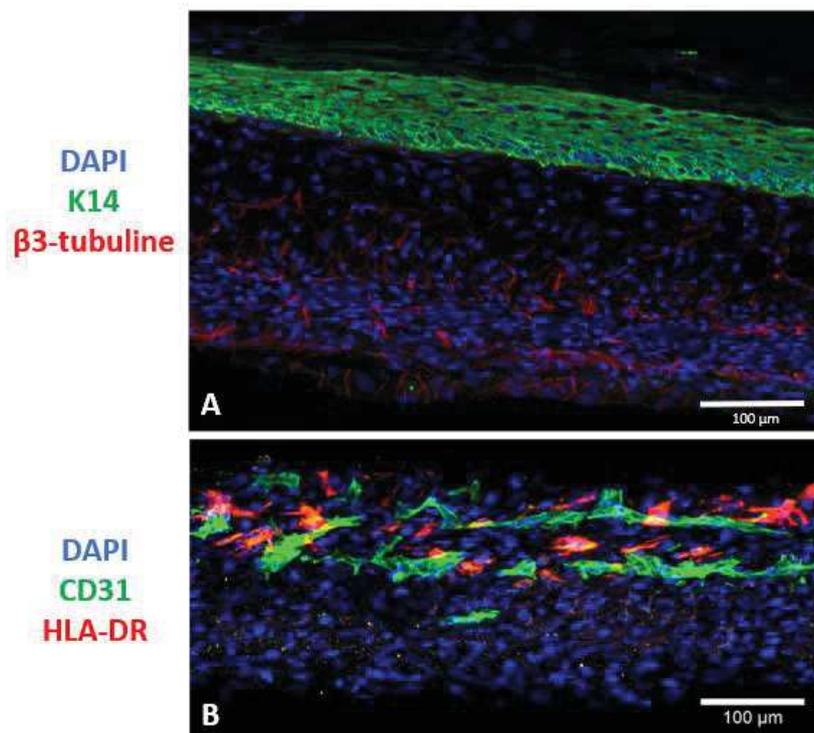


Figure 16 : Immunofluorescence d'un modèle complet obtenu au LOEX. Ces images représentent deux coupes transversales du modèle de peau reconstruite extraites, avec son accord, de la thèse de Quentin Muller. Elles ont été réalisées à Québec, dans le laboratoire d'organogénèse expérimentale (LOEX) dirigé par le Dr François Berthod. **(A)** Les kératinocytes sont marqués en vert avec le K14, les neurones murins en rouge avec la β 3-tubuline et les noyaux cellulaires en bleu avec le DAPI. **(B)** CD31 (en vert) marque les cellules endothéliales, HLA-DR (en rouge) les MonoDCs.

2.1 Stérilisation des éponges (Jour -3)

Les éponges, ou matrices de collagène/chitosan, sont lyophilisées en plaques 12 puits. Elles sont fabriquées dans des conditions non stériles. C'est pourquoi la première étape du protocole nécessite de les tremper une nuit en éthanol 70% dans de l'eau, mis en excès dans la plaque à 4°C. Le lendemain, les éponges sont rincées en DMEM enrichi en antibiotiques (300U/mL de pen/strep et 30µg/mL de gentamicine) et laissées une nuit à 37°C dans l'incubateur. Le troisième jour, celles-ci sont lavées en DMEM puis maintenues à 37°C jusqu'à ensemencement des cellules.

2.2 Colonisation du derme (Jour 0 à 14)

Au jour 0, 800 000 fibroblastes et 800 000 cellules endothéliales sont ensemencés par matrice préalablement « stérilisée » selon le protocole décrit ci-dessus. La solution de cellules est reprise dans 100µL de DMEM et EGM 2 complets (50/50) puis ajoutée en gouttes, au centre de l'éponge. Ces dernières sont de suite placées 2 heures dans l'incubateur (37°C, 5% CO₂) afin de permettre la pénétration des cellules. Après ce délai, il faut rajouter 3mL de milieu DMEM / EGM 2 complet avec 50µg/mL d'acide ascorbique (Sigma). Pour toutes les étapes suivantes du protocole, le milieu sera changé tous les 2 jours.

La colonisation du derme par ces cellules nécessite 7 à 14 jours de culture. Visuellement, la prolifération des cellules s'observe par une modification progressive de la couleur du milieu, qui grâce au rouge de phénol, devient jaune à pH acide. Les éponges devront alors être passées en plaque 6 puits dès que ce changement de pH apparaît avant 2 jours. Après 14 jours, le derme est colonisé à la fois par les fibroblastes, qui sécrètent leur propre matrice, et par les cellules endothéliales, qui forment des pseudo-vaisseaux. Le milieu EGM 2 peut désormais être arrêté, le DMEM étant suffisant pour la survie des cellules endothéliales déjà en place.

2.3 Innervation (Jour 14 à 21)

Au jour 14, il est nécessaire d'avoir préalablement synchronisé un accouplement de souris BALB/c pour obtenir des DRGs d'embryons E12 à cette date. L'éponge doit être retournée et déposée à l'interface air-liquide sur un support adapté en plastique biocompatible, support qui permettra le passage du milieu. Ce retournement permet d'orienter la croissance des axones vers le milieu de culture, c'est à dire vers la surface ensemencée en fibroblastes et cellules endothéliales, qui est maintenant en bas. Les neurones sensoriels extraits et digérés des

DRGs sont mis en culture à 800 000 cellules par éponge. 4mL de milieu sont directement ajoutés. Le DMEM complet, avec acide ascorbique, doit désormais à partir de ce point être supplémenté en NGF à 10ng/mL.

2.4 Immunocompétence (Jour 21 à 28)

Au jour 21, les modèles sont à nouveau retournés : les axones des neurones sont maintenant dirigés vers le haut, les corps cellulaires en bas. Le support est à retirer pour que la matrice soit immergée. 200 000 MonoDCs, MonoLCs ou MonoMacros, obtenues après différenciation de monocytes, sontensemencées par éponge dans 100µL de milieu complet. Après 2 heures d'incubation à 37°C, 4mL sont ajoutés.

2.5 Formation de l'épiderme (Jour 28 à 56)

Au jour 28, 800 000 kératinocytes préamplifiés à P2 ou P3 maximum sontensemencés selon le protocole habituel sur les éponges (dépôt en gouttes, incubation de 2 heures puis ajout du milieu). Le milieu de culture à cette étape change pour du DMEM F12 complet, toujours avec de l'acide ascorbique et du NGF, mais supplémenté avec 10ng/ml de facteur de croissance épidermique recombinant humain (*Epidermal growth factor*, EGF ; Austral Biologicals, AMSbio), 0,4mg/mL d'isoprotérénol (Sigma), 5mg/mL d'insuline bovine (Sigma) et 0,4mg/mL d'hydrocortisone (Calbiochem, Milipore). Cette étape permet la prolifération des kératinocytes sur la matrice, grâce à l'EGF notamment.

Au jour 35, après égouttement vertical rapide sur une compresse stérile, l'éponge est, pour la seconde fois, placée à l'interface air-liquide sur un support. La surface doit rester sèche afin de faciliter la formation de l'épiderme par contact direct avec l'air. Le volume à déposer doit être précis : 3,5mL de DMEM F12 complet avec les additifs précédents, mais sans EGF pour favoriser la différenciation des kératinocytes et non leur prolifération. La formation de l'épiderme peut être contrôlée visuellement par une opacification et prise en épaisseur de l'éponge. La stratification prend 3 semaines pour être complète, ce qui amène le protocole au jour 56. À partir de ce stade, l'éponge peut être caractérisée ou stimulée pour l'expérience requise. Elle peut se garder au maximum 1 à 2 semaines dans cet état.

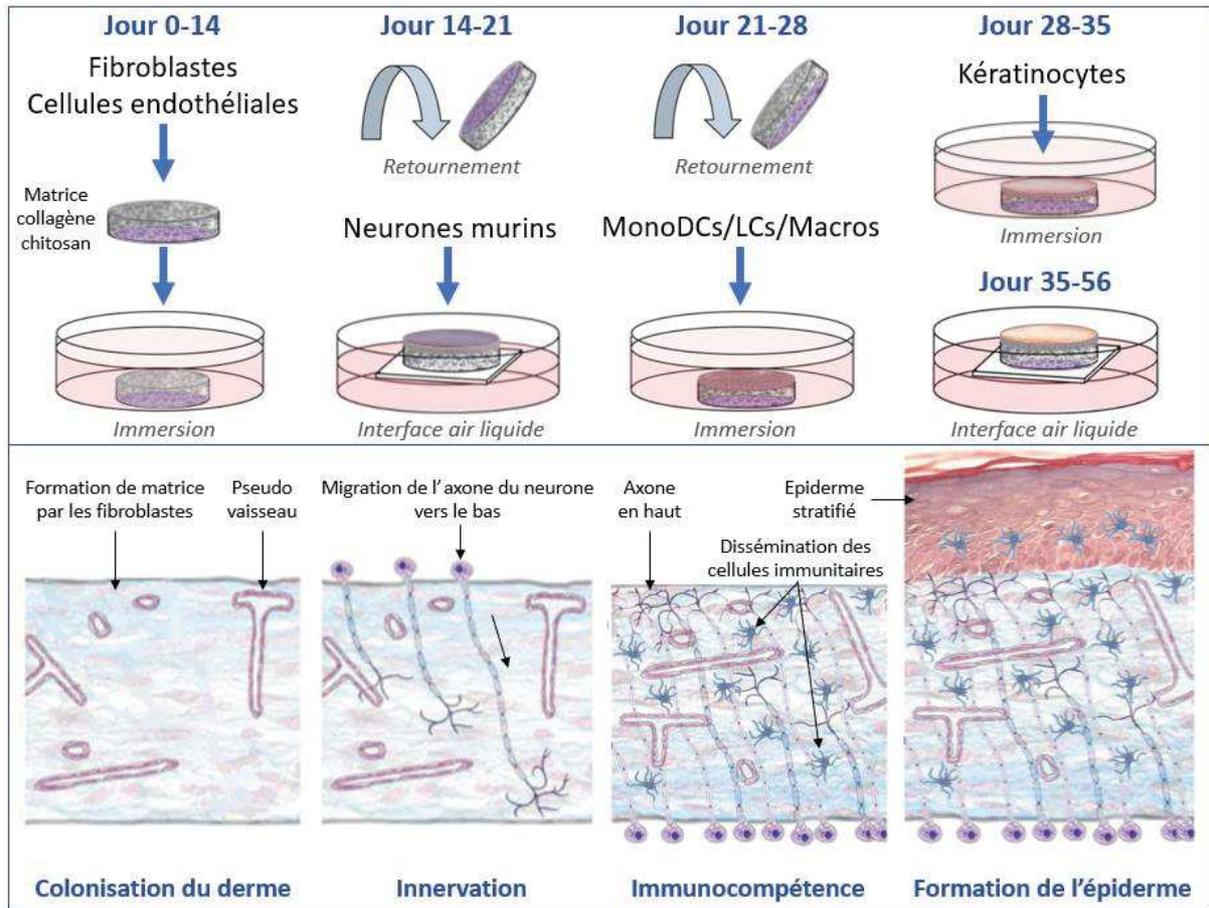


Figure 17 : Schématisation de la construction du modèle de peau complet. Le modèle de peau reconstruite utilisé dans cette étude s'obtient en 4 grandes étapes : la colonisation de la matrice collagène/chitosan par les fibroblastes et les cellules endothéliales, qui forment respectivement de la matrice extracellulaire et des pseudo-vasseaux (jour 0 à 14) ; l'innervation du derme par les neurones murins, après retournement et mise à l'interface air-liquide (jour 14 à 21) ; l'ajout des cellules immunitaires dérivées de monocytes (MonoDCs ou MonoLCs ou MonoMacros) qui vont se répartir dans toute l'épaisseur de l'éponge, après nouveau retournement et immersion (jour 21 à 28) ; la prolifération des kératinocytes (jour 28 à 35) puis leur différenciation à l'interface air-liquide (jour 35 à 56). Le modèle dit « complet » comprend l'ensemble de ces types cellulaires.

3. Obtention des explants de peau

Les explants de peau utilisés dans nos expériences proviennent eux aussi des déchets opératoires d'abdominoplastie obtenus en clinique de chirurgie esthétique. Après pelage (1mm d'épaisseur), des morceaux d'une surface de 4cm² sont découpés au scalpel. Ils sont mis en culture en plaque 6 puits sur un filtre de 40µm avec 6mL de RPMI complet. Le contexte pro-inflammatoire induit par la section chirurgicale permet la migration progressive vers le milieu des principales cellules immunitaires de la peau (cellules dendritiques, lymphocytes T), c'est la technique du *crawl-out*. Après 3 jours de culture, le surnageant, qui contient les cytokines produites par l'explant et les cellules migrantes, est récolté.

4. Stimulation des modèles

4.1 Réactifs

Dans cette étude, nous avons tenté de reproduire certaines caractéristiques initiales de DA avec 3 modèles : les explants de peau, les MonoDCs en 2D et la peau reconstruite. Les réactifs utilisés ont été choisis d'après la littérature selon leur capacité à induire de la TSLP dans les kératinocytes et/ou à orienter en Th2, par l'intermédiaire des DCs, chez la souris ou l'homme (**Tableau II**).

Dénomination	Classification	Concentration utilisée	Effets	Références
IL1β (Peptotech)	Cytokine de l'inflammasome	60ng/mL	TSLP (2D, 3D et explant)	<i>Bernard et al., 2017</i>
Heat killed <i>S. aureus</i> (InvivoGen)	Agoniste TLR2	Ratio de 50 bactéries par cellule stimulée (50:1)	TSLP (2D)	<i>Vu et al., 2010</i>
SLIGKV (Plateforme interne)	Agoniste PAR2	500 μ M	TSLP (2D)	<i>Wilson et al., 2013</i>
Calcitriol (R&D) Calcipotriol (Leo Pharma)	Analogues vitamine D ₃	200 nM ou 6nmol (crème)	TSLP + Th2 (souris)	<i>Li et al., 2006</i>
IL-4 (Peptotech)	Cytokine Th2	50ng/mL	TSLP + Th2 (2D, 3D, explant)	<i>Bogiatzi et al., 2007</i>
TSLP (R&D)	Alarmine	50ng/mL	Th2 (contrôle +)	<i>Soumelis et al., 2002</i>
LPS (InvivoGen)	Agoniste TLR4	0,1 μ g/mL	Th1 (contrôle -)	<i>Magram et al., 1996</i>
Capsaïcine (Sigma)	Agoniste TRPV1	100 μ M	Activation neurone sensoriel	<i>Darré et al., 2015</i>

Tableau II : Réactifs utilisés pour la stimulation des modèles

Les modèles de cette étude sont stimulés dans le but de reproduire certaines caractéristiques initiales de la DA : synthèse de TSLP, orientation Th2, activation des neurones sensoriels. D'après l'étude de la littérature IL-4, IL-1 β , *S. aureus* inactivé par la chaleur (Heat Killed *S. aureus*, HKSA), SLIGKV et les analogues de la vitamine D₃ (calcitriol, calcipotriol) sont susceptibles d'induire à la fois une production de TSLP et/ou une orientation Th2. La TSLP et le LPS sont utilisés comme contrôle Th2 et Th1 respectivement, la capsaïcine est un contrôle positif pour l'activation des neurones.

Les modèles 3D (explants de peau, peau reconstruite) sont stimulés pendant 3 jours, les cellules en 2D (MonoDCs) seulement pendant 24h. À la fin de la stimulation, les surnageants sont congelés à -20°C, les cellules sont soit fixées pour l'immunofluorescence, soit analysées par cytométrie en flux, soit utilisées pour la réaction mixte lymphocytaire (MLR).

4.2 Réaction mixte lymphocytaire

Dans nos expériences, 20 000 DCs (MonoDCs, DCs migrantes de l'explant) sont mises en culture avec 200 000 LT CD4⁺ naïfs d'un donneur différent en milieu RPMI complet, supplémenté non pas en SVF, mais en 10% SH (sérum humain) en plaque 96 puits pour un volume final de 200µL. Les T CD4⁺ naïfs avant d'être ajoutés aux DCs sont marqués au *Carboxyfluorescein succidinyl ester* (CFSE) à 0,5µM (Invitrogen/Molecular probes) pendant 10 minutes au bain-marie à 37°C et à l'abri de la lumière. Le CFSE est un marqueur qui sera perdu par les cellules proliférantes. Après 7 jours, les LT sont analysés par cytométrie en flux. Une partie de ces LT est remise en culture 24h en PMA/ionomycine afin de stimuler la production en cytokines pour l'ELISA.

5. Analyse des modèles

5.1 Explants de peau et MonoDCs

Les analyses réalisées sur les explants de peau et les MonoDCs (immunofluorescence, cytométrie, qPCR, ELISA) ont été effectuées selon les protocoles décrits dans la section Matériel et méthodes de la publication en **Partie A**. Les ELISA IL-6 et IL-8 (BD Biosciences) non présents dans cette publication ont été réalisées suivant les recommandations du fabricant.

5.2 Modèle de peau reconstruite

Le modèle de peau reconstruite est fixé en paraformaldéhyde (PFA) et congelé en milieu *Optimal cutting temperature* (OCT) selon un protocole identique à l'explant de peau. Les surnageants sont également conservés à -20°C. Certains modèles ont été digérés 2 heures avec 3mg/mL de collagénase D (Roche), 30µg/mL de DNase I en RPMI 2% SVF sous agitation à 37°C. Si indiqué, un gradient Ficoll a été effectué juste après la digestion pour éliminer la majorité des débris et enrichir en cellules immunitaires.

5.3 Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart type centré sur l'erreur standard de la moyenne (*Standard error of the mean*, SEM). Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad). La normalité a été évaluée avec le test d'Agostino-Pearson. En fonction du résultat, un test apparié paramétrique (test t de Student) ou non paramétrique (test de Wilcoxon) a été réalisé. Les valeurs inférieures à $p < 0.05$ sont considérées significatives.

RÉSULTATS

Dans la **Partie A**, nous avons mis en évidence que la supplémentation en vitamine D₃ sur la peau induit, comme chez la souris, des mécanismes qu'on peut juger proches des étapes d'initiation de la DA avec une production de TSLP et une orientation Th2 facilitée par les DCs. Nous avons pour objectif dans cette thèse de construire un modèle *in vitro* de DA précoce, en nous basant sur ces deux critères. C'est pourquoi nous avons stimulé notre modèle de peau avec de la vitamine D₃, mais aussi avec d'autres molécules connues pour favoriser la production de TSLP et/ou les réponses Th2. Des expériences ont été réalisées en parallèle sur des explants de peau et des MonoDCs en culture 2D afin de choisir le meilleur stimulus pour notre étude.

1. Transfert et reproduction du modèle

Le modèle de peau reconstruite stratifié, innervé, vascularisé et immunocompétent choisi pour cette étude a été mis en place au LOEX par le Dr. François Berthod en collaboration avec notre équipe CNRS UPR3572. Avec l'aide de Quentin Muller, doctorant en cotutelle entre nos deux laboratoires, mon premier objectif lors de mon arrivée fin 2016 a été de contribuer au transfert technologique du modèle conçu à Québec à partir de cellules saines.

1.1 Derme et épiderme

À partir de matrices en collagène/chitosan fournies par le LOEX, nous avons débuté nos essais par un ensemencement de fibroblastes et de kératinocytes. Selon le protocole initial et encore en place à Québec, la culture des kératinocytes s'effectue en 2D sur une lignée de fibroblastes murins 3T3 irradiés. En effet, ils ont un rôle nourricier indispensable pour les kératinocytes. Cette étape, longue et nécessitant la synchronisation de plusieurs cultures cellulaires, a été remplacée par l'utilisation d'un milieu CnT-Prime (CellnTec) suffisamment complet pour nous dispenser de l'usage de 3T3. Il était donc important de contrôler la capacité de ces kératinocytes, amplifiés dans un nouvel environnement, à fournir un épiderme une fois disposé en 3D sur une matrice dermique colonisée par des fibroblastes.

Les images qui suivent (**Figure 18**) représentent l'aspect d'un derme et d'un épiderme obtenu après 6 semaines de culture sur l'éponge (2 semaines avec les fibroblastes, 4 semaines avec les kératinocytes).

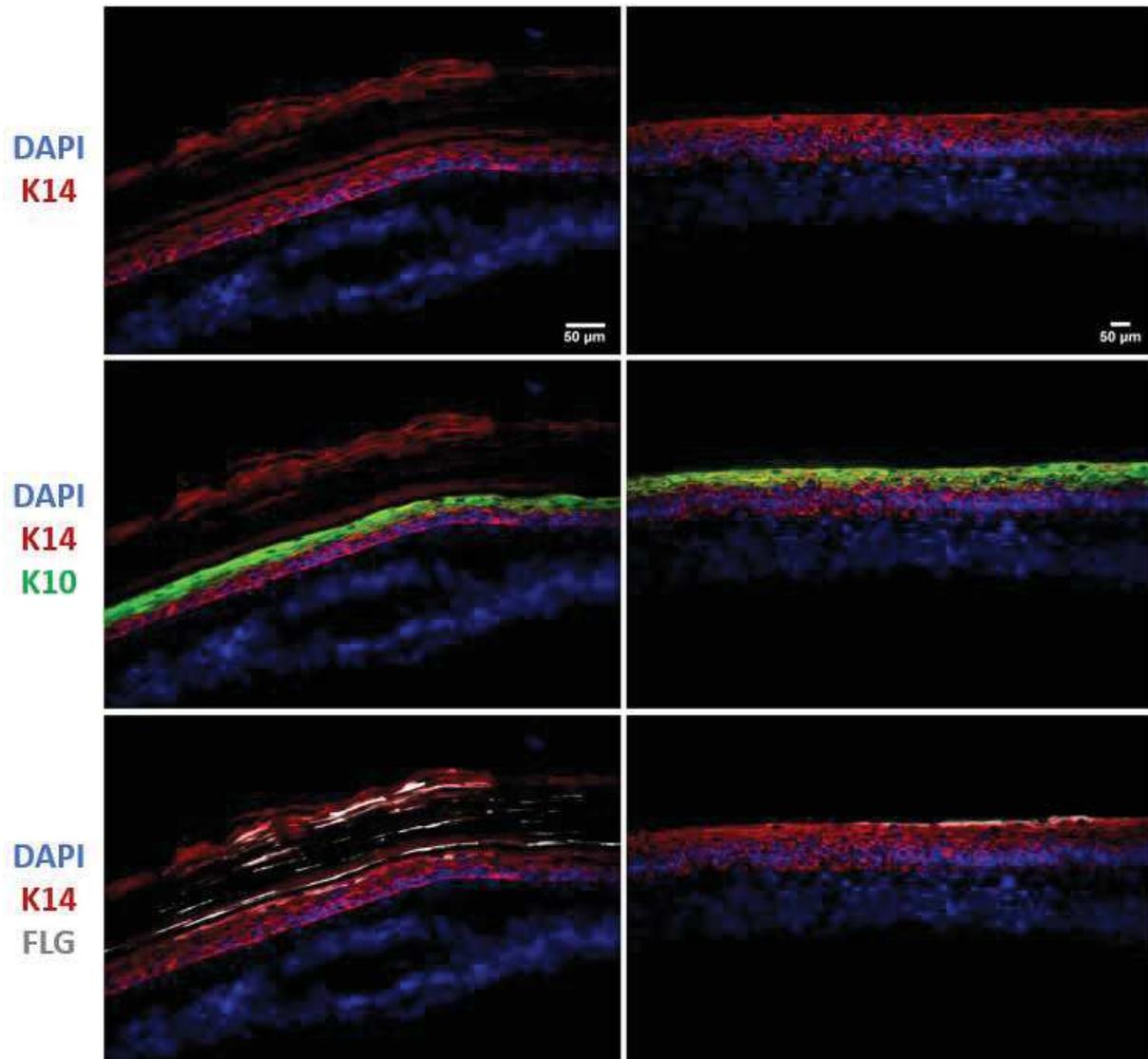


Figure 18 : Immunofluorescence d'un derme et épiderme reconstruit. Ces images représentent des coupes transversales du derme et de l'épiderme reconstruit après 6 semaines de culture. La K14 (rouge) est présente dans toutes les strates de l'épiderme. La K10 (vert) est elle, comme attendue, limitée aux couches supra-basales, et la FLG (gris) à la couche cornée.

En l'absence de marqueurs spécifiques, les fibroblastes sont reconnaissables dans la partie inférieure du modèle par le marquage du noyau avec le DAPI. Ils sont répartis de manière homogène dans la matrice. Les kératinocytes peuvent s'identifier par le marquage des kératines, comme K14 et K10. On peut aisément constater une stratification de l'épiderme en plusieurs couches, même si celles-ci semblent moins nombreuses que dans un épiderme humain normal (**Figure 19**). De plus, dans la peau, K14 est exprimé uniquement dans la couche basale proliférante (**Introduction Chapitre I, Figure 1**).

Dans notre modèle, l'ensemble des couches expriment K14, ce qui suggère un état précoce de différenciation. À ce niveau dans l'épiderme, les kératinocytes devraient être différenciés. Cependant, cette expression aberrante du K14 n'est pas inhabituelle pour un modèle de peau reconstruite de pleine épaisseur (Blais *et al.*, 2014). De plus, les couches supérieures de notre modèle expriment bien la K10 (marqueur des couches granuleuses et épineuses) et la FLG (marqueur de la couche cornée) ce qui semble confirmer qu'un processus de différenciation est bien mis en place.

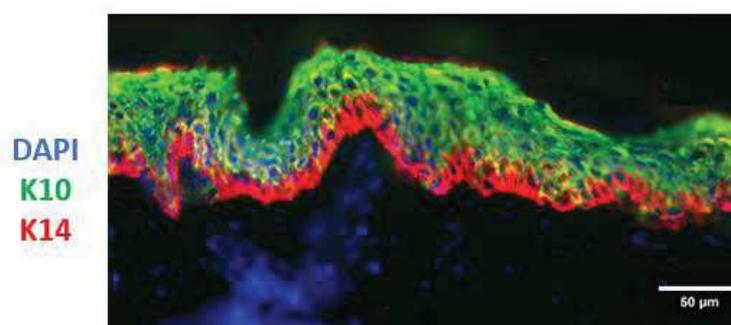


Figure 19 : Immunofluorescence d'une peau normale. Coupe transversale d'une peau normale humaine. Le marquage K14 (rouge) permet bien de distinguer la couche basale proliférative, K10 (en vert) les couches supra-basales, DAPI (en bleu) les noyaux cellulaires.

Avec un regard rétrospectif sur l'ensemble des modèles reconstruits réalisés durant cette thèse, nous avons constaté une certaine variabilité dans la qualité de l'épiderme obtenu, avec des épidermes parfois très fins. Des exemples seront montrés dans les paragraphes suivants.

1.2 Vascularisation et immunocompétence

Avant l'ajout des cellules endothéliales dans le derme, une longue étape d'optimisation de leur culture en 2D a été nécessaire. En effet, comme évoqué brièvement plus haut (**Matériel et méthodes Partie B, 1.4**), la principale difficulté dans la mise en place de ces cultures réside dans l'équilibre entre le nombre de cellules endothéliales et de fibroblastes contaminants à croissance plus rapide. Le protocole d'extraction à partir de tissu humain établi à Québec par simple grattage du derme n'a pas été reproductible dans nos locaux, c'est pourquoi pour un rendement optimal nous avons procédé par digestion totale du derme et purification magnétique des cellules CD31+.

Une fois enrichies à 70% minimum et amplifiées dans des flasques enrobées en gélatine, les cellules endothéliales sontensemencées sur la matrice au jour 0, en même temps que les fibroblastes. Ces cellules s'associent entre elles dans le derme pour former des structures caractéristiques, qu'on assimile à des pseudo-vaisseaux (**Figure 20**). Ces derniers sont évidemment différents d'un vaisseau normal, il n'existe pas de véritable lumière et ces structures ne supporteraient donc pas de flux. Néanmoins, la survie des cellules endothéliales dans notre modèle, ainsi que leur capacité à y former des structures cohérentes avec leur fonction reflète leur intégration adéquate.

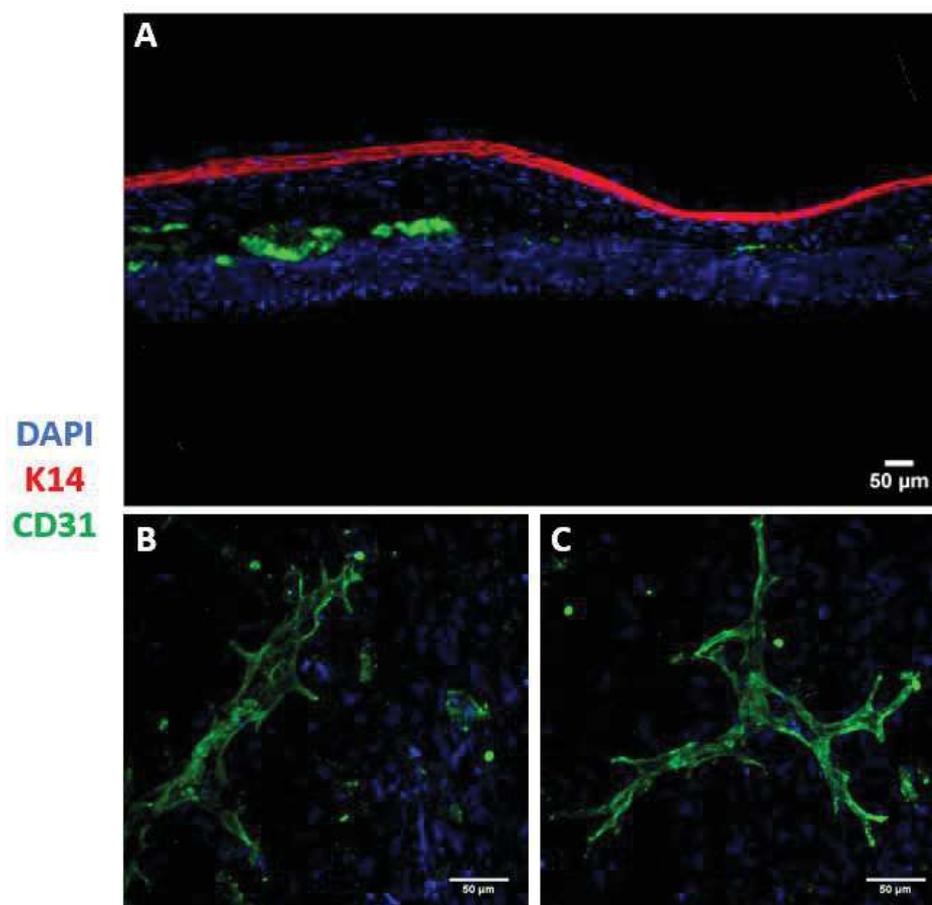


Figure 20 : Immunofluorescence d'un modèle vascularisé. Ces images permettent de visualiser la configuration en pseudo-vaisseaux prise par les cellules endothéliales identifiées par le CD31 (en vert) dans le modèle après 56 jours de culture en (A) coupe transversale ou (B) et (C) vue du dessous. Le DAPI (bleu) marque les noyaux et K14 (rouge) l'épiderme qui, sur cet exemple, est anormalement fin.

En initiant sa collaboration avec le LOEX, notre équipe avait pour ambition de contribuer à perfectionner ce modèle en y ajoutant une fonction d'immunocompétence. Le choix s'est porté sur des cellules présentatrices d'antigène dérivées de monocytes, qui

représentent un bon compromis entre fidélité aux DCs de la peau et facilité d'obtention. Le protocole initial a été élaboré avec des MonoDCs mais grâce à la plasticité des monocytes *in vitro*, nous avons pu le faire évoluer en y intégrant des MonoLCs ou des MonoMacros. Nous avons dû optimiser leur différenciation et leur caractérisation 2D avant de pouvoir les ensemercer sur nos éponges (**Matériel et méthodes Partie B, 1.4**). C'est pourquoi, même si des tests préliminaires en 3D ont été réalisés, ces expériences nécessitent encore d'être répétées.

La **Figure 21** ci-dessous illustre un modèle contenant des MonoDCs. Ces dernières semblent, comme attendu, se disséminer dans toute l'épaisseur du derme. Des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe par Quentin Muller suggèrent, pour une bonne répartition des MonoDCs, l'importance de la présence de cellules endothéliales.

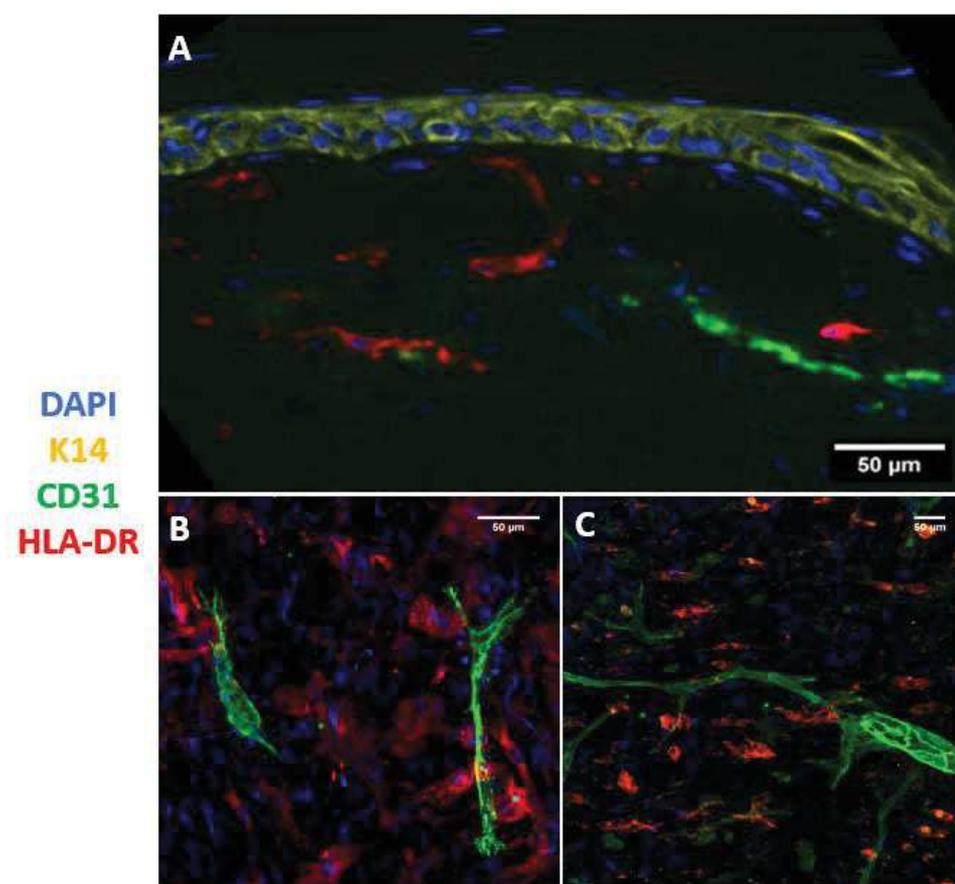


Figure 21 : Immunofluorescence d'un modèle immunocompétent. Un modèle stratifié, vascularisé et immunocompétent est caractérisé après 56 jours de culture. (A) coupe transversale, (B) et (C) vue du dessous. Les MonoDCs sont marquées en rouge (HLA-DR), les vaisseaux en vert (CD31), l'épiderme en jaune (K14) et les noyaux en bleu (DAPI).

