

Thèse en cotutelle

Entre

**L'ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
ED414 - DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC)
CNRS- UPR3572

Et

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ LAVAL

Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université
Laval / LOEX

**Développement par génie tissulaire
d'un modèle de peau humaine innervée,
vascularisée et immunocompétente
pour l'étude des réactions
inflammatoires cutanées**

THÈSE présentée par :

Quentin MULLER

Soutenue le : **28 Septembre 2018**

pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : **Biotechnologies (neurosciences et immunologie)**

Docteur de l'Université Laval

Discipline/ Spécialité : **Médecine Expérimentale**

Développement par génie tissulaire d'un modèle de peau humaine innervée, vascularisée et immunocompétente pour l'étude des réactions inflammatoires cutanées

Thèse en cotutelle

Doctorat des sciences de la vie et de la santé de l'Université de Strasbourg –
Biotechnologies (neurosciences et immunologie)

Doctorat de la Faculté de médecine de l'Université Laval - Médecine expérimentale



Quentin Muller

THÈSE co-dirigée par :

Monsieur FLACHER Vincent Chargé de recherches (CR2-CNRS), CNRS-UPR3572
Monsieur BERTHOD François PR, Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX)

RAPPORTEURS EXTERNES :

Madame FROMY Bérengère Directeur de recherches, UMR CNRS 5305
Monsieur NATAF Serge PR PUPH, INSERM 1060 / INRA 1397

RAPPORTEURS INTERNES :

Monsieur LELIEVRE Vincent PR, CNRS UPR3212
Madame POULIOT Roxane PR, IRSC Académique, LOEX

« I believe that scientific knowledge has fractal properties;
that no matter how much we learn, whatever is left,
however small it may seem,
is just as infinitely complex as the whole was to start with.
That, I think, is the secret of the Universe. »

Isaac Asimov

Remerciements

Une thèse n'est qu'un premier pas dans le monde de la Science. Une introduction à un univers qui, au-delà de la simple accumulation de connaissances, a son propre fonctionnement et sa propre façon de penser. La méthode scientifique met du temps à se comprendre et s'acquérir et la thèse n'est qu'un outil accélérant cette compréhension. De nombreuses personnes m'ont aidé, directement ou indirectement, dans ma compréhension de la méthode scientifique et donc dans le recul nécessaire à l'élaboration de cette thèse.

Une thèse ne se construit donc pas seul. Il y a déjà en amont tout un entourage de personnes vous aidant et orientant vos choix d'études universitaires et forgeant votre passion pour la science. Que ce soit la famille, les amis, les enseignants, les rencontres aléatoires, toutes ces personnes ont participé au fait que cette thèse ait pu voir le jour.

Je tiens déjà à remercier les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de lire et d'évaluer ce travail de recherche, résultat de 4 ans de thèse. Vos critiques, analyses et discussions qui vont en découler me seront d'une grande aide pour continuer à forger ma passion pour la science et ma compréhension de la méthode scientifique. Pour Madame Bérengère Fromy, merci, vous avez su me rassurer et me donner l'énergie qui me faisait défaut sur la fin de l'écriture. J'espère que la lecture de ce manuscrit tant attendu répondra à vos attentes pour que nous puissions en discuter de vive voix. Pour Monsieur Serge Nataf, je vous remercie pour votre disponibilité dans les moments critiques. J'espère que ce manuscrit saura attirer votre attention et que nous pourrons valoriser vos conclusions le moment venu. Pour Madame Roxane Pouliot, vous avez déjà eu l'occasion de voir une partie de mon travail de recherche, lors de mes visites, trop sporadiques à mon goût, au LOEX. Votre aide me fut très profitable lors de ces présentations au LOEX et j'espère encore pouvoir vous surprendre, pour ne pas rendre la lecture de ces pages trop redondante. Pour Monsieur Vincent Lelievre, vous m'avez enseigné les neurosciences ainsi que de nouvelles façons de voir l'enseignement au début de mes études supérieures. Je suis maintenant honoré de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse, merci d'avoir accepté. Je me réjouis d'avance de pouvoir discuter avec vous tous de cet intense travail transdisciplinaire.

Cette thèse est le fruit de la collaboration entre deux chercheurs qui sont aujourd'hui mes co-directeurs de thèse. J'ai eu la chance d'arriver au bon endroit, au bon moment pour profiter des fruits de leur collaboration. Pour François Berthod, merci de m'avoir donné ma chance, une première fois en 2011 à mon stage de DUT, puis une seconde fois en Master, puis une troisième fois par cette cotutelle. Tu as été ma porte d'entrée au monde de la recherche. Merci beaucoup de m'avoir fait découvrir ce monde et tout ce qu'il peut offrir. Plus qu'un travail, c'est un mode de vie auquel tu m'as initié. Grâce à toi, j'ai pleinement compris que la science peut avancer avec un réseau de connaissances que l'on se construit et aux collaborations que l'on peut y nouer. Pour Vincent Flacher, à qui j'ai malheureusement fait subir l'épreuve du feu, merci d'avoir cru en moi dès le début. Je suis très fier d'avoir été ton premier étudiant officiel en thèse, après ton HDR. Cette thèse n'a pas été sans défi, notamment avec la cotutelle. J'ai toujours été « monsieur dernière minute », même en m'y prenant longtemps à l'avance, et je te remercie d'avoir toujours été là pour m'aider dans ces moments de difficultés. A cause de toi, j'ai développé un attrait pour la photographie (qui va de pair avec l'imagerie microscopique du coup), je t'en remercie, mais mon portefeuille, moins. Tous les deux, vous m'avez toujours laissé beaucoup de liberté dans la façon d'organiser mon emploi du temps et mes manips. C'était déjà une source de pression en moins (on ne va pas parler des deadlines) et c'est grâce à votre confiance que j'ai pu autant m'investir dans mes travaux de recherche. Merci.

J'ai eu la chance de rencontrer d'autres chercheurs avant et au cours de cette thèse. Chacun ayant grandement participé à la construction de ma vision de la science.

Pour Hervé Cadiou, merci d'avoir les oreilles qui traînent quand tu diriges les TPs de Licence. Grâce à toi, j'ai pu occuper mes étés entre mes années de Licence et de Master. Merci de m'avoir montré une autre facette des neurosciences et qu'il y a autre chose dans la vie que le rat ou la souris comme modèle animal. Tu m'as aussi montré que le nerd peut avoir sa place en science (du moins en biologie) et que comparé à toi, je ne suis encore qu'un petit geek. Par contre j'ai toujours des progrès à faire en anglais, mais grâce à toi, je peux le faire en lisant Douglas Adams, avec une pointe d'humour anglais. Je te remercie aussi de m'avoir proposé de poursuivre l'aventure de ces stages en Master. Je suis désolé d'avoir décliné cette offre. J'ai préféré suivre tes excellents conseils : voir le maximum de labos possible (voir à l'international). Je vais tâcher de continuer à suivre ce conseil pour mes futures carrières d'après doc.

Pour Frédéric Gros, même si je n'ai jamais travaillé directement avec toi, en stage ou autre qu'en TP, tu as grandement participé à mon intérêt pour l'immunologie, surtout quand j'étais perdu dans le maelstrom du master Neuro. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de mi-thèse. Merci aussi pour tes conseils et avis extérieurs, qui ont toujours été grandement apprécié, tout comme tes encouragements.

Pour Christopher Mueller, merci pour toutes tes idées, à première vue, un peu hors-sujet mais toujours pertinentes. Les nombreux team meeting m'ont permis d'accroître mes connaissances en immunologie, dans des thématiques dont je ne me serais jamais intéressé par moi-même. Merci pour tous tes avis et remarques plus « externes » qui ont fait naître des remises en question. Enfin, merci pour les étés barbecue et l'ambiance détente, entraide mais sérieuse que tu tiens à instaurer au sein de ton équipe. C'est très agréable de travailler dans ces conditions et c'est grâce à toi.

Que serait un labo de recherche sans toute cette vie grouillante, faisant tourner les manip' et générant des résultats à foison. Je ne veux pas parler des cellules en culture ni des animaux d'animalerie mais du personnel, techniciens, ingénieurs, étudiants et stagiaires en tout genre. Faisant moi-même partie de cette masse informe productrice de données, je veux remercier ici toutes ces personnes qui m'ont à la fois supporté et aidé au cours de ma thèse.

Pour Sabrina, merci de m'avoir guidé dans ma première expérience de labo, avec Marie-Claude et Sébastien, que je remercie également. C'est grâce à vous trois que j'ai eu la conviction de vouloir continuer vers des études (très) longues. Tu as été là pour m'enseigner les bonnes pratiques de labo dès le DUT et tu as de nouveau été là pour m'aider à réaliser mes idées farfelues, une fois arrivé en thèse. Tu sais également quand nous réprimander, stagiaires et étudiants au doc, quand on commence à faire n'importe quoi ! Se faire montrer ses erreurs, c'est tout aussi important que l'aide technique inestimable que tu nous apportes. Quand tu n'es pas là, on peut toujours compter sur Lydia, un grand merci à toi aussi ! Sans votre duo de choc, le labo serait beaucoup moins agréable (et facile) au quotidien.

Pour Marie-Josée, toi aussi tu m'as poussé dans la voie des études supérieures, merci beaucoup. Tu m'as énormément aidé, techniquement et scientifiquement. Sans toi et l'énorme travail préalable que tu as fait, je n'aurais jamais pu amener ce projet où il en est maintenant. J'espère que tu vas arriver à avoir ce chalet autonome de tes rêves.

Pour Rémi, tu as pris le train en marche, au moment où j'avais vraiment besoin d'un backup immuno au LOEX. Merci beaucoup pour ton aide avec nos innombrables éponges !

Même si les premières fournées n'étaient pas parfaites, tu n'as pas baissé les bras et tu m'as énormément aidé, parfois lors de journées très très longues. Merci.

Pour Thiéry, j'ai appris il y a peu que tu allais continuer vers un doc ! Félicitations ! Mais pense à lever un peu le pied et à prendre du recul. Merci pour toute ton aide, même si tu n'avais pas le temps, tu étais toujours là pour les DGRs. Ça atténuait toujours mes nuits au labo de te voir à des heures improbables pour changer tes milieux de culture, même si c'était juste l'espace d'une petite discussion.

Pour Jennifer, merci, grâce à toi j'ai pu découvrir le monde des congrès internationaux, très orienté industrie où l'étudiant au doc est aussi considéré comme un produit (plus encore que dans un labo !). Je crains de ne jamais parvenir à avoir le même tact que toi dans ces congrès. Et merci pour la balade à Seattle. Merci aussi pour ton aide quotidien, surtout à ma seconde visite au LOEX. Entre voisin de bureau, il faut savoir se soutenir !

Pour Vincent Roy, merci pour ton excentricité, pour l'énergie que tu déploie à l'écoute d'un simple riff de guitare, merci pour toute la musique métal que tu m'as fait découvrir, merci pour l'ambiance et la vie que tu as mis dans notre bureau. C'était un plaisir d'être ton voisin de bureau lors de ma seconde visite au LOEX et notre complicité m'a été d'un grand secours. Nos lundis poutine m'ont manqué dès l'instant où j'ai quitté le Québec. Que ce soit autour d'un café ou d'une bonne bière de microbrasserie, soit sûr que je n'en n'ai pas fini avec toi ! Nous nous sommes déjà retrouvés au Japon, nous nous retrouverons encore ! A très bientôt.

Pour Todd, merci pour les magnifiques escalades sur les chutes gelées de Montmorency. Merci pour ces bières partagées, pour ta bonne humeur quotidienne et pour toute l'aide que tu m'as apporté en culture.

Pour Kiefer, tu m'as beaucoup aidé dans mes manips, merci, mais tu as surtout participé au début de ma courte vie sociale à Québec. Sans toi, le quotidien aurait été plus difficile à supporter.

Pour Marie-Michelle, merci pour les belles randonnées dans les grandes étendues sauvages du Canada. Soutiens psychologique culturel et culinaire, c'est grâce à toi que je me suis senti intégré au Québec et que j'ai pu avoir des moments d'évasion avec d'autres personnes que ceux que je côtoyais au labo. Comme tu ne tiens pas en place, je suis persuadé que nos chemins se recroiseront ! En tous cas, si au cours de tes nombreux voyages, tu passes par la France, tu as trouvé ton guide.

Pour Marie-Claude, tu as été ma première directrice de stage, merci de m'avoir transmis ta passion pour les neurones et la science. Je t'ai toujours vue souriante et pleine d'énergie, créant un environnement de « travail » à la fois drôle et agréable, ce qui a grandement participé à mon attrait pour la science. Merci pour les soirées et visites de cabanes à sucre. Le travail n'en n'est plus un quand on sait s'amuser en dehors du labo.

Aurélie, Sergio et Alex (T), je ne vous oublie pas. Même si nos aventures en dehors des murs du labo étaient plus rares, je vous remercie pour votre aide et pour avoir participé à créer une ambiance d'entraide et de soutien pour que l'on puisse tous avancer dans la même direction. Merci beaucoup.

Jusqu'à présent, j'ai remercié toutes les rencontres faites au LOEX, principalement parce qu'il me sera, malheureusement, plus difficile de tous les retrouver (l'Atlantique, n'étant pas juste une petite rivière à traverser). Je n'oublie pas pour autant toutes les personnes importantes que j'ai rencontré à l'IBMC et que je côtoie encore aujourd'hui.

Pour Astrid, merci de m'avoir montré comment bien peler un morceau de peau. Ton expertise au scalpel et au dermatome est autant impressionnante qu'effrayante. Tu es à la fois le soutien indispensable de tous les étudiants et stagiaires mais tu es aussi la gardienne de la bonne façon de travailler. Merci d'être à la fois une figure d'autorité sans faille et d'une grande aide pour nos manips de labo. Par contre, ce n'est pas bien de me gaver de chocolat et de bonbons ! ... Ce n'est pas bien, mais ce n'est pas pour autant que je m'en plains, merci beaucoup. A quand les tartes flambées maison ?

Pour Delphine (L) et Fabien. Parce que je n'ai pris que trop tard le temps de manger avec vous, pour vraiment parler, un peu plus longtemps qu'autour d'un café dans le hall d'entrée du labo. Merci pour les souris et pour vos conseils. Spécial dédicace à Fabien, ça fait du bien de se sentir moins marginal dans ses goûts musicaux.

Pour Jean-Daniel, merci pour ton expertise en imagerie confocale. Ton aide sur le spinning et ton utilisation d'image J était vraiment parfaite. Grâce à toi, j'ai pu en apprendre beaucoup pour le vaste monde de l'imagerie microscopique et me redonner goût à coder en JavaScript.

Pour Adrien, compagnon d'infortune, nos manip ont souvent pris la forme d'une traversée du désert, sans résultat. Ce n'est pas à toi que je vais apprendre ça, la culture cellulaire est une technique bien ingrate. Mais tu sais toujours aller de l'avant ! Et montrer à tous qu'un sérum complément contaminé, ce n'est pas qu'une légende. Merci de supporter mon humour aléatoire et d'être assez bon public pour rebondir dessus. Les changements de milieu et les manip en salle de culture m'ont paru moins longues grâce à toi. C'est sans parler de nos nombreux sujets d'intérêt en commun, qui allègent le poids des manip ratées ! Heureusement que le virus de la pop culture a bien pris sur toi. Mais je ne sais pas si j'aurai le même courage que toi et me lever à 4h du mat les dimanches pour aller chiner les consoles rétro.