2. Mesure de la production de cytokines

2.1 TSLP

Comme discuté dans l'introduction, les lésions de DA se caractérisent par l'expression prédominante de TSLP (*Soumelis et al., 2002*). Cette cytokine, qui appartient à la famille des alarmines, est libérée majoritairement par les kératinocytes de l'épiderme après perception d'un signal de danger. Elle a émergé au fil du temps comme un initiateur clé dans la réponse Th2 et dans l'allergie (*Liu et al., 2006*). Afin de construire un modèle des phases initiales de DA, nous avons choisi parmi la littérature différents inducteurs connus de TSLP *in vitro* 2D ou 3D chez l'homme, *in vivo* la souris (**Matériel et Méthodes Partie B, 4.1**). Notre modèle intégrant des kératinocytes, nous avons souhaité tester sa capacité à produire des cytokines, notamment la TSLP, par mesure dans le surnageant après stimulation de 3 jours. Dans le but de vérifier la pertinence de notre modèle, ces stimuli ont été également utilisés sur des explants de peau normale et des MonoDCs en 2D, après 3 jours ou 24h de culture respectivement (**Figure 22**).

En accord avec les données de la littérature sur des modèles 3D de peau reconstruite (*Danso et al., 2014 ; Bernard et al., 2017*) nous retrouvons dans nos éponges une libération de TSLP en quantité significative après stimulation de 3 jours par IL-4 (330pg/mL en moyenne) et IL-1 β (1900pg/mL) (**Figure 22A**). La production induite par IL-4 est observable également dans un explant de peau normale (590pg/mL). De façon inattendue, nous ne sommes pas parvenus à retrouver de la TSLP induit par IL1 β dans l'explant de peau, comme l'ont pourtant observé Bernard M. et al. (*Bernard et al., 2017*) (**Figure 22B**).

Des données précédemment publiées (*Wilson et al., 2013 ; Vu et al., 2010*) décrivent une libération de TSLP induite sur une culture 2D de kératinocytes primaires par stimulation du récepteur PAR2 avec l'agoniste SLIGKV ou en présence de HKSA. Toutefois, nous n'avons pu reproduire ces résultats dans nos modèles 3D. De même, la stimulation LPS n'induit pas de TSLP (**Figure 22A,B**).

Contrairement à ce que nous avons démontré sur des explants de peau humaine (**Figure 22B et Publication Partie A**) la vitamine D₃ (calcitriol ou calcipotriol en application topique) n'induit aucune libération significative de TSLP dans le modèle de peau reconstruite (23pg/mL en moyenne avec le calcitriol, contre 92pg/mL dans l'explant stimulé) (**Figure 22A**).

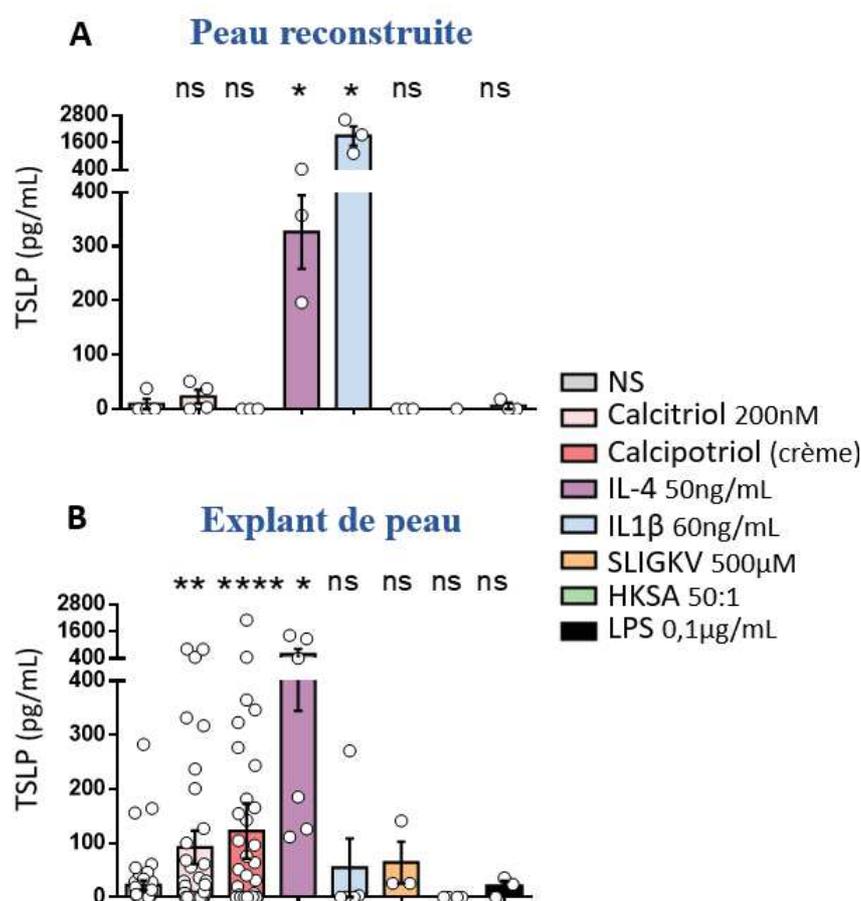


Figure 22 : Production de TSLP. La libération de TSLP est mesurée dans le surnageant (A) d'une peau reconstruite ou (B) d'un explant de peau après stimulation avec les réactifs suivants : les analogues de vitamine D₃ (calcitriol, calcipotriol), une cytokine Th2 (IL-4), la cytokine de l'inflammasome IL1β, un agoniste PAR2 (SLIGKV), *S. aureus* inactivé par la chaleur (HKSA) et le LPS. Nous n'avons pas observé de synthèse de TSLP par les MonoDCs (n=3) pour l'ensemble des réactifs testés (données non présentées). Les résultats sont visualisés en moyenne ± SEM. Les tests statistiques sont réalisés en fonction du contrôle non stimulé (NS). ns (non significatif), * p<0,05 **p<0,001 ****p<0,0001 selon un test de Wilcoxon.

2.2 IL-8 et IL-6

IL-8 et IL-6 sont deux médiateurs solubles pro-inflammatoires qui peuvent être produits par les kératinocytes et les fibroblastes (Nozaki *et al.*, 1992), présents dans notre modèle. Bien que le rôle de ces molécules, apparaissant dans de nombreux types d'inflammations cutanées, n'ait été que peu étudié dans la DA, le blocage du récepteur IL-6R avec un anticorps a déjà montré une efficacité en clinique sur 3 patients à forme IgE-dépendante, avec une amélioration du score EASI après 3 mois de traitement (Navarini *et al.*, 2011). Nous avons surtout voulu avec ces expériences nous assurer de la capacité de notre modèle à relarguer d'autres cytokines que la TSLP, mais également évaluer son état inflammatoire.

Nous observons dans la peau reconstruite non traitée une quantité non négligeable d'IL-8 (55ng/mL en moyenne) et d'IL-6 (51ng/mL) (**Figure 23A**). À titre comparatif, dans l'explant de peau non stimulé, on retrouve une concentration en IL-8 plus forte (74ng/mL). L'IL-6 est produite de manière encore beaucoup plus importante (640ng/mL) (**Figure 23B**). Le modèle reconstruit semble donc présenter un biais pro-inflammatoire plus réduit que les explants.

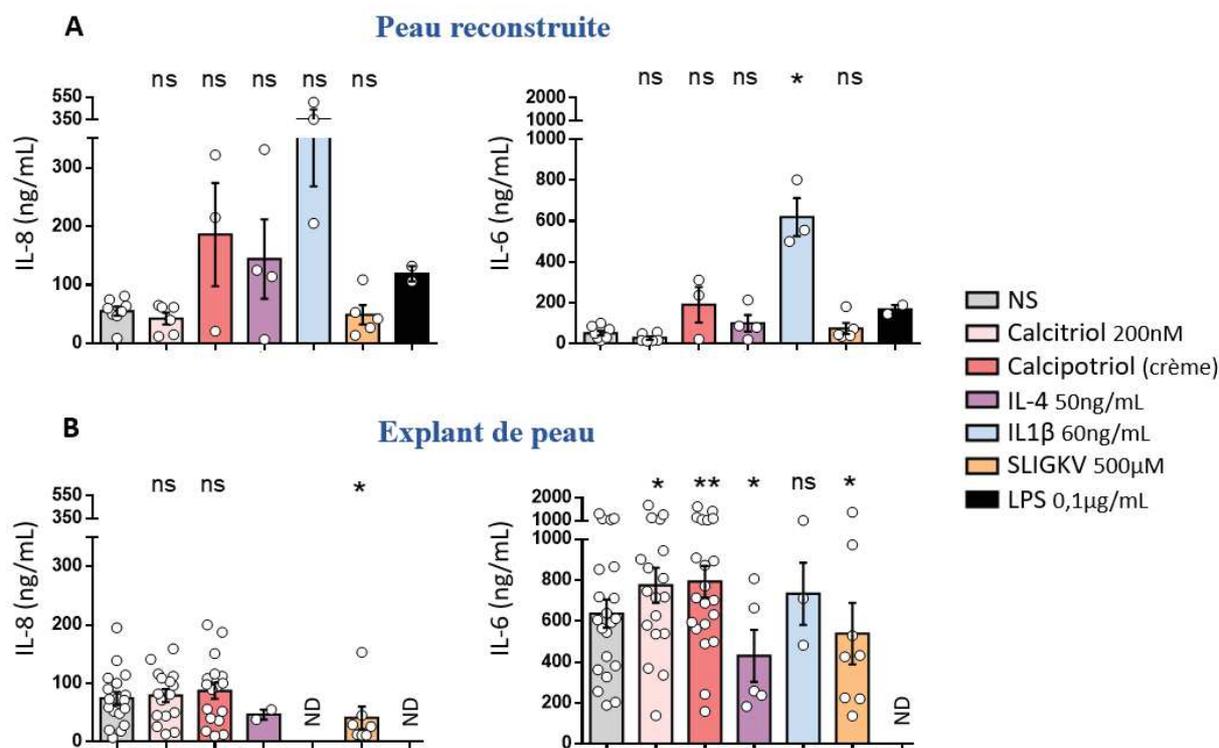


Figure 23 : Production d'IL-8 et IL-6. Cette figure illustre la mesure par ELISA d'IL-8 et IL-6 réalisée sur (A) le modèle de peau reconstruite et (B) les explants de peau après 3 jours de stimulation. ND (non déterminé) signifie que la condition n'a pas été faite. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. Les tests statistiques sont réalisés pour les échantillons supérieurs à $n=3$, en comparaison avec le contrôle non stimulé (NS). ns (non significatif), * $p<0,05$ ** $p<0,001$ selon un test de Wilcoxon.

Aucune différence significative n'est constatée selon les stimuli appliqués pour IL-8 dans le modèle reconstruit, même s'il existe une tendance à l'augmentation en présence d'IL1 β ($p=0,052$) (**Figure 23A**). Toutefois, il faut noter que certaines stimulations n'ont pu être répétées suffisamment pour réaliser des tests statistiques fiables. Il en est de même pour l'explant, mis à part une réduction significative (* $p<0,05$) avec l'agoniste SLIGKV (**Figure 23B**). Pour IL-6, seul IL1 β induit dans le modèle reconstruit une production significative en comparaison à la condition NS (**Figure 23A**). Dans l'explant on retrouve également une tendance à l'augmentation ($p=0,056$) avec IL1 β . Les analogues de la vitamine D₃ accentuent le relargage en IL-6 (* $p<0,05$ pour calcitriol, ** $p<0,001$ pour calcipotriol) alors que l'IL-4 et le SLIGKV le réduisent (* $p<0,05$) (**Figure 23B**).

3. Analyse du phénotype des DCs

Une fois les cellules dérivées de monocytes (MonoDCs, MonoLCs ou MonoMacros) intégrées et le modèle arrivé à son terme, soit 56 jours de culture totale, nous n'avons pas observé ces cellules dans le surnageant, à l'opposé des DCs de peau migrant spontanément hors des explants de peau cultivés. Même après 3 jours de stimulation par les différents réactifs du **Tableau II (Matériel et méthodes, Partie B, 4.1)**, les MonoDCs, MonoLCs et MonoMacros ne semblent pas migrer. Nous avons tenté d'orienter leur mobilité par ajout dans le surnageant de 250ng/mL de CCL21, chimiokine responsable de la migration des DCs vers les vaisseaux lymphatiques, mais sans résultat (n=2). Les marquages par immunofluorescence réalisés sur les cellules présentes dans le surnageant ne mettent en évidence que des fibroblastes HLA-DR-CD14- (données non présentées), confirmant que les MonoDCs ne migrent pas plus tôt dans la culture et ne sont donc pas perdues lors des changements de milieu.

À l'heure actuelle, seul le marquage HLA-DR fonctionne pour identifier les MonoDCs dans les sections du modèle de peau reconstruite. Nous ne sommes pas parvenus à retrouver des marqueurs attendus, comme le CD1a, que nous utilisons pourtant régulièrement avec succès pour analyser les DCs dans des explants de peau. C'est pourquoi, dans le but de caractériser le phénotype des DCs et de les récupérer pour analyser leur fonction, nous avons reproduit et expérimenté différents protocoles de digestion tissulaire. Nous avons arrêté notre sélection sur un protocole avec 3mg/mL de collagénase D et 30µg/mL de DNase I de 2 heures en RPMI 2% SVF sous agitation à 37°C. Avec ce protocole, nous comptons en moyenne 500 000 cellules vivantes par éponge. Après analyse par cytométrie en flux des cellules digérées sur nos différents modèles avec MonoDCs, MonoLCs ou MonoMacros (**Figure 24A**, page suivante) nous n'observons que 20 à 30% de cellules vivantes. Cela suggère une proportion non négligeable de débris et de cellules mortes, possiblement des cornéocytes comme c'est le cas après la digestion d'un explant de peau. Afin d'optimiser ce protocole, nous avons décidé de réaliser une séparation en gradient de Ficoll immédiatement après la digestion. Nous enrichissons ainsi en cellules vivantes de densité comparable aux monocytes. Comme illustré en **Figure 24B**, avec ce gradient nous observons maintenant presque 80% de cellules vivantes, pour un total d'environ 100 000 cellules comptées par éponge.

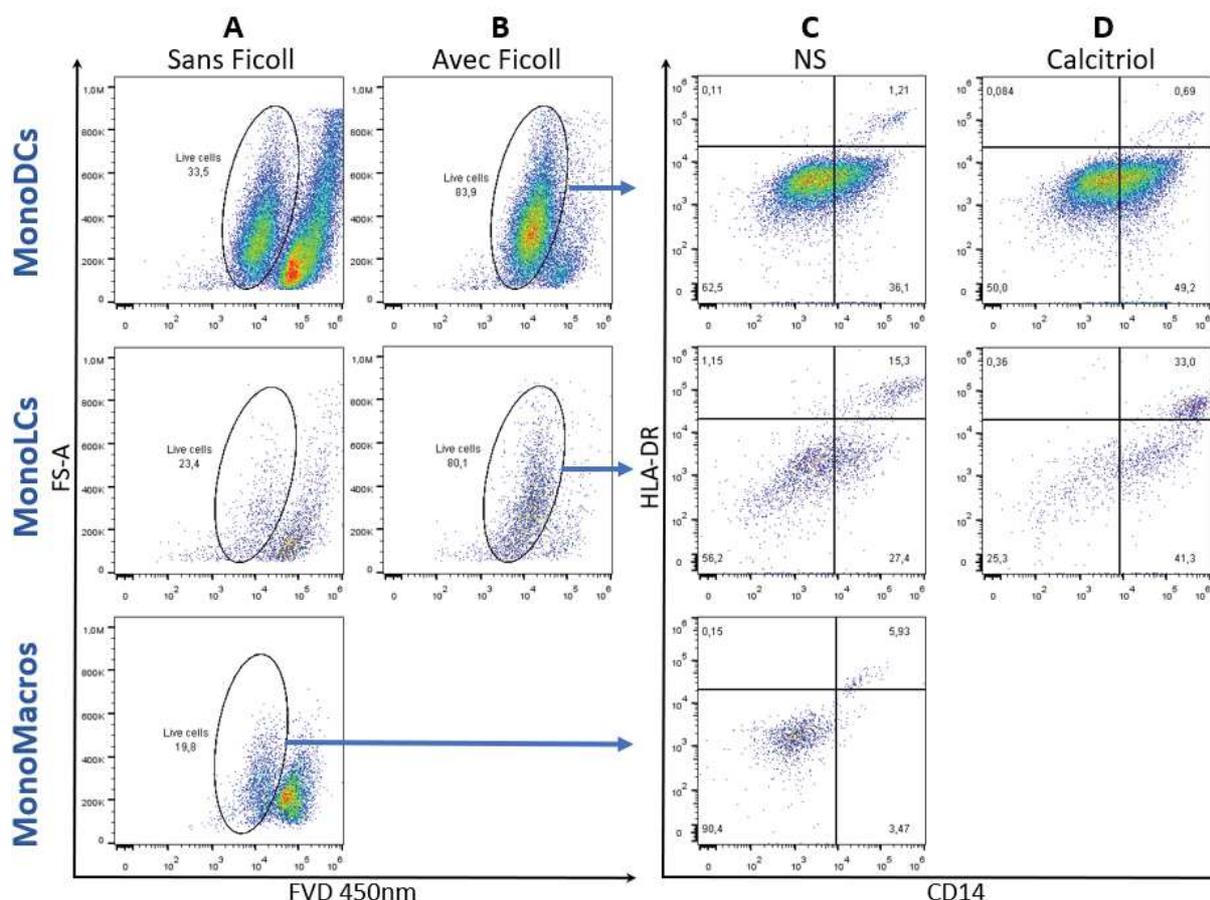


Figure 24 : Digestion des modèles reconstruits. Comparaison par cytométrie des cellules récoltées après digestion enzymatique d'éponges NS (non stimulées) contenant des MonoDCs, MonoLCs ou MonoMacros. Les cellules obtenues (A) avant ou (B) après gradient de Ficoll sont représentées en fonction de l'expression du marqueur de mort (FVD-eBio450) et de la taille (FS-A). (C-D) Expression de HLA-DR et CD14 sur les cellules vivantes de modèles (C) NS ou (D) stimulés 3 jours avec du calcitriol après digestion et séparation par Ficoll (à l'exception du modèle avec MonoMacros).

Parmi ces cellules, dans les modèles avec MonoDCs, nous obtenons moins de 2% de cellules HLA-DR⁺ (n=3) (Figure 24C). De façon surprenante, ces cellules coexpriment le CD14, qui est pourtant, avant ensemencement sur matrices, faiblement exprimé car perdu lors de la différenciation à partir de monocytes. On remarque également un pourcentage assez important de cellules HLA-DR⁻ et CD14⁺ (36,1%). L'identification de ces dernières représentera l'un des enjeux des prochaines expériences de digestion du modèle après mon départ. Les cellules obtenues à partir de peau reconstruite avec MonoLCs sont elles aussi en partie HLA-DR⁻ et CD14⁺. Le pourcentage de cellules HLA-DR⁺ CD14⁺ est supérieur dans cette analyse (15,3%). Enfin, nous avons réalisé la digestion d'un modèle avec MonoMacros, qui donne un peu moins de 6% de cellules HLA-DR⁺ CD14⁺, et une population HLA-DR⁻ CD14⁺ plus discrète (digestion faite sans Ficoll, n=1). Même si ces résultats sont très

préliminaires, ils portent à croire que les MonoLCs et MonoMacros sont plus facilement isolables après digestion que les MonoDCs. On peut aussi imaginer que les marqueurs sont mieux conservés.

Une éponge avec MonoDCs et une autre avec MonoLCs ont été stimulées 3 jours avec du calcitriol puis digérées afin d'en analyser les cellules immunitaires survivantes (**Figure 24D**). En comparant au contrôle NS (**Figure 24C**), on remarque à la fois une augmentation du pourcentage de cellules HLA-DR- CD14+ (modèle avec MonoDCs et MonoLCs) et de cellules doubles positives HLA-DR+ CD14+ (avec les MonoLCs uniquement). Ces données semblent cohérentes avec l'augmentation de l'expression du CD14 observée sur des MonoDCs et des DCs d'explant de peau après traitement à la vitamine D₃ démontrée dans la **Partie A** des résultats.

Bien évidemment, le manque de répétition est à prendre en compte dans ces analyses, rendues complexes par le temps nécessaire pour l'obtention du modèle. Néanmoins, ces résultats représentent une véritable avancée, car, jusqu'à présent, nous n'avions que très peu d'informations sur le devenir des cellules dérivées de monocytes dans les éponges, et notamment sur leur conservation des marqueurs de différenciation. Devant l'absence de migration et la difficulté de marquage par immunofluorescence, la digestion des modèles semble prometteuse pour une analyse plus poussée de ces cellules.

4. Orientation de LT CD4+ naïfs

Une partie de l'introduction de ce manuscrit insiste sur le rôle central de la réponse Th2 dans la physiopathologie initiale de la DA (défaut de barrière, inflammation et prurit) et en particulier de la cytokine IL-13, concordant cliniquement avec l'efficacité des nouveaux traitements bloquant son récepteur. Pour obtenir notre modèle de DA, nous avons pour objectif de reproduire une réponse Th2 IL-13+ dans la peau reconstruite (modèle avec MonoDCs dans un premier temps). Nous avons d'abord souhaité obtenir plus de recul sur la capacité des MonoDCs en culture 2D et des DCs migrantes d'explant de peau à induire des T *helper* (Th) avant de passer à l'évaluation de DCs issues de la peau reconstruite. Comme décrit dans la section Matériel et méthodes, le protocole de MLR permet de traduire l'effet global des signaux reçus par la DC en évaluant sa capacité à orienter des LT CD4+ naïfs allogéniques. Ce protocole nous autorise donc indirectement à déterminer la réponse des LT aux conditions testées sur nos modèles.

C'est pourquoi, à l'aide des réactifs décrits comme inducteurs TSLP et/ou Th2, nous avons stimulé 3 jours les explants de peau ou 24h les MonoDCs, puis récoltées ces cellules pour les mettre en MLR avec des LT CD4⁺ naïfs. La **Figure 25** en page suivante représente l'analyse par cytométrie en flux du profil de ces LT après 7 jours. Les cellules vivantes sont présélectionnées selon leur expression de CD3 et CD4. Les Th1 sont définies comme IFN γ ⁺ (histogramme du bas, points gris) et les Th2 comme IFN γ ⁻ et IL-13⁺ (histogramme du haut, points blancs).

Le rôle de la TSLP dans la capacité des DCs à orienter des T naïfs en Th2 IL-13⁺ est bien décrit dans la littérature, notamment avec des DCs sanguines (*Soumelis et al., 2002*). Nous observons effectivement une augmentation de la différenciation en Th2 avec la TSLP, significative pour les explants de peau (* p<0,05), mais pas pour les MonoDCs (p=0,15). Le pourcentage de LT Th1 a en revanche tendance à diminuer (p=0,069 pour les explants, p=0,11 pour les MonoDCs). À l'inverse le LPS, connu comme pro-Th1 (*Magram et al., 1996 ; Pattarini et al., 2017*) induit sur les MonoDCs une diminution de la capacité d'orientation en Th2 et une augmentation de celle en Th1 (* p<0,05). Le manque de répétition avec le LPS sur les explants de peau (n=2) ne permet pas de tirer de conclusion (**Figure 25A,B**).

Comme démontré dans le manuscrit présenté en **Partie A**, la vitamine D₃ induit une augmentation Th2 et une réduction Th1 avec les explants et les MonoDCs, de façon plus marquée pour ces dernières. L'IL-4, décrite comme pro-Th2 et inhibant la différenciation Th1 (*Swain et al., 1990 ; López-Bravo et al., 2013*), présente en effet ces propriétés lorsqu'elle est testée sur les explants (* p<0,05). Une tendance semblable est observée avec les MonoDCs. IL1 β , SLIGKV et HKSA induisent peu de différences, malgré une production de TSLP évoquée dans la littérature mais non confirmée dans nos expériences sur les explants (**Figure 25A,B**).

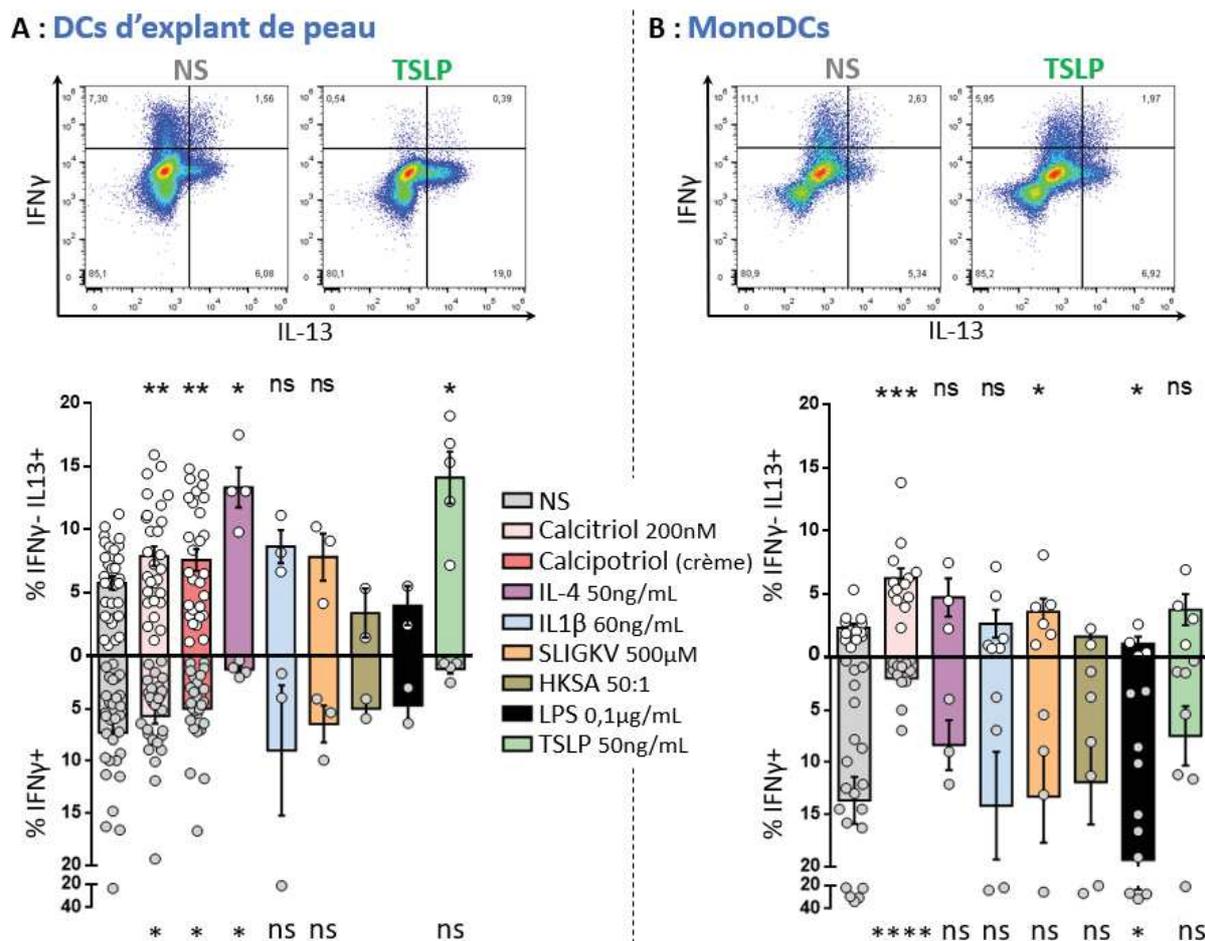


Figure 25 : MLR avec MonoDCs et DCs d'explant de peau. Analyse par cytométrie en flux des LT CD4+ après MLR avec (A) des DCs migrantes de l'explant de peau, (B) des MonoDCs stimulées en 2D. Les données sont représentées en moyenne ± SEM. Les tests statistiques sont réalisés pour les échantillons supérieurs à n=3, en comparaison avec le contrôle non stimulé (NS). ns (non significatif) * p<0,05 **p<0,001 ***p<0,001 ****p<0,0001 selon un test t de Student.

Le modèle de peau reconstruite de notre étude est considéré comme immunocompétent car il inclut des MonoDCs. Cependant, il ne contient pas de lymphocytes T car leur ajout direct présenterait un risque d'alloréaction envers les cellules du modèle provenant d'un donneur différent. En revanche, les MonoDCs incluses dans le modèle conservent leur rôle de sentinelle et devraient voir leur capacité d'activation et d'orientation modulées par des stimuli perçus directement ou via les autres cellules de l'environnement (kératinocytes, fibroblastes, endothéliales).

Considérant l'absence de migration des MonoDCs hors du modèle reconstruit (Résultats Partie B, 3), nous avons réalisé une MLR par coculture de LT avec des MonoDCs obtenues après digestion d'une peau reconstruite, comprenant épiderme et derme vascularisé,

exposée ou non au calcitriol pendant 3 jours (ratio de 1 MonoDC pour 10 LT ; n=1 ; **Figure 26**). On observe ainsi que la survie des LT après 7 jours est bonne (environ 75% en moyenne ; **Figure 26A**). Cependant, seule une faible fraction de ces cellules est proliférante (moins de 2% ; **Figure 26B**). De plus, ces LT produisent peu de cytokines avec ou sans calcitriol (**Figure 26C**). Pour le moment, seuls IFN γ et IL-13 ont été étudiées, il s'agit donc d'un résultat à confirmer.

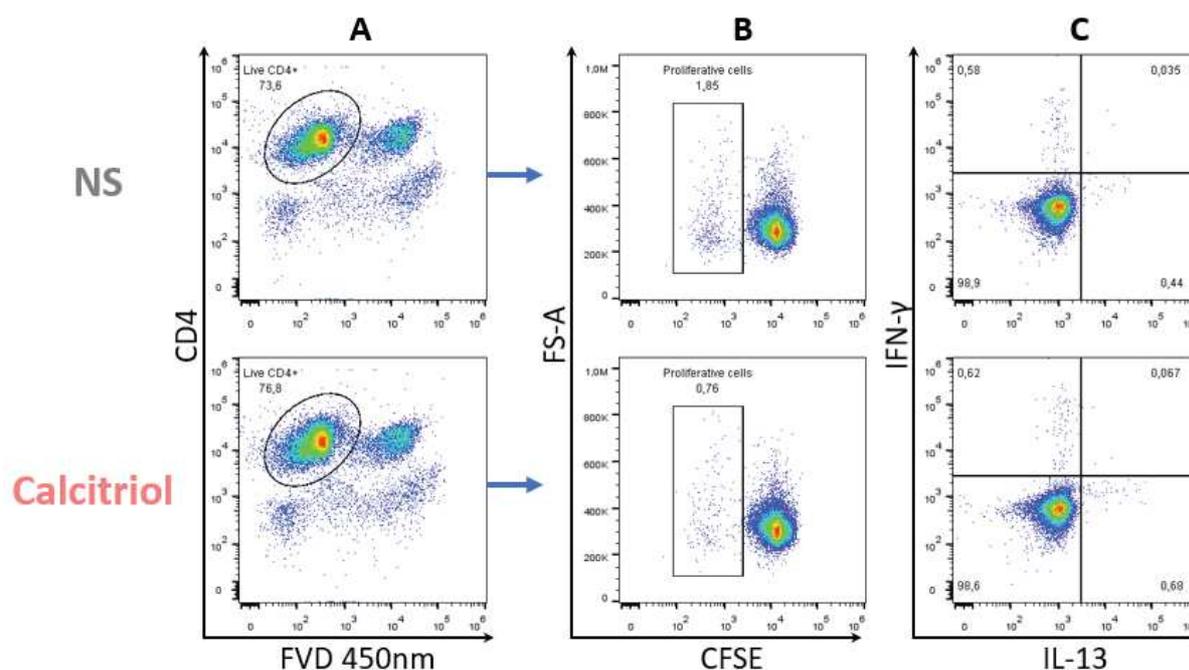


Figure 26 : MLR avec MonoDCs de peau reconstruite. (A-C) Analyse par cytométrie en flux du profil des LT CD4⁺ naïfs marqués au CFSE après une semaine de MLR avec des MonoDCs obtenues après digestion d'un modèle de peau. **(A)** Les LT CD4⁺ vivants sont sélectionnés selon la présence du CD4 et un faible marquage par le Fixable Viability dye (FVD-eBio450). **(B)** Sur cette population est déterminé le pourcentage de cellules proliférantes CFSE low et **(C)** l'expression intracellulaire d'IFN γ et IL-13.

5. Innervation

L'intégration de neurones dans le modèle de peau reconstruite représente la prochaine étape de l'avancée du modèle de DA, en effet comme la section dans les explants de peau conduit à la mort de ces derniers, seul le modèle reconstruit permet de conserver des neurones fonctionnels. À l'heure actuelle, des tests préliminaires pour ajouter des neurones murins dans un modèle complet ont déjà été réalisés. Cependant, nous n'avons pas encore effectué toutes les immunofluorescences nécessaires pour confirmer leur intégration et leur présence en fin de culture. La **Figure 27** illustre la seule image que nous avons pour le moment de l'innervation d'un de nos modèles, même si un bruit de fond important du collagène est constaté.

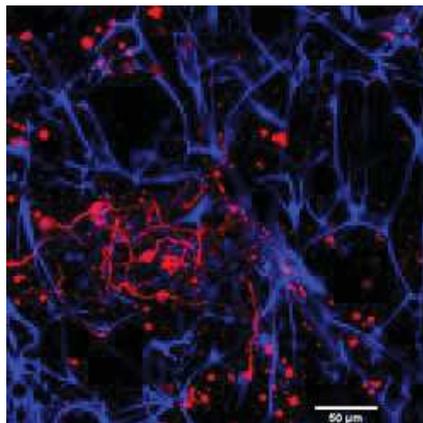


Figure 27 : Immunofluorescence d'un modèle innervé. Image représentative d'un modèle innervé après 56 jours de culture, en vue du dessous. La β 3-tubuline des neurones est marquée en rouge et le DAPI en bleu.

Nous n'avons pas encore pu tester les inducteurs de TSLP sur ces modèles innervés afin d'étudier à la fois la communication des neurones avec les autres cellules, ou la densité de l'innervation. Seules 3 éponges ont été stimulées avec la capsaïcine, agoniste TRPV1 sur les neurones, contribuant au relargage de neuropeptides SP et CGRP et à la production de cytokines pro-inflammatoires sur des cellules épithéliales bronchiques (*Veronesi et al., 1999*) (**Figure 28**). La présence d'IL-6 et d'IL-8 a été retrouvée par ELISA mais sans différence significative avec le contrôle NS (**Figure 28A,B**). Il faut toutefois prendre en considération que la présence de neurones dans ces éponges n'a pas encore été confirmée en parallèle par immunofluorescence.

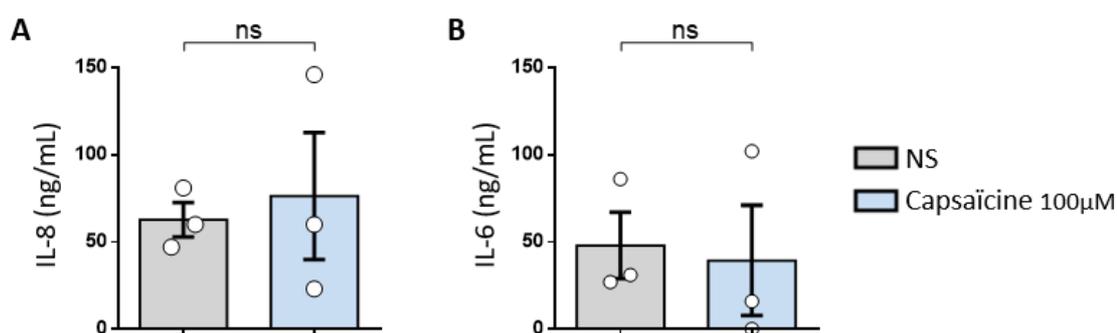


Figure 28 : Production d'IL-8 et IL-6 dans le modèle innervé. Mesure par ELISA de la libération (A) d'IL-8 et (B) IL-6 en ng/mL, réalisée sur des modèles reconstruits complets avec neurones murins, après stimulation de 3 jours par la capsaïcine. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. Les tests statistiques sont réalisés en fonction du contrôle non stimulé (NS) : ns (non significatif) selon un test t de Student.

DISCUSSION

1. Pertinence du modèle de base

Le transfert technologique du modèle de peau reconstruite dans notre laboratoire a été un véritable défi. Nous avons dû, comme décrit plus tôt dans ce manuscrit, mettre en place et adapter les protocoles d'isolation de cellules primaires, notamment pour les cellules endothéliales, les kératinocytes ou les neurones murins. D'un point de vue strictement pratique, à cause de travaux à l'IBMC, nous avons dû déplacer nos cultures en début de thèse vers les locaux de l'UMR 7200 à la faculté de Pharmacie d'Illkirch-Graffenstaden, au sein de l'équipe du Dr. Nelly Frossart. Avec l'aide séquentielle de Quentin Muller, qui a effectué plusieurs longs séjours chez nos collaborateurs québécois, nous avons dans un premier temps tenté de reproduire le modèle à partir de cellules saines sur des matrices collagène/chitosan élaborées outre-Atlantique.

1.1 Qualité de l'épiderme

Comme constaté sur certaines des immunofluorescences, l'épiderme obtenu en fin de culture n'est pas homogène sur un critère d'épaisseur. Il est également souvent plus fin qu'un épiderme normal. Comme nous utilisons un donneur différent à chaque série, ce qui n'est pas le cas à Québec, on peut suggérer une variabilité donneur-dépendante de la capacité des kératinocytes à produire un épiderme. Pourtant, parfois au sein d'une même série, nous avons aussi observé des différences. Les éponges collagène/chitosan étant coulées à la main, nous savons par expérience qu'il existe une légère variabilité entre les matrices, certaines peuvent par exemple se rompre spontanément pendant la culture. De plus, nous avons travaillé pendant ces 3 années à partir d'un même lot d'éponges et nous manquons de recul quant à leur conservation. C'est pourquoi notre équipe a commencé il y a quelques mois à produire sur place de nouvelles matrices, qui sont actuellement en cours d'évaluation.

Par-delà le critère assez subjectif de l'épaisseur, nous avons comparé avec une peau normale la qualité de stratification et de différenciation de l'épiderme. Avec l'aide des marqueurs K14 (couche basale proliférative), K10 (couche épineuse) et FLG (couche cornée) nous distinguons tout de même plusieurs assises de kératinocytes. La couche inférieure exprime K14, ce qui suggère un état peu différencié des kératinocytes, en accord avec une peau normale. Les strates supérieures montrent du K10, démontrant qu'un processus de différenciation est engagé. Cette observation est confirmée par la présence d'une couche cornée, plus ou moins

épaisse selon les lots, positive pour la FLG. En désaccord avec une peau normale, nous avons constaté que les kératinocytes des couches supérieures expriment encore le K14, cela suppose qu'ils conservent certaines caractéristiques de kératinocytes basaux. Ce résultat est aussi retrouvé chez nos collaborateurs québécois et serait fréquent pour ce type de modèle (*Blais et al., 2014*). On peut supposer que le kératinocyte ne reçoit probablement pas *in vitro* l'ensemble des signaux nécessaires à sa différenciation complète. Il peut s'agir d'un défaut de stimulation mécanique, d'une perturbation du gradient de calcium, ou d'une déficience provenant des fibroblastes comme nous le discuterons dans le paragraphe suivant. De plus, comme nous avons adapté la culture 2D de kératinocytes en milieu CnT-PR sans fibroblastes murins nourriciers (3T3), nous ne pouvons pas exclure que cette méthode ne soit pas optimale pour les kératinocytes, même si cette hypothèse n'est pas privilégiée au vu du retour d'autres utilisateurs. Il sera nécessaire de choisir des marqueurs de différenciation complémentaires pour connaître plus en détail l'épiderme obtenu avec le marquage éventuel du K5 basal, du K1 pour la couche épineuse, INV et LOR dans la granuleuse.

Simultanément à un changement de lot de SVF, utilisé dans l'ensemble des cultures en amont et pendant la construction du modèle, nous avons observé une dégradation encore plus importante de la qualité de nos épidermes, allant parfois jusqu'à leur absence totale. Nous avons pris conscience à ce stade de l'importance du rôle des fibroblastes pour fournir aux kératinocytes une bonne assise pour l'épidermisation. En effet, nous avons constaté dans nos cultures 2D de fibroblastes un rendement plus faible et un changement morphologique, avec des cellules plus « étalées », suggérant une différenciation en myofibroblastes, peut-être liée à une concentration accrue de TGF- β dans le sérum (*Janson et al., 2014*). De plus, nos cellules étant isolés du derme profond (partie non pelée par le dermatome, soit une perte de 1mm d'épaisseur), les cultures sont probablement enrichies en fibroblastes réticulaires. Or, ce sont les fibroblastes papillaires du derme supérieur qui produisent une matrice extracellulaire dont la composition permet un ancrage optimal des kératinocytes basaux (*Mine et al., 2008*). C'est pourquoi nous envisageons à présent d'établir une méthode pour les purifier. Leur maintien en culture est toutefois difficile sur le long terme, car d'après la littérature ils se différencient progressivement en réticulaires (*Janson et al., 2013*). Des études phénotypiques après digestion et/ou culture prolongée sont en cours dans notre équipe, utilisant CD26 et CD39 pour marquer les fibroblastes papillaires, CD36 et CD90 pour les réticulaires (*Philippeos et al., 2018*). Il nous est apparu récemment que nousensemencions majoritairement nos peaux reconstruites avec

des fibroblastes réticulaires, c'est pourquoi nous optimisons actuellement la récupération de fibroblastes papillaires par digestion spécifique du derme supérieur.

1.2 Vascularisation et innervation

Les cellules endothéliales, récupérées de la peau humaine après digestion du derme et tri magnétique CD31+, permettent une fois ensemencées sur éponge de former des structures particulières, avec des prolongements considérés comme des pseudo-vaisseaux. Nous n'attendions évidemment pas de véritables vaisseaux, mais nous nous satisfaisons de leur survie et de leur capacité à s'associer dans de telles structures, comme c'est le cas chez nos collaborateurs. Cependant, nous avons des efforts à faire sur la caractérisation de ces cellules. En effet, avec le tri CD31 nous isolons à la fois des cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques. Nous ne savons pas si les pseudo-vaisseaux sont hétérogènes ou si un type prédomine sur l'autre. L'utilisation de marqueurs complémentaires pour les distinguer autant en 2D au fil des passages ou après digestion, qu'en 3D dans le modèle, sera nécessaire. Nous pouvons envisager comme marqueurs lymphatiques la Podoplanine (PDPN), *lymphatic endothelial hyaluronan receptor-1* (LYVE-1) ou *prospero-related homeobox 1* (PROX-1) (Keuschnigg et al., 2013). D'autres marqueurs exclusifs aux vaisseaux sanguins, comme CD146/Sendo1, pourront également être utilisés. À partir des cultures obtenues suite à la digestion de derme et tri CD31, nous prévoyons de séparer les cellules endothéliales lymphatiques des cellules sanguines. Nos résultats préliminaires soutiennent l'intérêt d'un marquage PDPN lors du tri cellulaire pour isoler spécifiquement l'endothélium lymphatique. Nous pouvons ainsi envisager d'ensemencer le modèle dans un premier temps avec des cellules endothéliales sanguines, puis avec des cellules lymphatiques afin d'obtenir deux réseaux distincts.

Comme déjà évoqué, l'emploi de neurones murins a représenté une alternative temporaire à l'ajout de neurones humains. Malgré de nombreuses isolations effectuées, nous avons réussi que tardivement à reproduire des modèles innervés au cours de cette thèse. Pour le moment, nous n'avons pas démontré de réponse à la capsaïcine en analysant la libération d'IL-6 et IL-8. Même si de précédentes études au LOEX ont suggéré qu'elle augmentait la production de TNF- α , cette cytokine n'a pas encore été mesurée dans mes expériences. La mise en place récente de neurones humains dérivés de cellules iPS et pouvant être inclus dans un modèle de peau reconstruite (Muller et al., 2018) nous a fait provisoirement laisser de côté les éponges avec neurones issus d'embryons de souris. Malgré l'intérêt des neurones murins, plus

économiques et suffisants dans des constructions préliminaires de modèles pathologiques, nous souhaitons dans un avenir proche optimiser un modèle exclusivement humain, plus cohérent avec nos ambitions. En étroite collaboration avec l'équipe de F. Berthod à Québec, notre équipe a récemment acquis la capacité de réaliser la culture de cellules iPS humaines et leur différenciation en neurones, nous permettant de proposer des modèles de peau innervée 100% humaine (Muller et al., 2018).

1.3 Immunocompétence

Le modèle immunocompétent a été initialement conçu avec des MonoDCs. Nous manquons encore d'informations sur les conditions de survie de ces cellules dans les éponges. Comme les MonoDCs s'utilisent généralement *in vitro* sur du court terme, il n'est pas exclu qu'après 56 jours de culture celles-ci soient phénotypiquement et/ou fonctionnellement différentes. L'analyse par immunofluorescence du marqueur spécifique HLA-DR semble refléter leur intégration totale dans toute l'épaisseur du derme et leur maintien jusqu'à la fin de culture. Cependant, il reste difficile de caractériser précisément les MonoDCs au sein même du modèle. En effet, des marqueurs complémentaires comme le CD14, le CD1a ou le CD86 ne fonctionnent pas sur nos coupes, et seul HLA-DR est détectable pour le moment. Nous ne savons pas si le protocole de fixation des tissus doit être modifié (acétone au lieu de PFA) pour conserver certains épitopes, même si la PFA ne semble pas poser de problèmes sur les explants de peau. Nous pouvons aussi simplement faire l'hypothèse que dans le modèle, le phénotype des DCs est affecté et qu'elles n'expriment peut-être plus, ou beaucoup moins, ces marqueurs. Le bruit de fond important du collagène de la matrice peut alors suffire à masquer le signal. Dans ce cas, la question d'une fonctionnalité également altérée devra être posée.

Dans la culture d'explants *ex vivo*, la migration des DCs se fait sous influence de signaux pro-inflammatoires, vraisemblablement déclenchés suite à la section chirurgicale. Comme démontré avec les ELISA IL-6 et IL-8, le modèle reconstruit semble générer un environnement moins pro-inflammatoire que l'explant. C'est peut-être ce qui entraîne cette absence de mobilité des DCs hors du modèle reconstruit non stimulé, mais n'explique pas leur absence après exposition à des signaux de danger. En fin de culture, les éponges sont stimulées 3 jours. Comme avec un explant de peau, nous nous attendions à observer une migration des MonoDCs en dehors du modèle. Pourtant, quel que soit le stimulus considéré, la recherche de cellules dans le surnageant a été infructueuse.

Les DCs sont-elles alors retenues au niveau de l'endothélium présent dans le modèle ? L'ajout de CCL21, ligand de CCR7 responsable de la migration des DCs vers les vaisseaux lymphatiques, n'a pas suffi à l'accroître. Nous ne savons cependant pas si l'expression de CCR7, normalement concomitante à la maturation des DCs, est bien induite. Nous prévoyons d'utiliser des cocktails de maturation combinant plusieurs molécules (IL-1 β , IL-6, TNF- α , prostaglandine E2) décrites comme particulièrement efficaces pour provoquer la maturation et la migration des DCs (*Jonuleit et al., 1997*).

Pour pallier cette absence de migration, nous avons choisi de récupérer les MonoDCs en digérant nos éponges. Le protocole enzymatique utilisé en routine sur les explants de peau ne permettait pas une digestion optimale (nombreux morceaux, peu de cellules). Seule l'association de DNase I et collagénase D nous a aidé à récolter suffisamment de cellules pour une analyse par cytométrie en flux. Nous avons retrouvé un marquage HLA-DR à hauteur de 1% pour les modèles avec MonoDCs, 6% pour les MonoMacros et 15% pour les MonoLCs (résultats préliminaires ; après Ficoll sauf pour les MonoMacros). Ce faible pourcentage en cytométrie n'est cependant pas cohérent avec la densité observée pour le marquage HLA-DR en immunohistochimie. Nous pouvons donc nous interroger sur l'efficacité de cette digestion. Il serait pertinent à ce stade d'utiliser le CD45 comme marqueur leucocytaire, notamment pour s'assurer de l'origine hématopoïétique des cellules HLA-DR- CD14+. Malgré tout, ces données suggèrent qu'il est plus facile de collecter des MonoLCs et MonoMacros : survivent-elles mieux ? Leur séparation enzymatique de la matrice ou des autres cellules du modèle est-elle plus évidente ? Les marqueurs sont-ils plus conservés ? Nous ne pouvons pas encore répondre à ces questions. Dans tous les cas, il est surprenant que le pourcentage de cellules CD14+ soit important, sachant que les MonoDCs et MonoLCs le perdent après différenciation à partir de monocytes. Même si nous devons le confirmer par immunofluorescence sur coupe avant digestion, ce dernier résultat suggère une modification phénotypique profonde dans la cellule. Guironnet et al. ont observé des résultats similaires dans des modèles de peau reconstruite *in vitro* contenant des MonoDCs (*Guironnet et al., 2001*). L'absence des cytokines IL-4 et GM-CSF pendant la culture du modèle contribue à des altérations phénotypiques (peu de HLA-DR, beaucoup de CD14) et fonctionnelles (capacité de polarisation de T naïfs faible) identiques à nos observations. Des modèles cultivés avec IL-4 et GM-CSF permettent de pallier ces défauts. Il est intéressant de remarquer que l'intégration de MonoLCs à la place des MonoDCs permet d'obtenir en fin de culture des cellules qui conservent mieux leur phénotype initial, même en l'absence de l'IL-4 et du GM-CSF. Nous allons donc évaluer l'élaboration de peau avec

MonoLCs, afin de vérifier si ce résultat est applicable à notre modèle, avec comme objectif de conserver leur capacité à orienter des T naïfs après isolation et mise en MLR.

Nous pouvons questionner le choix des cellules dérivées de monocytes pour apporter l'immunocompétence dans notre modèle. En effet, elles ne représentent pas vraiment les DCs du derme, sachant qu'*in vivo* les DCs dérivées de monocytes sont recrutées uniquement après inflammation. Néanmoins, contrairement aux DCs primaires extraites d'explants de peau, ces cellules ont l'avantage de se maintenir à l'état immature en l'absence de stimulation, du moins en culture 2D. Elles sont faciles d'obtention et leur utilisation fréquente dans la littérature et dans notre équipe nous apporte un recul confortable dans nos expériences. Enfin, leur maturation, qui se traduit par une grande efficacité d'activation et de différenciation de lymphocytes T, est dirigée par le signal de danger auxquelles les DCs ont initialement répondu.

Il faut aussi noter que la culture des éponges nécessite la présence d'hydrocortisone dans le milieu à partir de l'ajout des kératinocytes. Même si les DCs sont alors déjà intégrées dans l'éponge, on peut supposer que son activité anti-inflammatoire peut influencer ces cellules. Cela ne semble pas être le cas pour la migration car nous avons toujours l'absence de MonoDCs hors du modèle après une stimulation de 3 jours réalisée sans hydrocortisone. Cependant, un impact sur le phénotype des MonoDCs reste envisageable (*Bellinghausen et al., 2001*), et devra être confirmé.

Pour résumer, notre modèle présente des avantages certains, mais aussi des inconvénients. La durée d'obtention (56 jours) auquel il faut rajouter les cultures 2D en amont est limitante pour un bon rendement de résultats. Le maintien en culture de ce modèle sur une longue période accentue le risque d'erreur de manipulation ou de contamination. Ces conditions contraignantes sont cependant nécessaires pour obtenir un modèle parmi les plus complets jamais mis en place en termes de diversité cellulaire. Ce dernier présente aujourd'hui un grand intérêt pour la reproduction de pathologies comme la DA, où les interactions neuro-immunes pourraient jouer un rôle central.

2. Pertinence du modèle de DA

Cette thèse avait pour objectif de mettre à profit le modèle de peau reconstruite dont nous disposons pour la reproduction des caractéristiques initiales de la DA. Celles-ci peuvent se décomposer en 4 éléments principaux : la présence d'un défaut de barrière (déficience en

FLG), une susceptibilité accrue de l'épiderme avec production d'alarmines (dont la TSLP), une activation immunitaire (orientation Th2 par les DCs) et une hyperinnervation avec induction d'un signal de prurit (par TSLP et les cytokines Th2 notamment). Avec du recul, nous avons peut-être sous-estimé le temps nécessaire pour l'optimisation des cultures primaires et le transfert technologique du modèle de peau saine. C'est pourquoi l'utilisation d'explant de peau et de MonoDCs en 2D, en plus de servir de contrôle, a représenté une bonne alternative pour préparer les évolutions futures de ce modèle. Devant l'ampleur de la tâche, nous avons décidé de nous concentrer dans un premier temps sur l'induction de TSLP et l'orientation Th2, le défaut de barrière étant déjà bien étudié en 3D dans la littérature, et l'ajout des neurones sur nos éponges n'ayant été concrétisé que tardivement. Nous avons conscience que ce choix ne reflète pas l'intégralité de la pathologie. Toutefois, plusieurs évolutions se rapportant à la barrière et au signal de prurit seront proposées pour la suite de ce projet. De plus, le modèle obtenu se focalise sur les phases initiales de la maladie faisant intervenir les cellules présentes dans le modèle, mais nous pouvons lui reprocher de ne pas comprendre d'autres acteurs potentiels impliqués dans la physiopathologie initiale de la DA. Dans un futur proche, nous pourrions tenter d'y intégrer des ILC2 (Salimi et al., 2013). En effet, ces cellules prennent une place de plus en plus importante dans la littérature, notamment dans la compréhension des mécanismes IgE indépendants et dans la synthèse d'IL-13. Les basophiles sont également décrits comme cruciaux chez des modèles murins, notamment via une activation directe par la TSLP, mais la confirmation de ces études chez l'homme est controversée (Salter et al., 2015 ; Salabert-Le Guen et al., 2018). Il pourrait être pertinent d'utiliser notre modèle de peau reconstruite pour répondre à ces interrogations. Enfin, l'absence de LTs dans le modèle, pourtant au centre de la physiopathologie, peut également nous être reprochée. Même si nous prévoyons de réaliser de nouvelles expériences de MLR avec des T en dehors du modèle, nous pourrions réfléchir à les y intégrer directement, cela nécessiterait l'isolation de cellules provenant toutes d'un même donneur. Il nous faudrait alors un prélèvement de sang en plus de l'abdominoplastie pour obtenir un modèle mono-patient.

2.1 Production de cytokines

Nous avons souhaité évaluer la réponse de notre modèle reconstruit à des stimuli en mesurant dans le surnageant des médiateurs solubles pouvant être produits par divers types cellulaires. Nous avons observé, en concordance avec la littérature, une production significative de TSLP avec IL-4 et IL-1 β (Danso et al., 2014 ; Bernard et al., 2017). La TSLP provenant principalement des kératinocytes, ceux intégrés dans notre modèle sont donc fonctionnels.

Même si nous avons démontré une libération de TSLP dans les explants de peau exposés à la vitamine D₃, cette production n'a pas été retrouvée significativement dans le modèle reconstruit (faible concentration avec le calcitriol, absence totale avec le calcipotriol). Nous avons encore très peu de données sur la pénétration d'une crème comme celle au calcipotriol dans notre éponge, rendant la comparaison avec les explants difficile. L'épaisseur trop faible de l'épiderme, sa variabilité ainsi que d'éventuels défauts de différenciation peuvent expliquer ces différences. De plus, comme nous n'avons pas plus de 30% de donneurs répondant à la vitamine D₃, ce taux de réponse va être également applicable à nos éponges car les kératinocytes qui les constituent proviennent eux aussi de diverses abdominoplasties. Il serait intéressant de comparer la réponse d'un même donneur sur son explant et sur un modèle reconstruit avec ses kératinocytes, ce qui n'a pas encore été fait.

Nous avons analysé également par ELISA la production d'IL-6 et IL-8 afin d'obtenir des informations sur l'état inflammatoire de nos modèles. La libération basale d'IL-6 et IL-8 (condition NS) est plus importante dans l'explant. Après stimulation, nous observons une réponse parfois différente avec la peau reconstruite. Celle-ci s'explique certainement par l'état d'inflammation de l'explant. En effet, la coupe entraîne un signal de danger conséquent. Le travail avec les explants présente des avantages : ils sont faciles à obtenir, la peau est déjà « complète » (à l'exception des neurones sectionnés), l'épiderme différencié, et on peut en isoler les cellules du patient. Cependant, il faut prendre en considération que les données qui en sont tirées ne sont pas représentatives d'une peau en conditions normales, mais d'un contexte pro-inflammatoire encore mal défini et aux causes non précisément connues. Ce paramètre confirme l'intérêt de notre peau reconstruite comme un modèle plus proche de l'état physiologique, qui à l'état basal exprime moins d'IL-6 et IL-8 qu'un explant.

2.2 Orientation Th2

Même si nous sommes parvenus à isoler les DCs après digestion de notre modèle et à avancer dans leur caractérisation, ces dernières n'induisent qu'une faible prolifération des LT naïfs après MLR. Ce résultat est bien sûr préliminaire et ne nous permet pas à l'heure actuelle de reproduire l'orientation Th2, typique de la DA, que nous avons observée avec les explants. Nous avons pour le moment uniquement utilisé une stimulation par le calcitriol, qui, malgré un effet sur les MonoDCs (augmentation probable du CD14) cohérent avec celui de ces mêmes cellules en 2D et avec les DCs de l'explant, n'induit pas plus de Th2 IL-13⁺ que le contrôle NS. Nous ne savons pas à ce stade si elles sont encore capables d'assurer cette fonction. Le

phénotype surprenant des MonoDCs après 56 jours de culture dans l'éponge est peut-être en cause.

Les avancées faites avec les inducteurs TSLP/Th2 sur les explants et les MonoDCs en 2D nous ont permis d'identifier les réactifs à privilégier pour la construction de notre modèle. Même si la stimulation par IL1 β provoque la libération de la TSLP par l'éponge, elle n'est pas retrouvée dans les explants et n'aide pas à l'orientation Th2 IL-13+. D'après la littérature, elle pourrait favoriser plutôt les réponses Th1/Th17 (*Santarlaschi et al., 2013*). SLIGKV (agoniste PAR2) et HKSA (*S. aureus* inactivé) n'induisent pas de TSLP dans l'ensemble de nos modèles, ni de Th2 sur les explants. Ces différents réactifs ne semblent donc pas être de bons choix pour poursuivre notre modélisation de la DA. L'IL-4, en revanche, fonctionne à la fois sur les explants et le modèle pour les faire produire la TSLP. De plus, c'est un inducteur Th2 bien connu et confirmé dans les explants, et nous avons à plusieurs reprises rappelé que l'IL-4 est multifactoriellement engagée dans la maladie. Pourtant, il nous semble plus cohérent d'induire du Th2 avec un autre réactif qu'une cytokine Th2 elle-même si nous voulons éclaircir l'initiation de la DA. L'IL-4 peut néanmoins être conservée comme contrôle positif.

Enfin, seule la vitamine D₃ est capable à la fois d'orienter en Th2 via les DCs des explants et les MonoDCs en 2D, ce qui valide son intérêt pour les développements futurs de nos modèles sur éponge. Néanmoins, nous avons démontré que la vitamine D₃ induit une polarisation Th2 TSLP-indépendante avec les MonoDCs, ce qui n'est pas en phase avec le mécanisme TSLP-dépendant que nous souhaitons reproduire. Cependant, la preuve récente de l'inefficacité clinique des anticorps anti-TSLP (tezepelumab) (*Simpson et al., 2019*) pourrait suggérer une orientation Th2 en partie TSLP-indépendante dans la peau de patients DA.

3. Perspectives

Jusqu'à présent nous étions dépendants de nos collaborateurs à Québec pour obtenir des matrices collagène/chitosan. Depuis peu, après acquisition d'un lyophilisateur, nous démarrons la construction de nos propres éponges. Nous sommes en cours de test pour y vérifier l'intégration adéquate des cellules et la formation d'un épiderme. C'est actuellement notre principale priorité. La maîtrise de ce procédé nous permettrait d'envisager une miniaturisation du système en format 24-puits, les éponges actuelles étant coulées en plaques 12-puits. Cette optimisation permettrait de consommer moins de cellules, de réactifs et de multiplier les conditions. Nous espérons que la fabrication de matrices au sein de notre laboratoire résoudra ce manque d'homogénéité dans l'épaisseur de l'épiderme. Nous avons également débuté la

construction de modèles cultivés avec des cellules de la lignée kératinocytaire HaCat afin de réduire le risque de variabilité mais aussi afin de pouvoir moduler génétiquement ces cellules. Ce projet est mené dans l'équipe par le doctorant Wacym Boufenghour, dans le but de construire des modèles 3D avec des HaCat modifiés par la technologie CRISPR-Cas9, porteurs de nouvelles mutations récemment associées à la maladie de Verneuil.

Nous nous sommes aperçus que nous manquions d'informations sur la survie de l'ensemble de nos cellules après chaque étape d'ensemencement. Afin d'éviter le sacrifice d'une éponge, nous optimisons une évaluation de la mortalité par mesure de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant. En effet, la LDH étant une enzyme exclusivement cytoplasmique, elle est libérée après lésion de la membrane plasmique. Par prélèvement d'un petit volume de surnageant, la mesure de son activité sera proportionnelle à la mort cellulaire.

Comme évoqué dans la discussion, nous prévoyons d'approfondir la caractérisation complète des cellules avant la mise en culture (fibroblastes, cellules endothéliales, neurones), mais également au sein du modèle (MonoDCs, kératinocytes). De plus, nous devons aussi nous assurer qu'avant ensemencement des cellules dérivées de monocytes (MonoDCs, MonoLCs ou MonoMacros) sur nos éponges, nous n'avons pas de contamination par des LT. En effet, ces derniers pourraient provoquer une alloréaction avec les cellules de peau dérivées d'autres donneurs, et ainsi perturber l'intégrité de nos éponges. Une déplétion des LT CD3⁺ peut être envisagée directement après l'isolation des monocytes.

Une fois sur éponge et après stimulation, si la migration des MonoDCs n'est pas réalisable, le protocole de digestion du modèle permettra de réaliser l'analyse phénotypique et fonctionnelle de ces cellules, afin de déterminer notamment si elles sont toujours capables de stimuler des LT naïfs et/ou mémoires. Nous pouvons déjà souligner que la possibilité d'ensemencer notre modèle avec plusieurs types de cellules immunitaires offre un avantage conséquent pour l'étude de mécanismes multiples spécifiques à ces cellules. L'ajout de MonoLCs ou MonoMacros à la place de MonoDCs semble prometteur car après digestion on récolte un nombre plus important de cellules HLA-DR⁺. Nous sommes également très curieux d'étudier leur répartition dans le modèle. Dans la peau normale, les LCs sont présentes uniquement dans l'épiderme. Dans notre modèle, la préparation des MonoLCs est basée sur un protocole publié suggérant que ces cellules peuvent aussi s'intégrer dans un épiderme reconstruit (*Bechetoille et al., 2006*). De plus, cette différenciation à partir de monocytes génère

une population hétérogène : seulement 15% des cellules expriment le CD207 caractéristique des LCs, les autres sont similaires à des MonoDCs. L'intégration de MonoLCs pourrait donc refléter au mieux la diversité des DCs d'une peau normale (*Otsuka et al., 2018*). Des études récentes soulignent chez la souris l'importance mutuelle de la relation entre les cellules endothéliales et les macrophages, respectivement en termes de croissance et maturation (*Krishnasamy et al., 2017 ; Gurevich et al., 2018*). Est-ce applicable à la peau humaine ? Les MonoMacros sont-ils en interaction étroite avec les vaisseaux dans notre modèle ? Enfin, des travaux récents ayant montré que les macrophages sont responsables de l'immunosurveillance des neurones sensoriels (*Kolter et al., 2019*), nous souhaiterions étudier ce type d'interactions dans notre modèle innervé entièrement humain.

Si nos difficultés à isoler les DCs à partir du modèle persistent, il existe une option qui se dispense de DCs pour l'étude de l'orientation T : l'usage de billes enrobées avec des anticorps anti CD3/CD28. Ces dernières miment artificiellement l'interaction avec la DC, c'est-à-dire le signal 1 et 2. Le signal 3 de l'environnement sera apporté par les facteurs solubles présents dans le surnageant du modèle activé. On conserve ainsi l'influence des DCs dans ce processus, et ce sans avoir besoin de les isoler. Cette technique a cependant des limites : les cytokines relarguées dans le surnageant sont peut-être trop diluées ou consommées par leur environnement cellulaire immédiat et le manque de signaux complémentaires des récepteurs de surface (CD40/CD40L) peut se faire sentir.

Pour la construction du modèle de DA, nous prévoyons de nous focaliser sur la vitamine D₃ et l'IL-4 pour induire à la fois de la TSLP et des lymphocytes auxiliaires de type Th2. Nous sommes également récemment procuré des extraits d'acariens (*House dust mite, HDM*), allergènes impliqués dans la DA (*Teplitzky et al., 2008*), pour étudier en détail leur impact sur la peau. Deux autres caractéristiques restent à reproduire : le défaut de barrière et l'hyperinnervation. Pour la barrière, nous avons déjà des kératinocytes FLG^{-/-} de patients atteints d'ichtyose vulgaire, obtenus grâce au Dr. Sandrine Dubrac de l'Université d'Innsbruck. Nous comptons reproduire un modèle avec ces kératinocytes et comparer la structure de l'épiderme et la réponse engagée en comparaison avec des kératinocytes sains. L'ajout de neurones humains dérivés d'iPS est aussi en cours d'élaboration. Ils pourront nous aider à étudier la colonisation de la matrice par les neurones (influence de la TSLP, des cytokines Th2) et leur activation via la production de neuropeptides qui pourraient influencer l'état d'activation des DCs. Considérant l'impact de la vitamine D₃ sur la peau, nous aimerions explorer son

influence (directe ou indirecte via une réponse Th2) sur l'expression par les kératinocytes des marqueurs de différenciation, notamment la FLG. De plus, comme ses effets sur les neurones sensoriels sont encore totalement inconnus car impossibles à mettre en œuvre sur explants, nous envisageons de les étudier sur notre modèle reconstruit.

Des essais cliniques récents s'intéressant à l'efficacité du tezepelumab, anticorps bloquant de la TSLP, ont mis en évidence l'absence d'effet sur la réduction du prurit (*Simpson et al., 2019*). Mais comme discuté dans le **Chapitre II, 5.3.3** cette étude présente certaines limites. Notre modèle reconstruit modélisant la DA pourrait être un outil pertinent pour éclaircir rapidement chez l'homme si cet anticorps peut bloquer les multiples effets de la TSLP. Nous pouvons envisager à plus long terme d'utiliser la combinaison de nos différents inducteurs pour stimuler le modèle (vitamine D₃, IL-4, IL1 β). Ce modèle serait également pertinent pour étudier l'influence du microbiome et notamment de *S. aureus* dans la physiopathologie de la maladie. Une complexification du modèle peut être envisagée avec l'étude des phases chroniques de la maladie et ajout d'autres types cellulaires y intervenant comme les LB ou mastocytes. Nous pourrions aussi éclaircir l'influence des cytokines Th1 et Th17 à ce stade en stimulant notre modèle avec leurs cytokines respectives (IFN γ , IL-17).

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

À ce jour, la construction du modèle de DA est encore à un stade préliminaire. Cependant, l'expérience acquise avec les explants et les cultures 2D nous a permis d'anticiper les réponses attendues dans notre modèle reconstruit. Nous avons ainsi accentué nos recherches sur la vitamine D₃. Pour la première fois chez l'homme, nous avons mis en évidence une variabilité interindividuelle de la production de TSLP après stimulation d'explants de peau. La vitamine D₃ est également capable de moduler directement et profondément le phénotype des DCs, comme le montrent notamment les variations du CD14 et d'autres marqueurs. Après MLR, ces DCs facilitent l'orientation en Th2 IL-13⁺ de façon dépendante de la TSLP. De manière plus surprenante, les CD14⁺ seules induisent des Th2 IL-4⁺ indépendamment de la TSLP. La vitamine D₃ peut donc se révéler, comme chez la souris, être un inducteur de choix pour mimer *in vitro* la DA.

En un peu plus de 3 ans, nous avons réussi à reproduire et maîtriser l'ensemble des protocoles d'isolation de cellules primaires. Nous sommes parvenus à transférer le modèle dans notre laboratoire, même si la production de nouvelles matrices représente un nouveau défi. Nous pouvons encore déplorer un manque de caractérisation, mais notre équipe travaille quotidiennement pour l'améliorer.

Notre modèle est propice à la colonisation et à la survie d'un nombre conséquent de cellules variées. Comme dans une peau DA, nous pouvons induire de la TSLP par les kératinocytes après stimulation adéquate. Les DCs présentes sont désormais isolables après digestion, ce qui ouvre la porte à une analyse plus poussée de leur fonctionnalité. Le modèle de DA souhaité devra les moduler pour aider à une orientation Th2.