Pour Romain, je ne ferai pas de commentaire sur ta personnalité singulière, ces remerciements se doivent de respecter une certaine décence... Ta présence dans le laboratoire et les discussions qu'on entretient sont à la fois source de bonheur et d'étonnement. Tu fais également partie des rescapés qui savent que la thèse n'est pas un long fleuve tranquille. Tu nous aide sans compromis et dès que tu en as la possibilité, que ce soit pour des manip ou pour un soutien psychologique. Merci beaucoup. Merci aussi à Alex, votre canapé m'a sauvé la vie aux moments adéquats et il faut qu'on se refasse plus de sorties dans les Vosges ou la Suisse sauvage, histoire de se couper du quotidien.

Pour Florent, l'outsider, chez qui le concept de règles est subjectif, contrairement au concepteur de loyauté et d'honneur. Tu es toujours prêt à aider, pour n'importe quoi, perso ou labo. Merci beaucoup. Tu as abattu plus de boulot qu'un bûcheron en fin de carrière (je mesure toute la portée de cette vanne) et je ne pouvais que me demander « mais où trouves-tu tout ce temps ? » J'espère que ton attitude d'électron libre ne te portera pas préjudice dans le futur. Je ne vais jamais perdre contact avec toi, ne serait-ce que pour avoir des nouvelles annuelles et vérifier que tu es toujours en vie. Remerciement spéciale à Delphine (B), qui joue le rôle de garde-flo et qui était en nervous breakdown au même moment que moi pour rendre cette maudite thèse. Merci à toi aussi pour toute l'aide que tu m'as apporté.

D'autres personnes, en dehors des laboratoires, m'ont beaucoup aidé pour cette thèse et dans ma vie en général. La partie qui va suivre leur est consacrée.

Pour Luc et Cécile, vous m'avez beaucoup apporté individuellement et tous les deux ensembles. Vous m'avez accueilli pendant mon changement d'appart et pendant les débuts chaotiques de mon stage de Master. Vous avez toujours été là, présents en cas de problème et même présents sans qu'il y ait le moindre problème, juste pour passer du bon temps. Merci pour ces soirées JDR, pour ces moments de détente et pour tous les bons moments passés ensemble (oui, il y a répétition avec la première phrase, c'est parce qu'il y en eu beaucoup !). Cécile, tu en tellement bavé avec ta thèse que j'espère que ça se finira bien. À l'instant où je purge ces lignes de fautes d'orthographe, ça s'est très bien fini et encore bravo pour ta thèse. Luc, félicitations pour avoir trouvé la tienne au Québec et je suis heureux que Cécile ait pu te suivre. Bravo pour votre nouvelle vie à tous les deux là-bas, j'espère voir revoir très bientôt.

Pour Vivien, Ben, Noelle, Maxence et plus tardivement Sam, merci pour nos abondantes soirées pendant le DUT et pour toutes celles, plus sporadique quand j'étais en Master et pour celles encore plus sporadiques en thèse. Je n'ai pas l'occasion de vous voir autant que je le souhaitais, vous êtes des amis tellement précieux que jamais je ne vous perdrai de vue. Même si je l'avoue, je suis un mauvais élève et je ne donne pas assez de mes nouvelles. A bientôt en GN ou sur un forum de RP.

Je remercie toute ma famille, qui a toujours été là pour moi. Merci à mon papa et ma maman, qui m'ont poussé et soutenu dans mes études, non sans quelques frayeurs. Vous m'avez toujours aidé, même si je ne pouvais pas rentrer à Vittel aussi souvent que je le voulais. J'ai toujours pu compter sur vous, jusqu'à la toute fin de la rédaction de cette thèse et, je suis sûr, encore bien au-delà. Merci énormément. Pour mes deux petits frères, Brice qui ne s'est jamais fait de souci pour moi et qui a toujours cru en mes capacités, Richard qui, s'en suis sûr, pense la même chose mais avec quelques blagues en prime, merci. Ça me faisait énormément de bien de vous retrouver quand j'étais de passage à Vittel et de voir que pour vous aussi, tout allait bien, dans les études et dans le travail maintenant pour Brice. De vous voir à chaque instant, entreprendre des choses nouvelles, que je ne vous imaginai jamais capable de faire (parce que dans ma tête vous restez mes petits frères) ça m'a donné du courage et de l'énergie pour aller de l'avant. Je vous aime tous énormément.

Un grand merci à la belle famille, pour votre accueil, pour votre soutien et aussi pour tout le soutien que vous avez apporté à Pauline quand je n'étais pas là. Je me sens bien parmi

vous et je vous remercie pour votre aide, même s'il s'agit juste de me laisser travailler dans un coin, alors que je suis votre invité (ce qui n'est pas très poli/courtois/sociable de ma part) ou s'il s'agit juste de garderie pour hamster. Je peux compter sur vous et c'est très important. Merci beaucoup.

Enfin, merci à Pauline, la personne la plus courageuse que je n'ai jamais connue, qui partage ma vie depuis 7 ans (au moment de la rédaction de ces lignes). Tu ne m'as jamais abandonné, tu as toujours cru en moi et mes capacités, et tu m'aidais même à me rendre compte quand je les surévaluais, tu as toujours su me remettre dans le droit chemin. Malgré nos longs mois séparés par les aller-retours à Québec, tu es restée avec moi, d'un soutien sans faille. Tu as tellement fait pour moi et tu continues tellement à en faire, merci ma chérie. Le plus important c'est que j'ai pu traverser cette épreuve avec toi. Je t'aime.

Toutes ces personnes remerciées, j'ai (eu) la chance de les côtoyer pendant des temps suffisamment longs pour que la portée leur influence aille au-delà de la rédaction de cette thèse. Ce sont des personnes exceptionnelles qui m'ont permis de me construire, non seulement en tant que scientifique, mais surtout en tant qu'individu. Je ne saurais jamais les remercier assez pour ça.

Si les connaissances et l'entourage personnel direct aident beaucoup à se forger une identité, scientifique ou non, des connaissances fictives ou indirectes y parviennent tout autant. De nombreux auteurs de vulgarisation, comme Étienne Klein, Bruce Benamran, Thomas C. Durand et Richard Dawkins, ou des auteurs de science-fiction et de fiction, comme Isaac Asimov, Arthur C. Clarke, Douglas Adams, Philip K. Dick, Terry Pratchett ont eu de grandes influences sur ma façon de voir la science ou d'envisager mes moments de loisirs. Je ne pourrai malheureusement pas remercier personnellement certains de ces auteurs mais j'espère pouvoir le faire pour les autres. De ces lectures, je retiens qu'il ne faut pas négliger ses loisirs et les autres sources de connaissances que les articles scientifiques de notre domaine d'expertise. C'est grâce à ces auteurs que je peux, un peu, comprendre la physique quantique (donc ne pas du tout la comprendre, si j'ai bien compris) ou que je parviens plus facilement à reconnaître certains biais cognitifs. Ces connaissances ont, bien évidemment, eu un impact positif sur ma façon d'entreprendre la recherche scientifique.

Tant qu'on est dans les œuvres artistiques (la vulgarisation est-elle une science ou un art ? La question est ouverte), un grand merci à la musique Métal et à ses sous-genres pour

m'avoir tenu éveillé au labo, servi de berceuse dans les transports en commun et pour avoir participé à l'entretien de mes rares activités physiques, au travers de concerts et festivals.

Je ne veux pas faire paraître la thèse pour quelque chose de pesant, mais comme je l'ai dit, c'est un mode de vie à part entière, dans ses bons comme dans ses mauvais côtés. J'ai l'impression que plus on progresse dans la science, plus ce mode de vie s'accroît. J'entends par là que la thèse est quelque chose de très chronophage et très épuisant physiquement et mentalement. Épuisant mais pas usant. Les récompenses, reconnaissances et satisfactions que l'on obtient au quotidien, en faisant de la recherche, font d'une thèse bien plus qu'un simple diplôme. Pour passer cette épreuve, j'ai beaucoup parlé, dans mes remerciements, de l'importance d'une bonne ambiance de travail, d'un entourage soutenant et de savoir s'octroyer des moments d'évasion pour prendre du recul. Je me suis trop souvent laissé emprisonné par des problèmes facilement solvables avec un peu de lâché prise et je profite de ces remerciements pour donner ce conseil aux courageux arrivés là : prenez du temps pour réfléchir ! La thèse, c'est aussi l'occasion de faire le point sur 4 années (dans mon cas) de vie, aussi bien pour le côté scientifique que pour le côté personnel. Aussi, croyez-moi quand je dis qu'il est important de prendre du temps pour un peu d'auto-critique.

Enfin, si vous qui lisez ces lignes, si vous êtes arrivé jusqu'ici, que vous me connaissez personnellement mais que votre nom n'apparaît dans ces remerciements, vous avez sûrement dû participer de près ou de loin à cette thèse. Malheureusement, à l'écriture de ces lignes, il pourrait m'arriver d'oublier des personnes importantes. Je vous charge alors de me contacter et de me sermonner comme il se doit !

Je vous souhaite une bonne lecture de ce manuscrit.

Résumé

Les réponses immunitaires de la peau sont déclenchées par les cellules dendritiques (dendritic cells, DCs) qui capturent les antigènes et, après une maturation induite par des signaux de danger, contrôlent la différenciation des lymphocytes T mémoires pouvant être mobilisés en cas de nouvelle exposition à l'antigène [1]. Cette réponse immunitaire crée localement une inflammation, se traduisant par une vasodilatation, un gonflement, une rougeur, une sensation de chaleur et une douleur. Ces deux derniers points traduisent une stimulation des neurones sensoriels au site de l'inflammation, la peau étant densément innervée. Les neurones sensoriels responsables de la sensation de chaleur et de douleur sont les fibres sensorielles de type C [2]. Ces fibres jouent un rôle dans la détection de dangers, et peuvent à ce titre être activées par les cytokines pro-inflammatoires, libérées par les DCs ou d'autres cellules non-immunitaires. En réponse, les neurones sensoriels libèrent dans la peau des neuropeptides comme la Substance P (SP) et le Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP). Outre leur capacité à induire une vasodilatation en agissant sur les cellules endothéliales, les neuropeptides ont vraisemblablement une influence sur les DCs, bien que celle-ci soit mal connue, faute de modèle adéquat pour étudier ces interactions [3].

De nombreuses substances chimiques sont à même de provoquer une irritation (inflammation limitée n'induisant pas de mémoire immunitaire) ou une sensibilisation (inflammation exacerbée par la contribution des lymphocytes T mémoires). De par leur rôle dans la différenciation des LT mémoires, les DCs sont essentielles à l'initiation de la sensibilisation lors de la première exposition aux composés chimiques. Différents modèles *in vitro* servent à évaluer le potentiel irritant ou sensibilisateur d'une molécule. Ces modèles peuvent être des monocultures ou des systèmes tridimensionnels plus complexes, dotés d'un épiderme et/ou d'un derme, certains incluant des DCs. Cependant, toutes les composantes de la peau ne sont pas représentées dans ces modèles, qui excluent notamment l'innervation cutanée.

Notre but était de développer un modèle innovant de peau reconstruite *in vitro* (Tissue-Engineered Skin, TES) combinant tous les éléments structuraux et fonctionnels de la peau humaine : un épiderme stratifié, un derme composé d'une matrice de collagène, une pseudo-vascularisation, une immunocompétence et une innervation sensorielle établie par des neurones murins (dérivés d'embryons) ou humains (dérivés de cellules souches pluripotentes induites, iPSCs). Ce modèle de IV-iTES (*Innervated and Vascularized immunocompetent Tissue-*

Engineered Skin) permettra de décomposer les étapes de la pathogénèse ou d'analyser les effets subtils de composés chimiques avec une précision inégalée. Ce projet de thèse, dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université de Strasbourg, en France, et l'Université Laval, à Québec, a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le Dr. Vincent Flacher, à l'UPR3572, au CNRS de Strasbourg et le Dr. Berthod au Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX ; Université Laval, Québec).

Les neuropeptides ont une influence directe sur la maturation des DCs.

Les DCs utilisées pour nos tests préliminaires en monoculture ont été dérivées de monocytes sanguins humains (MonoDCs), puis activées par du lipopolysaccharide (LPS) en présence de neuropeptides (SP et CGRP). Le phénotype mature des MonoDCs a été analysé par cytométrie en flux et quantifié par l'expression de CD86 et CD83. Les résultats ont montré que la stimulation des neuropeptides ne module pas l'expression de ces marqueurs de maturation. En revanche, après avoir analysé le surnageant de culture par ELISA, les neuropeptides ont provoqué une diminution de la production de TNF- α , alors que celle de l'IL-12p70 a été augmentée. La modulation de la libération de cytokines pro-inflammatoires par les MonoDCs sous l'influence de neuropeptides renforce l'hypothèse selon laquelle l'innervation sensorielle agit directement sur les réponses immunitaires cutanées.

La construction du modèle de peau reconstruite.

Le modèle de peau innervé par des neurones murins, vascularisé et avec un épiderme stratifié a initialement été développé au LOEX. Mon objectif est d'utiliser ce modèle comme base et d'y incorporer une innervation humaine et un système immunitaire. Les neurones humains sont dérivés d'iPSCs et devront posséder les mêmes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles que les neurones murins. L'immunocompétence est apportée par des MonoDCs, dont la différenciation et le phénotypage ont été mis au point à l'UPR3572.

Le modèle IV-iTES complet comprend :

- une matrice de collagène et de chitosan [4],
- des fibroblastes humains, qui complètent la structure de la matrice par leurs sécrétions de matrice extracellulaire, constituant ainsi un équivalent du derme
- des cellules endothéliales humaines pour établir une pseudo-vascularisation
- un épiderme fait de couches de kératinocytes humains différenciés
- une innervation sensorielle
- une immunocompétence, représentée par les MonoDCs.

Ce système se devait d'être mis en place et perdurer dans les deux laboratoires. Ainsi, un des objectifs de mon projet de cotutelle est de m'assurer que le LOEX intègre la culture des MonoDCs à ses protocoles de route et que toutes les conditions soient réunies pour permettre l'implantation et le développement du modèle de peau à l'UPR3572.

Les MonoDCs s'intègrent au modèle de peau

Les MonoDCs ont parfaitement pu s'intégrer dans le derme reconstruit, d'après les images réalisées en immunofluorescence. L'optimisation du protocole a permis de déterminer la quantité de cellules à ensemercer. De plus, ces cellules immatures se sont maintenues malgré le long temps de culture nécessaire pour compléter le modèle.

La maturation permet aux DCs d'assurer leur rôle de cellules présentatrices de l'antigène. Or, nous ne sommes pas parvenus à observer *in situ* la maturation par le LPS des MonoDCs intégrés dans le modèle de peau. L'extraction par digestion enzymatique ou induction de migration des MonoDCs, pour les caractériser par cytométrie en flux, devront être optimisées. Il se peut que les MonoDCs, différenciées en culture 2D à partir de monocytes, ne puissent pas migrer hors du modèle 3D par défaut de guidage chimiotactique. De plus, l'hydrocortisone présente dans le milieu de culture, indispensable à la culture des kératinocytes, pourrait avoir un effet inhibiteur sur la migration et la maturation des DCs. En ajoutant du CCL21 au milieu de culture et en absence d'hydrocortisone, la migration des MonoDCs semble améliorée, bien qu'il demeure impossible d'observer leur maturation en immunofluorescence. Pour confirmer la maturation des cellules, il sera nécessaire d'effectuer des quantifications de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-12.

Activation du modèle

Nous avons choisi d'utiliser quatre substances pour évaluer la capacité du modèle innervé et immunocompétent à prédire leur potentiel sensibilisateur. Ces substances ont été choisies suivant leur classification au test de sensibilisation *in vivo* LLNA (DNCB, Ethylene glycole diméthacrylate, Sodium Dodecyl Sulfate, DL-Tartaric Acid, du plus au moins sensibilisateur). Le LPS a été choisi en tant qu'activateur efficace des DCs et la Capsaïcine (agoniste du récepteur TRPV1, un canal calcique spécifique des neurones sensoriels) pour la stimulation spécifique des neurones. Les marquages par immunofluorescence montrent que, quelque soit la condition expérimentale, la structure du modèle et le phénotype des cellules présentes ne varient pas. En revanche, les analyses par ELISA du surnageant montrent que, dans les conditions avec Capsaïcine, il y a libération de TNF- α , de même qu'avec les sensibilisateurs

où cette libération tend à décroître avec le potentiel sensibilisateur de la molécule. Cela montre que le modèle de peau innervé, vascularisé et immunocompétent peut prédire le potentiel sensibilisateur d'une molécule. Pour confirmer ces résultats ; des analyses ELISA d'autres cytokines pro-inflammatoires et des neuropeptides seront nécessaires.

Les cellules pluripotentes induites humaines se différencient en neurones sensoriels fonctionnels innervant le modèle de peau.

Des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) humaines provenant de la plateforme iPSC du LOEX ont été utilisées pour générer des neurones sensoriels humains d'après un protocole déjà existant [5]. Le rendement, la pureté ainsi que la survie des neurones obtenus ont été augmentés grâce aux adaptations apportées au protocole publié. Toutes les cellules, après 17 jours de différenciation, ont acquis un phénotype de neurones matures, démontré par l'expression de SP et de TRPV1. Les quantifications de SP et CGRP dans le milieu de culture ont montré que les neurones humains issus d'iPSCs peuvent libérer ces neuropeptides en cas d'activation par des agonistes de TRPV1. Cette capacité fonctionnelle, mise en évidence en monoculture (2D) mais également au sein du modèle de peau (3D), est similaire à celle de neurones murins. Cependant, les immunofluorescences de coupes transversales du modèle de peau ont montré que les neurones humains n'innervent pas la totalité du derme jusqu'à l'épiderme, comme le font les neurones murins.

Les DRGs dont sont issus les neurones murins contiennent également des progéniteurs de cellules gliales, issus de la lignée neurale. Parmi ceux-ci, les cellules de Schwann sont présentes dans la peau et font office de cellules de soutien et nourricières. Ce sont également ces cellules qui créent la gaine de myéline autour des axones de certains neurones, renforçant l'innervation. Une immunofluorescence dirigée contre la protéine basique de la myéline (MBP) a permis de mettre en évidence la présence de cellules de Schwann fonctionnelles dans les modèles de peau avec innervation murine.

Des cellules de Schwann murines, extraites de moelle épinière d'embryons de souris, ou humaines, différenciées à partir d'iPSC [6], ont été utilisées en même temps que les neurones humains sur les éponges. Notre protocole optimisé a permis de générer des cellules de Schwann à partir d'iPSCs humaines avec un rendement et une pureté augmentée, tout en conservant leur capacité proliférative. En présence de cellules de Schwann humaines ou murines, les immunofluorescences sur coupes transversales du modèle ont montré une innervation totale du derme des neurones humains, qui s'étendent jusqu'à l'épiderme. De plus, ces cellules de

Schwann ont produit de la myéline, ce qui n'a jamais été démontré dans un modèle 3D. Ces résultats sont l'objet de la publication principale de ce manuscrit de thèse (Muller et al.), qui est actuellement en cours d'évaluation après une série de révisions.

Finalisation du modèle et perspectives

Un modèle de peau innervé par des neurones humains, fonctionnels et innervant l'épaisseur du derme, a été obtenu, et permet d'envisager une application topique de substances chimiques. Les MonoDCs se sont intégrées efficacement au modèle comprenant des neurones humains. Les marquages par immunofluorescence ont été pratiqués sur ce modèle de peau humaine et comparés à des coupes transversales de peau normale humaine. Ces résultats ont montré une répartition et un phénotype adéquats de toutes les populations cellulaires présentes.

Les neurones humains sont la composante limitante qui nous empêche, pour le moment, de réaliser les mêmes études fonctionnelles qu'avec les neurones murins. Les neurones humains nécessitent de long temps de culture et sont disponibles en quantité limitée. La différenciation fait passer les iPSC par un stade de progéniteurs neuronaux, une population de cellules multipotentes ayant conservé leur capacité de prolifération. La solution serait de trouver des conditions de cultures permettant le maintien de ces cellules (amplification, congélation, ré-amplification) pour ne pas avoir besoin d'iPSC à chaque nouvelle différenciation en neurones. Cette solution permettrait une meilleure homogénéité dans le processus de différenciation, puisque les neurones viendraient tous du même clone de progéniteur neuronal. De plus, économiquement parlant, moins de facteurs et milieux de différenciation seraient nécessaires. Enfin, l'UPR3572 ne dispose pas de sa propre plateforme iPSC, comme le LOEX et n'a pas la technologie pour initier la culture de cellules souches humaines. Cette solution permettrait à l'UPR3572 d'avoir des progéniteurs neuronaux, venant du LOEX, plus stable que des iPSC et demandant moins de temps et de milieux de culture pour être différenciés en neurones.

Conclusion

A la suite de 4 années de recherches, nous avons réussi à recréer un modèle de peau humaine immunocompétente, vascularisée et innervée, avec un épiderme stratifié. Nous avons également réussi à valider ce modèle avec l'évaluation du potentiel sensibilisateur de composés chimiques. Nous avons amélioré des techniques de différenciation d'iPSCs humaines en neurones sensoriels et cellules de Schwann et démontré leurs fonctionnalités au sein d'un modèle 3D, donnant ainsi lieu à l'écriture et à la soumission d'une publication scientifique.

Les difficultés à extraire les MonoDCs du modèle ont empêché l'évaluation de leurs influences sur la différenciation des lymphocytes T naïfs. Ces cellules de l'immunité adaptative se trouvent *in vivo* dans les ganglions lymphatiques. Il était nécessaire de les ajouter hors du modèle pour permettre leurs interactions avec les DCs migrant hors de la peau pour modéliser leurs interactions. Cependant, il est actuellement à l'étude un moyen de mimer une partie de cette réponse en utilisant le surnageant du modèle de peau activé, incluant les cytokines produites par les DCs, comme base de stimulation des lymphocytes T naïfs.

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	x
Les neuropeptides ont une influence directe sur la maturation des DCs	xi
La construction du modèle de peau reconstruite.....	xi
Les MonoDCs s'intègrent au modèle de peau.....	xii
Activation du modèle.....	xii
Les cellules pluripotentes induite humaines se différencient en neurones sensoriels fonctionnels innervant le modèle de peau.....	xiii
Finalisation du modèle et perspectives.....	xiv
Conclusion	xiv
Abréviations	xxvi
Liste des figures	xxxiii
Liste des Tableaux	xxxv
Liste des Annexes	xxxvi
Avant-Propos	xxxvii

Chapitre I - Introduction	1
1- Introduction à la structure cutanée	1
1-1. Structure de la peau normale humaine	1
1-2. L'épiderme	2
1-3. Le derme	7
1-4. La vascularisation cutanée	9
1-5. Le follicule pileux	11
1-6. Le microbiome cutané	15
2- L'immunité cutanée	18
2-1. Historique et fonctions du système immunitaire	18
2-2. La reconnaissance des signaux de danger	22
2-2-1. Les <i>Toll-like receptors</i>	22
2-2-2. Les <i>C-type Lectin Receptors</i>	24
2-2-3. Les <i>NOD-Like Receptors</i>	25
2-2-4. Les <i>Retinoic acid-inducible gene-I-Like Receptor</i>	26
2-3. Réponses immunitaires innées et adaptatives	27
2-3-1. L'ante-immunité.....	27
2-3-2. La réponse immunitaire innée.....	27
2-3-3. La détection des antigènes.....	30
2-3-4. L'activation et l'orientation des lymphocytes T helper.....	33
2-4. Les cellules dendritiques cutanées	38
2-4-1. Les différentes populations de dendritiques cutanées.....	38
2-4-2. Les cellules de Langerhans.....	42
2-4-3. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes.....	45
3- L'innervation sensorielle cutanée	47

3-1. La perception	47
3-2. Les neurones	48
3-2-1. Une unité cellulaire fonctionnelle	48
3-2-2. Organisation structurale	48
3-2-3. Le cytosquelette.....	51
3-2-4. Le potentiel membranaire.....	53
3-2-5. Les canaux potassiques	56
3-2-6. Les transporteurs et échangeurs ioniques.....	58
3-2-7. Le potentiel d'action.....	61
3-2-8. Synapse et neurotransmetteurs	65
3-3. Le système somatosensoriel	67
3-3-1. Les fonctions du système somatique	67
3-3-2. L'organisation structurale du système somatique	69
3-4. La nociception et la thermoception	70
3-4-1. Les types de fibres sensorielles et les cellules de Schwann	70
3-4-2. Les modalités tactiles	72
3-4-3. Les fibres nociceptives et thermoceptives.....	74
3-4-4. Les canaux <i>Transient receptor potential</i>	75
3-4-5. Stimuli nociceptifs et inflammatoires médiées par les récepteurs couplés aux protéines G.....	79
3-4-6. La substance P et le <i>Calcitonin gene-related peptide</i>	83
4- Le génie tissulaire	87
4-1. L'utilisation de modèles de peau <i>in vitro</i>	87
4-1-1. Alternatives aux modèles animaux	87
4-1-2. Cadre légale de la modélisation <i>in vitro</i>	88
4-1-3. Modèles <i>in vitro</i> en 2D.....	89
4-1-4. Modèles <i>in vitro</i> 3D.....	90

4-2. Les cellules souches pluripotentes induites	94
4-3. Les interactions entre système nerveux et système immunitaire	98
5- Objectifs de la thèse.....	101
5-1. Action de la substance P et du CGRP sur les cellules dendritiques humaines	101
5-1-1. Modulation de la maturation des DCs par les neuropeptides.....	101
5-1-2. Modulation de la migration des DCs par les neuropeptides.....	102
5-2. Caractérisation physiologique et fonctionnel du modèle de peau immunocompétent et innervé par des neurones murins	102
5-2-1. L'intégration des MonoDCs immatures dans un derme humain reconstruit	102
5-2-2. Caractérisation du phénotype des MonoDCs dans le modèle de peau et de leur capacité à migrer en cas d'activation	103
5-2-3. Utilisation du modèle de peau innervé, vascularisé et immunocompétent comme outils de détections de molécules sensibilisatrices	103
5-3. Développement d'un modèle de peau innervée par des neurones sensoriels humain et des cellules de Schwann dérivés d'iPSCs	104
5-4. Transfert technologique.....	104

Chapitre II - Matériels et Méthodes	105
1- Matériels	106
2- Méthodes	110
2-1. Extraction et culture cellulaire	110
2-1-1. Extraction des cellules cutanées.....	110
2-1-2. Culture des fibroblastes.....	110
2-1-3. Culture des kératinocytes	111
2-1-4. Culture des cellules endothéliales	112
2-1-5. Isolation des Monocytes à partir de sang humain	112
2-1-6. Technique dite du « Crawl-Out » pour la récupération de cellules dendritiques à partir de peau normale humaine.....	114
2-1-7. Extraction et mise en culture des neurones sensoriels murins	114
2-1-8. Extraction et culture des cellules de Schwann murines à partir de nerf sciatique .	115
2-1-9. Reprogrammation de cellules humaine pour l'obtention de cellules souches pluripotentes induites	116
2-1-10. Différenciation et culture des neurones sensoriels à partir de cellules souches humaines pluripotentes induites.....	116
2-1-11. Différenciation et culture des cellules de Schwann différencies à partir d'iPSCs humaines	117
2-2. Fabrication du support de culture tridimensionnel (3D)	119
2-2-1. Préparation de la solution de collagène bovin.....	119
2-2-2. Préparation de la solution de chitosan.....	119
2-2-1. Préparation du support à culture 3D.....	120
2-3. Création du modèle de peau innervé vascularisé et immunocompétente par génie tissulaire	120
2-3-1. Formation du derme vascularisé (14 jours).....	120

2-3-2. Formation de l'innervation (14 jours)	121
2-3-3. Formation de l'immunocompétence (7 jours).....	122
2-3-4. Formation de l'épiderme (21 – 28 jours)	122
2-3-5. Peau normale humaine, innervée, vascularisé et immunocompétente (iV-ITES)..	124
2-4. Conditions de stimulation et modèles d'éponges utilisés.....	125
2-5. Analyses.....	126
2-5-1. Phénotypage des monocytes, MonoDCs différenciés et activés et des DCs de la peau par cytométrie en flux.....	126
2-5-2. Quantification des cytokines par du milieu de culture pas technique ELISA.....	129
2-5-3. Protocole de marquages par immunofluorescence indirecte.....	129
2-5-4. Analyses statistiques	129

Chapitre III - Résultats	131
1- Effets de la substance P et du CGRP sur les MonoDCs	132
1-1. Les MonoDCs expriment NK1R et RAMP1	132
1-2. L'activation directe des neuropeptides sur les MonoDCs influence leur phénotype activé	134
1-3. L'activation ou l'inhibition des récepteurs aux neuropeptides n'intervient pas dans la migration des différentes populations de DCs de la peau normale humaine	136
1-4. Conclusion de l'impact des neuropeptides sur les DCs humaines	138
2- Construction d'un modèle de peau innervé par des neurones murins et immunocompétente pour l'étude de l'inflammation neurogénique	139
2-1. Introduction des DCs dans le modèle de peau	139
2-2. Etude du comportement des MonoDCs dans le modèle de peau en cas d'activation	141
2-2-1. Phénotype des MonoDCs dans le modèle de peau	141
2-2-2. Migration des MonoDCs	146
2-3. La stratification de l'épiderme du modèle de peau reconstruite reproduit celle de la peau normale humaine	148
2-4. Activation du modèle de peau complet par des molécules sensibilisatrices.	150
3- Development of an Innervated Tissue-engineered Skin with Human Sensory Neurons and Schwann Cells Differentiated from iPS Cells	156
Auteurs, affiliation et contributions.....	156
Résumé	156