Une longue période est encore nécessaire pour envisager un modèle DA complet (défaut de barrière, ajout des neurones), mais nous avons réussi avec cette thèse, je l'espère, à avancer dans la compréhension de notre modèle, tout en posant des bases solides pour reproduire *in vitro* des mécanismes pathologiques, dans l'intérêt de la recherche de traitements innovants pouvant être proposés aux patients.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J.S., Rafison, B., Witzel, S., Reyes, R.E., Shieh, A., Chun, R., Zavala, K., Hewison, M. and Liu, P.T. 2014. Regulation of the Extrarenal CYP27B1-Hydroxylase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **144PA**: 22–27.
- Akdis, C.A. and Akdis, M. 2003. Immunological differences between intrinsic and extrinsic types of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*, **33**: 1618–1621.
- Almerighi, C., Sinistro, A., Cavazza, A., Ciaprini, C., Rocchi, G. and Bergamini, A. 2009. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in human monocytes. *Cytokine*, **45**: 190–197.
- Al-Shobaili, H.A., Ahmed, A.A., Alnomair, N., Alobead, Z.A. and Rasheed, Z. 2016. Molecular Genetic of Atopic dermatitis: An Update. *Int J Health Sci (Qassim)*, **10**: 96–120.
- Amadesi, S., Cottrell, G.S., Divino, L., Chapman, K., Grady, E.F., Bautista, F., Karanjia, R., Barajas-Lopez, C., Vanner, S., Vergnolle, N. and Bunnett, N.W. 2006. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C ϵ - and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J. Physiol. (Lond.)*, **575**: 555–571.
- Angelova-Fischer, I., Fernandez, I.M., Donnadiou, M.-H., Bulfone-Paus, S., Zillikens, D., Fischer, T.W. and Soumelis, V. 2010. Injury to the stratum corneum induces in vivo expression of human thymic stromal lymphopoietin in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **130**: 2505–2507.
- Apfelbacher, C.J., Diepgen, T.L. and Schmitt, J. 2011. Determinants of eczema: population-based cross-sectional study in Germany. *Allergy*, **66**: 206–213.
- Asher, M.I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C.K.W., Strachan, D.P., Weiland, S.K., Williams, H. and ISAAC Phase Three Study Group. 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, **368**: 733–743.
- Atri, C., Guerfali, F.Z. and Laouini, D. 2018. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*, **19**.
- Auxenfans, C., Fradette, J., Lequeux, C., Germain, L., Kinikoglu, B., Bechetoille, N., Braye, F., Auger, F.A. and Damour, O. 2009. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *Eur J Dermatol*, **19**: 107–113.
- Bäck, O., Blomquist, H.K.S., Hernell, O. and Stenberg, B. 2009. Does vitamin D intake during infancy promote the development of atopic allergy? *Acta Derm. Venereol.*, **89**: 28–32.
- Baeke, F., Korf, H., Overbergh, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Gysemans, C. and Mathieu, C. 2010. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the immune system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **121**: 221–227.
- Bakdash, G., Schneider, L.P., van Capel, T.M.M., Kapsenberg, M.L., Teunissen, M.B.M. and de Jong, E.C. 2013. Intradermal application of vitamin D₃ increases migration of CD14⁺ dermal dendritic cells and promotes the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Hum Vaccin Immunother*, **9**: 250–258.

- Barrat, F.J., Cua, D.J., Boonstra, A., Richards, D.F., Crain, C., Savelkoul, H.F., de Waal-Malefyt, R., Coffman, R.L., Hawrylowicz, C.M. and O'Garra, A. 2002. In Vitro Generation of Interleukin 10–producing Regulatory CD4+ T Cells Is Induced by Immunosuppressive Drugs and Inhibited by T Helper Type 1 (Th1)– and Th2-inducing Cytokines. *J Exp Med*, **195**: 603–616.
- Bechetoille, N., André, V., Valladeau, J., Perrier, E. and Dezutter-Dambuyant, C. 2006. Mixed Langerhans cell and interstitial/dermal dendritic cell subsets emanating from monocytes in Th2-mediated inflammatory conditions respond differently to proinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.*, **80**: 45–58.
- Belgrave, D.C.M., Simpson, A., Buchan, I.E. and Custovic, A. 2015. Atopic Dermatitis and Respiratory Allergy: What is the Link. *Curr Dermatol Rep*, **4**: 221–227.
- Bellinghausen, I., Brand, U., Steinbrink, K., Enk, A.H., Knop, J. and Saloga, J. 2001. Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**: 242–249.
- Benenson, S., Zimhony, O., Dahan, D., Solomon, M., Raveh, D., Schlesinger, Y. and Yinnon, A.M. 2005. Atopic dermatitis--a risk factor for invasive Staphylococcus aureus infections: two cases and review. *Am. J. Med.*, **118**: 1048–1051.
- Berer, A., Stöckl, J., Majdic, O., Wagner, T., Kollars, M., Lechner, K., Geissler, K. and Oehler, L. 2000. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Exp. Hematol.*, **28**: 575–583.
- Bergmann, M.M., Caubet, J.-C., Boguniewicz, M. and Eigenmann, P.A. 2013. Evaluation of food allergy in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*, **1**: 22–28.
- Bernard, M., Carrasco, C., Laoubi, L., Guiraud, B., Rozières, A., Goujon, C., Duplan, H., Bessou-Touya, S., Nicolas, J.-F., Vocanson, M. and Galliano, M.-F. 2017. IL-1 β induces thymic stromal lymphopoietin and an atopic dermatitis-like phenotype in reconstructed healthy human epidermis. *J. Pathol.*, **242**: 234–245.
- Berry, M., Brightling, C., Pavord, I. and Wardlaw, A. 2007. TNF-alpha in asthma. *Curr Opin Pharmacol*, **7**: 279–282.
- Bieber, T. 2020. Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis. *Allergy*, **75**: 54–62.
- Bikle, D. 2000. Vitamin D: Production, Metabolism, and Mechanisms of Action. In: *Endotext* (K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, et al., eds).
- Bikle, D.D., Xie, Z. and Tu, C.-L. 2012. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab*, **7**: 461–472.
- Bischoff-Ferrari, H.A., Dietrich, T., Orav, E.J. and Dawson-Hughes, B. 2004. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am. J. Med.*, **116**: 634–639.
- Blaine, J., Chonchol, M. and Levi, M. 2015. Renal Control of Calcium, Phosphate, and Magnesium Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*, **10**: 1257–1272.
- Blais, M., Mottier, L., Germain, M.-A., Bellenfant, S., Cadau, S. and Berthod, F. 2014. Sensory Neurons Accelerate Skin Reepithelialization via Substance P in an Innervated Tissue-Engineered Wound Healing Model. *Tissue Eng Part A*, **20**: 2180–2188.

- Blicharz, L., Rudnicka, L. and Samochocki, Z. 2019. Staphylococcus aureus: an underestimated factor in the pathogenesis of atopic dermatitis? *Postepy Dermatol Alergol*, **36**: 11–17.
- Blunder, S., Rühl, R., Moosbrugger-Martinz, V., Krimmel, C., Geisler, A., Zhu, H., Crumrine, D., Elias, P.M., Gruber, R., Schmuth, M. and Dubrac, S. 2017. Alterations in Epidermal Eicosanoid Metabolism Contribute to Inflammation and Impaired Late Differentiation in FLG-Mutated Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, **137**: 706–715.
- Bogiatzi, S.I., Fernandez, I., Bichet, J.-C., Marloie-Provost, M.-A., Volpe, E., Sastre, X. and Soumelis, V. 2007. Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J. Immunol.*, **178**: 3373–3377.
- Boltjes, A. and van Wijk, F. 2014. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol*, **5**: 131.
- Boonstra, A., Barrat, F.J., Crain, C., Heath, V.L., Savelkoul, H.F. and O’Garra, A. 2001. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J. Immunol.*, **167**: 4974–4980.
- Borgogni, E., Sarchielli, E., Sottili, M., Santarlasci, V., Cosmi, L., Gelmini, S., Lombardi, A., Cantini, G., Perigli, G., Luconi, M., Vannelli, G.B., Annunziato, F., Adorini, L., Serio, M. and Crescioli, C. 2008. Elocalcitol inhibits inflammatory responses in human thyroid cells and T cells. *Endocrinology*, **149**: 3626–3634.
- Braff, M.H., Bardan, A., Nizet, V. and Gallo, R.L. 2005. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J. Invest. Dermatol.*, **125**: 9–13.
- Braverman, I.M. 2000. The cutaneous microcirculation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **5**: 3–9.
- Brennan, A., Katz, D.R., Nunn, J.D., Barker, S., Hewison, M., Fraher, L.J. and O’Riordan, J.L. 1987. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology*, **61**: 457–461.
- Brenninkmeijer, E.E.A., Schram, M.E., Leeflang, M.M.G., Bos, J.D. and Spuls, P.I. 2008. Diagnostic criteria for atopic dermatitis: a systematic review. *Br. J. Dermatol.*, **158**: 754–765.
- Briot, A., Deraison, C., Lacroix, M., Bonnart, C., Robin, A., Besson, C., Dubus, P. and Hovnanian, A. 2009. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J. Exp. Med.*, **206**: 1135–1147.
- Brown, S.J. and McLean, W.H.I. 2012. One remarkable molecule: Filaggrin. *J Invest Dermatol*, **132**: 751–762.
- Brunner, P.M., Khattri, S., Garcet, S., Finney, R., Oliva, M., Dutt, R., Fuentes-Duculan, J., Zheng, X., Li, X., Bonifacio, K.M., Kunjraiva, N., Coats, I., Cueto, I., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Suárez-Fariñas, M., Krueger, J.G. and Guttman-Yassky, E. 2016. A mild topical steroid leads to progressive anti-inflammatory effects in the skin of patients with moderate-to-severe atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **138**: 169–178.
- Byrd, A.L., Deming, C., Cassidy, S.K.B., Harrison, O.J., Ng, W.-I., Conlan, S., Belkaid, Y., Segre, J.A. and Kong, H.H. 2017. Staphylococcus aureus and S. epidermidis strain diversity underlying human atopic dermatitis. *Sci Transl Med*, **9**.

- Callen, J., Chamlin, S., Eichenfield, L.F., Ellis, C., Girardi, M., Goldfarb, M., Hanifin, J., Lee, P., Margolis, D., Paller, A.S., Piacquadio, D., Peterson, W., Kaulback, K., Fennerty, M. and Wintroub, B.U. 2007. A systematic review of the safety of topical therapies for atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.*, **156**: 203–221.
- Campion, M., Smith, L., Gatault, S., Métais, C., Buddenkotte, J. and Steinhoff, M. 2019. Interleukin-4 and interleukin-13 evoke scratching behaviour in mice. *Exp. Dermatol.*, **28**: 1501–1504.
- Candi, E., Schmidt, R. and Melino, G. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**: 328–340.
- Carlberg, C. and Haq, A. 2018. The concept of the personal vitamin D response index. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **175**: 12–17.
- Carpentier, S., Vu Manh, T.-P., Chelbi, R., Henri, S., Malissen, B., Haniffa, M., Ginhoux, F. and Dalod, M. 2016. Comparative genomics analysis of mononuclear phagocyte subsets confirms homology between lymphoid tissue-resident and dermal XCR1(+) DCs in mouse and human and distinguishes them from Langerhans cells. *J. Immunol. Methods*, **432**: 35–49.
- Caubet, C., Jonca, N., Brattsand, M., Guerrin, M., Bernard, D., Schmidt, R., Egelrud, T., Simon, M. and Serre, G. 2004. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J. Invest. Dermatol.*, **122**: 1235–1244.
- Cauley, J.A., Lacroix, A.Z., Wu, L., Horwitz, M., Danielson, M.E., Bauer, D.C., Lee, J.S., Jackson, R.D., Robbins, J.A., Wu, C., Stanczyk, F.Z., LeBoff, M.S., Wactawski-Wende, J., Sarto, G., Ockene, J. and Cummings, S.R. 2008. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk for hip fractures. *Ann. Intern. Med.*, **149**: 242–250.
- Chavanas, S., Bodemer, C., Rochat, A., Hamel-Teillac, D., Ali, M., Irvine, A.D., Bonafé, J.L., Wilkinson, J., Taïeb, A., Barrandon, Y., Harper, J.I., de Prost, Y. and Hovnanian, A. 2000. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat. Genet.*, **25**: 141–142.
- Chen, S.-L., Yan, J. and Wang, F.-S. 2010. Two topical calcineurin inhibitors for the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Dermatolog Treat*, **21**: 144–156.
- Cheng, J.B., Levine, M.A., Bell, N.H., Mangelsdorf, D.J. and Russell, D.W. 2004. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 7711–7715.
- Cho, S.H., Strickland, I., Boguniewicz, M. and Leung, D.Y. 2001. Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of Staphylococcus aureus to atopic skin. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**: 269–274.
- Chorro, L., Sarde, A., Li, M., Woollard, K.J., Chambon, P., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Barbaroux, J.-B., Groves, R. and Geissmann, F. 2009. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J. Exp. Med.*, **206**: 3089–3100.
- Christakos, S., Dhawan, P., Porta, A., Mady, L.J. and Seth, T. 2011. Vitamin D and Intestinal Calcium Absorption. *Mol Cell Endocrinol*, **347**: 25–29.

- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L. and Carmeliet, G. 2016. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev.*, **96**: 365–408.
- Chung, M.-K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M. and Caterina, M.J. 2004. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, **279**: 21569–21575.
- Clark, R.A. 2015. Resident memory T cells in human health and disease. *Sci Transl Med*, **7**: 269rv1.
- Collin, M. and Bigley, V. 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, **154**: 3–20.
- Columbo, M., Horowitz, E.M., Kagey-Sobotka, A. and Lichtenstein, L.M. 1996. Substance P activates the release of histamine from human skin mast cells through a pertussis toxin-sensitive and protein kinase C-dependent mechanism. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **81**: 68–73.
- Cornelissen, C., Marquardt, Y., Czaja, K., Wenzel, J., Frank, J., Lüscher-Firzlaff, J., Lüscher, B. and Baron, J.M. 2012. IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **129**: 426–433, 433.e1–8.
- Crotty, S. 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, **41**: 529–542.
- Dainichi, T., Kitoh, A., Otsuka, A., Nakajima, S., Nomura, T., Kaplan, D.H. and Kabashima, K. 2018. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat. Immunol.*, **19**: 1286–1298.
- Danso, M.O., van Drongelen, V., Mulder, A., van Esch, J., Scott, H., van Smeden, J., El Ghalbzouri, A. and Bouwstra, J.A. 2014. TNF- α and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *J. Invest. Dermatol.*, **134**: 1941–1950.
- Darré, L. and Domene, C. 2015. Binding of Capsaicin to the TRPV1 Ion Channel. *Mol. Pharm.*, **12**: 4454–4465.
- Davidson, S. and Giesler, G.J. 2010. The multiple pathways for itch and their interactions with pain. *Trends Neurosci.*, **33**: 550–558.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E. and Taylor, P.R. 2013. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.*, **14**: 986–995.
- De Benedetto, A., Rafaels, N.M., McGirt, L.Y., Ivanov, A.I., Georas, S.N., Cheadle, C., Berger, A.E., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L.C., Hanifin, J.M., Gallo, R.L., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T.H., Leung, D.Y.M., *et al.* 2011. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**: 773–786.e1–7.
- de Jongh, G.J., Zeeuwen, P.L.J.M., Kucharekova, M., Pfundt, R., van der Valk, P.G., Blokx, W., Dogan, A., Hiemstra, P.S., van de Kerkhof, P.C. and Schalkwijk, J. 2005. High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, **125**: 1163–1173.
- De Vuyst, E., Salmon, M., Evrard, C., Lambert de Rouvroit, C. and Poumay, Y. 2017. Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models. *Front Med (Lausanne)*, **4**: 119.
- DeLuca, H.F. 2014. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKey Reports*, **3**.

- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenameele, P. and Declercq, W. 2008. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol*, **180**: 451–458.
- Dillon, S.R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S.R., Haugen, H.S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., Bort, S., Mudri, S., Kuijper, J.L., Bukowski, T., Shea, P., Dong, D.L., Dasovich, M., Grant, F.J., Lockwood, L., *et al.* 2004. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat. Immunol.*, **5**: 752–760.
- Ding, W., Stohl, L., Wagner, J.A. and Granstein, R.D. 2008. Calcitonin Gene-related Peptide Biases Langerhans Cells Towards Th2-type Immunity. *J Immunol*, **181**: 6020–6026.
- Dong, H., Hu, Y., Liu, L., Zou, M., Huang, C., Luo, L., Yu, C., Wan, X., Zhao, H., Chen, J., Xie, Z., Le, Y., Zou, F. and Cai, S. 2016. Distinct roles of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in house dust mite-induced asthmatic airway epithelial barrier disruption. *Sci Rep*, **6**: 39559.
- Dunford, P.J., Williams, K.N., Desai, P.J., Karlsson, L., McQueen, D. and Thurmond, R.L. 2007. Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **119**: 176–183.
- Ebner, S., Nguyen, V.A., Forstner, M., Wang, Y.-H., Wolfram, D., Liu, Y.-J. and Romani, N. 2007. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **119**: 982–990.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E. and Declercq, W. 2013. Cell death by cornification. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**: 3471–3480.
- Elbe-Bürger, A. and Schuster, C. 2010. Development of the prenatal cutaneous antigen-presenting cell network. *Immunol. Cell Biol.*, **88**: 393–399.
- Elias, P.M., Ahn, S.K., Denda, M., Brown, B.E., Crumrine, D., Kimutai, L.K., Kömüves, L., Lee, S.H. and Feingold, K.R. 2002. Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J. Invest. Dermatol.*, **119**: 1128–1136.
- Eyerich, K., Brown, S.J., Perez White, B.E., Tanaka, R.J., Bissonette, R., Dhar, S., Bieber, T., Hijnen, D.J., Guttman-Yassky, E., Irvine, A., Thyssen, J.P., Vestergaard, C., Werfel, T., Wollenberg, A., Paller, A.S. and Reynolds, N.J. 2019. Human and computational models of atopic dermatitis: A review and perspectives by an expert panel of the International Eczema Council. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **143**: 36–45.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S.R., Schmidt-Weber, C.B. and Cavani, A. 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.*, **119**: 3573–3585.
- Fartasch, M. and Diepgen, T.L. 1992. The barrier function in atopic dry skin. Disturbance of membrane-coating granule exocytosis and formation of epidermal lipids? *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, **176**: 26–31.
- Feld, M., Garcia, R., Buddenkotte, J., Katayama, S., Lewis, K., Muirhead, G., Hevezi, P., Plessner, K., Schrupf, H., Krjutskov, K., Sergeeva, O., Müller, H.W., Tsoka, S., Kere, J., Dillon, S.R., Steinhoff, M. and Homey, B. 2016. The pruritus- and TH2-associated cytokine IL-31 promotes growth of sensory nerves. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **138**: 500-508.e24.

- Fornasa, G., Tsilingiri, K., Caprioli, F., Botti, F., Mapelli, M., Meller, S., Kislat, A., Homey, B., Di Sabatino, A., Sonzogni, A., Viale, G., Diaferia, G., Gori, A., Longhi, R., Penna, G. and Rescigno, M. 2015. Dichotomy of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in inflammatory disorders of the bowel and skin. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **136**: 413–422.
- Forsythe, P., McGarvey, L.P., Heaney, L.G., MacMahon, J. and Ennis, M. 2000. Sensory neuropeptides induce histamine release from bronchoalveolar lavage cells in both nonasthmatic coughers and cough variant asthmatics. *Clin. Exp. Allergy*, **30**: 225–232.
- Freinkel, D.R.K. and Woodley, D.T. 2001. *The Biology of the Skin*.
- Friend, S.L., Hosier, S., Nelson, A., Foxworthe, D., Williams, D.E. and Farr, A. 1994. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp. Hematol.*, **22**: 321–328.
- Fuchs, E. and Raghavan, S. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.*, **3**: 199–209.
- Fujita, H., Nograles, K.E., Kikuchi, T., Gonzalez, J., Carucci, J.A. and Krueger, J.G. 2009. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**: 21795–21800.
- Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., Yamamoto, Y., Wada, T., Kojima, T., Yokozaki, H., Yamashita, T., Kato, S., Sawada, N. and Chiba, H. 2008. Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 Are Critical for Vitamin D-dependent Ca²⁺ Absorption between Enterocytes. *Mol Biol Cell*, **19**: 1912–1921.
- Fyhrquist, N., Muirhead, G., Prast-Nielsen, S., Jeanmougin, M., Olah, P., Skoog, T., Jules-Clement, G., Feld, M., Barrientos-Somarribas, M., Sinkko, H., van den Bogaard, E.H., Zeeuwen, P.L.J.M., Rikken, G., Schalkwijk, J., Niehues, H., Däubener, W., Eller, S.K., Alexander, H., Pennino, D., *et al.* 2019. Microbe-host interplay in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Commun*, **10**.
- Garrido-Urbani, S., Bradfield, P.F., Lee, B.P.-L. and Imhof, B.A. 2008. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochem. Soc. Trans.*, **36**: 203–211.
- Gaspar, N.K. and Aidé, M.K. 2016. Atopic dermatitis: allergic dermatitis or neuroimmune dermatitis? *An Bras Dermatol*, **91**: 479–488.
- Geoghegan, J.A., Irvine, A.D. and Foster, T.J. 2018. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. *Trends Microbiol.*, **26**: 484–497.
- Gessner, A., Mohrs, K. and Mohrs, M. 2005. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J. Immunol.*, **174**: 1063–1072.
- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubreau, M., Dai, X.-M., Stanley, E.R., Randolph, G.J. and Merad, M. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.*, **7**: 265–273.
- Gittler, J.K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K.J., Wang, C.Q.F., Mitsui, H., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J.G. and Guttman-Yassky, E. 2012. Progressive activation of Th2/Th22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, **130**: 1344–1354.

- Grant, A.D., Cottrell, G.S., Amadesi, S., Trevisani, M., Nicoletti, P., Materazzi, S., Altier, C., Cenac, N., Zamponi, G.W., Bautista-Cruz, F., Lopez, C.B., Joseph, E.K., Levine, J.D., Liedtke, W., Vanner, S., Vergnolle, N., Geppetti, P. and Bunnett, N.W. 2007. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J. Physiol. (Lond.)*, **578**: 715–733.
- Grice, E.A. and Segre, J.A. 2011. The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**: 244–253.
- Gros, F., Fournel, S., Liégeois, S., Richard, D. and Soulas-Sprauel, P. 2018. *Atlas d'immunologie: De la détection du danger à l'immunothérapie*.
- Gruber, R., Elias, P.M., Crumrine, D., Lin, T.-K., Brandner, J.M., Hachem, J.-P., Presland, R.B., Fleckman, P., Janecke, A.R., Sandilands, A., McLean, W.H.I., Fritsch, P.O., Mildner, M., Tschachler, E. and Schmuth, M. 2011. Filaggrin Genotype in Ichthyosis Vulgaris Predicts Abnormalities in Epidermal Structure and Function. *Am J Pathol*, **178**: 2252–2263.
- Gschwandtner, M., Mildner, M., Mlitz, V., Gruber, F., Eckhart, L., Werfel, T., Gutzmer, R., Elias, P.M. and Tschachler, E. 2013. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. *Allergy*, **68**: 37–47.
- Guironnet, G., Dezutter-Dambuyant, C., Gaudillère, A., Maréchal, S., Schmitt, D. and Péguet-Navarro, J. 2001. Phenotypic and functional outcome of human monocytes or monocyte-derived dendritic cells in a dermal equivalent. *J. Invest. Dermatol.*, **116**: 933–939.
- Gurevich, D.B., Severn, C.E., Twomey, C., Greenhough, A., Cash, J., Toyne, A.M., Mellor, H. and Martin, P. 2018. Live imaging of wound angiogenesis reveals macrophage orchestrated vessel sprouting and regression. *EMBO J*, **37**.
- Gutowska-Owsiak, D., Schaupp, A.L., Salimi, M., Taylor, S. and Ogg, G.S. 2011. Interleukin-22 downregulates filaggrin expression and affects expression of profilaggrin processing enzymes. *Br. J. Dermatol.*, **165**: 492–498.
- Guttman-Yassky, E., Pavel, A.B., Zhou, L., Estrada, Y.D., Zhang, N., Xu, H., Peng, X., Wen, H.-C., Govas, P., Gudi, G., Ca, V., Fang, H., Salhi, Y., Back, J., Reddy, V., Bissonnette, R., Maari, C., Grossman, F. and Wolff, G. 2019. GBR 830, an anti-OX40, improves skin gene signatures and clinical scores in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **144**: 482-493.e7.
- Hamid, Q., Boguniewicz, M. and Leung, D.Y. 1994. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest*, **94**: 870–876.
- Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.-N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., Hilkens, C., Merad, M. and Collin, M. 2009. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med*, **206**: 371–385.
- Haniffa, M., Gunawan, M. and Jardine, L. 2015. Human skin dendritic cells in health and disease. *J. Dermatol. Sci.*, **77**: 85–92.
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., Larbi, A., Tan, P., Zhao, H., Poidinger, M., Pagan, S., Cookson, S., Dickinson, R., Dimmick, I., Jarrett, R.F., *et al.* 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*, **37**: 60–73.

- Hara, J., Higuchi, K., Okamoto, R., Kawashima, M. and Imokawa, G. 2000. High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, **115**: 406–413.
- Harder, J., Dressel, S., Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Mrowietz, U., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J.-M., Schwarz, T. and Gläser, R. 2010. Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *J. Invest. Dermatol.*, **130**: 1355–1364.
- Hart, P.H., Gorman, S. and Finlay-Jones, J.J. 2011. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat. Rev. Immunol.*, **11**: 584–596.
- Hartmann, B., Riedel, R., Jörss, K., Loddenkemper, C., Steinmeyer, A., Zügel, U., Babina, M., Radbruch, A. and Worm, M. 2012. Vitamin D receptor activation improves allergen-triggered eczema in mice. *J. Invest. Dermatol.*, **132**: 330–336.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W., Forsberg, E.C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., *et al.* 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, **38**: 792–804.
- Hawro, T., Saluja, R., Weller, K., Altrichter, S., Metz, M. and Maurer, M. 2014. Interleukin-31 does not induce immediate itch in atopic dermatitis patients and healthy controls after skin challenge. *Allergy*, **69**: 113–117.
- Heger, L., Balk, S., Lühr, J.J., Heidkamp, G.F., Lehmann, C.H.K., Hatscher, L., Purbojo, A., Hartmann, A., Garcia-Martin, F., Nishimura, S.-I., Cesnjevar, R., Nimmerjahn, F. and Dudziak, D. 2018. CLEC10A Is a Specific Marker for Human CD1c+ Dendritic Cells and Enhances Their Toll-Like Receptor 7/8-Induced Cytokine Secretion. *Front Immunol*, **9**: 744.
- Heilborn, J.D., Weber, G., Grönberg, A., Dieterich, C. and Stähle, M. 2010. Topical treatment with the vitamin D analogue calcipotriol enhances the upregulation of the antimicrobial protein hCAP18/LL-37 during wounding in human skin in vivo. *Exp. Dermatol.*, **19**: 332–338.
- Horejs-Hoeck, J., Schwarz, H., Lamprecht, S., Maier, E., Hainzl, S., Schmittner, M., Posselt, G., Stoecklinger, A., Hawranek, T. and Duschl, A. 2012. Dendritic cells activated by IFN- γ /STAT1 express IL-31 receptor and release proinflammatory mediators upon IL-31 treatment. *J. Immunol.*, **188**: 5319–5326.
- Howell, M.D., Kim, B.E., Gao, P., Grant, A.V., Boguniewicz, M., DeBenedetto, A., Schneider, L., Beck, L.A., Barnes, K.C. and Leung, D.Y.M. 2009. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **124**: R7–R12.
- Hsieh, S.-T., Lin, W.-M., Chiang, H.-Y., Huang, I.-T., Ko, M.-H., Chang, Y.-C. and Chen, W.-P. 1997. Skin Innervation and Its Effects on the Epidermis. *J. Biomed. Sci.*, **4**: 264–268.
- Huang, C.M., Lara-Corrales, I. and Pope, E. 2018. Effects of Vitamin D levels and supplementation on atopic dermatitis: A systematic review. *Pediatr Dermatol*, **35**: 754–760.
- Hubiche, T., Ged, C., Benard, A., Léauté-Labrèze, C., McElreavey, K., de Verneuil, H., Taïeb, A. and Boralevi, F. 2007. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort. *Acta Derm. Venereol.*, **87**: 499–505.

- Hyppönen, E., Sovio, U., Wjst, M., Patel, S., Pekkanen, J., Hartikainen, A.-L. and Järvelin, M.-R. 2004. Infant vitamin d supplementation and allergic conditions in adulthood: northern Finland birth cohort 1966. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1037**: 84–95.
- Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F. and D'Ambrosio, D. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.*, **194**: 847–853.
- Ilves, T. and Harvima, I.T. 2013. OX40 ligand and OX40 are increased in atopic dermatitis lesions but do not correlate with clinical severity. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **27**: e197-205.
- Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P.W., Matsushima, K. and Yoshie, O. 1999. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int. Immunol.*, **11**: 81–88.
- Imamachi, N., Park, G.H., Lee, H., Anderson, D.J., Simon, M.I., Basbaum, A.I. and Han, S.-K. 2009. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**: 11330–11335.
- Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. 2011. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D* (A. C. Ross, C. L. Taylor, A. L. Yaktine, and H. B. Del Valle, eds).
- Ishikawa, J., Narita, H., Kondo, N., Hotta, M., Takagi, Y., Masukawa, Y., Kitahara, T., Takema, Y., Koyano, S., Yamazaki, S. and Hatamochi, A. 2010. Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J. Invest. Dermatol.*, **130**: 2511–2514.
- Itin, P.H., Pittelkow, M.R. and Kumar, R. 1994. Effects of vitamin D metabolites on proliferation and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free or defined culture medium. *Endocrinology*, **135**: 1793–1798.
- Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X.-F., Yao, Z., Cao, W. and Liu, Y.-J. 2005. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med*, **202**: 1213–1223.
- Jakasa, I., Koster, E.S., Calkoen, F., McLean, W.H.I., Campbell, L.E., Bos, J.D., Verberk, M.M. and Kezic, S. 2011. Skin barrier function in healthy subjects and patients with atopic dermatitis in relation to filaggrin loss-of-function mutations. *J. Invest. Dermatol.*, **131**: 540–542.
- Janeway, C.A. and Murphy, K. 2018. *Immunobiologie de Janeway*.
- Jang, H., Matsuda, A., Jung, K., Karasawa, K., Matsuda, K., Oida, K., Ishizaka, S., Ahn, G., Amagai, Y., Moon, C., Kim, S.-H., Arkwright, P.D., Takamori, K., Matsuda, H. and Tanaka, A. 2015. Skin pH is the Master Switch of Kallikrein 5-Mediated Skin Barrier Destruction in a Murine Atopic Dermatitis Model. *J. Invest. Dermatol.*, doi: 10.1038/jid.2015.363.
- Janson, D., Saintigny, G., Mahé, C. and El Ghalbzouri, A. 2013. Papillary fibroblasts differentiate into reticular fibroblasts after prolonged in vitro culture. *Exp. Dermatol.*, **22**: 48–53.
- Janson, D., Saintigny, G., Zeypveld, J., Mahé, C. and El Ghalbzouri, A. 2014. TGF- β 1 induces differentiation of papillary fibroblasts to reticular fibroblasts in monolayer culture but not in human skin equivalents. *Eur J Dermatol*, **24**: 342–348.

- Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G.S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P.J., Vreeken, R.J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., Lavrijsen, A.P. and Bouwstra, J.A. 2012. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J. Lipid Res.*, **53**: 2755–2766.
- Järvikallio, A., Harvima, I.T. and Naukkarinen, A. 2003. Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch. Dermatol. Res.*, **295**: 2–7.
- Jeffery, L.E., Burke, F., Mura, M., Zheng, Y., Qureshi, O.S., Hewison, M., Walker, L.S.K., Lammas, D.A., Raza, K. and Sansom, D.M. 2009. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J. Immunol.*, **183**: 5458–5467.
- Jeon, S.-M. and Shin, E.-A. 2018. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med*, **50**.
- Jiao, D., Wong, C.-K., Qiu, H.-N., Dong, J., Cai, Z., Chu, M., Hon, K.-L., Tsang, M.S.-M. and Lam, C.W.-K. 2016. NOD2 and TLR2 ligands trigger the activation of basophils and eosinophils by interacting with dermal fibroblasts in atopic dermatitis-like skin inflammation. *Cell. Mol. Immunol.*, **13**: 535–550.
- Jin, H., He, R., Oyoshi, M. and Geha, R. 2009. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, **129**: 31–40.
- Johanek, L.M., Meyer, R.A., Friedman, R.M., Greenquist, K.W., Shim, B., Borzan, J., Hartke, T., LaMotte, R.H. and Ringkamp, M. 2008. A role for polymodal C-fiber afferents in nonhistaminergic itch. *J. Neurosci.*, **28**: 7659–7669.
- Johanek, L.M., Meyer, R.A., Hartke, T., Hobelmann, J.G., Maine, D.N., LaMotte, R.H. and Ringkamp, M. 2007. Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch. *J. Neurosci.*, **27**: 7490–7497.
- Johansson, S.G.O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Ortega Martell, J.A., Platts-Mills, T.A.E., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P. and Williams, H.C. 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **113**: 832–836.
- Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. and Enk, A.H. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.*, **27**: 3135–3142.
- Kamsteeg, M., Bergers, M., de Boer, R., Zeeuwen, P.L.J.M., Hato, S.V., Schalkwijk, J. and Tjabringa, G.S. 2011. Type 2 helper T-cell cytokines induce morphologic and molecular characteristics of atopic dermatitis in human skin equivalent. *Am. J. Pathol.*, **178**: 2091–2099.
- Kashem, S.W., Haniffa, M. and Kaplan, D.H. 2017. Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annu. Rev. Immunol.*, **35**: 469–499.
- Kashyap, M., Rochman, Y., Spolski, R., Samsel, L. and Leonard, W.J. 2011. Thymic Stromal Lymphopoietin is Produced by Dendritic Cells. *J Immunol*, **187**: 1207–1211.
- Kawakami, T., Ando, T., Kimura, M., Wilson, B.S. and Kawakami, Y. 2009. Mast cells in atopic dermatitis. *Curr. Opin. Immunol.*, **21**: 666–678.