Abstract	157
Introduction	158
Materials and methods	159
1.1 Cell culture.....	159
1.2 Differentiation of iPS cells into sensory neurons	160
1.3 Differentiation of iPS cells into Schwann cells	161
1.4 Cell purity quantification	162
1.5 Preparation of the tissue-engineered 3D skin model	162
1.6 ELISA analyses.....	163
1.7 Immunofluorescence.....	164
1.8 Statistical analysis.....	164
Results	165
2.1 Sensory neurons were differentiated from human iPS cells with high purity, high yield and expressed specific markers.....	165
2.2 TRP agonists trigger SP and CGRP release from iPSC-derived sensory neurons. ..	166
2.3 Efficient neurite outgrowth from iPSC-derived neurons throughout the tissue-engineered skin is dependent of the presence of mouse or iPSC-derived Schwann cells. ...	167
Discussion	168
Conclusion	170
Acknowledgments	170
Figure legends	171
References	175
Supplemental material	178
Statement of Significance	181

Chapitre IV - Discussion et Perspectives	182
1- Immunocompétence du modèle de peau	183
1-1. Monocytes, macrophages et cellules de Langerhans.....	183
1-2. L'utilisation de TH naïf comme modèle de prédiction de l'orientation de l'immunité adaptative	184
2- L'hydrocortisone et le maintien en culture du modèle de peau...	185
3- Les MonoDCs, un bon modèle de cDCs ?	186
4- Les neuropeptides, modulateurs de réponses immunitaire	187
4-1. Activateurs et environnement de maturation.....	187
4-2. Ordre et temps de stimulation des MonoDCs par les neuropeptides.....	187
4-3. Le peptide vasoactif intestinal.....	188
5- Caractérisation des neurones dérivés d'iPSCs	189
5-1. L'interaction neuro-immunitaire	189
5-2. Organisation structurale des fibres nerveuses	190
5-3. Les étapes de la différenciation des iPSCs en neurones et cellules de Schwann	190
6- Les perspectives du modèle de peau complet	191
6-1. Un outil de détection de composés sensibilisateurs et/ou irritants.....	191
6-2. Les enjeux économiques de l'exploitation en industrie	192
6-2-1. Le coût théorique et les avantages d'une éponge par rapport aux modèles existant	192
6-2-2. Les modèles tridimensionnels alternatifs	193
6-3. Un outil d'étude de l'interaction neuro-immunitaire pour la recherche académique	195

7- Conclusion générale et perspectives à court terme	196
Bibliographie	198
Remerciements particuliers	225
Annexes	227

Abréviations

A

- A : Ampère
- AC : Adénylate Cyclase
- ADP : Adénosine-diphosphate
- AMOG : adhesion molecule of glia
- AMPc : AMP cyclique
- AOP : Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation
- AP-2 : adaptor protein 2
- ATP : Adénosine-triphosphate
- ASIC : acid-sensing ion channels

B

- BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
- BCR : B-cell receptor
- BMP : Bone Morphogenetic Protein

C

- CCL : chemokine C-C motif ligand
- CCR : C-C chemokine receptor
- CD : Cluster de Différenciation
- CGRP : Calcitonin gene-related peptide
- C-LTM : Fibres C low threshold mechanoreceptors
- CLR : calcitonin receptor-like receptor
- CLRs : C-type lectin receptors, récepteurs à lectine de type C
- CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
- CMi : mechanically-insensitive C-fibers
- CPA : cellules présentatrices d'antigène

CRD : Carbohydrate-recognition domain

CTLA4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DCs : Dendritic cells, Cellules dendritiques

D

DNCB : 2,4-dinitrofluorobenzene

DPRA : Direct Peptide Reactivity Assay

DRG : dorsal root ganglion, ganglions de la racine dorsale

E

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

EG : Ethylène glycol diméthylacrylate

EGF : Epidermal Growth Factor, facteur de croissance épidermique

ERK : extracellular signal-regulated kinases

EURL.ECVAM : European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing

F

FGF : Fibroblast Growth Factor, facteur de croissance fibroblastique

FoxP3 : forkhead box P3

FVD : Fixable Viability Dye

G

GAG : glycosaminoglycans

GDNF : glial-derived neurotrophic factor

GDP : Guanosine diphosphate

GF : Growth Factor, facteur de croissance

GFR : glycosyl-phosphatidylinositol-anchored coreceptor

GM-CSF : granulocyte macrophage colony stimulating factor

GPCR : G protein-coupled receptor, récepteur couplé aux protéines G

GRK : G protein-coupled receptor kinase

GTP : Guanosine triphosphate

H

HGF : hepatic growth factor

HLA : human leukocyte antigen-A

Hyl : Hydroxylysine

I

I : intensité (de courant)

IDECs : inflammatory dendritic epidermal cells

ICOS : inducible T cell co-stimulator

IFN : interféron

IGF : insulin-like growth factor

IL : Interleukines

IRF : interferon regulatory factor

iNOS : inducible nitric oxide synthase

iPSC : induced pluripotent stem cells

J

JNKs : c-Jun N-terminal kinases

K

KLK : kallistéine

L

LB : Lymphocytes B

LCs : Langerhans cells, Cellules de Langerhans

LCSA : Loose-Fit Coculture-Based Sensitization Assay

- LLNA : Local Lymph Node Assay
 LOX : lysyl-oxydase
 LPS : Lipopolysaccharides
 LRR : leucine-rich repeats, répétitions riches en leucine
 LT : Lymphocytes T
 Lys : Lysine

M

- M-CSFR : macrophage colony-stimulating factor receptor
 MAPK : mitogen-activated protein kinase
 MBP : myelin basic protein
 MDPs : monocyte-macrophage/DC progenitors
 MEC : Matrice extracellulaire
 MLR : mixed leukocyte reaction, réaction leucocytaire mixte
 MonoDCs : Monocytes-derived Dendritic cells, Cellules dendritiques dérivées de Monocytes
 MonoLCs : Monocytes-derived Langerhans cells, Cellules de Langerhans dérivées de monocytes
 MR : Mannose récepteur
 Mrgpr : Mas-related G protein-coupled receptor
 MUSST : Myeloid U937 Skin Sensitization Test
 MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

N

- NCX : sodium-calcium exchanger
 NF- κ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
 NF : Neurofilament
 NF-L - NF Light
 NF-M - NF Medium
 NF-H - NF Heavy

- NGF : nerve growth factor
- NK1R : neurokinin 1 receptor
- NLRs : nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, récepteurs de type NOD
- Nod : nucleotide-binding oligomerization domain
- NSF-ATPase : N-ethylmaleimide sensitive fusion-ATPase
- NT : neurotrophique factor

O

- OCDE : L'Organisation de coopération et de développement économiques
- OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development
- OCT : Optimal cutting temperature compound

P

- PAMPs : pathogen-associated molecular patterns, motif moléculaire associé au pathogène
- PAR : protease-activated receptor
- PBS : Phosphate-buffered saline
- PCL : polycaprolactone
- PEG : poly-ethylene-glycol
- PKA : protéine kinase A
- PLC : phospholipase C
- PMCA : plasma membrane Ca^{2+} ATPase
- PPSE : potentiel post-synaptique excitateur
- PPSI : potentiels post synaptique inhibiteur
- PRRs : pattern recognition receptor, récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaire

R

- RAMP : receptor activity-modifying protein

- RCP : receptor component protein
 RET : receptor tyrosine kinase
 RIG-I : retinoic acid-inducible gene-I
 RLRs : retinoic acid-inducible gene-I-like receptor, récepteurs de type RIG-I
 ROR- γ t : retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t

T

- TA : Acide-DL-Tartarique
 TAP : transporter associated with antigen presentation
 TCR : T-cell receptor
 TED : thioester-containing domain, groupe contenant des thioesters
 TGF : transforming growth factor
 T_H : Lymphocyte T helper
 TipDCs : TNF- α /iNOS-*producing* DCs
 TIR : domaine récepteur de type Toll/IL-1
 TLRs : Toll-like receptor
 TNF : tumor necrosis factor
 TNFR : tumor necrosis factor receptor
 T_{Reg} : lymphocytes T régulatrices
 Trk : tropomyosin receptor kinase
 TRPs : Transient receptor potential
 TRPA - TRP Ankyrin repeat
 TRPC - TRP Canonical
 TRPM - TRP Melastatin
 TRPML - TRP Mucolipins
 TRPP - TRP Polycystins
 TRPV - TRP Vanilloid
 TSLP : thymic stromal lymphopoietin
 TTX : tétrodotoxine

S

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SE : Solution Sérum + EDTA

SEM : standard error of the mean

Shh : Sonic Hedgehog

SNAP-25 : synaptosomal-associated protein 25

SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor

SNC : système nerveux centrale

SNP : système nerveux périphérique

SP : Substance P

U

UV : ultraviolets

V

V : volts

VAMP : vesicle-associated membrane protein

VEGF : vascular endothelial growth factor

Z

ZAP-70 : ζ -chain-associated protein

Liste des figures

Figure 1 : Schématisation de la structure générale de la peau normale humaine, avec l'épiderme, le derme et l'hypoderme.	1
Figure 2 : Différenciation des kératinocytes de la couche basale	3
Figure 3 : Schématisation des jonction adhérentes, des desmosomes et des hémidesmosomes des kératinocytes.	4
Figure 4 : Représentation de l'expression de différentes protéines des kératinocytes en fonction leur emplacement dans les couches de l'épiderme.	6
Figure 5 : Représentation schématique de capillaire lymphatique et des différents types de capillaires sanguins.	10
Figure 6 : Organisation structurelle du follicule pileux en phase d'anagène.....	13
Figure 7 : Impacte de la flore commensale pour le maintien de l'intégrité de la barrière cutanée.....	17
Figure 8 : Résumé de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.....	20
Figure 9 : Structure des Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I et II et présentation de l'antigène.....	32
Figure 10 : Orientation helpers (TH) en fonction du signal II et III et leurs réponses immunitaire associées [180].....	37
Figure 11 : Origine des cDCs dermiques dans la peau normale humaine.	39
Figure 12 : Prolifération, maintien et maturation des cellules de Langerhans (LCs).	44
Figure 13 : Structure d'un neurone du système nerveux central (SNC) et d'un neurone du système nerveux périphérique.....	49
Figure 14 : Structure de la pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	59
Figure 15 : Séquence des événements générant un potentiel d'action.....	63
Figure 16 : Fusion de la vésicule synaptique avec la membrane plasmique [316].	66
Figure 17 : Les récepteurs cutanés [357].	73
Figure 18 : Classification des canaux TRPs thermo-nocicepteurs TPA1, TRPM8, TRPV4 et TRPV1 en fonction de leur température d'activation.	77
Figure 19 : Caractérisation des différentes fibres nociceptives par leur co-expressions de TRPV1, TRPA1 et TPRV4 avec des GPCRs.....	82
Figure 20 : Structures des récepteurs à la SP et au CGRP.	84

Figure 21 : Schématisation de la différenciation et de la reprogrammation cellulaire par la métaphore du paysage de Waddington..... 95

Figure 22 : Schéma récapitulatif de la construction du modèle de peau complet, innervé, vascularisé et immunocompétent. 124

Figure 23 : Analyse de la purification et de la différenciation des monocytes en MonoDCs, puis analyse du phénotype mature des MonoDCs 128

Figure 24 : Analyse des populations de DCs obtenus par la technique du « Crawl-Out » pour discriminer les LCs, les DCs CD14⁺ et les DCs CD1a⁺ 129

Figure 25 : Observation au microscope confocal d’immunofluorescence de MonoDCs. 133

Figure 26 : 135

Figure 27 : 137

Figure 28 : 140

Figure 29 : 142

Figure 30 : 144

Figure 31 : 147

Figure 32 : 149

Figure 33 : 151

Figure 34 : 153

Licence d’exploitation des figures : Toutes les images et figures de ce manuscrit proviennent de réalisations personnelles ou de la banque d’images à licence libre Servier Medical ART.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Caractérisation phénotypique des sous-populations des DCs cutanés chez l'homme.	41
Tableau 2 : Valeurs moyennes des concentrations extra et intracellulaires des ions et leur valeur associée de potentiel d'équilibre.	55
Tableau 3 : Références des produits, kits et consommables utilisés.....	108
Tableau 4 : Récapitulatif des sensibilisateurs, avec leurs doses, en application dans le milieu de culture des modèles de peau.	125
Tableau 5 : Récapitulatif de l'action des sensibilisateurs chimique sur le modèle de peau complet.	155

Liste des Annexes

Annexe 1	a
Annexe 2	b
Annexe 3	c
Annexe 4 : Migration des MonoDCs hors du modèle de peau.....	d
Annexe 5 : Protocole de différenciation d'iPSCs humain en DCs	e
Annexe 6 : Les cellules de Schwann produisent la protéine de base de la myéline et interagissent avec les neurones sensoriels humains dérivés des iPSC.	g
Annexe 7 : Devis	h
Annexe 8 : Publication scientifique Muller, Q. ; Beaudet, MJ. et al. (2018) <i>Acta Biomaterialia</i>	i
Annexe 9 : Publication scientifique Flacher, V. et al. (2015), <i>ACS Chemical Biology</i>	j

Avant-Propos

Le but premier de l'innervation cutanée est la perception des sensations du toucher, de la douleur ou de la température. Les neurones cutanés sont en contact avec tous les autres types cellulaires de la peau et ont donc un rôle à jouer dans la régulation de la physiologie de la peau. Par la libération de neuropeptides suite à une stimulation, les neurones sont capables de déclencher une inflammation neurogène. Ces neuropeptides vont avoir un impact sur toutes les cellules proches des neurones et peuvent induire une vasodilatation microvasculaire, ou même une modulation de la maturation de cellules immunitaire [7, 8]. La stimulation neuronale est donc un élément important, dans la réponse immunitaire, dans le dialogue entre ces deux systèmes, pour la génération ou la régulation de l'inflammation, et dans la détection de signaux de danger. De plus, système immunitaire cutané et système nerveux sensoriel ont en commun l'expression de plusieurs récepteurs aux signaux de danger, comme les TLRs [9, 10].

Nous avons précédemment créé un modèle de peau contenant des neurones sensoriels provenant d'embryons de souris. Ces neurones forment un réseau d'innervation dans l'épaisseur du tissu reconstruit, dans le derme jusqu'à l'épiderme et peuvent produire des neuropeptides, comme la Substance P [11, 12]. L'utilisation de neurones d'origine humaine permettrait de développer le modèle de peau innervé en le rendant plus fiable, s'affranchissant de la variabilité inter-espèce, ou en le rendant accessibles aux industries ne pouvant utiliser de cellules d'origine animale.

C'est ce que nous avons cherché à créer, au travers d'une publication scientifique soumise le 6 Juin 2018 dans le journal Acta Biomaterialia (REF : AB-18-1400R1) où je suis premier auteur avec Marie-Josée Beaudet. Nous avons tous deux participé à la conception, à la construction et l'achèvement des expériences décrites dans cet article. Thiéry De Serres-Bérard et Sabrina Bellenfant ont participé à l'acquisition des données expérimentales. Vincent Flacher a participé l'analyse et l'interprétation des résultats, ainsi qu'à la correction de l'article. François Berthod est à l'origine du projet dans sa conception et dans sa construction. Il a participé à l'analyse des données, à la rédaction de l'article pour sa soumission et à ses corrections.

La version soumise à l'éditeur et révisée à la date du 13 Aout 2018, après évaluation par les paires (*peer review*), est présentée dans la 3^e partie des Résultats. La version approuvée à la

suite de la seconde révision (09/10/2018, REF : AB-18-1400R1) et sous presse (PMID : 30316025, DOI : 10.1016/j.actbio.2018.10.011) de cet article se trouve en Annexe 8.

Ce travail de thèse a été précédé d'un d'Master de Neurosciences Cellulaires et Intégratives de l'Université de Strasbourg, dont le stage de fin d'étude a été réalisé à l'unité CNRS-UPR3572, à l'IBMC. Au cours de ce stage, j'ai pu apprendre la technique de différenciation des monocytes humain sanguin en Cellules Dendritiques (MonoDCs) (Introduction, Partie 5-1 ; Matériel et Méthodes, Partie 2-1-5).

L'utilisation de cette technique au sein des autres projets de recherches de l'équipe a permis la publication d'un article scientifique, *Flacher, V. et al.*, publié en 2015 chez ACS Chemical Biology (DOI : 10.1021/acscembio.5b00552). Mon implication dans l'utilisation de cette technique et dans la production des données expérimentales constituant cet article a été jugé suffisamment importante pour que je fasse partie des auteurs. L'article complet se trouve en Annexe 9.

Chapitre I

Introduction

1- Introduction à la structure cutanée

1-1. Structure de la peau normale humaine

La peau forme une barrière physique entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme. D'une surface comprise entre 1,2 et 2 m² pour un humain adulte, elle représente 16% de sa masse corporelle en moyenne [13]. La peau permet le maintien de la température et de l'homéostasie corporelle, c'est une protection contre les UV (ultraviolets, ondes lumineuses comprises entre 100 et 400 nm) et sa barrière physique imperméable protège contre une exposition extérieur de bactéries, virus et toxines [14].

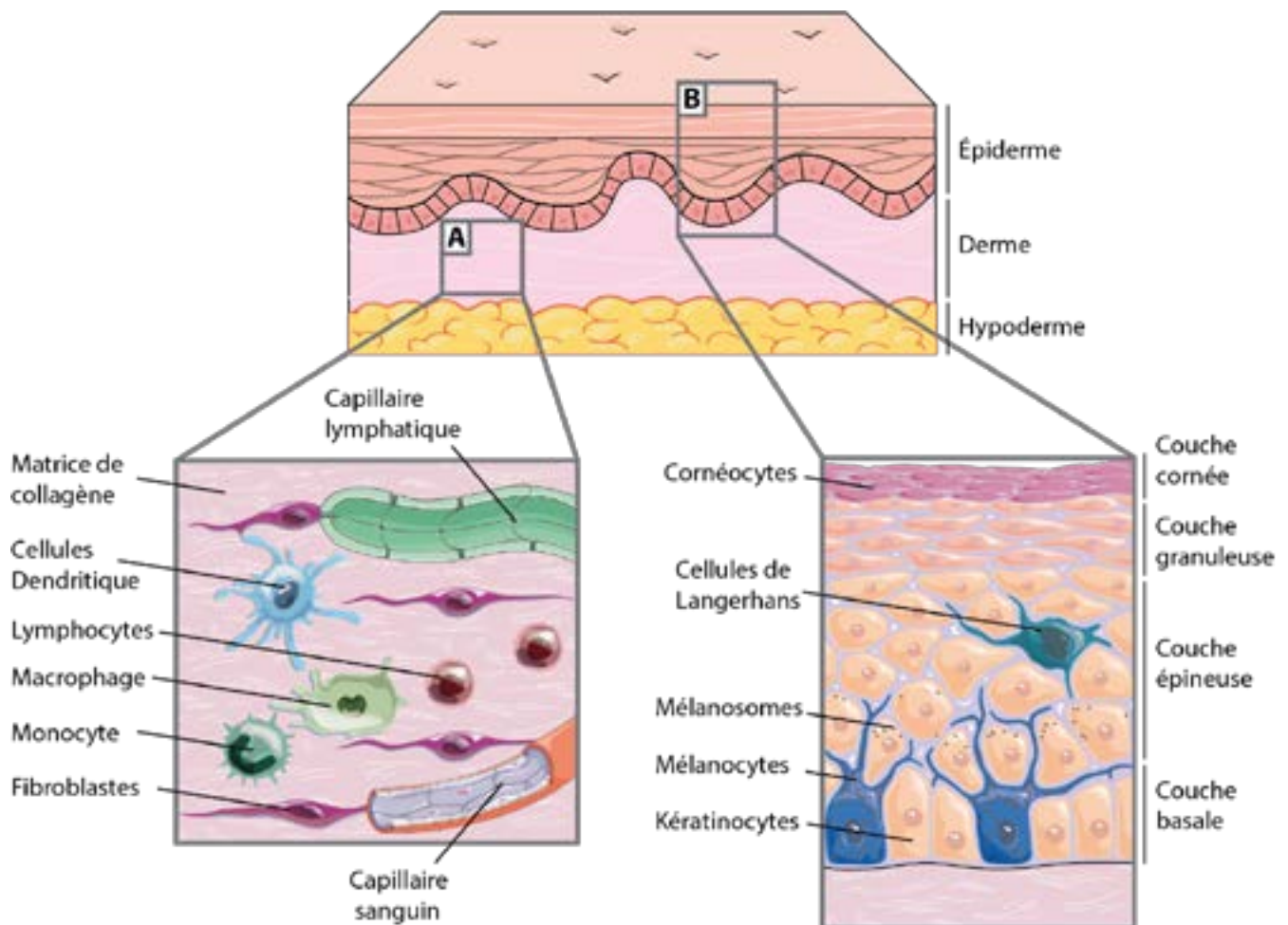


Figure 1 : Schématisation de la structure générale de la peau normale humaine, avec l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

(A) Agrandissement du derme montrant les fibroblastes, les principales cellules immunitaires, les capillaires sanguins et lymphatiques. (B) Agrandissement de l'épiderme pour y représenter sa structure stratifiée, les mélanocytes sécrétant la mélanine dans les mélanosomes (vésicules de mélanine) et les cellules de Langerhans, cellules immunitaires de l'épiderme. Image issue de réalisation originale, inspirée de la banque d'images libre de droit Servier Medical Art.

Elle est composée de 3 structures : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure1). Toutes ces structures sont immunocompétentes et innervées, faisant de la peau à la fois un organe sensoriel et un organe actif dans la défense contre les pathogènes. Seul le derme et l'hypoderme possèdent une vascularisation, sanguine et lymphatique, servant à la fois à l'apport en oxygène et nutriments de la peau, mais aussi pour la migration de cellules immunitaires, à l'intérieur et à l'extérieur de la peau, en cas d'inflammation.

L'hypoderme, densément vascularisé, est principalement composé d'adipocytes dont le rôle est de stocker les acides gras et de métaboliser les sucres en triglycérides, responsable de 85% des réserves énergétiques du corps en moyenne. Même si son rôle est indispensable pour la protection thermique, le stockage calorique sous forme de graisse blanche, et la régulation de l'inflammation cutané par les adipokines et cellules immunitaires qui s'y trouvent, l'hypoderme ne sera pas plus développé dans les parties ultérieures.

1-2. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau, responsable de l'imperméabilité de cette dernière. Il est majoritairement composé de kératinocytes (90%), cellules issues de la lignée ectodermique, dont les cellules souches apparaissent au niveau de l'embryon en une couche unique au moment de la gastrulation [15]. A ce stade l'épiderme porte le nom d'épithélium unistratifié, pour ensuite se scinder en deux, une couche supérieure appelée périoderme et une couche inférieure appelée couche germinale [16]. La suite du développement se fera dans la différenciation des couches intermédiaires, au nombre de quatre, entre la couche germinale et le périoderme [17]. Ce dernier va acquérir les propriétés d'étanchéité de la couche externe de l'épiderme, pendant que la couche germinale maintiendra sa capacité proliférative pour devenir la première couche de l'épiderme, la couche basale [18].

La couche basale ou *stratum germinativum* est la couche la plus profonde de l'épiderme, attachée au derme par la lame (ou membrane basale), via les intégrines $\alpha 6$ et $\beta 4$, exprimées par les kératinocytes indifférenciés (Figure 3). La membrane basale, séparant le derme de l'épiderme, est composée de protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène de type IV, le fibronectine et la laminine 5, protéines synthétisées à la fois par les fibroblastes et les kératinocytes [19]. La couche basale est formée de cellules souches unipotentes, seulement capables de s'auto-renouveler par division symétrique ou de se différencier par division asymétrique, pour entretenir le renouvellement des cellules des couches supérieures [19, 20].

Le choix de la polarité de ces kératinocytes se fait en fonction de gradients de différents facteurs de croissances (*Growth Factor*, GF), comme le facteur de croissance fibroblastique (*Fibroblast Growth Factor*, FGF), ou le facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor*, EGF), mais également grâce au changement de conformation de leur environnement extracellulaire. Toutes les cellules de l'épiderme sont connectées ensemble par des alliances de jonctions adhérentes (E-cadhérine) et de desmosomes, reliées aux filaments intermédiaires, composés de kératine. En cas de défaut de connexion cellule-cellule avec les couches supérieures, la protéine Par-3, exprimée uniquement du côté apical à la peau dans la membrane du kératinocyte immature, va changer l'emplacement du centrosome dans la cellule pour la faire passer de la division symétrique à la division asymétrique (Figure 2). Une des cellules filles va se retrouver au-dessus de l'autre cellule fille, perdant l'inhibition de la voie des Notch conférée par la membrane basale, la liaison Notch1 – Delta-like 1 ligand, responsable du maintien de l'état indifférencié.

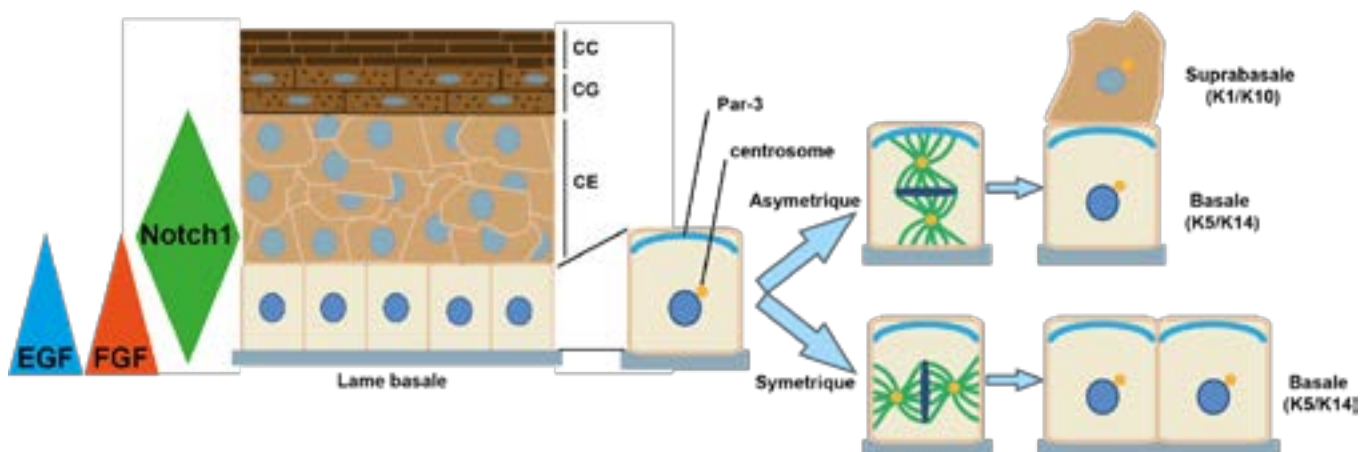


Figure 2 : Différenciation des kératinocytes de la couche basale

Les kératinocytes de la couche basale, en cas de de division asymétrique, se différencient par une absence de stimulation EGF et FGF et une levée d'inhibition de la voie Notch1 [21]. CC : couche cornée, CG : couche granuleuse, CE : couche épineuse. Image issue d'une réalisation originale, inspirée de Muroyama et al. (2012) *Semin Cell Dev Biol* [21].

Par cette levée d'inhibition et par le fait que la concentration environnementale d'EGF diminue (EGF-Récepteur moins stimulé), la composition en filament intermédiaire de la cellule fille côté apical va changer pour perdre son expression de kératine 5 et 14, au profit de kératine 1 et 10, protéines plus longues et condensées (Figure 4). La nouvelle cellule devient donc un kératinocyte différencié, ayant perdu sa capacité de proliférer et n'appartenant plus à la couche basale [18, 20-24].

Suite à cette première différenciation et à la perte de leur pouvoir mitotique, ces kératinocytes appartiennent alors à la couche épineuse ou *stratum spinosum*. Le nom de cette couche vient des tonofibrilles, structure particulière en « épines » liant le cytosquelette (kératine 1 et 10) aux desmosomes, exprimés par les kératinocytes pour maintenant leurs connexions tissulaires [25]. Cependant ces connexions tissulaires sont suffisamment lâche pour permettre le passage de l'innervation sensorielle dans cette couche de l'épiderme et d'y abriter les seules cellules immunitaires de l'épiderme, les cellules de Langerhans (Introduction 2-4-2). C'est dans cette couche que se trouvent également les prolongements des mélanocytes dont le corps cellulaire se situe au niveau de la couche basale, entre les cellules kératinocytes indifférenciés. Plus les cellules vont progresser vers les couches supérieures, plus leurs cytoplasmes vont se modifier pour engranger des lipides et exprimer des protéines intervenant dans la rigidité du cytosquelette, comme la profilaggrine et dans la cohésion tissulaire comme la claudin-1 (jonctions serrées), contribuant ainsi à la fonction barrière physique (Figure 3) [14].