- Keuschnigg, J., Karinen, S., Auvinen, K., Irjala, H., Mpindi, J.-P., Kallioniemi, O., Hautaniemi, S., Jalkanen, S. and Salmi, M. 2013. Plasticity of Blood- and Lymphatic Endothelial Cells and Marker Identification. *PLoS One*, **8**.
- Kezic, S., Kemperman, P.M.J.H., Koster, E.S., de Jongh, C.M., Thio, H.B., Campbell, L.E., Irvine, A.D., McLean, W.H.I., McLean, I.W.H., Puppels, G.J. and Caspers, P.J. 2008. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, **128**: 2117–2119.
- Kiehl, P., Falkenberg, K., Vogelbruch, M. and Kapp, A. 2001. Tissue eosinophilia in acute and chronic atopic dermatitis: a morphometric approach using quantitative image analysis of immunostaining. *Br. J. Dermatol.*, **145**: 720–729.
- Kim, B.E., Leung, D.Y.M., Boguniewicz, M. and Howell, M.D. 2008. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol*, **126**: 332–337.
- Kim, D., Kobayashi, T. and Nagao, K. 2019. Research Techniques Made Simple: Mouse Models of Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, **139**: 984-990.e1.
- Kim, M.J., Kim, S.-N., Lee, Y.W., Choe, Y.B. and Ahn, K.J. 2016. Vitamin D Status and Efficacy of Vitamin D Supplementation in Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, **8**.
- Kim, S.-J., Park, G.H., Kim, D., Lee, J., Min, H., Wall, E., Lee, C.J., Simon, M.I., Lee, S.J. and Han, S.-K. 2011. Analysis of cellular and behavioral responses to imiquimod reveals a unique itch pathway in transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)-expressing neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: 3371.
- Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Sato, T., Okumura, K., Nogami, M., Hasegawa, Y., Niimi, H., Yanagisawa, J., Tanaka, T. and Kato, S. 1998. Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets. *N. Engl. J. Med.*, **338**: 653–661.
- Kittaka, H. and Tominaga, M. 2017. The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin. *Allergol Int*, **66**: 22–30.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., Reiter, Y., Banchereau, J. and Ueno, H. 2008. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity*, **29**: 497–510.
- Klose, C.S.N. and Artis, D. 2016. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.*, **17**: 765–774.
- Kolter, J., Feuerstein, R., Zeis, P., Hagemeyer, N., Paterson, N., d'Errico, P., Baasch, S., Amann, L., Masuda, T., Lösslein, A., Gharun, K., Meyer-Luehmann, M., Waskow, C., Franzke, C.-W., Grün, D., Lämmermann, T., Prinz, M. and Henneke, P. 2019. A Subset of Skin Macrophages Contributes to the Surveillance and Regeneration of Local Nerves. *Immunity*, **50**: 1482-1497.e7.
- Komatsu, N., Saijoh, K., Kuk, C., Liu, A.C., Khan, S., Shirasaki, F., Takehara, K. and Diamandis, E.P. 2007. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp. Dermatol.*, **16**: 513–519.

- Kopfnagel, V., Harder, J. and Werfel, T. 2013. Expression of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and possible immunoregulatory functions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **13**: 531–536.
- Krishnasamy, K., Limbourg, A., Kapanadze, T., Gamrekelashvili, J., Beger, C., Häger, C., Lozanovski, V.J., Falk, C.S., Napp, L.C., Bauersachs, J., Mack, M., Haller, H., Weber, C., Adams, R.H. and Limbourg, F.P. 2017. Blood vessel control of macrophage maturation promotes arteriogenesis in ischemia. *Nat Commun*, **8**: 952.
- Küchler, S., Henkes, D., Eckl, K.-M., Ackermann, K., Plendl, J., Korting, H.-C., Hennies, H.-C. and Schäfer-Korting, M. 2011. Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down. *Altern Lab Anim*, **39**: 471–480.
- Kuroda, Y., Yuki, T., Takahashi, Y., Sakaguchi, H., Matsunaga, K. and Itagaki, H. 2017. Long form of thymic stromal lymphopoietin of keratinocytes is induced by protein allergens. *J Immunotoxicol*, **14**: 178–187.
- Kwan, W.-H., Navarro-Sanchez, E., Dumortier, H., Decossas, M., Vachon, H., dos Santos, F.B., Fridman, H.W., Rey, F.A., Harris, E., Despres, P. and Mueller, C.G. 2008. Dermal-type macrophages expressing CD209/DC-SIGN show inherent resistance to dengue virus growth. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**: e311.
- Landheer, J., Giovannone, B., Mattson, J.D., Tjabringa, S., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., McClanahan, T., de Waal Malefyt, R., Knol, E. and Hijnen, D. 2013. Epicutaneous application of house dust mite induces thymic stromal lymphopoietin in nonlesional skin of patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **132**: 1252–1254.
- Landheer, J., Giovannone, B., Sadekova, S., Tjabringa, S., Hofstra, C., Dechering, K., Bruijnzeel-Koomen, C., Chang, C., Ying, Y., de Waal Malefyt, R., Hijnen, D. and Knol, E. 2015. TSLP is differentially regulated by vitamin D3 and cytokines in human skin. *Immun Inflamm Dis*, **3**: 32–43.
- Laverdet, B., Danigo, A., Girard, D., Magy, L., Demiot, C. and Desmoulière, A. 2015. Skin innervation: important roles during normal and pathological cutaneous repair. *Histol. Histopathol.*, **30**: 875–892.
- Lee, U.H., Kim, B.E., Kim, D.J., Cho, Y.G., Ye, Y.M. and Leung, D.Y.M. 2017. Atopic dermatitis is associated with reduced corneodesmosin expression: role of cytokine modulation and effects on viral penetration. *Br. J. Dermatol.*, **176**: 537–540.
- Leman, G., Moosbrugger-Martinz, V., Blunder, S., Pavel, P. and Dubrac, S. 2019. 3D-Organotypic Cultures to Unravel Molecular and Cellular Abnormalities in Atopic Dermatitis and Ichthyosis Vulgaris. *Cells*, **8**.
- Leyva-Castillo, J.M., Hener, P., Michea, P., Karasuyama, H., Chan, S., Soumelis, V. and Li, M. 2013. Skin thymic stromal lymphopoietin initiates Th2 responses through an orchestrated immune cascade. *Nat Commun*, **4**: 2847.
- Li, B. and Wang, J.H.-C. 2011. Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement. *J Tissue Viability*, **20**: 108–120.
- Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Kato, S., Metzger, D. and Chambon, P. 2006. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**: 11736–11741.

- Liu, M., Lee, M.H., Cohen, M., Bommakanti, M. and Freedman, L.P. 1996. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.*, **10**: 142–153.
- Liu, Q., Tang, Z., Surdenikova, L., Kim, S., Patel, K.N., Kim, A., Ru, F., Guan, Y., Weng, H.-J., Geng, Y., Undem, B.J., Kollarik, M., Chen, Z.-F., Anderson, D.J. and Dong, X. 2009. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell*, **139**: 1353–1365.
- Liu, T., Xu, Z.-Z., Park, C.-K., Berta, T. and Ji, R.-R. 2010. Toll-like receptor 7 mediates pruritus. *Nat. Neurosci.*, **13**: 1460–1462.
- Liu, Y.-J. 2006. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med*, **203**: 269–273.
- López-Bravo, M., Minguito de la Escalera, M., Domínguez, P.M., González-Cintado, L., del Fresno, C., Martín, P., Martínez del Hoyo, G. and Ardavin, C. 2013. IL-4 blocks TH1-polarizing/inflammatory cytokine gene expression during monocyte-derived dendritic cell differentiation through histone hypoacetylation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **132**: 1409–1419.
- Magram, J., Connaughton, S.E., Warriar, R.R., Carvajal, D.M., Wu, C.Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D.A. and Gately, M.K. 1996. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity*, **4**: 471–481.
- Malissen, B., Tamoutounour, S. and Henri, S. 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.*, **14**: 417–428.
- Mashiko, S., Mehta, H., Bissonnette, R. and Sarfati, M. 2017. Increased frequencies of basophils, type 2 innate lymphoid cells and Th2 cells in skin of patients with atopic dermatitis but not psoriasis. *J. Dermatol. Sci.*, **88**: 167–174.
- Mathers, A.R., Janelins, B.M., Rubin, J.P., Tkacheva, O.A., Shufesky, W.J., Watkins, S.C., Morelli, A.E. and Larregina, A.T. 2009. Differential capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses. *J. Immunol.*, **182**: 921–933.
- Matsumoto, K., Hashimoto, K., Nishida, Y., Hashiro, M. and Yoshikawa, K. 1990. Growth-inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on normal human keratinocytes cultured in serum-free medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**: 916–923.
- McAleer, M.A. and Irvine, A.D. 2013. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **131**: 280–291.
- McGovern, N., Schlitzer, A., Gunawan, M., Jardine, L., Shin, A., Poyner, E., Green, K., Dickinson, R., Wang, X.-N., Low, D., Best, K., Covins, S., Milne, P., Pagan, S., Aljefri, K., Windebank, M., Miranda-Saavedra, D., Larbi, A., Wasan, P.S., *et al.* 2014. Human dermal CD14⁺ cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity*, **41**: 465–477.
- McPherson, T., Sherman, V.J., Aslam, A., Crack, L., Chan, H., Lloyd-Lavery, A., Jones, L., Ardern-Jones, M. and Ogg, G. 2010. Filaggrin null mutations associate with increased frequencies of allergen-specific CD4⁺ T-helper 2 cells in patients with atopic eczema. *Br. J. Dermatol.*, **163**: 544–549.
- Mélissopoulos, A. and Levacher, C. 1998. *La peau: structure et physiologie*.
- Merad, M., Ginhoux, F. and Collin, M. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.*, **8**: 935–947.

- Meylan, P., Lang, C., Mermoud, S., Johannsen, A., Norrenberg, S., Hohl, D., Vial, Y., Prod'hom, G., Greub, G., Kypriotou, M. and Christen-Zaech, S. 2017. Skin Colonization by *Staphylococcus aureus* Precedes the Clinical Diagnosis of Atopic Dermatitis in Infancy. *J. Invest. Dermatol.*, **137**: 2497–2504.
- Mildner, M., Jin, J., Eckhart, L., Kezic, S., Gruber, F., Barresi, C., Stremnitzer, C., Buchberger, M., Mlitz, V., Ballaun, C., Sterniczky, B., Födinger, D. and Tschachler, E. 2010. Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. *J. Invest. Dermatol.*, **130**: 2286–2294.
- Milovanovic, M., Drozdenko, G., Weise, C., Babina, M. and Worm, M. 2010. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *J. Invest. Dermatol.*, **130**: 2621–2628.
- Mine, S., Fortunel, N.O., Pigeon, H. and Asselineau, D. 2008. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS ONE*, **3**: e4066.
- Mizwicki, M.T. and Norman, A.W. 2009. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal*, **2**: re4.
- Moosbrugger-Martinz, V., Schmuth, M. and Dubrac, S. 2017. A Mouse Model for Atopic Dermatitis Using Topical Application of Vitamin D3 or of Its Analog MC903. *Methods Mol. Biol.*, **1559**: 91–106.
- Mueller, T.D., Zhang, J.-L., Sebald, W. and Duschl, A. 2002. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**: 237–250.
- Muller, Q., Beaudet, M.-J., De Serres-Bérard, T., Bellenfant, S., Flacher, V. and Berthod, F. 2018. Development of an innervated tissue-engineered skin with human sensory neurons and Schwann cells differentiated from iPS cells. *Acta Biomater*, **82**: 93–101.
- Muroyama, A. and Lechler, T. 2012. Polarity and Stratification of the Epidermis. *Semin Cell Dev Biol*, **23**: 890–896.
- Nakamura, Y., Oscherwitz, J., Cease, K.B., Chan, S.M., Muñoz-Planillo, R., Hasegawa, M., Villaruz, A.E., Cheung, G.Y.C., McGavin, M.J., Travers, J.B., Otto, M., Inohara, N. and Núñez, G. 2013. *Staphylococcus* δ -toxin promotes mouse allergic skin disease by inducing mast cell degranulation. *Nature*, **503**: 397–401.
- Nakashima, C., Otsuka, A. and Kabashima, K. 2018. Interleukin-31 and interleukin-31 receptor: New therapeutic targets for atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.*, **27**: 327–331.
- Nakatsuji, T., Chen, T.H., Narala, S., Chun, K.A., Two, A.M., Yun, T., Shafiq, F., Kotol, P.F., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Latif, H., Kim, J.-N., Lockhart, A., Artis, K., David, G., Taylor, P., Streib, J., Dorrestein, P.C., Grier, A., *et al.* 2017. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci Transl Med*, **9**.
- Nakatsuji, T., Chen, T.H., Two, A.M., Chun, K.A., Narala, S., Geha, R.S., Hata, T.R. and Gallo, R.L. 2016. *Staphylococcus aureus* exploits epidermal barrier defects in atopic dermatitis to trigger cytokine expression. *J Invest Dermatol*, **136**: 2192–2200.
- Navarini, A.A., French, L.E. and Hofbauer, G.F.L. 2011. Interrupting IL-6-receptor signaling improves atopic dermatitis but associates with bacterial superinfection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **128**: 1128–1130.

- Nemere, I., Yoshimoto, Y. and Norman, A.W. 1984. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology*, **115**: 1476–1483.
- Neve, A., Corrado, A. and Cantatore, F.P. 2014. Immunomodulatory effects of vitamin D in peripheral blood monocyte-derived macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Med.*, **14**: 275–283.
- Niehues, H., Schalkwijk, J., van Vlijmen-Willems, I.M.J.J., Rodijk-Olthuis, D., van Rossum, M.M., Wladykowski, E., Brandner, J.M., van den Bogaard, E.H.J. and Zeeuwen, P.L.J.M. 2017. Epidermal equivalents of filaggrin null keratinocytes do not show impaired skin barrier function. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **139**: 1979-1981.e13.
- Nogralles, K.E., Zaba, L.C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., Bergman, R., Krueger, J.G. and Guttman-Yassky, E. 2009. IL-22-producing “T22” T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **123**: 1244-1252.e2.
- Nomura, I., Goleva, E., Howell, M.D., Hamid, Q.A., Ong, P.Y., Hall, C.F., Darst, M.A., Gao, B., Boguniewicz, M., Travers, J.B. and Leung, D.Y.M. 2003. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J. Immunol.*, **171**: 3262–3269.
- Norman, A.W., Okamura, W.H., Hammond, M.W., Bishop, J.E., Dormanen, M.C., Bouillon, R., van Baelen, H., Ridall, A.L., Daane, E., Khoury, R. and Farach-Carson, M.C. 1997. Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Mol. Endocrinol.*, **11**: 1518–1531.
- Nozaki, S., Feliciani, C. and Sauder, D.N. 1992. Keratinocyte cytokines. *Adv Dermatol*, **7**: 83–100; discussion 101.
- Oaklander, A.L. and Siegel, S.M. 2005. Cutaneous innervation: form and function. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **53**: 1027–1037.
- Oetjen, L.K. and Kim, B.S. 2018. Interactions of the immune and sensory nervous systems in atopy. *FEBS J.*, **285**: 3138–3151.
- Oetjen, L.K., Mack, M.R., Feng, J., Whelan, T.M., Niu, H., Guo, C.J., Chen, S., Trier, A.M., Xu, A.Z., Tripathi, S.V., Luo, J., Gao, X., Yang, L., Hamilton, S.L., Wang, P.L., Brestoff, J.R., Council, M.L., Brasington, R., Schaffer, A., *et al.* 2017. Sensory Neurons Co-opt Classical Immune Signaling Pathways to Mediate Chronic Itch. *Cell*, **171**: 217-228.e13.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G. and Förster, R. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, **21**: 279–288.
- Okuyama, R., Tagami, H. and Aiba, S. 2008. Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J. Dermatol. Sci.*, **49**: 187–194.
- Omori, M. and Ziegler, S. 2007. Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J. Immunol.*, **178**: 1396–1404.
- Ong, P.Y. 2019. The PATHOGENesis of Food Allergy. *Front Pediatr*, **7**.

- Orfali, R.L., Sato, M.N., Santos, V.G., Titz, T.O., Brito, C.A., Duarte, A.J.S., Takaoka, R. and Aoki, V. 2015. Staphylococcal enterotoxin B induces specific IgG4 and IgE antibody serum levels in atopic dermatitis. *Int. J. Dermatol.*, **54**: 898–904.
- Otsuka, Y., Watanabe, E., Shinya, E., Okura, S., Saeki, H., Geijtenbeek, T.B.H. and Takahashi, H. 2018. Differentiation of Langerhans Cells from Monocytes and Their Specific Function in Inducing IL-22–Specific Th Cells. *The Journal of Immunology*, **201**: 3006–3016.
- Owen, J., Punt, J. and Stranford, S. 2014. *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*.
- Palmer, M.T., Lee, Y.K., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Bikle, D.D., Jetten, A.M. and Weaver, C.T. 2011. Lineage-specific Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on the Development of Effector CD4 T Cells. *J Biol Chem*, **286**: 997–1004.
- Pandey, A., Ozaki, K., Baumann, H., Levin, S.D., Puel, A., Farr, A.G., Ziegler, S.F., Leonard, W.J. and Lodish, H.F. 2000. Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat. Immunol.*, **1**: 59–64.
- Pattarini, L., Trichot, C., Bogiatzi, S., Grandclaudon, M., Meller, S., Keuylian, Z., Durand, M., Volpe, E., Madonna, S., Cavani, A., Chiricozzi, A., Romanelli, M., Hori, T., Hovnanian, A., Homey, B. and Soumelis, V. 2017. TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. *J. Exp. Med.*, **214**: 1529–1546.
- Paul, W.E. and Zhu, J. 2010. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*, **10**: 225–235.
- Pendaries, V., Malaise, J., Pellerin, L., Le Lamer, M., Nachat, R., Kezic, S., Schmitt, A.-M., Paul, C., Poumay, Y., Serre, G. and Simon, M. 2014. Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, **134**: 2938–2946.
- Penna, G., Amuchastegui, S., Giarratana, N., Daniel, K.C., Vulcano, M., Sozzani, S. and Adorini, L. 2007. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.*, **178**: 145–153.
- Philippeos, C., Telerman, S.B., Oulès, B., Pisco, A.O., Shaw, T.J., Elgueta, R., Lombardi, G., Driskell, R.R., Soldin, M., Lynch, M.D. and Watt, F.M. 2018. Spatial and Single-Cell Transcriptional Profiling Identifies Functionally Distinct Human Dermal Fibroblast Subpopulations. *J. Invest. Dermatol.*, **138**: 811–825.
- Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B.E., Dal Cin, E., Allavena, P. and Di Carlo, V. 2000. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, **164**: 4443–4451.
- Pike, J.W. and Meyer, M.B. 2014. Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **144 Pt A**: 5–11.
- Prassas, I., Eissa, A., Poda, G. and Diamandis, E.P. 2015. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nat Rev Drug Discov*, **14**: 183–202.
- Provvedini, D.M., Sakagami, Y. and Manolagas, S.C. 1989. Distinct target cells and effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and glucocorticoids in the rat thymus gland. *Endocrinology*, **124**: 1532–1538.

- Prüfer, K., Racz, A., Lin, G.C. and Barsony, J. 2000. Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. *J. Biol. Chem.*, **275**: 41114–41123.
- Rebane, A., Zimmermann, M., Aab, A., Baurecht, H., Koreck, A., Karelson, M., Abram, K., Metsalu, T., Pihlap, M., Meyer, N., Fölster-Holst, R., Nagy, N., Kemeny, L., Kingo, K., Vilo, J., Illig, T., Akdis, M., Franke, A., Novak, N., *et al.* 2012. Mechanisms of IFN- γ -induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **129**: 1297–1306.
- Reche, P.A., Soumelis, V., Gorman, D.M., Clifford, T., Liu Mr, null, Travis, M., Zurawski, S.M., Johnston, J., Liu, Y.J., Spits, H., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A. and Bazan, J.F. 2001. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J. Immunol.*, **167**: 336–343.
- Reefer, A.J., Satinover, S.M., Wilson, B.B. and Woodfolk, J.A. 2007. The relevance of microbial allergens to the IgE antibody repertoire in atopic and nonatopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **120**: 156–163.
- Reichrath, J., Perez, A., Müller, S.M., Chen, T.C., Kerber, A., Bahmer, F.A. and Holick, M.F. 1997. Topical calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) treatment of psoriasis: an immunohistological evaluation. *Acta Derm. Venereol.*, **77**: 268–272.
- Ribatti, D., Nico, B. and Crivellato, E. 2011. The role of pericytes in angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, **55**: 261–268.
- Rigby, W.F., Denome, S. and Fanger, M.W. 1987. Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Specific inhibition at the level of messenger RNA. *J Clin Invest*, **79**: 1659–1664.
- Rippke, F., Schreiner, V., Doering, T. and Maibach, H.I. 2004. Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus Aureus*. *Am J Clin Dermatol*, **5**: 217–223.
- Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U. and Leonard, W.J. 2010. Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: 19455–19460.
- Rodenbeck, D.L., Silverberg, J.I. and Silverberg, N.B. 2016. Phototherapy for atopic dermatitis. *Clin. Dermatol.*, **34**: 607–613.
- Roggenkamp, D., Falkner, S., Stäb, F., Petersen, M., Schmelz, M. and Neufang, G. 2012. Atopic keratinocytes induce increased neurite outgrowth in a coculture model of porcine dorsal root ganglia neurons and human skin cells. *J. Invest. Dermatol.*, **132**: 1892–1900.
- Roggenkamp, D., Köpnick, S., Stäb, F., Wenck, H., Schmelz, M. and Neufang, G. 2013. Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model. *J. Invest. Dermatol.*, **133**: 1620–1628.
- Ross, A.C., Manson, J.E., Abrams, S.A., Aloia, J.F., Brannon, P.M., Clinton, S.K., Durazo-Arvizu, R.A., Gallagher, J.C., Gallo, R.L., Jones, G., Kovacs, C.S., Mayne, S.T., Rosen, C.J. and Shapses, S.A. 2011. The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. *J Clin Endocrinol Metab*, **96**: 53–58.

- Ruzicka, T., Hanifin, J.M., Furue, M., Pulka, G., Mlynarczyk, I., Wollenberg, A., Galus, R., Etoh, T., Mihara, R., Yoshida, H., Stewart, J., Kabashima, K. and XCIMA Study Group. 2017. Anti-Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis. *N. Engl. J. Med.*, **376**: 826–835.
- Saba, I., Jakubowska, W., Bolduc, S. and Chabaud, S. 2018. Engineering Tissues without the Use of a Synthetic Scaffold: A Twenty-Year History of the Self-Assembly Method. *Biomed Res Int*, **2018**.
- Salabert-Le Guen, N., Héumont, C., Delbove, A., Poli, C., Braudeau, C., Fantou, A., Amouriaux, K., Bériou, G., Martin, J.C., Colas, L., Soumelis, V. and Josien, R. 2018. Thymic stromal lymphopoietin does not activate human basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **141**: 1476–1479.e6.
- Salimi, M., Barlow, J.L., Saunders, S.P., Xue, L., Gutowska-Owsiak, D., Wang, X., Huang, L.-C., Johnson, D., Scanlon, S.T., McKenzie, A.N.J., Fallon, P.G. and Ogg, G.S. 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.*, **210**: 2939–2950.
- Salter, B.M., Oliveria, J.P., Nusca, G., Smith, S.G., Watson, R.M., Comeau, M., Sehmi, R. and Gauvreau, G.M. 2015. Thymic stromal lymphopoietin activation of basophils in patients with allergic asthma is IL-3 dependent. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **136**: 1636–1644.
- Saluja, R., Zoltowska, A., Ketelaar, M.E. and Nilsson, G. 2016. IL-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin in mast cell functions. *Eur. J. Pharmacol.*, **778**: 68–76.
- Santarasci, V., Cosmi, L., Maggi, L., Liotta, F. and Annunziato, F. 2013. IL-1 and T Helper Immune Responses. *Front Immunol*, **4**.
- Sato-Deguchi, E., Imafuku, S., Chou, B., Ishii, K., Hiromatsu, K. and Nakayama, J. 2012. Topical vitamin D₃ analogues induce thymic stromal lymphopoietin and cathelicidin in psoriatic skin lesions. *Br. J. Dermatol.*, **167**: 77–84.
- Schmelz, M., Schmidt, R., Weidner, C., Hilliges, M., Torebjork, H.E. and Handwerker, H.O. 2003. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J. Neurophysiol.*, **89**: 2441–2448.
- Schmitt, E.G. and Williams, C.B. 2013. Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol*, **4**: 152.
- Schmitt, J., Spuls, P.I., Thomas, K.S., Simpson, E., Furue, M., Deckert, S., Dohil, M., Apfelbacher, C., Singh, J.A., Chalmers, J., Williams, H.C. and HOME initiative collaborators. 2014. The Harmonising Outcome Measures for Eczema (HOME) statement to assess clinical signs of atopic eczema in trials. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **134**: 800–807.
- Scudellari, M. 2017. News Feature: Cleaning up the hygiene hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**: 1433–1436.
- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M. and Kupper, T.S. 2012. Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity*, **36**: 873–884.
- Shikotra, A., Choy, D.F., Ohri, C.M., Doran, E., Butler, C., Hargadon, B., Shelley, M., Abbas, A.R., Austin, C.D., Jackman, J., Wu, L.C., Heaney, L.G., Arron, J.R. and Bradding, P. 2012. Increased expression of immunoreactive thymic stromal lymphopoietin in patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **129**: 104-111.e1–9.

- Shim, W.-S., Tak, M.-H., Lee, M.-H., Kim, Minjung, Kim, Minkyung, Koo, J.-Y., Lee, C.-H., Kim, Misook and Oh, U. 2007. TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *J. Neurosci.*, **27**: 2331–2337.
- Shoulders, M.D. and Raines, R.T. 2009. COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. *Annu Rev Biochem*, **78**: 929–958.
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J. and Potempa, J. 2004. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**: 4673–4679.
- Sigmundsdottir, H., Pan, J., Debes, G.F., Alt, C., Habtezion, A., Soler, D. and Butcher, E.C. 2007. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to “program” T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat. Immunol.*, **8**: 285–293.
- Simons, F.E.R. 2004. Advances in H1-antihistamines. *N. Engl. J. Med.*, **351**: 2203–2217.
- Simpson, E.L., Bieber, T., Guttman-Yassky, E., Beck, L.A., Blauvelt, A., Cork, M.J., Silverberg, J.I., Deleuran, M., Kataoka, Y., Lacour, J.-P., Kingo, K., Worm, M., Poulin, Y., Wollenberg, A., Soo, Y., Graham, N.M.H., Pirozzi, G., Akinlade, B., Staudinger, H., *et al.* 2016. Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. *N. Engl. J. Med.*, **375**: 2335–2348.
- Simpson, E.L., Parnes, J.R., She, D., Crouch, S., Rees, W., Mo, M. and van der Merwe, R. 2019. Tezepelumab, an anti-thymic stromal lymphopoietin monoclonal antibody, in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis: A randomized phase 2a clinical trial. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **80**: 1013–1021.
- Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Hill, D.A., Kim, B.S., Headley, M.B., Doering, T.A., Wherry, E.J., Jessup, H.K., Siegel, L.A., Kambayashi, T., Dudek, E.C., Kubo, M., Cianferoni, A., Spergel, J.M., Ziegler, S.F., Comeau, M.R. and Artis, D. 2011. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature*, **477**: 229–233.
- Sittig, S.P., Bakdash, G., Weiden, J., Sköld, A.E., Tel, J., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M. and Schreiber, G. 2016. A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets. *Mediators Inflamm.*, **2016**: 3605643.
- Sommer, A. and Fabri, M. 2015. Vitamin D Regulates Cytokine Patterns Secreted by Dendritic Cells to Promote Differentiation of IL-22-Producing T Cells. *PLoS One*, **10**.
- Sonkoly, E., Muller, A., Lauerma, A.I., Pivarcsi, A., Soto, H., Kemeny, L., Alenius, H., Dieu-Nosjean, M.-C., Meller, S., Rieker, J., Steinhoff, M., Hoffmann, T.K., Ruzicka, T., Zlotnik, A. and Homey, B. 2006. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **117**: 411–417.
- Soter, N.A. 1989. Morphology of atopic eczema. *Allergy*, **44 Suppl 9**: 16–19.
- Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., de Waal-Malefyt, R., Bazan, F., Kastelein, R.A., *et al.* 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.*, **3**: 673–680.
- Staeva-Vieira, T.P. and Freedman, L.P. 2002. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells. *J. Immunol.*, **168**: 1181–1189.

- Stefansson, K., Brattsand, M., Ny, A., Glas, B. and Egelrud, T. 2006. Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum. *Biol. Chem.*, **387**: 761–768.
- Steinhoff, M., Neisius, U., Ikoma, A., Fartasch, M., Heyer, G., Skov, P.S., Luger, T.A. and Schmelz, M. 2003. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J. Neurosci.*, **23**: 6176–6180.
- Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A. and Bunnett, N.W. 2000. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat. Med.*, **6**: 151–158.
- Suárez-Fariñas, M., Dhingra, N., Gittler, J., Shemer, A., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J.G. and Guttman-Yassky, E. 2013. Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **132**: 361–370.
- Surjit, M., Ganti, K.P., Mukherji, A., Ye, T., Hua, G., Metzger, D., Li, M. and Chambon, P. 2011. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*, **145**: 224–241.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M. and Huston, G. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.*, **145**: 3796–3806.
- Takai, T. 2012. TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol Int*, **61**: 3–17.
- Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T. and Fujita, T. 1999. Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*, **140**: 1005–1008.
- Taves, S. and Ji, R.-R. 2015. Itch control by Toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*, **226**: 135–150.
- Teplitsky, V., Mumcuoglu, K.Y., Babai, I., Dalal, I., Cohen, R. and Tanay, A. 2008. House dust mites on skin, clothes, and bedding of atopic dermatitis patients. *Int. J. Dermatol.*, **47**: 790–795.
- Thyssen, J.P., Godoy-Gijon, E. and Elias, P.M. 2013. Ichthyosis vulgaris: the filaggrin mutation disease. *Br. J. Dermatol.*, **168**: 1155–1166.
- Thyssen, J.P. and Kezic, S. 2014. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **134**: 792–799.
- Tordesillas, L., Berin, M.C. and Sampson, H.A. 2017. Immunology of Food Allergy. *Immunity*, **47**: 32–50.
- Tortora, G.J. and Derrickson, B. 2007. *Principes D'anatomie et de Physiologie*.
- Totté, J.E.E., van der Feltz, W.T., Hennekam, M., van Belkum, A., van Zuuren, E.J. and Pasmans, S.G.M.A. 2016. Prevalence and odds of Staphylococcus aureus carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Dermatol.*, **175**: 687–695.
- Tsilingiri, K., Fornasa, G. and Rescigno, M. 2017. Thymic Stromal Lymphopoietin: To Cut a Long Story Short. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, **3**: 174–182.

- Tsoi, L.C., Rodriguez, E., Degenhardt, F., Baurecht, H., Wehkamp, U., Volks, N., Szymczak, S., Swindell, W.R., Sarkar, M.K., Raja, K., Shao, S., Patrick, M., Gao, Y., Uppala, R., Perez White, B.E., Getsios, S., Harms, P.W., Maverakis, E., Elder, J.T., *et al.* 2019. Atopic Dermatitis Is an IL-13-Dominant Disease with Greater Molecular Heterogeneity Compared to Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, **139**: 1480–1489.
- Tsujii, K., Andoh, T., Lee, J.-B. and Kuraishi, Y. 2008. Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine-dependent and -independent pathways in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **108**: 385–388.
- Turner, M.J., DaSilva-Arnold, S.C., Yi, Q., Mehrotra, P., Kaplan, M.H. and Travers, J.B. 2013. Topical Application of a Vitamin D Analogue Exacerbates Atopic Dermatitis and Induces the Atopic Dermatitis-like Phenotype in Stat6^{VT} mice. *Pediatr Dermatol*, **30**: 574–578.
- Urashima, R. and Mihara, M. 1998. Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Arch.*, **432**: 363–370.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., Caux, C., Lebecque, S. and Saeland, S. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*, **12**: 71–81.
- Van Cromphaut, S.J., Dewerchin, M., Hoenderop, J.G., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R.J., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R. and Carmeliet, G. 2001. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**: 13324–13329.
- van der Aar, A.M.G., Sibiryak, D.S., Bakdash, G., van Capel, T.M.M., van der Kleij, H.P.M., Opstelten, D.-J.E., Teunissen, M.B.M., Kapsenberg, M.L. and de Jong, E.C. 2011. Vitamin D3 targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**: 1532-1540.e7.
- van Drongelen, V., Alloul-Ramdhani, M., Danso, M.O., Mieremet, A., Mulder, A., van Smeden, J., Bouwstra, J.A. and El Ghalbzouri, A. 2013. Knock-down of filaggrin does not affect lipid organization and composition in stratum corneum of reconstructed human skin equivalents. *Exp. Dermatol.*, **22**: 807–812.
- Varricchi, G., Pecoraro, A., Marone, Giancarlo, Criscuolo, G., Spadaro, G., Genovese, A. and Marone, Gianni. 2018. Thymic Stromal Lymphopoietin Isoforms, Inflammatory Disorders, and Cancer. *Front Immunol*, **9**.
- Veldhuis, N.A., Poole, D.P., Grace, M., McIntyre, P. and Bunnett, N.W. 2015. The G protein-coupled receptor-transient receptor potential channel axis: molecular insights for targeting disorders of sensation and inflammation. *Pharmacol. Rev.*, **67**: 36–73.
- Veldman, C.M., Cantorna, M.T. and DeLuca, H.F. 2000. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**: 334–338.
- Veronesi, B., Carter, J.D., Devlin, R.B., Simon, S.A. and Oortgiesen, M. 1999. Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. *Neuropeptides*, **33**: 447–456.
- Vidal. 2019. *Vidal: Le dictionnaire*.