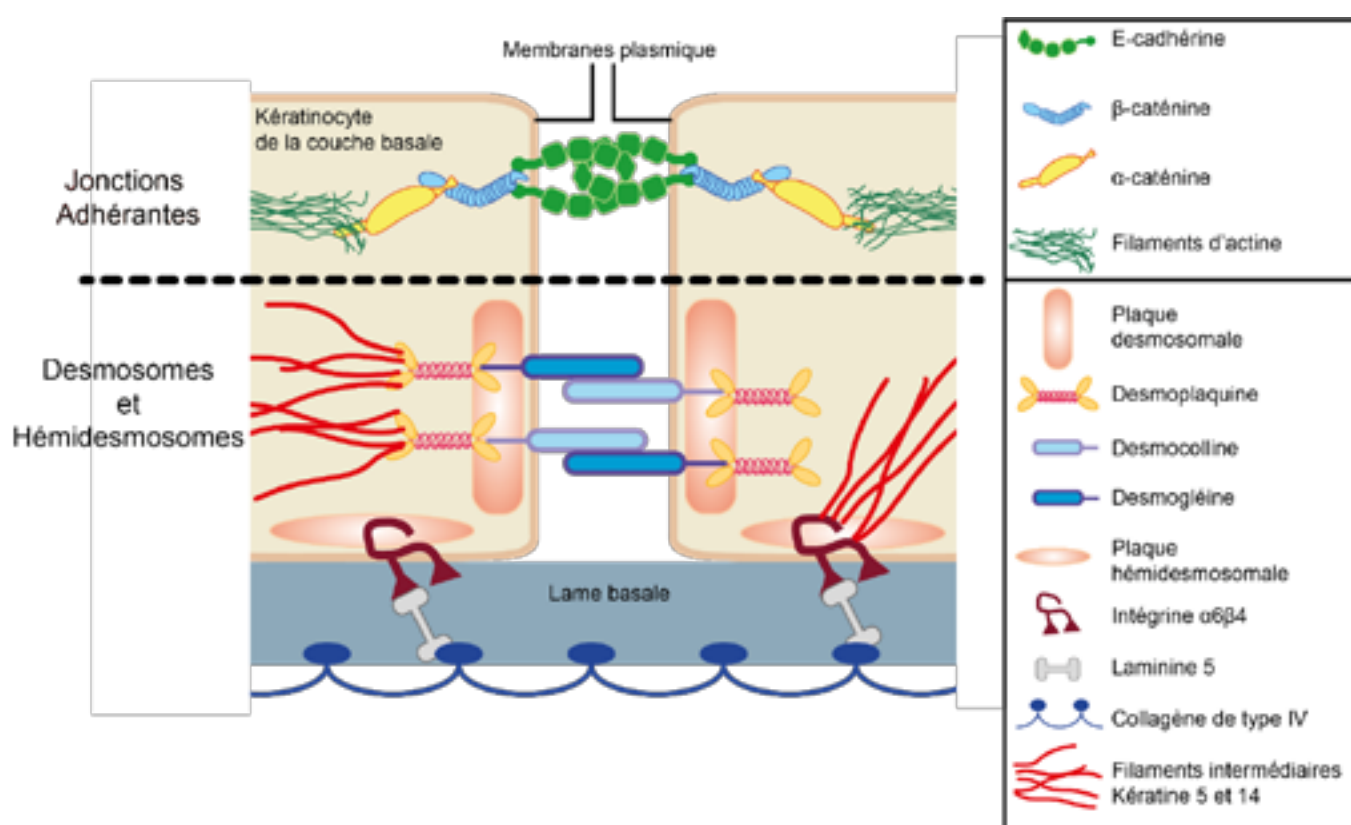


Figure 3 : Schématisation des jonction adhérentes, des desmosomes et des hémidesmosomes des kératinocytes.

Les jonctions adhérentes, constituées de l'E-cadhérine, sont extracellulaires et connectées aux filaments d'actines en intracellulaire. Les desmosomes, constitués de desmocolline et de desmogléine en extracellulaire, sont reliés à une plaque desmosomale en intracellulaire qui

permet de connecter les desmosomes aux filaments intermédiaires des kératinocytes, la kératine. L'hémidesmosome est exprimé uniquement par les kératinocytes de la couche basale, pour se lier à la lame basale et est constitué d'intégrine $\alpha 6$ et $\beta 4$ en extracellulaire pour se lier aux filaments de kératine en intracellulaire. Image issue d'une réalisation originale, inspirée de Fuchs et al. (2002) *Nature Rev. Genetic* [19].

Les kératinocytes vont donc continuer à se développer, notamment sous l'influence d'une concentration croissante de calcium extracellulaire. Avec le changement de leur cytosquelette et l'accumulation de lipides, les cellules vont prendre un aspect granuleux, formant ainsi la couche granuleuse ou *stratum granulosum*. L'expression de protéines extracellulaire comme la claudine-1, se liant avec les E-cadhérine, forment les jonctions étanches de l'épiderme [14, 18]. Cette nouvelle couche, non seulement plus étanche, se trouve aussi rigidifiée par l'expression de kératine 2 et de profilaggrine qui va se fixer sur les tonofibrilles et ancrer les desmosomes aux filaments de kératine. Plus les cellules vont progresser vers la dernière couche de l'épiderme, plus la profilaggrine va se cliver en filaggrine, protéine se fixant entre les filaments intermédiaires pour condenser au maximum le cytosquelette sous l'action des transglutaminases et des peptidylarginines deiminases (Figure 4) [26].

Ces actions combinées vont réduire la taille du cytoplasme qui va s'engorger de corps lamellaires (corps lipidiques, composés de phospholipides, stérols, céramides et glucosylcéramides, synthétisés par l'appareil de Golgi de la cellule). Ces organelles contiennent également des enzymes hydrolytiques comme des phosphatases, des lipases, des glucosidases et des protéases, ainsi que des protéines de structure comme la cornéodesmosine. En fusionnant avec la partie apicale de la membrane cellulaire, les corps lamellaires libèrent leur contenu, augmentant la concentration en calcium extracellulaire qui induit la différenciation des cellules des couches inférieures. Cette fusion entraîne également la libération de tout le cytoplasme de la cellule, à l'exception du cytosquelette. Ces composants, contenant des corps lamellaires et cytoplasmiques, sont les principaux constituant de la matrice extracellulaire (MEC) de la dernière couche de l'épiderme [26, 27].

Le *stratum corneum* ou couche cornée est composée d'un empilement de cornéocytes, le stade de différenciation finale des kératinocytes, consécutif au relargage de leur contenu et donc se traduisant par la mort par apoptose des cellules [28]. Son épaisseur varie en fonction de l'emplacement sur le corps et peut être comprise entre 5 et 30 couches de cellules en moyenne

à plusieurs centaines. Les cornéocytes sont des cellules anucléées à forme polygonale entourées des lipides libérés par les corps lamellaires de la couche inférieure et reliées entre elles par leurs cornéodesmosomes, résultat de la fixation de la cornéodesmosine sur les desmosomes exprimés par les kératinocytes depuis la lame basale [29]. En plus de cette barrière de lipides et des jonctions étanches formées par les cellules, le cytosquelette des cornéocytes participe à empêcher toute perte d'humidité du corps. L'action de la caspase 14 sur la filaggrine, rigidifiant le cytosquelette des cellules, entraîne la formation de facteurs naturels d'hydratation quand les métabolites de la caspase 14 se lient avec des acides aminés libres comme l'acide urocanique ou l'acide pyrrolidone carboxylique [26].

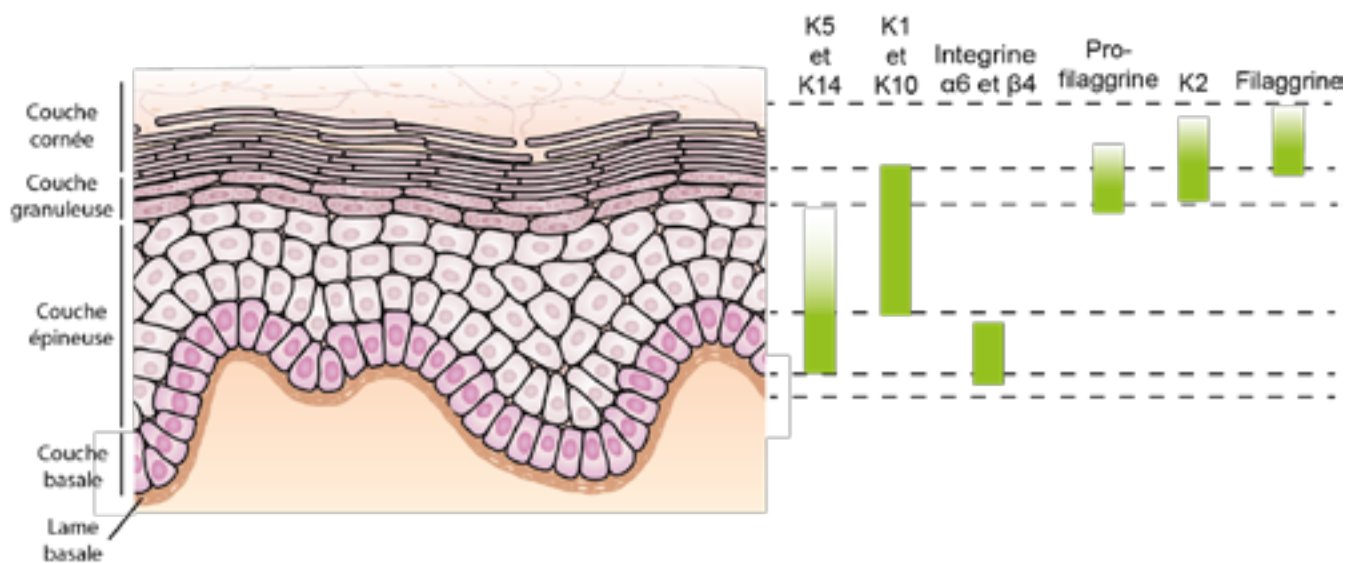


Figure 4 : Représentation de l'expression de différentes protéines des kératinocytes en fonction de leurs emplacements dans les couches de l'épiderme.

En fonction de leurs différenciations, les kératinocytes vont exprimer différents types de filaments intermédiaires (kératines, K1, K2, K5, K10, K14), de molécules d'adhésion (intégrine $\alpha 6/\beta 4$), de protéines intercalantes aux tonofibrilles (profilaggrine) ou de protéines intercalantes aux filaments intermédiaire (filaggrine) [21, 22, 30]. Image issue d'une réalisation originale, inspirée de Solanas et al. (2013) *Nat Rev Mol Cell Biol* [30].

Pour ajouter plus de rigidité au système et une protection hydrophobe supplémentaire, les cornéocytes s'entourent d'une membrane lipidique, en plus de leur membrane de phospholipide. Cette enveloppe lipidique est majoritairement composée de longues chaînes de ω -hydroxycéramides et glucosylcéramides [31]. Les cornéocytes, directement exposés à l'air libre, ont pour seul but de se détacher un à un des autres et de se séparer de l'épiderme. Ce processus, faisant partie de la physiologie de la peau, s'appelle la desquamation. Ce décollement

continue de la couche la plus superficielle est important pour le maintien de l'immunité innée de la peau, le renouvellement de la flore bactérienne, l'élimination des éventuels contaminants et des cornéocytes abimés.

Les cellules, pourtant étroitement liées par leurs cornéodesmosomes, voient leurs liaisons clivées par les protéases de la famille des kallicroïne (KLK de type 5 et 7), initialement contenues dans les corps lamellaires mais uniquement actives à pH5.5. Ce pH est justement atteint dans les dernières extrémités de la couche cornée et permet ainsi l'action des KLKs et donc, la desquamation [32, 33].

1-3. Le derme

Plus épais que l'épiderme, le derme n'est pas stratifié et se compose majoritairement de fibroblastes. Ces cellules sont les principales responsables de l'intégrité du tissu puisqu'elles synthétisent, réparent et entretiennent la MEC spongieuse du derme.

La MEC du derme se compose majoritairement d'un mélange de fibres de collagènes de type I, III et V, conférant à la peau sa résistance mécanique. D'autres molécules hydratées comme, les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes non sulfatés (GAG), comme l'acide hyaluronique permettent à la peau de résister à la pression et à l'écrasement, tandis que l'élastine assure son élasticité, c'est-à-dire de retrouver sa forme initiale suite à une contrainte mécanique [34].

Les fibres de collagènes sont constituées d'un enroulement de 3 chaînes alpha, dont le type de chaîne varie en fonction du type de collagènes, avec des répétitions de triplets d'acides aminés comme glycine, proline et hydroxyproline. L'hydroxyproline, produite par synthèse enzymatique, ayant pour co-facteur l'acide ascorbique (vitamine C), permet de stabiliser la triple hélice de collagène. Ce sont les assemblages des différents types de chaînes- α qui caractérisent le type de collagènes [35].

Le collagène de type I, majoritaire à 80% dans la peau, se compose d'un hétérotrimère fait de deux chaînes $\alpha 1(I)$ et d'une chaîne $\alpha 2(I)$, formant une structure compacte de gros diamètres (90 nm) avec des régions riches en lysine (Lys) et hydroxylysine (Hyl). Ces régions sont sensibles aux enzymes extracellulaires, comme la lysyl-oxydase (LOX), qui va convertir Lys et Hyl en leurs formes aldéhydes $\text{Lys}^{\text{ald}}/\text{Hyl}^{\text{ald}}$ permettant des fixations spontanées et non réductibles inter- et intra-peptidiques. Par ces formes aldéhydes, la fibre de collagène peut donc

interagir avec des peptides, des protéines exprimées par les cellules et également mieux fixer ses propres chaînes α , rendant les complexes moins sensibles aux enzymes de clivage. L'action de la LOX va permettre le dépôt, sur collagène de type I, d'autres éléments de la MEC, comme les fibres d'élastines ou les autres fibres de collagènes, comme le collagène de type III, qui représente 20% du collagène total cutané. Le collagène de type III est un homotrimer fait de chaînes $\alpha 1(\text{III})$ de petit diamètre, connectant les grandes fibres de collagène mais n'étant pas réparti de façon homogène sur toute l'épaisseur du derme [35, 36].

Le derme, bien que non stratifié, s'organise en deux régions structurales, la zone papillaire, directement en dessous de l'épiderme, responsable de l'invagination du derme dans l'épiderme, et la zone réticulaire. Ces deux zones sont non seulement distinctes par leur composition en MEC mais également par leurs types de fibroblastes, puisque ce sont ces derniers qui façonnent la MEC. Les fibroblastes sont des cellules d'origines mésenchymateuses et leurs différenciations au sein du derme se font en fonction de leurs interactions avec les types cellulaires avoisinants. Ainsi les fibroblastes proches de l'épiderme vont devenir des fibroblastes papillaires, très sensibles aux cytokines pro-inflammatoires et aux facteurs de croissances, comme le TGF- β (*transforming growth factor* β) libérés par les kératinocytes. Cependant, en cas de déchirement du derme, les fibroblastes papillaires produisent de la décorine qui piège le TGF- β , les rendant moins susceptibles de former des cicatrices hypertrophiques par rapport aux fibroblastes de la zone inférieure, les fibroblastes réticulaires. En cas de trop forte inflammation ou de contrainte mécanique, les fibroblastes peuvent se différencier en myofibroblastes, sécrétant en excès des collagènes de la MEC, responsable de la formation de cicatrices dans le processus de guérison.

Les papilles dermiques, constituées de collagène de type III, la décorine, la fibromoduline et les GAG, sont des zones denses en vascularisation et innervation, assurant un apport en nutriment optimale pour le derme [37, 38]. En produisant des fibres de collagène de plus gros diamètre, les fibroblastes réticulaires régulent précisément la densité de la MEC, notamment par l'action de métalloprotéases pour permettre de dissoudre ou reconstruire la MEC suite aux déplacements physiologiques nécessaires à certaines cellules à travers le derme [37-39].

Le derme n'abrite pas que des fibroblastes, c'est un tissu de soutien et d'échange pour les cellules immunitaires, les fibres sensorielles et les vaisseaux sanguins et lymphatiques le composant.