- Volpe, E., Pattarini, L., Martinez-Cingolani, C., Meller, S., Donnadieu, M.-H., Bogiatzi, S.I., Fernandez, M.I., Touzot, M., Bichet, J.-C., Rey, F., Paronetto, M.P., Chiricozzi, A., Chimenti, S., Nasorri, F., Cavani, A., Kislak, A., Homey, B. and Soumelis, V. 2014. Thymic stromal lymphopoietin links keratinocytes and dendritic cell-derived IL-23 in patients with psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **134**: 373–381.
- Vostálová, J., Galandáková, A., Zálešák, B., Lichnovská, R., Čížková, K., Ulrichová, J. and Rajnochová Svobodová, A. 2019. Changes in antioxidant, inflammatory and metabolic markers during 1 week cultivation of human skin explants. *J Appl Toxicol*, **39**: 773–782.
- Vu, A.T., Baba, T., Chen, X., Le, T.A., Kinoshita, H., Xie, Y., Kamijo, S., Hiramatsu, K., Ikeda, S., Ogawa, H., Okumura, K. and Takai, T. 2010. Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **126**: 985–993, 993.e1–3.
- Walley, A.J., Chavanas, S., Moffatt, M.F., Esnouf, R.M., Ubhi, B., Lawrence, R., Wong, K., Abecasis, G.R., Jones, E.Y., Harper, J.I., Hovnanian, A. and Cookson, W.O. 2001. Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat. Genet.*, **29**: 175–178.
- Wang, T.-T., Nestel, F.P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., Liao, J., Tavera-Mendoza, L., Lin, R., Hanrahan, J.W., Mader, S., White, J.H. and Hanrahan, J.H. 2004. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol.*, **173**: 2909–2912.
- Weidinger, S., Beck, L.A., Bieber, T., Kabashima, K. and Irvine, A.D. 2018. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*, **4**: 1.
- Weidinger, S., O’Sullivan, M., Illig, T., Baurecht, H., Depner, M., Rodriguez, E., Ruether, A., Klopp, N., Vogelberg, C., Weiland, S.K., McLean, W.H.I., von Mutius, E., Irvine, A.D. and Kabesch, M. 2008. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **121**: 1203–1209.e1.
- Weidner, C., Klede, M., Rukwied, R., Lischetzki, G., Neisius, U., Skov, P.S., Petersen, L.J. and Schmelz, M. 2000. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin—a microdialysis study. *J. Invest. Dermatol.*, **115**: 1015–1020.
- Weiland, S.K., Hüsing, A., Strachan, D.P., Rzehak, P., Pearce, N. and ISAAC Phase One Study Group. 2004. Climate and the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinitis, and atopic eczema in children. *Occup Environ Med*, **61**: 609–615.
- Werfel, T., Layton, G., Yeadon, M., Whitlock, L., Osterloh, I., Jimenez, P., Liu, W., Lynch, V., Asher, A., Tsianakas, A. and Purkins, L. 2019. Efficacy and safety of the histamine H₄ receptor antagonist ZPL-3893787 in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **143**: 1830–1837.e4.
- Williams, M.R., Nakatsuji, T., Sanford, J.A., Vrbanac, A.F. and Gallo, R.L. 2017. Staphylococcus aureus Induces Increased Serine Protease Activity in Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **137**: 377–384.
- Wilson, S.R. and Bautista, D.M. 2014. Role of Transient Receptor Potential Channels in Acute and Chronic Itch. In: *Itch: Mechanisms and Treatment* (E. Carstens and T. Akiyama, eds).
- Wilson, S.R., Gerhold, K.A., Bifulco-Fisher, A., Liu, Q., Patel, K.N., Dong, X. and Bautista, D.M. 2011. TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat. Neurosci.*, **14**: 595–602.

- Wilson, S.R., Thé, L., Batia, L.M., Beattie, K., Katibah, G.E., McClain, S.P., Pellegrino, M., Estandian, D.M. and Bautista, D.M. 2013. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*, **155**: 285–295.
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K. and Sabat, R. 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, **21**: 241–254.
- Wong, C.K., Hu, S., Cheung, P.F.Y. and Lam, C.W.K. 2010. Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **43**: 305–315.
- Xie, Y., Takai, T., Chen, X., Okumura, K. and Ogawa, H. 2012. Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, **66**: 233–237.
- Xie, Z., Komuves, L., Yu, Q.-C., Elalieh, H., Ng, D.C., Leary, C., Chang, S., Crumrine, D., Yoshizawa, T., Kato, S. and Bikle, D.D. 2002. Lack of the vitamin D receptor is associated with reduced epidermal differentiation and hair follicle growth. *J. Invest. Dermatol.*, **118**: 11–16.
- Xu, H., Soruri, A., Gieseler, R.K. and Peters, J.H. 1993. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand. J. Immunol.*, **38**: 535–540.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., Lee, T.H. and Corrigan, C. 2005. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J. Immunol.*, **174**: 8183–8190.
- Yoo, J., Omori, M., Gyarmati, D., Zhou, B., Aye, T., Brewer, A., Comeau, M.R., Campbell, D.J. and Ziegler, S.F. 2005. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J. Exp. Med.*, **202**: 541–549.
- Yosipovitch, G., Greaves, M.W. and Schmelz, M. 2003. Itch. *Lancet*, **361**: 690–694.
- Zhang, Y., Leung, D.Y.M., Richers, B.N., Liu, Y., Remigio, L.K., Riches, D.W. and Goleva, E. 2012. Vitamin D Inhibits Monocyte/macrophage Pro-inflammatory Cytokine Production by Targeting Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1. *J Immunol*, **188**: 2127–2135.
- Zhao, H., Liao, X. and Kang, Y. 2017. Tregs: Where We Are and What Comes Next? *Front Immunol*, **8**.
- Zhao, L.P., Di, Z., Zhang, L., Wang, L., Ma, L., Lv, Y., Hong, Y., Wei, H., Chen, H.D. and Gao, X.H. 2012. Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in Northeast China. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **26**: 572–577.
- Zhou, B., Comeau, M.R., De Smedt, T., Liggitt, H.D., Dahl, M.E., Lewis, D.B., Gyarmati, D., Aye, T., Campbell, D.J. and Ziegler, S.F. 2005. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat. Immunol.*, **6**: 1047–1053.
- Zhu, T.H., Zhu, T.R., Tran, K.A., Sivamani, R.K. and Shi, V.Y. 2018. Epithelial barrier dysfunctions in atopic dermatitis: a skin-gut-lung model linking microbiome alteration and immune dysregulation. *Br. J. Dermatol.*, **179**: 570–581.

ANNEXES

Annexe a : « *Inhibition of dengue virus infection by mannoside glycolipid conjugates* »
Schaeffer E*, Flacher V, Neuberg P, Hoste A, **Brulefert A**, Fauny JD, Wagner A, Mueller CG.
Antiviral Res. 2018; 154:116-123.



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral

Inhibition of dengue virus infection by mannoside glycolipid conjugates

Evelyne Schaeffer^a, Vincent Flacher^a, Patrick Neuberger^b, Astrid Hoste^a, Adrien Brulefert^a, Jean-Daniel Fauny^a, Alain Wagner^b, Christopher G. Mueller^{a,*}

^a CNRS, Université de Strasbourg, Immunopathology and Therapeutic Chemistry, UPR 3572, 67000 Strasbourg, France

^b CNRS, Université de Strasbourg, Laboratory of Functional Chemo Systems, UMR 7199, 67400 Illkirch, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Dengue virus
Dendritic cells
Macrophages
Skin
Inhibitors
Cell membrane

ABSTRACT

Dengue virus (DENV), a mosquito-borne flavivirus, causes severe and potentially fatal symptoms in millions of infected individuals each year. Although dengue fever represents a major global public health problem, the vaccines or antiviral drugs proposed so far have not shown sufficient efficacy and safety, calling for new antiviral developments. Here we have shown that a mannoside glycolipid conjugate (MGC) bearing a trimannose head with a saturated lipid chain inhibited DENV productive infection. It showed remarkable cell promiscuity, being active in human skin dendritic cells, hepatoma cell lines and Vero cells, and was active against all four DENV serotypes, with an IC_{50} in the low micromolar range. Time-of-addition experiments and structure-activity analyses revealed the importance of the lipid chain to interfere with an early viral infection step. This, together with a correlation between antiviral activity and membrane polarization by the lipid moiety indicated that the inhibitor functions by blocking viral envelope fusion with the endosome membrane. These findings establish MGCs as a novel class of antivirals against the DENV.

1. Introduction

Infection by Dengue virus (DENV) is a major cause of disease in tropical and subtropical areas, with at least 100 million clinical cases occurring each year, and more than 2.5 billion people at risk (Bhatt et al., 2013; Stanaway et al., 2016). DENV is an arthropod-borne single-stranded RNA virus of the *Flavivirus* genus, transmitted to humans by infected *Aedes* mosquitoes. It comprises four related but antigenically distinct serotypes, DENV-1, -2, -3, and -4. To restrict the burden on public health, studies have concentrated on the elaboration of vaccines, but the complex immunopathology of dengue has hampered their development and efficacy. No specific vaccine and no antiviral drug have been licensed for clinical use; for review see (Julander et al., 2011; Lo and Perng, 2016; Rather et al., 2017).

DENV cell-entry is mediated by a number of receptors (Kaufmann and Rossmann, 2011) including the C-type lectins Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN/CD209) (Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneeritthep et al., 2003) and the mannose receptor (MR/CD206) (Miller et al., 2008) expressed by dendritic cells (DCs) and macrophages. Early in DENV infection the first events decisive for disease development are likely to occur in the skin. It has been shown that after virus inoculation by the

mosquito, dermal DCs and macrophages are the primary targets of infection (Cerny et al., 2014; Duyen et al., 2017; Ivory et al., 2015; Schaeffer et al., 2015; Schmid et al., 2014).

In the search of DENV inhibitors, both viral and host proteins essential for the viral replication cycle have been tested as potential targets for antiviral development (see review, (Noble et al., 2010)). For example, some strategies target viral RNA replication (Diamond et al., 2002), the NS2B-NS3 protease (Chu et al., 2015), or the viral envelope protein (Jadav et al., 2015), while others target cellular enzymes that act as regulators of lipid homeostasis (Hyrina et al., 2017). The nucleoside analogue balapiravir blocks viral RNA synthesis by acting as a chain terminator. Chloroquine inhibits the fusion of the viral membrane with that of the endosome, as well as virus maturation. Lovastatin inhibits virus entry, maturation and egress. Celgosivir impairs proper glycosylation of the DENV E, prM and NS1 proteins. So far, no obvious beneficial clinical effect was detected with any of these compounds (Kaptein and Neyts, 2016). This emphasizes the need for continuous research to find new anti-DENV drugs.

Mannoside glycolipid conjugates (MGCs) are formed by three building blocks: a tri-mannose head, a hydrophilic linker and a hydrophobic lipid chain. They are water-soluble and can self-assemble into micelles. Our previous studies have shown that MGCs interact with

Abbreviations: DENV, dengue virus; DC, dendritic cell; MDDC, monocyte-derived dendritic cells; IC_{50} , 50% inhibitory concentration; IL-4, Interleukin-4; MGC, mannoside glycolipid conjugate

* Corresponding author. CNRS UPR 3572, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.

E-mail address: c.mueller@ibmc-cnrs.unistra.fr (C.G. Mueller).

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.005>

Received 21 December 2017; Received in revised form 6 March 2018; Accepted 5 April 2018

Available online 06 April 2018

0166-3542/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

lectin cell surface receptors that bind glycosylated molecules (Dehuyser et al., 2012; Schaeffer et al., 2013). Because DENV is glycosylated on the envelope protein, it appeared attractive to test the ability of MGCs to inhibit DENV infection. Interestingly, MGCs also antagonize Toll-like receptor type 4 signaling by lipopolysaccharide (LPS), although this receptor or its co-receptor CD14 do not bind MGCs (Flacher et al., 2015). This suggests that the biological properties of MGCs may not only be mediated by a specific interaction with lectin receptors.

In this report, we have tested whether MGCs display antiviral activity against DENV and have investigated the underlying mechanism. We find that a MGC, referred here as MGC 2, inhibits infection of primary human DCs, hepatoma and Vero cell lines. Using time-of-addition experiments, we show data supporting the conclusion that an early infection step is inhibited. Further, by visualization and quantitative image analysis we provide supporting evidence that a disruption of normal cell membrane composition may be the underlying mechanisms of blockage of viral life cycle initiation.

2. Material and methods

2.1. Viruses, virus titration and cells

The pDENV-2 replicon of DENV-2 (strain 16681) was generously provided by Dr. E. Harris (University of California, Berkeley, USA). The clinical isolates DENV-1 (CRBIP 10.1), DENV-2 (RO7/2259), DENV-3 (CRBIP 10.3), and DENV-4 (VIMFH4) were a generous gift of Dr Anavaj Sakuntabhai (Institut Pasteur, Paris, France). Viruses were produced in C6/36 *Aedes albopictus* mosquito cells, as described (Schaeffer et al., 2015). Titers in cell-free supernatants were determined by infection of Vero cells as described (Lambeth et al., 2005). Infectivity titers were expressed as FACS-infectious units (FIU)/ml.

African green monkey kidney Vero cells and human hepatoma HepG2 cells were cultured at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and gentamycin. Human monocytic THP-1 and primary cells were cultured at 37 °C in RPMI 1640 supplemented with gentamycin and 10% (v/v) FBS (complete medium). Human monocytes were purified from buffy coats by successive Ficoll and Percoll gradients. Monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) were differentiated from monocytes by 5 days of culture with GM-CSF (50 ng/ml, ImmunoTools) and IL-4 (10 ng/ml, ImmunoTools), as described. Abdominal skin was obtained with written informed consent and institutional review board approval, in agreement with the Helsinki Declaration and French legislation. Dermal dendritic cells (dDCs) and dermal macrophages were isolated from surgical explants of human skin, as previously described (Schaeffer et al., 2015). Briefly, dDCs were allowed to migrate out of the skin for 2 days into a medium lacking or containing IL-4. The non-migratory macrophages were isolated from the tissue by enzymatic digestion. After culturing the dermal cell suspension for 2 days, CD14⁺HLA-DR⁺ cells were purified by flow cytometric cell sorting (Schaeffer et al., 2015).

2.2. Compounds

Compounds MGC 2 and 2U were synthesized by the company Roowin (Riom, France). Other MGCs were synthesized at the Laboratory of Functional Chemo Systems (Illkirch, France). The syntheses, physico-chemical properties and cytotoxicities of MGCs were previously reported (Dehuyser et al., 2012; Flacher et al., 2015; Schaeffer et al., 2013). All compounds were dissolved in water.

2.3. Cell cytotoxicity assay

The effect of MGC 2 on cell viability was assessed by monitoring the reduction by cellular deshydrogenases of the tetrazolium salt WST-1 to dark yellow colored formazan, using the Cell Proliferation Reagent

WST-1 (Roche). Human cells (10⁵ MDDCs, 5 × 10⁴ dDCs, 2 × 10⁴ HepG2 cells) in 96-well culture plates were treated in quadruplicate with different concentrations of MGC 2, medium alone, or 1% Triton-X100 at 37 °C. After 24 h, WST-1 stock solution diluted 10-fold in cell culture medium (50 µL) was added at 37 °C. After 1 h (HepG2 cells) or 4 h (dDCs, MDDCs), the optical density of the resulting solutions was measured at 450 nm using a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific).

2.4. Antiviral assays

2.4.1. Inhibition assays

Assays were performed in 48-well plates. MDDCs (2 × 10⁵ cells) and skin-purified cells (0.5 × 10⁵ cells) were preincubated with compounds for 30 min before exposure to DENV-2 (MOI of respectively 0.2 and 0.5). In time-of-addition assays, cells were treated with MGC 2 according to the indicated timing. HepG2 cells (0.5 × 10⁵ cells) were exposed to DENV-1, -2, -3, or -4 after 30 min of pre-treatment with MGC 2. After incubation for 2 h at 37 °C in serum-free medium, cells were washed and cultured in complete medium. After 2 days, cells infected with DENV-2 were labeled for intracellular viral envelope protein with mouse anti-dengue type 2 virus monoclonal antibody (clone 3H5.1, Millipore MAB8702) and stained with APC rat anti-mouse IgG1 (BD Biosciences). Cells infected with DENV-1, -2, -3, -4 were analyzed with mouse anti-dengue complex monoclonal antibody (clone D3-2H2-9, Millipore, MAB 8705) followed by APC rat anti-mouse IgG2a (BD Biosciences). Fluorescence was measured by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson) and the data analyzed using Cell Quest Pro (BD Bioscience) or FlowJo (TreeStar).

2.4.2. Viral cell-entry by confocal microscopy

Cells were pre-treated in medium without serum with MGC 2 (100 µM) for 30 min or left untreated, exposed to DENV-2 for 1 h, and subjected or not to wash/chase by extensive washes and incubation in complete medium for 1 h, before fixation, permeabilization and labeling of DENV-E using Cy3-conjugated mAb 4G2 (kind gift from Philippe Desprès, Institut Pasteur, Paris, France). Cells were labeled with DiI (5 µg/ml, Thermo Fisher Scientific) for 10 min at 37 °C. DAPI was used as nuclear counterstaining. Slides were mounted using Prolong Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific). Images were acquired on a Zeiss LSM 780 confocal microscope with GaAsP detector and Zen acquisition software. Images were processed using the ImageJ software and the DiI color was chosen in green.

2.5. Endosomal pH analysis

Vero cells (10⁵) in 48-well plates were left untreated or treated with NH₄Cl (10 mM), bafilomycin A1 from *Streptomyces griseus* (Sigma, 1 µM final) or MGC (10 and 100 µM) for 0.5 h or 3 h, as indicated. LysoSensor Green DND-189 (Molecular Probes, 1 µM final) was added for 4 min at 37 °C before washes with PBS. Cells were detached with trypsin treatment and analyzed by flow cytometry.

2.6. Imaging flow cytometry analysis

THP-1 (10⁶) cells in 0.1 ml PBS were incubated with propidium iodide (50 ng/ml) and the lipophilic probe dSQ12S (100 nM) (kind gift of Dr Klymchenko, Université de Strasbourg, France) (Collot et al., 2015) for 10 min, before addition of MGCs (100 µM) for 10 min. Amnis ImageStream^X flow cytometry analysis was performed (ImagoSeine core facility of the Institut Jacques Monod, Paris, France). Cells were imaged using Amnis ImageStream^X flow cytometry (Zuba-Surma et al., 2007) and live cells were selected as propidium iodide negative cells. The cell images were analyzed by IDEAS software (Amnis) using the Delta Centroid method to measure cell polarity (Zuba-Surma et al., 2007).

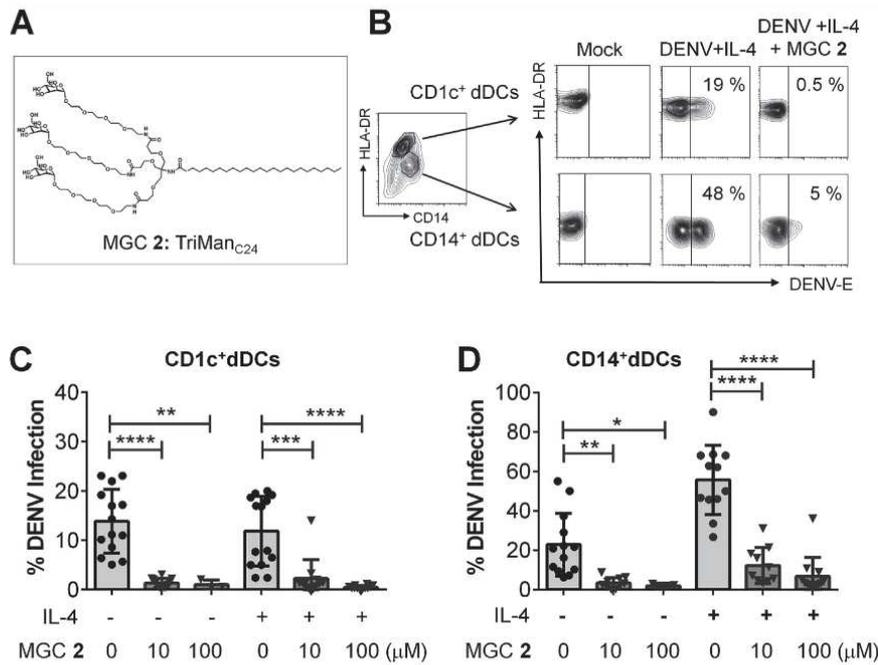


Fig. 1. Effect of MGC 2 on DENV-2 infection of human skin DCs. (A) Structure of MGC 2. (B) Representative FACS analysis of mock- or DENV-infected dermal DCs preincubated with IL-4 before addition of MGC 2 (100 μM) and the virus (MOI of 0.5). After washing and culture for 2 days, DENV infection of CD1c⁺ dDCs (HLA-DR^{hi}CD14⁺) and CD14⁺ dDCs (HLA-DR⁺CD14⁺) was assessed as intracellular detection of DENV-envelope (E) protein. The percentage indicates the proportion of DENV-E⁺ cells. The graphs depict the percentage of DENV-E⁺ CD1c⁺dDCs (C) and DENV-E⁺ CD14⁺dDCs (D) as a function of MGC 2 concentrations in conditions with or without IL-4. Each symbol represents a different skin donor. Mean values (± SD) are shown as horizontal bars. (*: p < 0.1; **: p < 0.01; ***: p < 0.001; ****: p < 0.0001).

Table 1
Activities of MGC 2. IC₅₀, half maximal DENV-2 inhibitory concentration; CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; SI, Selectivity Index, calculated as CC₅₀/IC₅₀. IC₅₀ and CC₅₀ values are means ± SD.

Cell type	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI
Dermal DCs	1.4 ± 0.7	832 ± 83	594
MDDCs	1.0 ± 0.5	1544 ± 152	1544
HepG2	4.9 ± 1.9	1165 ± 165	238

2.7. Statistical and data analysis

Graph-Pad Prism 6.01 was used for IC₅₀ and CC₅₀ determination by nonlinear regression, and for statistical analysis using paired Student's t-tests. Data were considered significantly different when p was less than 0.05.

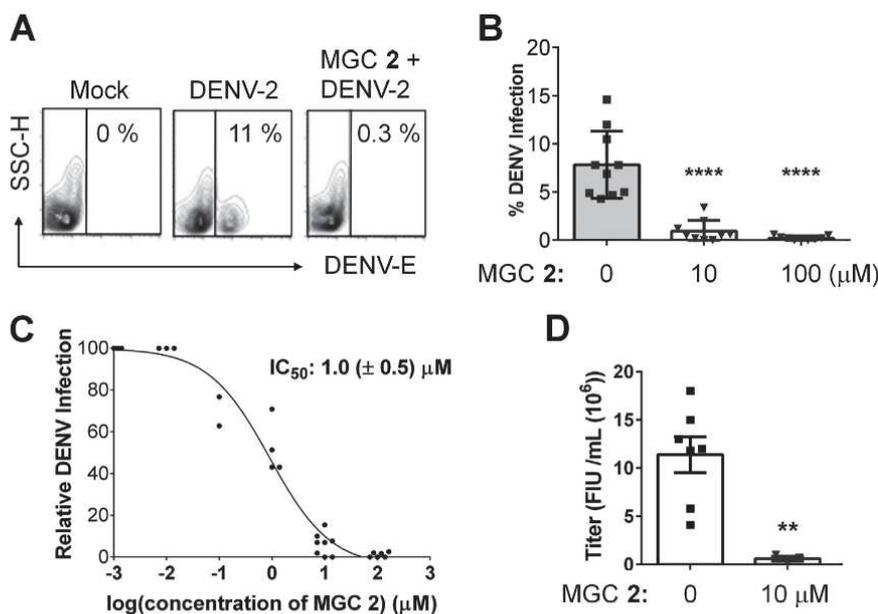


Fig. 2. MGC 2 inhibits DENV-2 infection of MDDCs. (A) Representative flow cytometry analysis of mock- or DENV-infected MDDCs preincubated with MGC 2 (100 μM) for 30 min before exposure to the virus (MOI of 0.2). The percentage of infection was measured after 2 days as the intracellular accumulation of DENV-E protein. (B) The graph depicts the percentage of infection as a function of MGC 2 concentrations. (C) Determination of the IC₅₀ of MGC 2 on MDDCs. (D) Viral titers in the cell-free supernatants of DENV-infected MDDCs were determined in Vero cells as FACS infectious units (FIU/mL). For panels B–D, each symbol represents a different blood donor and the mean values (± SD) are shown as horizontal bars (****: p < 0.0001, **: p < 0.01).

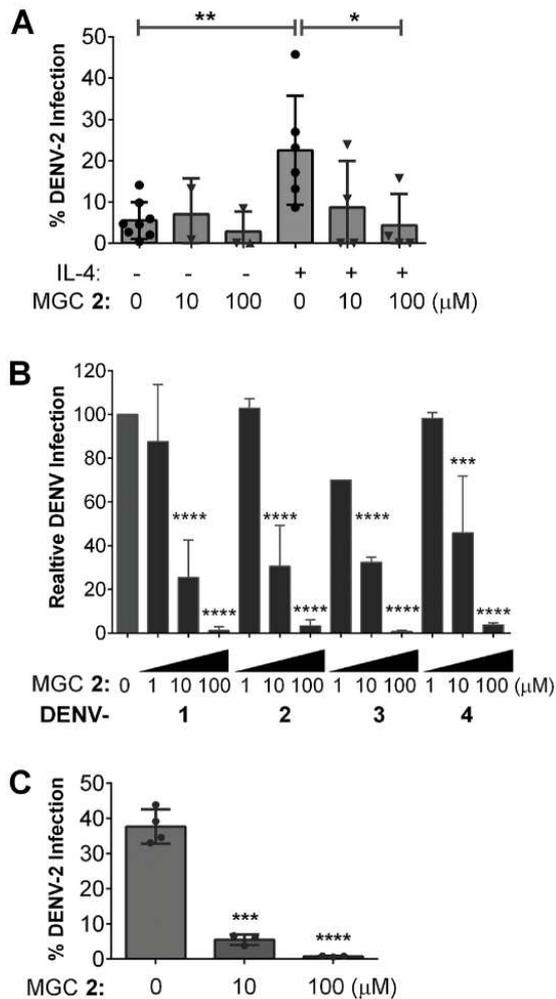


Fig. 3. Effect of MGC 2 on DENV infection of different cell types. Cells were preincubated with MGC 2 for 30 min before exposure to the virus for 2 h. The percentage of infection was measured after 2 days by FACS as the intracellular accumulation of DENV-E protein. (A) The graph depicts the percentage of dermal macrophages positive for DENV-E protein as a function of MGC concentrations for each skin donor, either untreated or IL-4-stimulated. Each donor is represented by a symbol. Mean values (\pm SD) are shown as horizontal bars. (B) HepG2 cells were exposed to DENV-1, -2, -3, and -4 serotypes. Histograms present the mean % of infection (\pm SD) relative to untreated, DENV-infected cells (at least 2 experiments in duplicate). (C) DENV-2 infection of Vero cells. Histograms present the mean values (\pm SD) of infection and each experiment is represented by symbol. (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$).

3. Results

3.1. Inhibition of DENV infection of human dermal dendritic cells

The human dermis comprises two dermal dendritic cell (DC) subsets, CD1c⁺ and CD14⁺, that are highly permissive to productive infection by DENV and represent an important portal to systemic spread (Cerny et al., 2014; Schaeffer et al., 2015; Schmid et al., 2014). Therefore, we investigated the anti-DENV efficacy of MGC 2 on human dermal DCs, a trimannoside linked to a 24-carbon saturated fatty acyl chain (Fig. 1A). Isolated from normal human skin, the cells were preincubated with IL-4 to increase infectivity (Schaeffer et al., 2015) and

then pretreated with MGC 2 for 30 min before exposure to DENV-2. After 2 days, viral infection of the CD1c⁺ and the CD14⁺ DC subsets was assessed by flow cytometry by detection of intracellular DENV-2 envelope protein. 100 μM conjugate potently inhibited DENV-2 infection of both subsets (Fig. 1B). The analysis of dermal DCs from different donors in the absence or presence of IL-4 showed significant reduction of infection of both DC subsets in all conditions and with both concentrations (10 or 100 μM) (Fig. 1C and D). To determine viral progeny, we exposed Vero cells to the supernatants and determined their infection by FACS. Although not as accurate as the plaque assay (Lambeth et al., 2005), the measures showed the reduction of infectious viral particle release by MGC 2 (Supplemental Fig. S1). Toxicity measures showed minimal toxicity ($CC_{50} = 921 \mu\text{M} \pm 112$) while the IC_{50} value was $1.4 \mu\text{M} \pm 0.7$ (Table 1). This shows that MGC 2 inhibits productive DENV infection of skin DCs.

3.2. Inhibition of DENV infection of human monocyte-derived DCs

Following infection of dermal DCs and macrophages, monocytes that circulate in the blood are recruited to the dermis and differentiate into monocyte-derived DCs (MDDCs). Their infection would constitute a second wave of infection in the skin (Schmid and Harris, 2014). In the light of this and because MDDCs are more easily obtained than skin DCs, we repeated the tests on MDDCs with 100 μM of MGC 2. We found that the conjugate also inhibited DENV infection of these cells (Fig. 2A). The results obtained with MDDCs derived from monocytes from different blood donors demonstrated significant inhibition of productive infection with 10 μM and 100 μM (Fig. 2B). The IC_{50} was $1.0 \mu\text{M} \pm 0.5$ (Fig. 2C) and the CC_{50} was $1544 \mu\text{M} \pm 152$ (Table 1). The infectivity of the cell supernatants titrated on Vero cells confirmed a strongly reduced production of infectious viral particles (Fig. 2D). Taken together, MGC 2 inhibits productive viral infection of *ex vivo* or monocyte-derived DCs with a high selectivity index.

3.3. MGC is active in different cell types and against different DENV serotypes

We next verified whether cell types other than DCs are sensitive to MGC inhibition. We first tested human dermal macrophages. Similar to CD14⁺ dermal DCs, IL-4 enhanced their infection, which was inhibited by MGC 2 at 10 μM and 100 μM concentrations (Fig. 3A). Because after entry into the skin, DENV spreads systemically and can infect the liver (Martina et al., 2009), we tested hepatoma cells. The cells were infected with all four DENV serotypes, and the proportion of infected cells in the absence of MGC 2 was set to 100% for each serotype for better comparison. The results showed a dose-dependent inhibition of infection by all four serotypes (Fig. 3B), albeit with a slightly higher IC_{50} value (Table 1). Finally, given this cell-unspecific activity, we tested Vero cells. Also Vero cells were sensitive to MGC 2-mediated DENV inhibition (Fig. 3C). These findings demonstrate that MGC 2 displays a similar inhibition efficiency in unrelated cell types susceptible to DENV infection.

3.4. MGC 2 blocks DENV replication at early steps of infection

Because of its cell-indiscriminate activity, we reasoned that inhibition of infection by MGC 2 may not be mediated by cell-specific receptors. Therefore, to better understand its mode of action, we performed time-of-addition experiments in MDDCs by adding or removing the inhibitor at different time points. Results showed that 10 μM of MGC 2 abolished viral replication when present throughout (b-d) or during most (e) of the virus-cell contacts (Fig. 4A). However, infection was not reduced when MGC 2 was added to the cells and then washed off before exposure to the virus (f). This supports the notion that the conjugate does not stably interact with a viral receptor to block virus attachment. Infection also occurred when it was added after viral

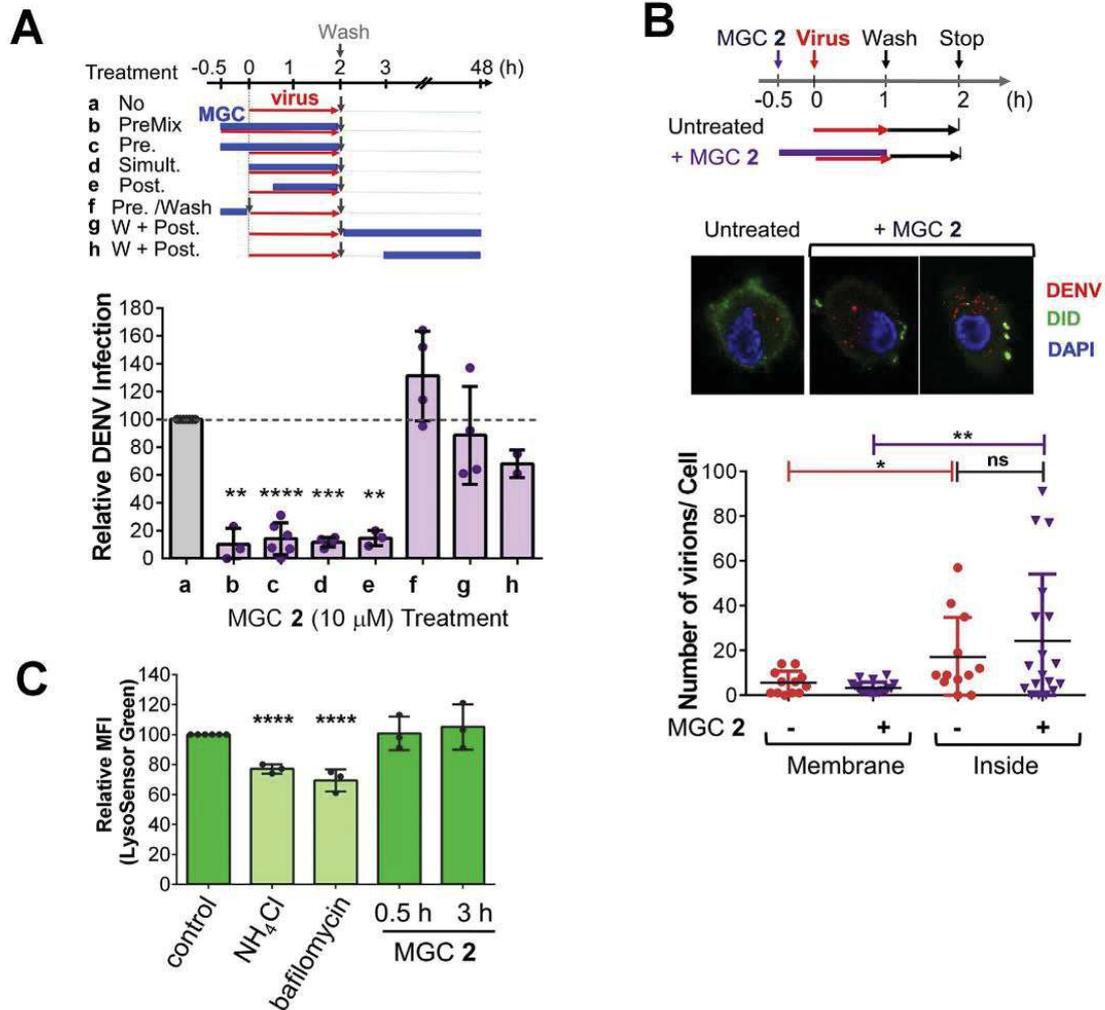


Fig. 4. MGC 2 affects early steps of the DENV replication cycle. (A) Schematic representation of time-of-addition experiments with MDDCs using MGC 2 (10 μ M) and DENV-2 virus (MOI of 0.2). The graph shows the percentage of infection (\pm SD, 3–5 blood donors) measured after 48 h by intracellular accumulation of DENV-E protein, relative to untreated cells (condition ‘a’). (B) Assessment of viral particles in MDDCs, untreated or treated with MGC 2 as indicated in the scheme. DENV, cell membrane and nucleus were identified using Cy3-conjugated mAb 4G2 (red), DiD (green) and DAPI (blue), respectively. The graph depicts the mean number of virions (\pm SD, 3 blood donors) on the membrane and in the cytoplasm. (C) Effect of MGC 2 on the endosomal pH. Vero cells were left untreated or treated with the inhibitors of endosomal acidification NH_4Cl and bafilomycin A1 for 3 h, or with MGC (100 μ M) for 0.5 h or for 3 h. LysoSensor Green DND-189 was added for 4 min at 37 $^\circ\text{C}$ before flow cytometry analysis. Results show the mean fluorescence intensity (MFI, SD, 3 experiments) of LysoSensor Green relative to that of untreated cells. (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$).

exposure and was not removed (g, h). These finding showed that the compound is active only when present during the early viral infection events.