1-4. La vascularisation cutanée

Comme dans les autres organes, la vascularisation sanguine dans la peau permet d'apporter nutriments et dioxygènes, indispensable à la survie des cellules. La peau étant un tissu d'interface entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme, la vascularisation sanguine joue aussi un rôle important dans la thermorégulation [40]. La vascularisation lymphatique permet le contrôle des différents fluides de la peau (eau, lymphe) et le transport des cellules immunitaires. Les vaisseaux lymphatiques et sanguins sont composés de cellules endothéliales qui, dans la peau, vont créer des réseaux de structures tubulaires à la porosité variable, les capillaires [41]. Les cellules endothéliales sont des cellules polarisées, séparant les compartiments intra- et extra-vésiculaires. Les capillaires ont un diamètre entre 4 et 8 μm et sont entourés d'une membrane basale composée de collagène de type IV et de laminines (chaines $\alpha 4$ et $\alpha 5$) [42].

Toutes les cellules endothéliales se caractérisent par leur expression du récepteur transmembranaire d'adhésion CD31 (cluster de différenciation 31), codé par le gène PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), qu'on peut aussi trouver faiblement exprimé par certaines cellules immunitaires. L'expression de CD31, par les cellules immunitaires, leur permet d'utiliser les mêmes molécules d'adhésion que les cellules endothéliales pour écarter ces dernières et permettre leur sortie de la circulation sanguine ou leur entrée dans la circulation lymphatique [43, 44]. Sans cette co-expression de CD31, les cellules endothéliales sont fortement liées entre elles par des jonction serrées (*tight junction*), constituées de claudine et d'occludine, des protéines transmembranaires directement reliées au cytosquelette d'actine [45]. Le CD31 n'est pas le seul récepteur d'adhésion qui permet l'écartement des cellules endothéliales pour permettre le passage des cellules immunitaires, il y a également la VE-cadhérine (*vascular endothelial cadherin* ou CD144) ou les récepteurs de la famille des lectines de type C (Introduction, Partie 2-2-2).

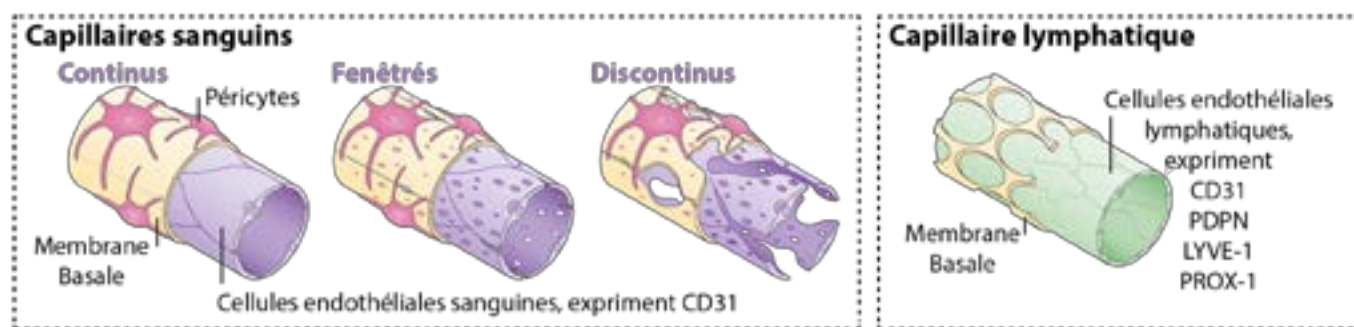


Figure 5 : Représentation schématique de capillaire lymphatique et des différents types de capillaires sanguins.

Il existe 3 types de capillaires sanguins, les continus, les fenêtrés et les discontinus. Seuls les capillaires sanguins continus sont présents dans le derme. Il existe un seul type de capillaires lymphatiques et, à la différence des capillaires sanguins, ils ne possèdent pas de cellules de soutiens, les péricytes. Les cellules endothéliales lymphatiques se caractérisent par l'expression de nombreuses molécules d'adhésion, en plus de CD31 : la podoplanine (PDPN), LYVE-1 (*Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) et PROX-1 (*Prospero homeobox protein 1*). Image modifiée d'après Potente et al. (2017) *Nat Rev Mol Cell Biol* [41].

Cependant, même si les cellules endothéliales lymphatiques et sanguines ont des récepteurs d'adhésion en commun, la structure des capillaires sanguins et lymphatiques est différente.

La micro-vascularisation sanguine prend naissance dans les artérioles provenant de l'hypoderme et va se prolonger jusqu'au niveau des papilles dermiques en formant une boucle et se termine en veinules rejoignant l'hypoderme [46]. Il existe 3 types de capillaires sanguins (Figure 5) : les capillaires fenêtrés (glandes endocrines, foie et rein), permettant le passage de grosses molécules au travers des cellules, les capillaires discontinus (moelle osseuse et ganglions lymphatiques), permettant le passage des cellules du sang sans nécessiter l'ouverture de nouveaux pores intercellulaires, et enfin les capillaires continus, présents dans la peau, dont la porosité restreinte permet le passage uniquement d'ions, d'eau et de petites molécules [41, 47]. Tous ces types de capillaires sont entourés de péricytes, des cellules permettant de réguler le flux sanguin dans les capillaires et intervenant dans la régénération tissulaire et la formation de nouveaux vaisseaux [48].

La micro-vascularisation lymphatique prend naissance dans la peau elle-même, elle n'a pas de vaisseaux afférents et se termine dans des vaisseaux de plus gros diamètres (vaisseaux lymphatiques collecteurs) se rendant jusqu'aux ganglions lymphatiques [41, 49]. Il existe qu'un seul type de capillaire lymphatique, dont les cellules endothéliales ont des jonctions continues et une membrane basale discontinue. De plus, les capillaires lymphatiques ne sont pas entourés de péricytes. Les cellules endothéliales lymphatiques ont une forme dite « en feuille de chêne » avec des jonctions particulières « en bouton ». Ces jonctions permettent le maintien d'une pression de fluide constante vers l'intérieur du capillaire grâce à l'expression de récepteurs d'adhésion comme la podoplanine (PDPN), LYVE-1 (*Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) et PROX-1 (*Prospero homeobox protein 1*) [50-52]. La forme particulière des cellules endothéliales lymphatiques est notamment due à l'alternance des zones d'expression membranaire des récepteurs d'adhésion VE-cadhérine et LYVE-1 (Figure 5) [53].

1-5. Le follicule pileux

Chez l'homme, les zones glabres, entièrement dépourvues de pilosité (poils ou cheveux) représentent une faible surface comprise entre 150 cm² et 240 cm², soit 1,25% de la surface totale de la peau (entre 1,2 m² et 2 m² en moyenne chez l'adulte). Ces zones sont différentes des zones avec pilosités, en terme d'innervation, d'immunocompétence, de vascularisation et donc en terme d'utilité physiologique [54]. Le follicule pileux (poil et ensemble des cellules le synthétisant) a un rôle essentiel dans la biologie de la peau [55] et peut donc être considéré comme un organe à part entière [56].

A la fois plongeant dans le derme et appartenant structurellement à l'épiderme, le follicule pileux rassemble les deux types cellulaires majoritaires de ces deux structures de la peau, les fibroblastes, dans la zone de la papille dermique pour contrôler la croissance du poil, et les cellules épithéliales, issues de cellules souches du « bulge » qui interviennent dans le renouvellement cyclique de la structure du follicule. Fibroblastes et kératinocytes du follicule pileux ont leurs activités (prolifération et différenciation) synchronisées pour permettre le renouvellement du poil, au travers des différentes phases cycliques du follicule : l'anagène, la catagène et la télogène [57].

Au cours du développement embryonnaire, l'installation du poil commence par la morphogénèse du follicule. Durant cette phase, les cellules de la papille dermique se regroupent et s'entourent de cellules souches épithéliales pour initier la croissance des premiers poils. C'est *in utero* que tous les follicules pileux du corps humain se répartissent sous l'action de facteurs de segmentation intervenant dans l'orientation dorso-ventrale de l'embryon, tels que les couples Sonic Hedgehog (Shh) et Wnt, dépendant de la voie des β -caténines. Ces protéines d'orientation vont forcer la maturation des fibroblastes en cellules de la papille dermique qui, une fois agglomérées, vont former la base du follicule pileux. A la naissance, environs 5 millions de follicules recouvrent le corps humain et aucun nouveau follicule ne pourra se former par la suite. Tous les follicules ne sont pas à maturité, mais ceux qui le sont vont entrer en phase de catagène et poursuivre le cycle [55].

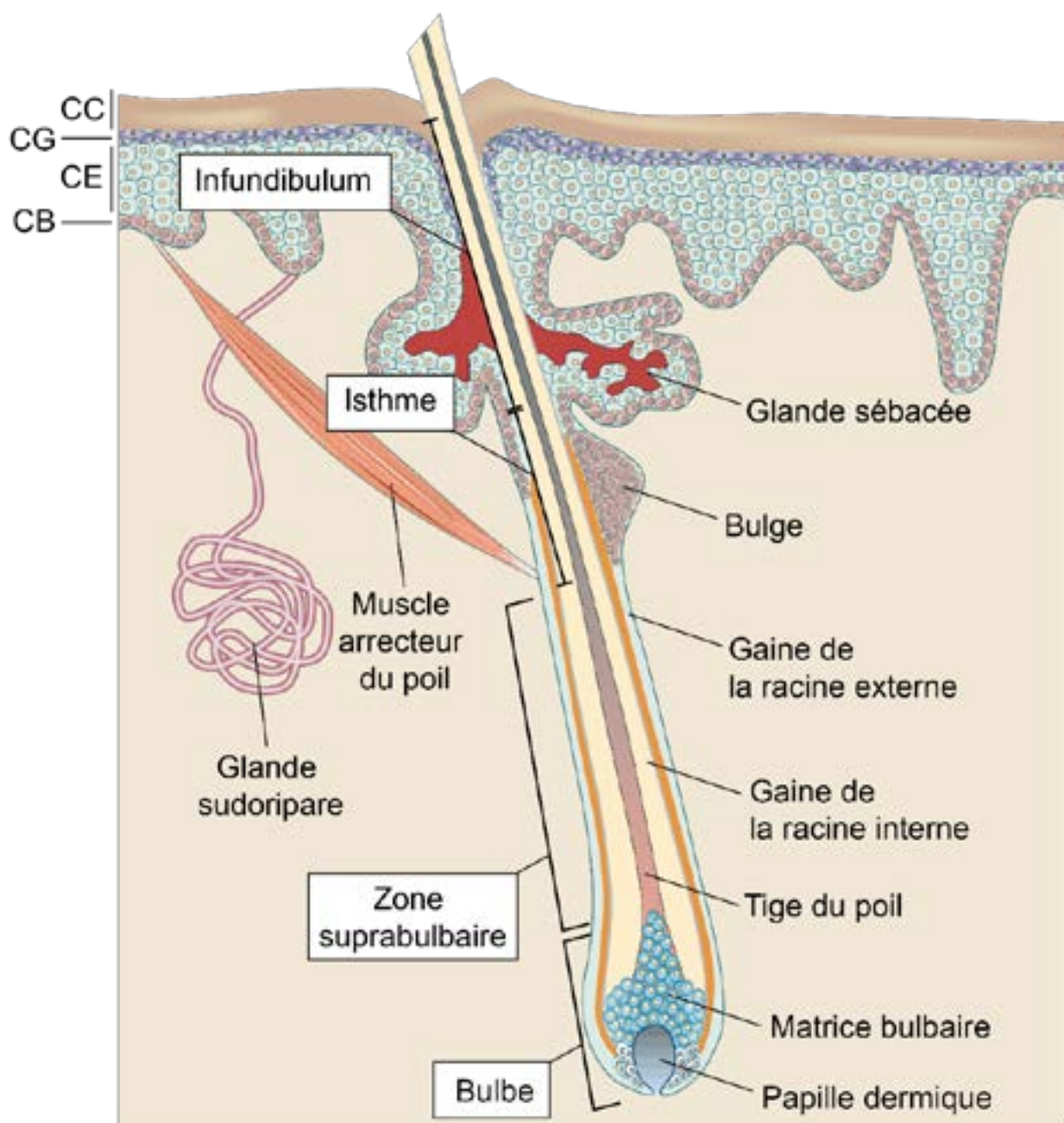


Figure 6 : Organisation structurale du follicule pileux en phase d'anagène.

L'infundibulum et l'isthme font partie de la région constante du follicule, pendant que la zone suprabulbaire et le bulbe font partie de la zone cyclique, ou zone variée [15, 58]. La glande sébacée fait partie intégrante de la structure du follicule pileux et est constituée de cellules souches du bulge et de cellules exocrines productrices de lipides. Les cellules exocrines de la glande sébacée produisent le sébum, composé de monoesters de cire, de triglycérides (41 %), d'acides gras libres (16 %) et de squalène (12 %) et sert à la lubrification de la gaine interne du poil, ainsi qu'au maintien de l'imperméabilité et l'élasticité cutané [59, 60]. Il existe deux types de glandes sudoripares, les eccrines, dont le canal excréteur débouche directement au niveau de la couche cornée (CC), et les apocrines dont le canal excréteur débouche dans le follicule pileux. Les deux glandes sécrètent de la sueur, composée à 99% d'eau et d'électrolytes (ion chlorures, sodium, potassium, calcium et magnésium). La sueur a un rôle important dans la

thermorégulation de l'organisme (par son évaporation) et dans l'humidification de l'épiderme [61, 62]. CC : couche cornée, CG : couche granuleuse, CE : couche épineuse, CB : couche basale. Image modifiée d'après Blanpain et al. (2009) *Nat Rev Mol Cell Biol* [15].

Un follicule pileux mature (à la fin de l'anagène) peut se séparer en deux régions : une zone supérieure, invariante, permanente, que le cycle folliculaire ne va pas modifier et une zone inférieure dont la morphologie va varier au cours des différentes phases du cycle (Figure 6). La zone supérieure est constituée de l'infundibulum, ouvrant le canal folliculaire à l'extérieur (partie apical) de la peau et de l'isthme. La séparation entre l'infundibulum et l'isthme se fait par la zone d'insertion du canal de la glande sébacée dans le canal folliculaire. L'isthme est constitué du bulge, réserve des cellules souches épithéliales destinée à entretenir la structure du follicule, et pour le renouvellement de la glande sébacée et de l'épiderme autour du poil. A la base de l'isthme, se trouve le point de contact du canal folliculaire avec le muscle arrecteur du poil, muscle lisse relié à l'épiderme et intervenant dans l'érection du poil. En dessous du bulge se trouve la zone variante, avec la zone suprabulbaire et le bulbe.

Au niveau du bulbe, zone de croissance du poil, il est possible de distinguer la matrice bulbaire, concentrée de cellules à prolifération rapide, servant à synthétiser le poil. Ce dernier est constitué de trichocytes, un autre stade terminal de différenciation des kératinocytes. Ils forment le cœur du poil, synthétisant de la kératine de type I et II pour emprisonner les particules de mélanine [63]. La croissance, la longueur, le diamètre et la coloration du poil sont contrôlés par les cellules de la papille dermique. Ce condensé de fibroblastes détermine également la durée de la phase d'anagène via de nombreux facteurs de croissances tels que l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1), l'hépatique growth factor (HGF), le fibroblast growth factor 7 (FGF-7) et le vascular endothelial growth factor (VEGF).