We next sought to determine whether MGC 2 affects viral internalization. MDDCs were pretreated or not with the compound for 30 min before adding the virus (condition ‘c’ of Fig. 4A). After 1 h, the cells were washed free of excess virus and inhibitor, and incubated for another hour before fixing the cells for confocal microscopy (Fig. 4B). The cells were labeled with an anti-DENV-specific fluorescent antibody and with fluorescent dyes to visualize cell membrane and nucleus. As expected for a successful infection, the number of virions was higher within the cell than at the membrane; however, strikingly, this number was not significantly changed by the compound. These findings showed that MGC 2 prevented neither attachment nor internalization of DENV particles. It was notable that the distribution of the lipophilic membrane dye was different between the untreated and treated cells.

Given that the exit of the DENV RNA from endosomes into the cell cytoplasm requires low pH (Modis et al., 2004), we next asked whether endosomal pH is affected by MGC 2. Vero cells were treated with 10 μ M or 100 μ M of the compound or with inhibitors of endosomal acidification. After 0.5 h or 3 h, the cells were incubated with LysoSensor Green whose fluorescence is sensitive to pH (Fig. 4C and Supplemental Fig. S2). As expected, whilst NH_4Cl and bafilomycin A1 decreased the fluorescence intensity, reflecting a block in endosomal acidification, MGC 2 caused no significant change irrespective of time of exposure or concentration. Taken together, the data show that MGC 2 inhibits an event between viral uptake into endosomes and nucleic acid exit into the cytoplasm, but that does not imply an interference with endosomal acidification.

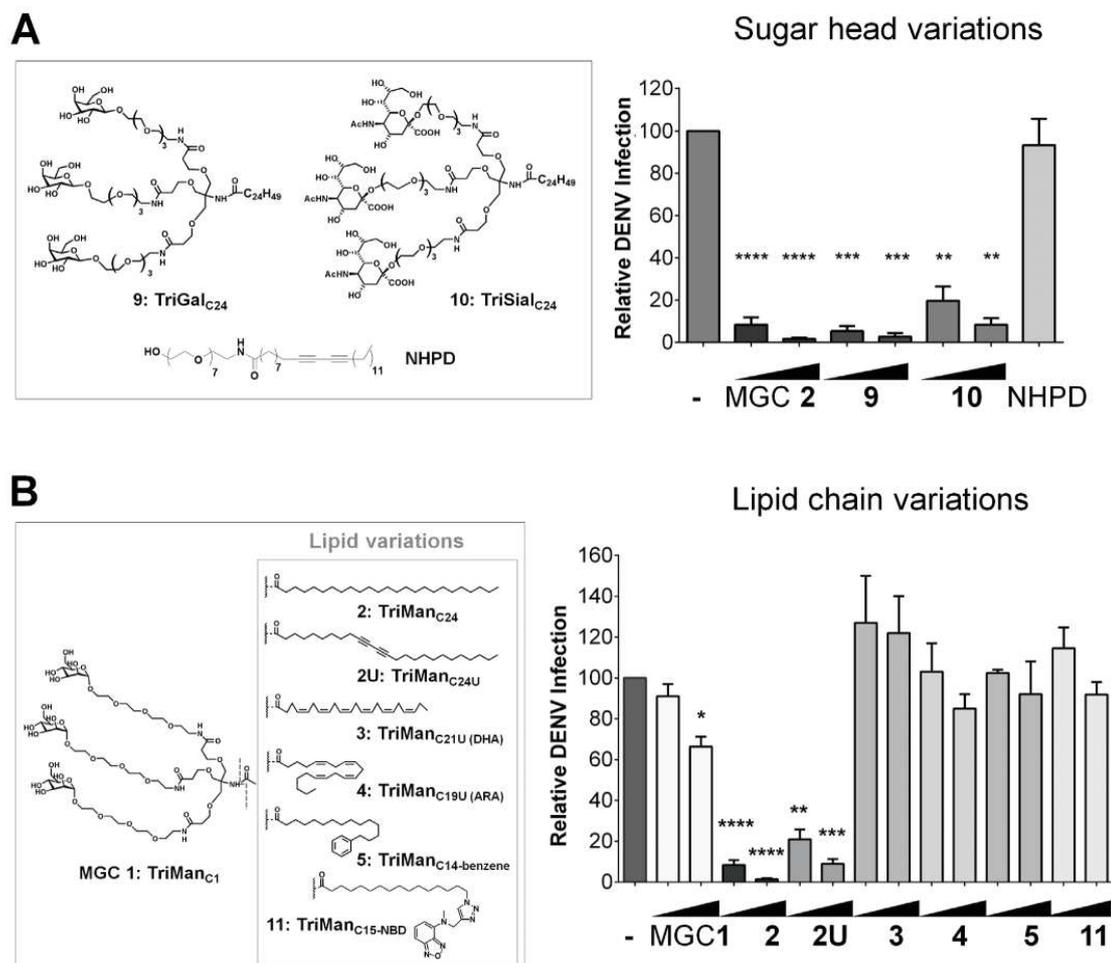


Fig. 5. Effect of sugar head and lipid chain variations of MGC 2 on DENV infection. (A) Left panel, structure of conjugates containing sugar variations (9, 10, with galactose or sialic acid) instead of mannose, or without a sugar moiety (NHPD). Right panel, MDDCs were either untreated or treated with MGC 2 or with the indicated variations of MGC 2 (concentrations of 10 and 100 μ M) for 30 min before exposure to DENV-2 (MOI of 0.2). The percentage of infection was measured by intracellular accumulation of DENV-E protein and expressed as the proportion relative to the untreated control. Data are the mean \pm SD of triplicates and are representative of 3 different donors. (B) Left panel, structures of conjugates containing lipid variations (1 contains no lipid chain, 2U contains an unsaturated C24 lipid chain, 3, 4 have an omega-3 and omega-6 lipid chain, conjugate 5 has a benzene-ending lipid chain, conjugate 11 contains a fluorescent NBD motif). All compounds, except 11, were previously described (Dehuysen et al., 2012; Schaeffer et al., 2013; Flacher et al., 2015). Right panel, as for panel A, only that the lipid chain was either lacking (MGC 1) or variations were introduced (MGC 2U, 3, 4, 5, 11). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ ****: $p < 0.0001$.

3.5. Structure-activity relationship studies: importance of the lipid chain

To further clarify the molecular mechanism of MGC 2 antiviral activity, improve antiviral activity and also to obtain a fluorescent derivative, we altered the sugar and lipid moieties of MGC 2. Inhibition of DENV-2 infection of MDDCs was completely lost in the absence of the sugar head (NHPD), yet replacing mannose by galactose (MGC 9) or sialic acid (MGC 10) had little impact (Fig. 5A and Supplemental Fig. S3). We designed different MGCs with variations in their lipid moiety to modulate their rigidity or flexibility (Fig. 5B). The absence of a lipid moiety (MGC 1) abolished activity. MGC 3 and 4 containing a short (19–21 carbons) polyunsaturated fatty acid chain were also inactive. Similarly, alteration of a short carbon chain with a benzene group in MGC 5 or a fluorescent NBD group in MGC 11 abolished activity. Only a minor modification introduced in the 24-carbon saturated chain of MGC 2 by replacing two saturated bonds with two unsaturations of linear geometry (MGC 2U) marginally reduced antiviral activity (Fig. 5B and Supplemental Fig. S3). These findings show that the sugar

head is exchangeable, but that the lipid moiety cannot accommodate major modifications of the C24 saturated fatty acyl chain of MGC 2.

3.6. Cell membrane polarization by MGCs correlates with antiviral activity

We had previously found that MGC 2 and 2U negatively affected LPS signaling in MDDCs and altered the cell membrane distribution of the signaling receptors (Flacher et al., 2015). In addition, we have noted the effect of MGC 2 on the distribution of lipid dye DiD (Fig. 4B). Because lipid chain length and chemical composition are likely to affect the affinity of MGCs for the cell membrane, we asked whether there was a correlation between the ability to insert into the cell membrane and the antiviral activity. Since a fluorescently tagged analog of MGC 2 (MGC 11) was inactive, we addressed this question indirectly by monitoring the cell membrane distribution of the strongly fluorescent membrane dye dsQ12S (Collot et al., 2015). We compared untreated THP-1 cells with cells exposed to MGC 2, MGC 2U (slightly decreased antiviral activity) and MGC 1 (no antiviral activity). The cell

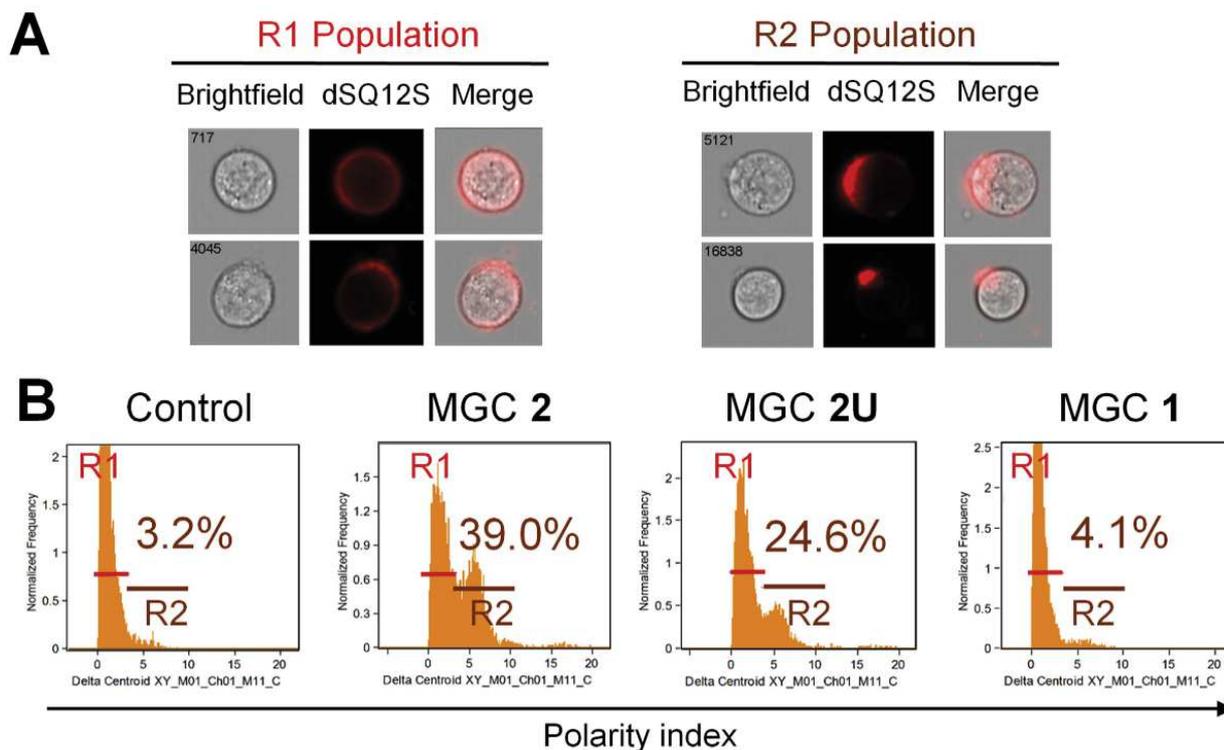


Fig. 6. MGCs affect lipid dye distribution in the plasma membrane. Amnis ImageStream^x flow cytometry analysis after incubation of THP1 cells with the lipophilic fluorescent dye dSQ12S (100 nM) for 10 min, before addition of MGCs (100 μ M) for 10 min. (A) Representative images of cells of the R1 and R2 cell population. Columns on the left: brightfield; middle columns: red fluorescence of the probe, showing probe capping in R2 cells; columns on the right show brightfield merged with the fluorescence images. (B) Delta centroid cell polarity analysis showing the frequency of cells in the different conditions with uniform membrane dye staining (R1 population) and with a capped membrane distribution (R2 population). The proportion of the R2 population is indicated (representative of two experiments).

fluorescence was visualized and evaluated using imaging flow cytometry to detect slight alterations in cell membrane fluorescence patterns (Marangon et al., 2013; Zuba-Surma et al., 2007). In untreated control cells there was a homogeneous distribution of the plasma membrane dye (population R1), however 39% of the cells treated with MGC 2 displayed a polarized dye localization (population R2) (Fig. 6A and B). Strikingly, the proportion of the cells with membrane dye polarization was only 24.6% with MGC 2U and 4% with MGC 1. These findings show that the presence of the lipid and its nature disrupt the even distribution of the cell membrane dye, and the degree of disturbance correlates with the antiviral activity of the MGCs.

4. Discussion

In this study we showed that MGC 2 inhibits the productive infection of different cell types by DENV. The compound does not inhibit viral cell-entry, and the endosomes acidify normally. However, it perturbs the cell membrane, which most likely affects subsequent viral membrane-endosome fusion leading to blockage of viral genome entry into the cytoplasm.

We had previously shown that dermal CD14⁺ DCs were highly susceptible to DENV infection that was further increased by IL-4 (Schaeffer et al., 2015). We found that even in the presence of IL-4, MGC 2 inhibited the infection of dermal DCs in the low μ M range. Activity on DCs was confirmed with MDDCs. Because DCs express DC-SIGN that enhances DENV infection by binding the glycosylated viral envelope protein (Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneetriph et al., 2003), we first suspected interference of the mannosylated conjugates

with DC-SIGN for binding the virus. Indeed, MGC 2 has affinity for recombinant DC-SIGN (Schaeffer et al., 2013). The lipid chain plays an important role in the affinity of MGCs to recombinant DC-SIGN (Dehuyser et al., 2012), which is most likely related to the formation of micelles and hence an increase in avidity. However, the finding that MGC 2 displays antiviral activity in hepatoma and Vero cells that lack this lectin, shows that the MGC 2 activity is not solely explained by a competition with the virus for DC-SIGN. Further, while the replacement of the mannose by a different sugar abolished interaction to DC-SIGN (Schaeffer et al., 2013), it had little impact on anti-DENV activity. On the other hand, we found that the lipid chain plays a critical role in the antiviral activity. How to consolidate these findings? All things considered, we interpret the data that MGCs in their micellar form bind with high affinity to any cell surface lectins; once bound, the micelles are disrupted to allow the lipid chain to insert into the membrane lipid bilayer. Owing to this dual function, namely formation of micelles and entry into the cell membrane, modifications of the lipid chain are poorly tolerated. In addition, the different fatty acids are likely to have an impact on cell membrane composition and physical properties. The polyunsaturated fatty acids (in MGC 3, 5) would have a favorable interaction with the non-raft membrane domains, resulting in the stabilization of the ordered rafts (Levental et al., 2016), whereas the saturated MGC 2 is likely to assemble into the ordered, saturated lipid-raft membrane domain and induces its destabilization (Sezgin et al., 2017). The more rigid MGC 2U with two triple unsaturations would be less tightly associated with the lipid raft. On this basis, MGC antiviral action would correlate with raft incorporation and destabilization.

Although our data cannot exclude a direct interaction of MGC 2

with the DENV envelope, they clearly point to a cell membrane alteration resulting in a subsequent block of virus fusion out of endosomes. Further work is required to determine in what way MGC 2 could alter the lipid/protein composition or the dynamics (stiffness versus fluidity) of the membranes.

The role of lipids in viral infection (entry, trafficking, replication and egress) is well recognized (Mazzon and Mercer, 2014); in the case of DENV, this virus utilizes a specific lipid for fusion from the late endosomes (Zaitseva et al., 2010). Thus, the pharmaceutical interference of cellular membrane composition and fluidity represents a new paradigm for broad-spectrum antiviral discovery (Pollock et al., 2010; St Vincent et al., 2010; Vigant et al., 2015). In addition to exploring the molecular interaction between MGCs and cell membrane lipids, a further question is whether MGC 2 confers protection against viruses other than DENV, given the broad-spectrum antiviral activity that results from targeting membranes. The high selectivity index of MGC 2 in human cells and its good water solubility makes this conjugate a novel and attractive candidate for further testing in cellular and animal models.

Acknowledgements

This work was supported by the “Centre National de la Recherche Scientifique” (CNRS) and the Agence Nationale de la Recherche (Program “Investissements d’Avenir” ANR-11-EQPX-022 and ANR-10-LABX-0034). We thank Sophie Reibel-Foisset (Chronobiothron, UMS 3415) for use of the L3 facilities, the IGBMC cell sorting service, the Strasbourg/Esplanade imaging platform, and Andrey Klymchenko (Strasbourg UMR 7213) for the lipid dye. We acknowledge the ImagoSeine core facility of the Institut Jacques Monod, member of IBISA and France-BioImaging (ANR-10-INBS-04) infrastructures, and Dr Nicole Boggetto for help in the field of imaging flow cytometry.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.005>.

References

- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J., Hay, S.I., 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504–507.
- Cerny, D., Haniffa, M., Shin, A., Bigliardi, P., Tan, B.K., Lee, B., Poidinger, M., Tan, E.Y., Ginhoux, F., Fink, K., 2014. Selective susceptibility of human skin antigen presenting cells to productive dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 10 e1004548.
- Chu, J.J., Lee, R.C., Ang, M.J., Wang, W.L., Lim, H.A., Wee, J.L., Joy, J., Hill, J., Brian Chia, C.S., 2015. Antiviral activities of 15 dengue NS2B-NS3 protease inhibitors using a human cell-based viral quantification assay. *Antivir. Res.* 118, 68–74.
- Collot, M., Kreder, R., Tatarski, A.L., Patsenker, L.D., Mely, Y., Klymchenko, A.S., 2015. Bright fluorogenic squaraines with tuned cell entry for selective imaging of plasma membrane vs. endoplasmic reticulum. *Chem. Commun.* 51, 17136–17139.
- Dehuyser, L., Schaeffer, E., Chaloin, O., Mueller, C.G., Baati, R., Wagner, A., 2012. Synthesis of novel mannoside glycolipid conjugates for inhibition of HIV-1 trans-infection. *Bioconjugate Chem.* 23, 1731–1739.
- Diamond, M.S., Zachariah, M., Harris, E., 2002. Mycophenolic acid inhibits Dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. *Virology* 304, 211–221.
- Duyen, H.T.L., Cerny, D., Trung, D.T., Pang, J., Velumani, S., Toh, Y.X., Qui, P.T., Hao, N.V., Simmons, C., Haniffa, M., Wills, B., Fink, K., 2017. Skin dendritic cell and T cell activation associated with dengue shock syndrome. *Sci. Rep.* 7, 14224.
- Flacher, V., Neuberger, P., Point, F., Daubeuf, F., Muller, Q., Sigwalt, D., Fauny, J.D., Remy, J.S., Frossard, N., Wagner, A., Mueller, C.G., Schaeffer, E., 2015. Mannoside glycolipid conjugates display anti-inflammatory activity by inhibition of Toll-like receptor-4 mediated cell activation. *ACS Chem. Biol.* 10, 2697–2705.
- Hyrina, A., Meng, F., McArthur, S.J., Eivemark, S., Nabi, I.R., Jean, F., 2017. Human Subtilisin Kexin Isozyme-1 (SKI-1)/Site-1 Protease (S1P) regulates cytoplasmic lipid droplet abundance: a potential target for indirect-acting anti-dengue virus agents. *PLoS One* 12 e0174483.
- Ivory, M.O., Birchall, J.C., Piguet, V., 2015. Early dengue virus infection in human skin: a cycle of inflammation and infectivity. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1711–1712.
- Jadav, S.S., Kaptein, S., Timiri, A., De Burghgraeve, T., Badavath, V.N., Ganesan, R., Sinha, B.N., Neyts, J., Leyssen, P., Jayaprakash, V., 2015. Design, synthesis, optimization and antiviral activity of a class of hybrid dengue virus E protein inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 1747–1752.
- Julander, J.G., Perry, S.T., Shresta, S., 2011. Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antivir. Chem. Chemother.* 21, 105–116.
- Kaptein, S.J., Neyts, J., 2016. Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections. *Curr. Opin. Pharmacol.* 30, 1–7.
- Kaufmann, B., Rossmann, M.G., 2011. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect.* 13, 1–9.
- Lambeth, C.R., White, L.J., Johnston, R.E., de Silva, A.M., 2005. Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3267–3272.
- Levental, K.R., Lorent, J.H., Lin, X., Skinkle, A.D., Surma, M.A., Stockenbojer, E.A., Gorfe, A.A., Levental, I., 2016. Polyunsaturated lipids regulate membrane domain stability by tuning membrane order. *Biophys. J.* 110, 1800–1810.
- Lo, Y.C., Perng, G.C., 2016. Novel concept on antiviral strategies to dengue. *Curr. Opin. Virol.* 18, 97–108.
- Marangon, I., Boggetto, N., Menard-Moyon, C., Luciani, N., Wilhelm, C., Bianco, A., Gazeau, F., 2013. Localization and relative quantification of carbon nanotubes in cells with multispectral imaging flow cytometry. *J. Vis. Exp.* e50566.
- Martina, B.E., Koraka, P., Osterhaus, A.D., 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 564–581.
- Mazzon, M., Mercer, J., 2014. Lipid interactions during virus entry and infection. *Cell. Microbiol.* 16, 1493–1502.
- Miller, J.L., de Wet, B.J., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C.M., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Gordon, S., 2008. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.* 4, e17.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C., 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313–319.
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Despres, P., 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4, 723–728.
- Noble, C.G., Chen, Y.L., Dong, H., Gu, F., Lim, S.P., Schul, W., Wang, Q.Y., Shi, P.Y., 2010. Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antivir. Res.* 85, 450–462.
- Pollock, S., Nichita, N.B., Bohmer, A., Radulescu, C., Dwek, R.A., Zitzmann, N., 2010. Polyunsaturated liposomes are antiviral against hepatitis B and C viruses and HIV by decreasing cholesterol levels in infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17176–17181.
- Rather, I.A., Parray, H.A., Lone, J.B., Paek, W.K., Lim, J., Bajpai, V.K., Park, Y.H., 2017. Prevention and control strategies to counter dengue virus infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–8.
- Schaeffer, E., Dehuyser, L., Sigwalt, D., Flacher, V., Bernacchi, S., Chaloin, O., Remy, J.S., Mueller, C.G., Baati, R., Wagner, A., 2013. Dynamic micelles of mannoside glycolipids are more efficient than polymers for inhibiting HIV-1 trans-infection. *Bioconjugate Chem.* 24, 1813–1823.
- Schaeffer, E., Flacher, V., Papageorgiou, V., Decossas, M., Fauny, J.D., Kramer, M., Mueller, C.G., 2015. Dermal CD14(+) dendritic cell and macrophage infection by dengue virus is stimulated by Interleukin-4. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1743–1751.
- Schmid, M.A., Diamond, M.S., Harris, E., 2014. Dendritic cells in dengue virus infection: targets of virus replication and mediators of immunity. *Front. Immunol.* 5, 1–10.
- Schmid, M.A., Harris, E., 2014. Monocyte recruitment to the dermis and differentiation to dendritic cells increases the targets for dengue virus replication. *PLoS Pathog.* 10, e1004541.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., Eggeling, C., 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 18, 361–374.
- St Vincent, M.R., Colpitts, C.C., Ustinov, A.V., Muqadas, M., Joyce, M.A., Barsby, N.L., Epand, R.F., Epand, R.M., Khramyshev, S.A., Valueva, O.A., Korshun, V.A., Tyrrell, D.L., Schang, L.M., 2010. Rigid amphiphatic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17339–17344.
- Stanaway, J.D., Shepard, D.S., Undurraga, E.A., Halasa, Y.A., Coffeng, L.E., Brady, O.J., Hay, S.I., Bedi, N., Bensenor, I.M., Castaneda-Orjuela, C.A., Chuang, T.W., Gibney, K.B., Memish, Z.A., Rafay, A., Ukwaja, K.N., Yonemoto, N., Murray, C.J.L., 2016. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect. Dis.* 16, 712–723.
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Bix, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger, S., Marovich, M.A., 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 823–829.
- Vigant, F., Santos, N.C., Lee, B., 2015. Broad-spectrum antivirals against viral fusion. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 426–437.
- Zaitseva, E., Yang, S.T., Melikov, K., Pourmal, S., Chernomordik, L.V., 2010. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog.* 6 e1001131.
- Zuba-Surma, E.K., Kucia, M., Abdel-Latif, A., Lillard Jr., J.W., Ratajczak, M.Z., 2007. The ImageStream System: a key step to a new era in imaging. *Folia histochem. Cytobiol.* 45, 279–290.

Annexe b : « Chikungunya virus envelope protein E2 provides a targeting vector for antigen delivery to human dermal CD14+ dendritic cells »

Brulefert A, Kraemer M, Cumin M, Selle A, Hoste A, Gad HH, Rühl J, Madinier JB, Chaloin O, Münz C, Després P, Mueller CG, Flacher V.

Chikungunya virus envelope protein E2 provides a targeting vector for antigen delivery to human dermal CD14⁺ dendritic cells.

Adrien Brulefert¹, Melanie Kraemer¹, Marie Cumin¹, Amandine Selle¹, Astrid Hoste¹, Hans-Henrik Gad², Julia Rühl³, Jean-Baptiste Madinier¹, Olivier Chaloin¹, Christian Münz³, Philippe Després^{2,4}, Christopher George Mueller¹, Vincent Flacher^{1*}

1. Laboratory CNRS I²CT/UPR3572 Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry, Laboratory of Excellence Medalis, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

2. Unité Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôtes, Institut Pasteur, Paris, France.

3. Viral Immunobiology, Institute of Experimental Immunology, University of Zürich, Zürich, Switzerland.

4. Present address: Université de La Réunion, INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Plateforme Technologique CYROI, 97491 Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

*Correspondence: v.flacher@ibmc-cnrs.unistra.fr

TO THE EDITOR

Therapeutic modulation of human cutaneous antigen-presenting cells (APCs) that control the fate of T cells represents an interesting option for immunotherapy. As they capture glycosylated proteins via C-type lectins, anti-lectin antibodies have been used to specifically convey antigens to APCs (Romani *et al.*, 2012; Stoitzner *et al.*, 2014; Kastenmuller *et al.*, 2014). Beyond potential therapeutic applications, APC-targeting strategies can also be harnessed to acquire fundamental knowledge about their function (Flacher *et al.*, 2014). In human skin, epidermal Langerhans cells (LCs), CD1c⁺ dermal type-2 conventional dendritic cells (cDC2) and CD141⁺ dermal cDC1 (Nestle *et al.*, 2009; Schlitzer *et al.*, 2015) are attractive targets to stimulate naïve T cells in lymph nodes. Dermal APCs (dAPCs) also include two CD14⁺ subsets that express the lectins Mannose Receptor (MR)/CD206 and DC-specific intracellular adhesion molecules-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN)/CD209 (Klechevsky *et al.*, 2008; McGovern *et al.*, 2014). During skin explant culture, CD14⁺ dermal DCs (dDCs) can migrate into the supernatant, whereas sessile macrophages require enzymatic digestion to be isolated from the dermis. Nevertheless, in-depth comparison highlighted strong similarities between CD14⁺ dDCs and dermal macrophages (McGovern *et al.*, 2014). Both are now considered as permanent dermal residents that may exert local functions in pathogen capture and interactions with skin-resident memory T cells (TRM) (Clark, 2015). Subset differences might reflect their origin, i.e. monocyte-derived dDCs vs. embryonically seeded resident macrophages (Ginhoux and Guilliams, 2016; McGovern *et al.*, 2014). Because tools to specifically target human CD14⁺ dAPCs remain scarce (Duinkerken *et al.*, 2019), we propose here a novel approach based on recombinant viral envelope proteins.

Mosquito-borne Chikungunya virus (CHIKV), of the flavivirus genus of *Togaviridae* family, is introduced in the dermis during a blood meal. CHIKV infection triggers high fever, arthritis, skin rash, myalgia and persistent arthralgia. In the absence of specific antiviral therapy, treatment options are limited. Our finding that CD14⁺ dAPCs are preferentially infected by Dengue virus (Kwan *et al.*, 2008; Schaeffer *et al.*, 2015) prompted the idea that they may represent an immediate CHIKV target. CD14⁺ dAPCs isolated from digested dermis, monocyte-derived DCs (MDDCs) and dermal-like macrophages (MDdMs) were exposed to CHIKV-06.049 strain (MOI=2.5) and compared with HeLa cells, in which vigorous viral replication is expected (Sourisseau *et al.*, 2007). CD14⁺ dAPCs and their monocyte-derived equivalent MDdMs were permissive CHIKV target cells, as well as MDDCs, which resemble the inflammatory DCs recruited to the site of infection (**Figure 1A**).

We hypothesized that APCs express endocytic receptors of viral capsid proteins. CHIK-sE2, a soluble form of CHIKV envelope glycoprotein E2, was fused to the SNAP proprietary enzyme and produced in insect cells to retain specific N-glycosylations that may be recognized by lectins (**Figure 1B**). In surface plasmon resonance assays, CHIK-sE2 displayed high affinity for MR and DC-SIGN (**Figure S1A/B**), with dissociation constants of 3.9nM and 51.1nM, respectively (**Figure S1C**). CHIK-sE2 was then covalently conjugated via its enzymatic SNAP moiety to AlexaFluor488 fluorochrome (**Figure 1C**). Since MDdMs and MDDCs, but not monocytes, express high levels of DC-SIGN (Kwan *et al.*, 2008), we assessed their binding of the viral glycoprotein. CHIK-sE2-A488 labelled MDdMs and MDDCs but not monocytes, and an anti-CHIK-sE2 antibody could diminish binding to MDDCs (**Figure 1D/E**). Moreover, fluorescence microscopy revealed intracellular vesicles containing CHIK-sE2-A488 within MDdMs and MDDCs (**Figure 1F**).

To evaluate whether CHIK-sE2 can target CD14⁺ dAPCs within the skin, we compared its capture by different primary cutaneous APCs and non-hematopoietic cells. Epidermal cell suspensions, fibroblasts or purified CD14⁺ dAPCs and CD1c⁺ dDCs were incubated with CHIK-sE2-A488 and binding efficacy was measured by flow cytometry. CD14⁺ dAPCs displayed clear binding of CHIK-sE2-A488, as opposed to keratinocytes, LCs, fibroblasts and CD1c⁺ dDCs (**Figure 1G**). Anti-CHIK-sE2 mAb inhibited the interaction with CD14⁺ dAPCs. Quantitative analyses on skin samples from different individuals confirmed that only CD14⁺ dAPCs could efficiently capture CHIK-sE2-A488 (**Figure 1H**). Moreover, we found a strong correlation ($R^2=0.73$) between DC-SIGN expression and CHIK-sE2-binding (**Figure 1I**). Finally, CHIK-sE2-A488 was detected as condensed spots in the cytoplasm of CD14⁺ dAPCs, reflecting endocytic uptake (**Figure 1J**).

We next tested whether CHIK-sE2 could be used to convey antigens to CD14⁺ dDCs, which stimulate T cells more potently than macrophages (McGovern *et al.*, 2014). To assess binding to CD14⁺ dDCs in comparison with the other skin DC subsets, we cultured skin explants for 3 days and retrieved LCs, CD14⁻ dDCs and CD14⁺ dDCs from the supernatant (**Figure 2A**). When the cell suspension was exposed to CHIK-

sE2-A488, only CD14⁺ dDCs significantly captured the fluorescent protein (**Figure 2B/C**). Internalization was demonstrated by confocal fluorescent microscopy (**Figure 2D and Video S2**). To address antigen presentation, we used a CD4⁺ T-cell line with defined specificity for HLA-DR1-restricted antigenic peptide of the Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (EBNA1) (Ruhl *et al.*, 2019). Total migrating APCs or CD14⁺ dDCs from HLA-DR1⁺ skin explants (5 donors out of 34) were first loaded with CHIK-sE2 conjugated to EBNA1 peptide (**Figure 2E**). APCs were then cocultured with CFSE-labelled, EBNA1-specific CD4⁺ T cells. After 5 days, proliferation and intracellular IFN- γ production were quantified by flow cytometry. Alone or with mismatched, non-DR1 APCs, T cells did not proliferate (**Figure 2F**). Conversely, CHIK-sE2-EBNA1-exposed APCs from HLA-DR1 donors strongly enhanced proliferation (**Figure 2G**) and triggered IFN- γ production (**Figure 2H**) of EBNA1-specific T cells. Finally, targeting purified CD14⁺ dDCs with CHIK-sE2-EBNA1 was sufficient to promote EBNA1-specific T-cell proliferation. Yet, IFN- γ production was not significantly enhanced, possibly because CD14⁺ dDCs produce anti-inflammatory IL-10 (Klechevsky *et al.*, 2008).

Cutaneous TRM are derived from effector T cells that colonize the skin to mediate adaptive immune responses (Clark, 2015). CD14⁺ dAPCs might be critically involved during secondary exposure to cognate antigen, because they also permanently reside in the skin and can reactivate memory T cells (McGovern *et al.*, 2014). CD14⁺ dAPCs targeting by CHIK-sE2 could be particularly useful to investigate and influence these interactions for therapeutic purposes. Moreover, our work suggests that arboviruses may represent a natural reservoir of molecules targeting different skin APCs. They may be derived into a specific delivery system for antigens but also adjuvants, silencing RNA or toxins, thereby harnessing the properties of skin APCs for immunotherapy or vaccination.

Acknowledgements

This work was supported by the European Union Marie-Slodowska-Curie Career Integration Grant of Dr. V. Flacher (PCIG12-GA-2012-334011 – DERMACRO) and by the Agence Nationale pour la Recherche (Program “Investissements d’Avenir,” ANR-10-LABX-0034 MEDALIS and ANR-11-EQPX-022). The authors wish to thank Drs. Sylvie Tourne and Henri De La Salle (Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France) for their advice on HLA typing assays.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CD14⁺ dAPCs are infected by Chikungunya virus and selectively capture CHIK-sE2 recombinant envelope protein

(A) HeLa cells, MDdMs, MDDCs and CD14⁺ dAPCs were exposed to CHIKV at an MOI of 2.5. After 2h, the cells were washed and cultured for 24h. The cell supernatant was harvested and viral progeny titrated on AP-1 cells by a focus infectivity assay. (B) Schematic representation of CHIK-sE2 cloned in frame with a SNAP-tag and produced in S2 insect cells. Red residues depict N-glycosylation sites N264, N274 and N346. (C) Covalent coupling to CHIK-sE2 occurs when the SNAP enzymatic moiety reacts with benzylguanine (BG)-coupled AlexaFluor488, generating fluorescent CHIK-sE2-A488. (D) Interaction of CHIK-sE2-A488 with monocytes, MDdMs and MDDCs. The cells were incubated for 30 min at 37°C with 150nM CHIK-sE2-A488 or left untreated, then analyzed by flow cytometry. Representative histograms are shown. For MDDCs, CHIK-sE2 was preincubated with or without anti-CHIK-sE2 mAb. (E) Relative mean fluorescence intensity (MFI) of CHIK-sE2-A488-treated cells vs. untreated cells. (F) Confocal microscopy images of MDdMs and MDDCs incubated with CHIK-sE2-A488. Counterstaining of HLA-DR allows visualization of the cell surface. DAPI labels nuclei in blue. Scale bars: 10µm. (G) Healthy human skin samples were from donors undergoing plastic surgery. Epidermal cell suspensions were prepared by trypsin digestion. HLA-DR⁺ CD1a⁺ LCs and HLA-DR⁻ CD1a⁻ keratinocytes were identified by flow cytometry. The dermis was digested by collagenase and CD1c⁺ dDCs were isolated by anti-CD1c-coupled magnetic beads. After 2 days of culture, the dermal fibroblasts were identified as HLA-DR⁻ CD14⁻ adherent cells and the non-adherent CD14⁺ dAPCs were isolated by anti-CD14-coupled magnetic beads. 10⁵ enriched cells were incubated in serum-free medium for 1h at 37°C with 150nM CHIK-sE2-A488 or left untreated. Where indicated, CHIK-sE2-A488 was preincubated for 20min with anti-CHIK-sE2 mAb before addition of CD14⁺ dAPCs. Cells were stained with antibodies against HLA-DR, CD1a, CD14 and CD1c and analyzed by flow cytometry. (H) Relative MFI comparing the fluorescence intensity of CHIK-sE2-A488-treated vs. untreated cells. (I) Correlation between CHIK-E2 binding and DC-SIGN expression by CD14⁺ dAPCs. (J) Confocal microscopy images of CD14⁺ dAPCs exposed to CHIK-sE2-A488 for 30 min at 37°C. Cells were labelled for cell-surface HLA-DR, fixed and visualized by fluorescence microscopy. DAPI labels nuclei in blue. Scale bars: 10µm. Data were obtained from at least three different donors and are presented as mean ±SEM. Statistical comparisons: ANOVA followed by post-hoc tests (ns: non significant, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Figure 2: CHIK-sE2 conveys antigenic peptide to CD14⁺ dDCs for presentation to CD4⁺ T cells. (A) Whole skin pieces were floated onto complete culture medium for 3 days. 10⁵ total emigrating cells were incubated alone or with 150nM CHIK-sE2-A488 in serum-free medium for 1h at 37°C. Cells were then stained with antibodies against HLA-DR, Langerin/CD207, DC-SIGN/CD209, and CD14 and analyzed by flow cytometry. **(B)** Representative histograms of cells treated with CHIK-sE2-A488 or left untreated. **(C)** Relative MFI comparing the fluorescence intensity of CHIK-sE2-A488 vs. untreated cells. **(D)** CD14⁺ dDCs enriched by CD14 MACS were incubated with CHIK-sE2-A488 for 1h at 37°C, then fixed with 4% PFA and counterstained with anti-CD14 to highlight cell surface. Fluorescent CHIK-sE2 was visualized in intracellular compartments of targeted cells by spinning-disk confocal microscopy. **(E)** Schematic representation of EBNA1-derived peptide coupling to CHIK-sE2. The selected peptide contains the cognate HLA-DR1-restricted CD4⁺ T cell epitope (underlined). **(F)** EBV-specific T-cell activation by the indicated skin APC populations with and without CHIK-sE2-EBNA1 loading (200nM) was measured as EBNA1-specific T cell proliferation by CFSE dilution assays. **(G)** IFN- γ production was assessed by intracellular cytokine staining in proliferating EBNA1-specific CD4⁺ T cells after cognate peptide restimulation of co-cultures with the indicated skin APC populations with and without CHIK-sE2-EBNA1 loading. Data were obtained from at least three different donors and are presented as mean \pm SEM. Statistical comparisons: ANOVA followed by post-hoc tests (ns: non significant, *p<0.05, **p<0.01).

REFERENCES

- Clark RA: Resident memory T cells in human health and disease. *Sci Transl Med* 7:269rv1 (2015).
- Duinkerken S, Horrevorts SK, Kalay H, Ambrosini M, Rutte L, De Gruijl TD, Garcia-Vallejo JJ, van KY: Glyco-Dendrimers as Intradermal Anti-Tumor Vaccine Targeting Multiple Skin DC Subsets. *Theranostics* 9:5797-5809 (2019).
- Flacher V, Tripp CH, Mairhofer DG, Steinman RM, Stoitzner P, Idoyaga J, Romani N: Murine Langerin+ dermal dendritic cells prime CD8+ T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance. *EMBO Mol Med* 6:1191-1204 (2014).
- Ginhoux F, Williams M: Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44:439-449 (2016).
- Kastenmuller W, Kastenmuller K, Kurts C, Seder RA: Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype? *Nat Rev Immunol* 14:705-711 (2014).
- 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* 29:497-510 (2008).
- Kwan WH, Navarro-Sanchez E, Dumortier H, Decossas M, Vachon H, dos Santos FB, Fridman HW, Rey FA, Harris E, Despres P, Mueller CG: Dermal-type macrophages expressing CD209/DC-SIGN show inherent resistance to dengue virus growth. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e311 (2008).
- McGovern N, Schlitzer A, Gunawan M, Jardine L, Shin A, Poyner E, Green K, Dickinson R, Wang XN, Low D, Best K, Covins S, Milne P, Pagan S, Aljefri K, Windebank M, Miranda-Saavedra D, Larbi A, Wasan PS, Duan K, Poidinger M, Bigley V, Ginhoux F, Collin M, Haniffa M: Human dermal CD14(+) cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity* 41:465-477 (2014).
- Nestle FO, Di MP, Qin JZ, Nickoloff BJ: Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9:679-691 (2009).
- Romani N, Flacher V, Tripp CH, Sparber F, Ebner S, Stoitzner P: Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* 351:113-138 (2012).
- Ruhl J, Citterio C, Engelmann C, Haigh T, Dzionek A, Dreyer J, Khanna R, Taylor GS, Wilson JB, Leung CS, Munz C: Heterologous prime-boost vaccination protects against EBV antigen-expressing lymphomas. *J Clin Invest* 129:2071-2087 (2019).
- Schaeffer E, Flacher V, Papageorgiou V, Decossas M, Fauny JD, Kramer M, Mueller CG: Dermal CD14(+) Dendritic Cell and Macrophage Infection by Dengue Virus Is Stimulated by Interleukin-4. *J Invest Dermatol* 135:1743-1751 (2015).
- Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F: Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol* 41:9-22 (2015).

Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, Sol-Foulon N, Le Roux K, Prevost MC, Fsihi H, Frenkiel MP, Blanchet F, Afonso PV, Ceccaldi PE, Ozden S, Gessain A, Schuffenecker I, Verhasselt B, Zamborlini A, Saib A, Rey FA, Arenzana-Seisdedos F, Despres P, Michault A, Albert ML, Schwartz O: Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog* 3:e89 (2007).

Stoitzner P, Schaffenrath S, Tripp CH, Reider D, Komenda K, Del FB, Djedovic G, Ebner S, Romani N: Human skin dendritic cells can be targeted in situ by intradermal injection of antibodies against lectin receptors. *Exp Dermatol* 23:909-915 (2014).

SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1: DC-SIGN and MR are receptors for CHIK-sE2. Affinity of CHIK-sE2 for immobilized MR (A) and DC-SIGN (B) were measured by surface plasmon resonance. Sensorgrams depict association and dissociation to DC-SIGN (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 μ M of CHIK-E2) and MR (3.1, 6.3, 12.5, 25, 50 and 100nM of CHIK-sE2). (C) Constants for the binding assays. The K_D for DC-SIGN and MR were 51.1nM and 3.9nM, respectively.

Figure S2: Z-stack video rendition of CD14⁺ dDCs loaded with CHIK-sE2-A488. CD14⁺ dDCs enriched by CD14 MACS were incubated with 150nM CHIK-sE2-A488 in serum-free medium for 1h at 37°C, then fixed with 4% PFA and counterstained with anti-CD14 to highlight cell surface (magenta). Fluorescent CHIK-sE2 (green) was visualized in intracellular compartments of targeted cells by spinning-disk confocal microscopy.

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Antibodies and media

The following antibodies were used for flow cytometry: HLA-DR (clones Tü39 or L243), CD206/MR (19.2), CD209/DC-SIGN (DCN46), CD1a (HI149), CD86 (FUN-1), IFN- γ (B27), CD3 (UCHT1) from BD, CD14 (MEM-18, Immunotools), CD1c (AD5-8E7) and CD4 (REA623) from Miltenyi Biotec, and CD207/Langerin (DCGM4, Dendritics). Staining buffer was PBS containing 2% fetal calf serum (FCS; Dutscher) and 2.5mM EDTA (SE buffer). Dead cells were labelled by Fixable Viability Dye-eFluor450 (eBioscience) or Sytox Red dye (Invitrogen). Cells were collected on FACSCalibur (BD) or Gallios (Beckman-Coulter) flow cytometers. Data were analysed with CellQuest (BD), Kaluza (Beckman-Coulter) or FlowJo (Treestar) softwares. Complete medium was RPMI1640 supplemented with 10 μ g/mL gentamycin, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 10mM HEPES (all from Lonza) and 10% FCS.

Primary cell isolation and culture

Fresh abdominal skin was obtained from patients undergoing abdominoplasty with written informed consent and institutional review board approval, in agreement with the Helsinki Declaration and French legislation.

Enzymatic digestion: Subcutaneous fat was removed and the remainder was incubated for 1h at 37°C in PBS containing 0.5% trypsin XI (Sigma-Aldrich). The epidermis was then peeled off and agitated in complete medium for 10min to liberate LCs and keratinocytes. The dermis was cut into small pieces and digested overnight with 1mg/mL collagenase I (Invitrogen) and 50µg/mL DNase (Sigma-Aldrich) at 37°C and 5% CO₂ in complete medium. The digested dermis was filtered in SE buffer with 50µm cell strainers and dermal cDC2 were isolated by anti-CD1c-coupled magnetic beads (Miltenyi Biotec). Remaining cells were incubated for 48h in a 175cm² culture flask (50x10⁶ cells/50mL complete medium). CD14⁺ dAPCs were isolated from the loosely adherent cells using anti-CD14-conjugated magnetic beads (Miltenyi Biotec). After an overnight culture in dermal fibroblast-conditioned culture medium at 10⁶ cells/mL, CD14⁺ dAPCs were sorted by flow cytometry as CD14⁺ HLA-DR^{low} CD86^{low} cells.

Skin explant cultures: 2cm² biopsies of ~1mm thickness were placed at air-liquid interface onto 40µm cell strainers in 6mL complete medium. After 3 days, migrating cells were harvested from the culture supernatant. Resident memory T cells were excluded by selection with anti-CD3 magnetic beads (Miltenyi-Biotec). Where indicated, CD14⁺ dDCs were separated with anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi-Biotec).

Monocyte-derived DCs and macrophages

Monocyte-derived dermal-like macrophages (MDdMs) and MDDCs were generated from blood monocytes as described (Kwan *et al.*, 2008). Briefly, 2x10⁶ monocytes, purified from adult blood by counterflow centrifugal elutriation (Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France) were cultured in 5mL complete medium in the presence of GM-CSF (50ng/mL) and IL-4 (10ng/mL) for MDDCs, or GM-CSF (25ng/mL), IL-10 (25ng/mL) and M-CSF (10ng/mL) for MDdMs. On day 3, the culture was refreshed with 1mL of complete medium containing GM-CSF (50ng/mL) and IL-4 (10ng/mL) for MDDCs, or GM-CSF (12.5ng/mL) and IL-10 (12.5ng/mL) for MDdMs. On day 5, cells were characterized by flow cytometry for expression of CD1a, CD14 and DC-SIGN.

Cell lines

HeLa and Vero cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FCS and antibiotics. *Aedes pseudoscutellaris* AP-61 mosquito cells were cultured at 27°C in Leibovitz's L-15 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS, 1% tryptose phosphate broth (Eurobio) and antibiotics.

Viral infections

The CHIKV-06.049 virus strain was isolated from a young adult during the 2006 outbreak of Chikungunya fever in La Réunion island (Schuffenecker *et al.*, 2006). Virus stocks were produced on mosquito AP-61 cells (Brehin *et al.*, 2008) and all infectivity titers were expressed as plaque-forming units on Vero cells. 5×10^4 HeLa cells, CD14⁺ dAPCs, MDdMs and MDDC were exposed to CHIKV at an MOI of 2.5, or mock-infected, in RPMI1640 supplemented with 2% FCS for 2h at 37°C. Virus was removed by extensive washing and cells were kept for 22h in their respective culture media. The supernatants were used for titer analysis by the plaque-forming assay on Vero cells.

Recombinant CHIK-sE2 protein production

Stably transfected *Drosophila melanogaster* S2 cell line inducible for the secretion of the ectodomain of CHIKV envelope E2 protein (CHIK-sE2; residues 4-364) were described elsewhere (Aubry *et al.*, 2015). Briefly, a SNAP adaptor sequence (New England Biolabs) was fused in-frame to the C-terminus of recombinant CHIK-sE2, resulting in a chimeric protein that was purified from the supernatants of S2 cells. SNAP is the catalytic site of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. 3D rendition of CHIK-sE2-SNAP was created with the Yasara software.

Surface plasmon resonance

Surface plasmon resonance experiments were performed using a Biacore 3000. Extracellular domains of DC-SIGN[Lys62-Ala404] and MR[Leu19-Lys1383] (R&D Systems) were immobilized on a CM5 sensor chip (GE-Healthcare) by injecting 70µL of recombinant proteins (50µg/mL in formate buffer, pH 4.3) onto the surface activated with N-Ethyl-N'-dimethylaminopropyl carbodiimide/N-hydroxysuccinimide. 20µL of ethanolamine hydrochloride, pH 8.5, saturated the free activated sites of the matrix. Biosensor assays were performed with HEPES-buffered-saline (10mM HEPES, 150mM sodium chloride, pH 7.4) containing 0.005% surfactant P20 and 5mM CaCl₂, as running buffer. All binding experiments were carried out at 25°C with a constant flow rate of 20µL/min. CHIK-sE2 dissolved in the running buffer was injected for 3min, followed by a dissociation phase of 3min. The sensor chip surface was regenerated after each experiment by injecting 10µL EDTA 0.5M pH 8.0. The kinetic parameters were calculated using the BIAeval 4.1 software. Analysis was performed using the simple Langmuir binding 1:1 model with separate k_a/k_d (k_{on}/k_{off}). The specific binding profiles were obtained after subtracting the response signal from the control channel and from blank-buffer injection. The fitting to each model was judged by the chi-square value and randomness of residue distribution compared to the theoretical model.

CHIK-sE2 binding studies

Benzylguanine (BG)-AlexaFluor488 fluorochrome (New England Biolabs) was covalently linked to CHIK-sE2 via the SNAP moiety according to the manufacturer's recommendations. 10^5 cells were incubated in 200 μ L RPMI1640 alone or with 2 μ g of CHIK-sE2-A488 (final concentration \sim 150nM) for 30min at 37°C. The cells were then washed and labelled for cell surface markers in SE buffer and analyzed by flow cytometry. Where indicated, CHIK-sE2 (1.2 μ g) was pre-incubated for 30min at 4°C with anti-E2 monoclonal antibody 3E4 (0.9 μ g) to verify specificity of binding (Brehin *et al.*, 2008). To quantify binding efficiency, the mean fluorescent intensity (MFI) of CHIK-sE2-A488-exposed cells was calculated relatively to the MFI of untreated cells, which was set at 100%. For internalization studies by confocal microscopy, cells exposed to CHIK-sE2-A488 were washed in SE buffer and counterstained with antibodies against HLA-DR or CD14 for 25min on ice. The cells were washed twice, fixed in 4% formaldehyde for 20min at RT, and the secondary goat-anti-mouse AlexaFluor594 antibody (Invitrogen) was added and incubated for 30min on ice. After washing, nuclei were labelled with DAPI. Samples were mounted on glass slides in fluorescence mounting medium (Dako). Images taken with Zeiss confocal microscopes LSM510 and Axio Observer Z1 were analyzed with ImageJ.

Peptide synthesis

Peptides were assembled using optimized Fmoc chemistry protocols with a multichannel peptide synthesizer (Neimark and Briand, 1993). Side-chain deprotection and cleavage of peptides from the solid support was performed by treatment with reagent K (82.5% TFA v/v, 5% phenol w/v, 5% water v/v, 5% thioanisole v/v, 2.5% 1,2-ethanedithiol v/v) for 150min at 20°C. Peptides were purified by reversed-phase HPLC (RP-HPLC) using a Beckman preparative HPLC system (Gagny, France) on a Nucleosil C18 (1 x 30cm) column, (Macherey Nagel, Hoerdts, France). The elution was achieved with a linear gradient of aqueous 0.1% TFA and 0.08% TFA in acetonitrile at a flow rate of 6mL/min with UV detection at 230nm. The purity of peptides was controlled by analytical RP-HPLC on a Beckman instrument (Gagny, France) with a Nucleosil C18 5 μ m column (150 x 4.6mm) using a linear gradient of 0.1% TFA in water and acetonitrile containing 0.08% TFA at a flow rate of 1.2mL/min. The integrity of each peptide was assessed by LC/MS using a Thermo Finigan LCQ.

The Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (EBNA1)-derived peptide (507-535; CVFVYGGSKTSLYNLRRGTALAIPQRLTG) was bound to BG-maleimide (New England Biolabs) by reacting with the thiol group of the N-terminal cysteine residue, before purification by HPLC.

Expansion of EBNA1-specific CD4⁺ T memory cells

Allogeneic PBMCs were purified from buffy coats of healthy blood donors (EFS) by Ficoll gradient (Sigma-Aldrich). 5×10^3 EBNA1-specific CD4⁺ T cell (CK-NLR line, HLA-DR1) cells/well were cocultured with 10^5 irradiated PBMCs (3000rad) and 2×10^3 irradiated, EBV-infected autologous B-LCL (20000rad) in RPMI1640 supplemented with 8% PHS (pooled human sera, Corning), 150U/mL IL-2 (Novartis), 1 μ g/mL Phytohemagglutinin-L (Sigma-Aldrich), and gentamicin. After 5 days, half of the medium was refreshed with RPMI1640 + 8% PHS + gentamycin + 450U/mL IL-2. Cells were monitored daily and split into the same medium and new 96 well-plates if necessary, until freezing at day 14 (Ruhl *et al.*, 2019).

Antigen presentation assays

Genomic DNA was extracted from 40-80mg of skin using Nucleospin columns (Macherey-Nagel) and HLA haplotype of donors was determined with SSP HLA DQDR Combitray kit (Olerup). BG-EBNA1 peptide (250pmol) was coupled to CHIK-sE2 (200pmol) via the SNAP moiety in PBS. CHIK-sE2-EBNA1 (200nM) was incubated with 5×10^5 migratory skin DCs or CD14⁺ dDCs for 1h in RPMI1640 medium. 10^4 T-cell depleted, CHIK-EBNA1-loaded skin DCs or CD14⁺ dDCs from HLA-DR1 donors were cocultured in 200 μ L RPMI1640 + 8% PHS in 96-well U-bottom plates with 5×10^4 EBNA1-specific CD4⁺ T cells previously labelled with 0.5 μ M carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). After 5 days, T cells were restimulated 6h with EBNA1 peptide (1 μ g/mL), including 4h with 10 μ g/mL brefeldin A and 1 μ M monensin (BD). T cells were stained for CD3 and CD4, then fixed and permeabilized with BD Cytotfix/Cytoperm Kit, stained with anti-IFN- γ antibody and analyzed by flow cytometry. T-cell proliferation was determined by CFSE dilution.

Statistical analyses

Data from different experimental conditions were tested by ANOVA, followed by relevant post-hoc multiple comparisons. Tests were performed with Prism 6.0 software (GraphPad). Values of p below 0.05 were considered significant.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

Aubry M, Finke J, Teissier A, Roche C, Broult J, Paulous S, Despres P, Cao-Lormeau VM, Musso D: Silent Circulation of Ross River Virus in French Polynesia. *Int J Infect Dis* 37:19-24 (2015).

Brehin AC, Rubrecht L, Navarro-Sanchez ME, Marechal V, Frenkiel MP, Lapalud P, Laune D, Sall AA, Despres P: Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology* 371:185-195 (2008).

Kwan WH, Navarro-Sanchez E, Dumortier H, Decossas M, Vachon H, dos Santos FB, Fridman HW, Rey FA, Harris E, Despres P, Mueller CG: Dermal-type macrophages expressing CD209/DC-SIGN show inherent resistance to dengue virus growth. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e311 (2008).

Neimark J, Briand JP: Development of a fully automated multichannel peptide synthesizer with integrated TFA cleavage capability. *Pept Res* 6:219-228 (1993).

Ruhl J, Citterio C, Engelmann C, Haigh T, Dzionek A, Dreyer J, Khanna R, Taylor GS, Wilson JB, Leung CS, Munz C: Heterologous prime-boost vaccination protects against EBV antigen-expressing lymphomas. *J Clin Invest* 129:2071-2087 (2019).

Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, Lavenir R, Pardigon N, Reynes JM, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel MP, Brehin AC, Cubito N, Despres P, Kunst F, Rey FA, Zeller H, Brisse S: Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* 3:e263 (2006).

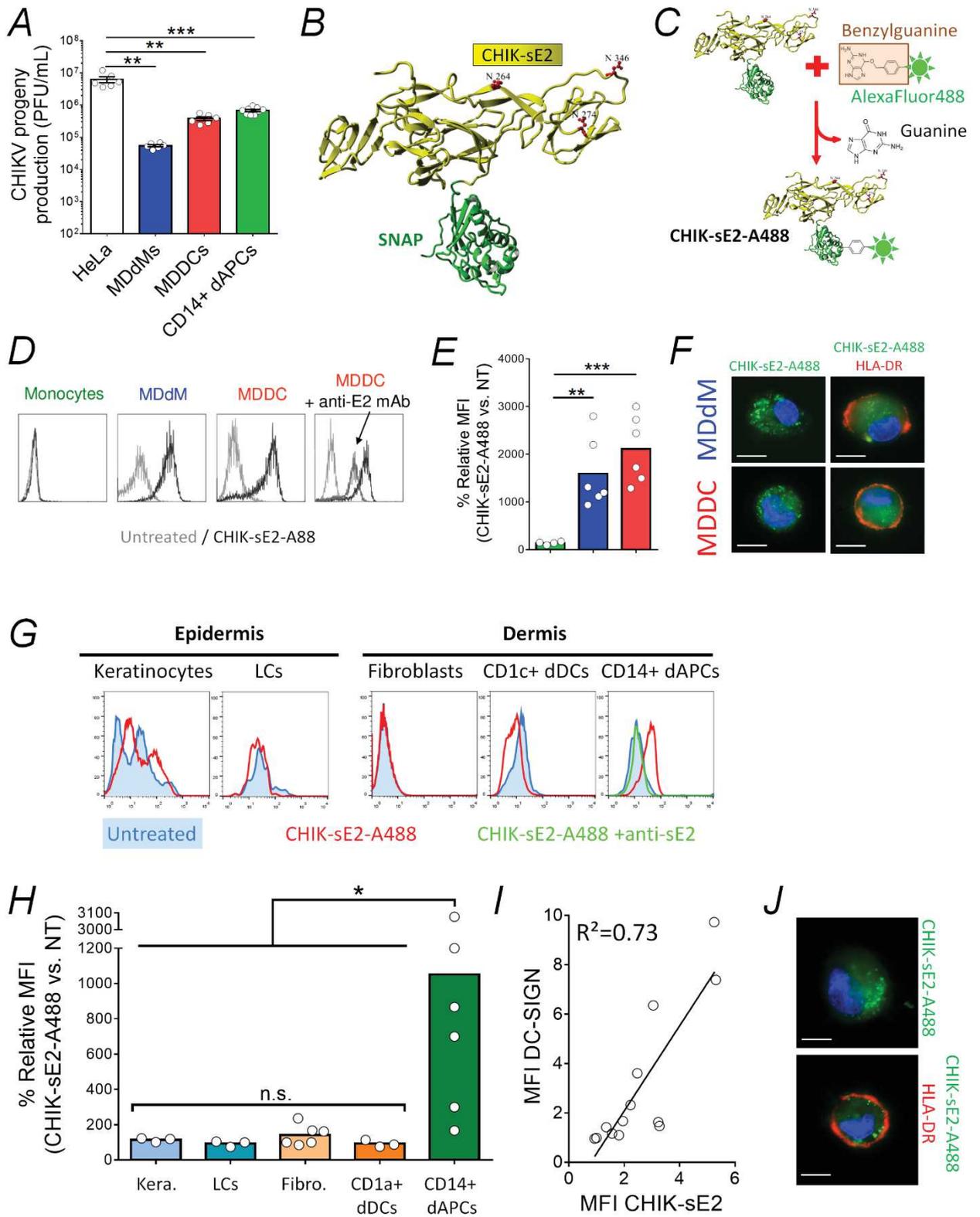


Figure 1

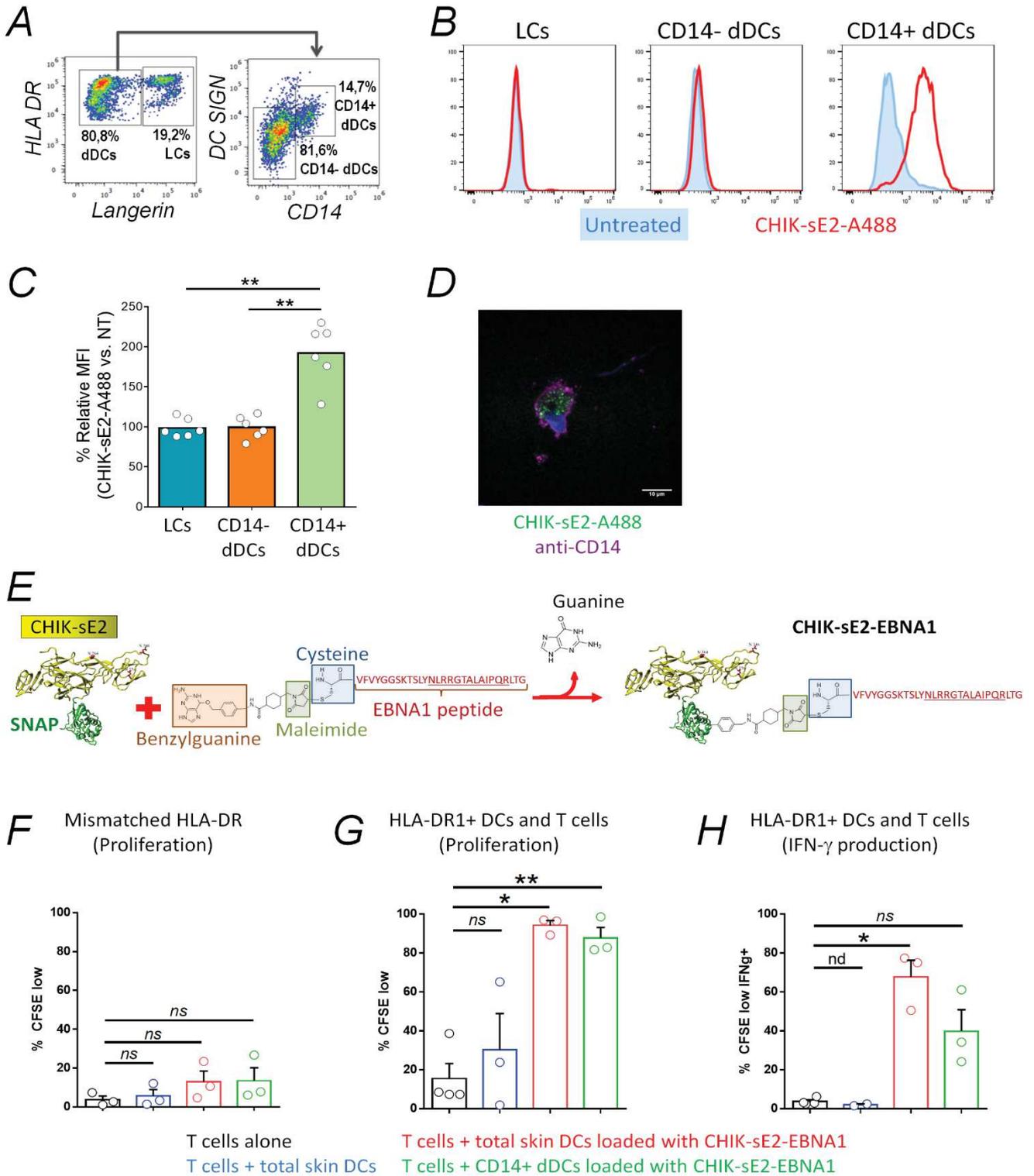
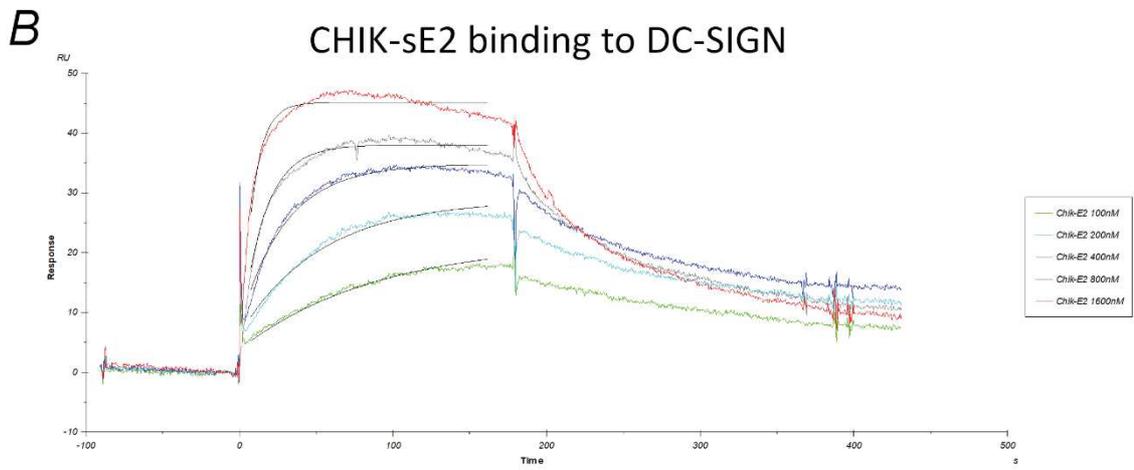
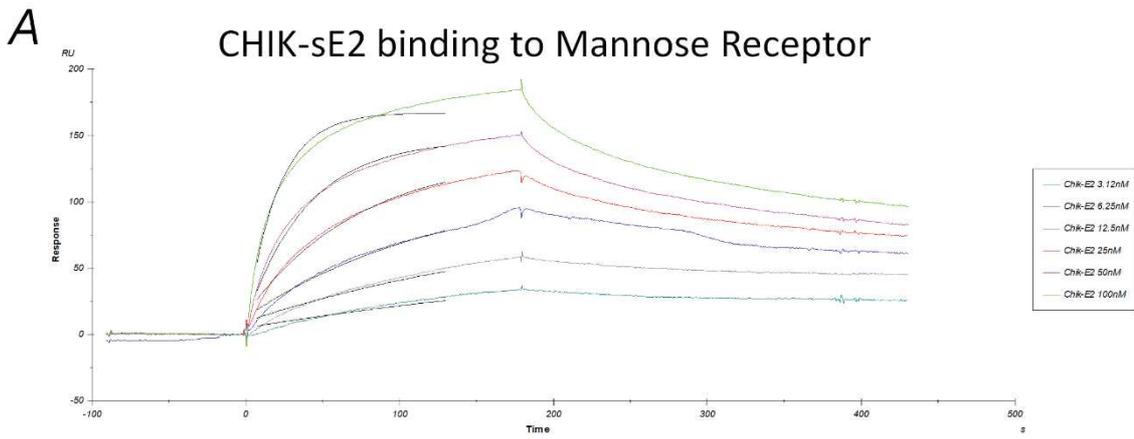


Figure 2



C

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (nM)	Chi ²
MR	4.72×10^5	1.83×10^{-3}	130.0	2.58×10^8	3.88	10.20
DC-SIGN	7.91×10^4	4.04×10^{-3}	29.7	1.96×10^7	51.10	2.44

Supplementary Figure 1

Adrien BRULEFERT

Reconstitution *in vitro* des réponses immunitaires initiales dans la dermatite atopique

Résumé

La dermatite atopique (DA) est une maladie cutanée inflammatoire chronique, caractérisée par un infiltrat de lymphocytes *T helper 2* (Th2) et une sensation de prurit. Cette réponse est sous influence du *Thymic Stromal Lymphopoietin* (TSLP), produit par les kératinocytes, qui affecte la capacité des cellules dendritiques (DCs) de la peau à orienter des lymphocytes T. Nous proposons ici de nouvelles stratégies pour modéliser la DA *in vitro* chez l'homme. Nous avons validé la vitamine D₃ pour initier des réponses Th2 TSLP-dépendantes (IL-13+) sur des explants de peau saine. Dans les DCs de peau ou dérivées de monocytes (MonoDCs), nous avons démontré que la vitamine D₃ provoque de profonds changements phénotypiques, caractérisés par l'expression du marqueur CD14. Ces cellules conduisent spécifiquement à une orientation Th2 (IL-4+) TSLP-indépendante. En parallèle, nous avons constitué un modèle 3D de peau contenant des DCs, des neurones et des kératinocytes, dans lequel nous évaluerons si la vitamine D₃ et d'autres agents peuvent induire une réponse Th2, et si celle-ci peut être influencée par les neurones. Cette étude aidera à la conception de thérapies spécifiques de la DA.

Mots clés : Dermatite atopique, *Thymic stromal lymphopoietin*, Cellule dendritique, *T helper 2*, Vitamine D₃, Modèle de peau reconstruite

Résumé en anglais

Atopic dermatitis (AD) is a chronic cutaneous inflammation driven by T helper 2 cells (Th2) and characterized by a persistent itch. This response relies on Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) production by keratinocytes and T cell orientation by TSLP-stimulated skin dendritic cells (DCs). Here, we propose new strategies to model AD pathogenesis in human systems. We validated vitamin D₃ as an initiation stimulus for human TSLP-dependent Th2 (IL-13+) responses in healthy skin explants. In skin DCs and monocyte-derived DCs (MonoDCs), we showed that vitamin D₃ provokes marked phenotypic alterations, characterized by CD14 expression. These cells specifically lead to TSLP-independent Th2 (IL-4+) orientation. In parallel, we have constructed a 3D skin model harboring DCs, sensory neurons and keratinocytes, in which we will evaluate whether vitamin D₃ and other stimuli may induce Th2 responses, and how this might be regulated by neurons. This approach will help the rational design of AD-specific therapies.

Keywords: Atopic dermatitis, Thymic stromal lymphopoietin, Dendritic cell, T helper 2, Vitamin D₃, Reconstructed skin model