La phase d'anagène correspond justement à la phase de croissance régulière du poil où ce dernier remplit tout le follicule. Les facteurs d'orientation Shh et Wnt/ β -catenin vont permettre de régler la durée de l'anagène pendant que le couple IGF-1 et FGF-7 vont régler la taille du poil formé. Par exemple, un cheveu humain a une durée d'anagène de 4 ans en moyenne, sans limite précise de taille.

Le passage en phase de catagène reste encore un mécanisme inconnu mais il semblerait que l'absence de stimulation Wnt/ β -catenin et la présence FGF-5 entraîne l'apoptose des molécules de la matrice bulbaire. D'autres facteurs tels que les cytokines IL-1 β (interleukine 1- β), TGF- β 1 et TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) et les facteurs neurotrophiques NT-3, NT-4 et BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) participent à précipiter le passage en catagène. L'apoptose des cellules de la matrice bulbaire et des mélanocytes induit un arrêt de la prolifération du poil. Pendant que la papille dermique restera en place, le bulbe va alors remonter le long de la zone suprabulbaire qui deviendra une colonne de cellule épithéliale en régression. La fin de cette phase de mort programmée du bulbe s'accompagne par une remontée de la papille dermique jusqu'au bulge et donc de la fin de vie du follicule si rien n'est fait pour relancer le cycle.

L'entrée en phase de télogène, la quiescence des cellules souches du follicule, se fait par une augmentation extrafolliculaire de l'activité des *bone morphogenetic protein* (BMP) 2 et 4. Cette activité, principalement initiée par les cellules adipeuses intradermiques, a pour but de relancer l'amplification des cellules souches du bulge pour réactiver leur division asymétrique et donc leur différenciation [64]. En diminuant, les BMP-2 et 4 vont relancer l'activation de la voie des β -caténine via Wnt dans la papille bulbaire et ainsi initier une nouvelle anagène.

1-6. Le microbiome cutané

La peau est un organe à part entière et contient même des mini-organes tel que le follicule pileux. De plus, les conditions d'humidité, de pH, la présence de nutriments comme des acides gras, des acides aminés et même la présence de protéases antimicrobiennes font de la peau un environnement propice au développement d'écosystèmes à la fois unique selon les individus et variable sur un même individu. Cet écosystème, appelé microbiome, comporte une multitude d'espèces différentes de bactéries, de champignons/moisissures et de virus. Il est possible d'identifier ces bactéries par simple culture ou encore d'en retracer leur phylogénie en utilisant l'ARN ribosomique 16S propre aux procaryotes [65, 66]. Ces analyses permettent non seulement d'identifier les constituants du microbiome cutané humain, mais également de préciser leurs zones de prédilection, comme les zones majoritairement humides ou contenant une majorité d'acides gras du sébum. Enfin, ces analyses permettent de différencier la flore dite commensale, symbiotique, indispensable à la survie d'un individu sain de la flore à tendance pathogénique.

Les trois principaux genres dominants de bactéries appartenant à la flore commensale retrouvés sont *Cutibacterium* (23,0% ; anciennement *Propionibacterium*), *Corynebacterium* (22,8%) et *Staphylococcus* (16,8%) sur plus de 205 genres identifiés et environ 112 290 espèces différentes [67, 68]. Cependant, le rôle de l'hôte de cette flore ne se résume pas à être une boîte de pétris vivante pour les bactéries, il y a une interaction symbiotique entre le microbiome et l'hôte.

Même si l'absence de microbiome n'impacte pas la morphologie cutanée, la flore bactérienne reste indispensable pour le maintien de l'homéostasie, le développement du système immunitaire et le contrôle du développement des bactéries pathogènes [69]. Le microbiome commensal entretient un dialogue avec le système immunitaire cutané avec des réponses immunitaires non inflammatoires qui leur sont propre. Par exemple, *Staphylococcus epidermidis*, bactérie Gram positif (Figure 7C), entraîne une réponse unique de la part des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), pour que l'immunité adaptative entraîne l'apparition de lymphocyte T-CD8⁺ productrices d'IL-17A (Figure 7A). Ces lymphocytes T-CD8⁺ spécifiques de la bactérie commensale vont stimuler les kératinocytes pour leur faire produire des peptides anti-microbiens, qui ne vont pas s'attaquer à *S. epidermidis* mais qui vont réguler la population des bactéries pathogènes, comme *Staphylococcus aureus* [70].

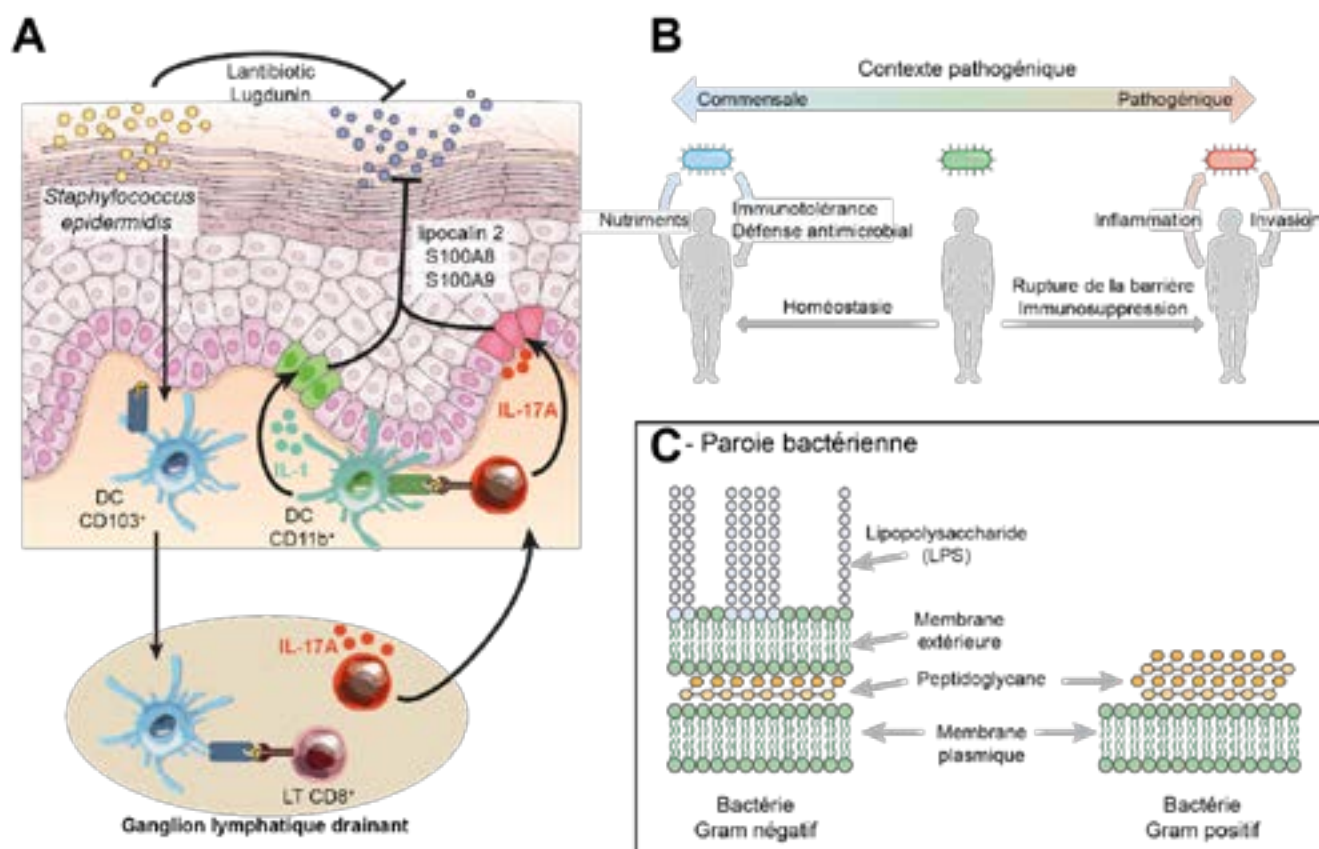


Figure 7 : Impacte de la flore commensale pour le maintien de l'intégrité de la barrière cutanée.

A. Les bactéries de la flore commensale, comme *S.epidermidis*, activent les cellules dendritiques (DC) CD103⁺, pour entraîner la maturation des Lymphocytes T (LT) CD8⁺ dans les ganglions lymphatiques drainants (Introduction, Partie 2-3-4). Les LT vont produire de l'IL-17A pour activer les kératinocytes directement ou par l'intermédiaire des DCs CD11b⁺. Les kératinocytes de la couche basale activés vont produire des peptides antimicrobiens pour limiter la croissance des bactéries pathogènes, comme *S.aureus* [65, 69]. **B.** Le contrôle, par la flore commensale, de la flore pathogénique, empêche sa sur-prolifération et donc leur invasion. **C.** Différence dans la composition de la paroi entre les bactéries Gram négatifs à double membranes et exprimant des Lipopolysaccharides (LPS) et les bactéries Gram positifs avec une seule membrane. Image issue d'une réalisation originale, inspirée de Solanas et al. (2013) *Nat Rev Mol Cell Biol* [30].

La colonisation du microbiome par *S. aureus* est, la plupart du temps, asymptomatique mais certaines souches de ces bactéries sont considérées comme des pathogènes opportunistes. Ils sont très résistants en cas d'infection, de par leurs multirésistances aux antibiotiques (comme la pénicilline, la méticilline ou dernièrement contre le dernier rempart contre les *Staphylococcus*, la vancomycine) et leurs capacités à sécréter enzymes et toxines pour infester le corps humain, tout en détruisant les défenses immunitaires et se protégeant de ces dernières grâce à des biofilms [71].

D'autres bactéries comme *Corynebacterium accolens* ou *Staphylococcus hominis* induisent cette réponse immunitaire non-inflammatoire à base de production d'IL-17A dans le but d'activer les kératinocytes (Figure 7A) [70, 72]. Ces derniers, en ce différenciant, vont pouvoir enrichir la couche cornée en lipides comme l'acide sapiénique, qui a une activité antimicrobienne, ou des triglycérides qui peuvent être métabolisés par les bactéries, finissant cette boucle symbiotique en nourrissant le microbiome qui les protègent.

L'effet indirecte d'une flore commensale compétente est donc une meilleure différenciation des kératinocytes et donc un meilleur maintien du pH épidermique, qui doit être à 7,4 au niveau de la lame basale et à 4,5 au niveau de la couche cornée. Ce maintien indirecte du pH épidermique par la flore commensale est vitale pour permettre la desquamation et donc le renouvellement continu de l'épiderme [73]. Même si toutes les interactions entre le système immunitaire, les cellules de la peau et le microbiome cutané ne sont pas entièrement connus, une atteinte de la flore commensale (stress, environnement, alimentation, hygiène excessive, médicaments) est un facteur déterminant pour l'apparition ou l'aggravation de pathologies cutanées multifactorielles comme la dermatite atopique ou le psoriasis (Figure 7B) [74, 75].

La peau n'est pas le seul épithélium à avoir un écosystème puisque 70% du microbiome se trouve dans le tractus intestinal et tout comme le microbiome cutané, ce dernier est en étroite relation avec les cellules nerveuses et immunitaires humaines [76].

2- L'immunité cutanée

2-1. Historique et fonctions du système immunitaire

L'immunologie est l'étude biologique des défenses de l'organisme contre les virus, les bactéries, les champignons/moisissures et les parasites mais également l'étude des dérives de ce système de défense comme les maladies auto-immunes, réactions d'hypersensibilité, allergies, rejets [77]... L'origine de cette branche particulière de la biologie est souvent attribuée à Edward Jenner, qui a démontré en 1796, que le fait d'inoculer à un individu sain la variole bovine, bénigne, permettait de protéger cet individu contre la forme infectieuse et meurtrière de la variole humaine [78]. Il faudra attendre la seconde moitié du XIXe siècle pour que Robert Koch, en 1876 et Louis Pasteur en 1878 démontrent que certaines maladies sont dues à des agents infectieux appelés « microbes » et que ces agents infectieux ne sont pas issus d'une « génération spontanée ». Par la suite, Élie Metchnikoff a démontré, en 1882, la présence

de cellules phagocytaires (du Grec « *phagein* » pour « qui mange ») spécifiques capables d'englober et de digérer les microorganismes. Il a appelé ces cellules les macrophages et il a démontré qu'elles étaient constamment présentes comme première ligne de défense contre tout type de pathogène, introduisant le terme d'immunité « naturelle » qui sera par la suite appelée immunité innée [79].

Les notions d'immunité innée et d'immunité adaptative ont été proposées pour la première fois par Charles Janeway Jr. en 1989 après les nombreuses découvertes faites sur l'utilisation du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) dans l'activation des Lymphocytes T helper (Th) [80]. Ce paradigme distingue les premières lignes de défense de l'organisme, comme les macrophages ou des cellules dendritiques (DCs, *dendritic cells*), qui s'attaquent, sans distinction, à tout type de pathogène (immunité innée), et la réponse immunitaire spécifique, comme les anticorps, reconnaissant la conformation d'une seule molécule appartenant à un seul type de pathogène (immunité adaptative) [77].

Les macrophages d'Élie Metchnikoff ne sont pas les seuls intervenants du système immunitaire. Pour cette découverte, il partage le prix Nobel de Physiologie et de Médecine de 1908 avec Paul Ehrlich, « en reconnaissance de leurs travaux sur l'immunité » puisque ce dernier a mis en évidence une population de cellules particulières dans le sang grâce à une coloration au chlorure de toulon. Cette coloration a montré, en plus des érythrocytes, ou globules rouges, une population de cellules baptisés leucocytes, ou globules blancs. Ces cellules appartiennent au système immunitaire circulant dans le sang et ont en commun, avec les macrophages, leur origine développementale.

Même si les réponses immunitaires innées et adaptatives sont conceptuellement séparées, le système immunitaire dans sa globalité remplit quatre principales fonctions dans sa lutte contre les pathogènes. Premièrement, le système immunitaire doit reconnaître rapidement le pathogène, c'est le rôle du système immunitaire inné. Ce mécanisme n'est pas spécifique aux vertébrés et se base sur la reconnaissance d'épitopes exprimés spécifiquement par les pathogènes [81]. Ces motifs moléculaires sont nommés les PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Une fois identifié, d'abord par le système immunitaire inné, puis reconnu par le système immunitaire adaptatif, le pathogène doit être traité et éliminé de l'organisme. Cette réaction, qui conduit à une inflammation tissulaire, doit rester sous le contrôle du système immunitaire et ne doit pas perdurer une fois le pathogène éliminé. C'est le rôle de la troisième fonction : la régulation du système immunitaire. Enfin, une fois le pathogène reconnu, éliminé et la réponse adéquate contrôlée, il se peut que l'organisme rencontre encore cet agent

infectieux ou une forme analogue. Pour cela, le système immunitaire adaptatif permet la survie et le maintien au long terme de cellules dites « mémoires » spécifiques de l'agent infectieux afin, en cas de nouvelle rencontre, d'agir plus rapidement dans l'élimination du pathogène. C'est sur cette notion de mémoire immunitaire que repose la théorie de la vaccination. Le système immunitaire adaptatif a un autre rôle, faire en sorte que les motifs des pathogènes soient différents des motifs moléculaires exprimés par le corps, c'est-à-dire faire la différence entre le « soi » et le « non-soi ».

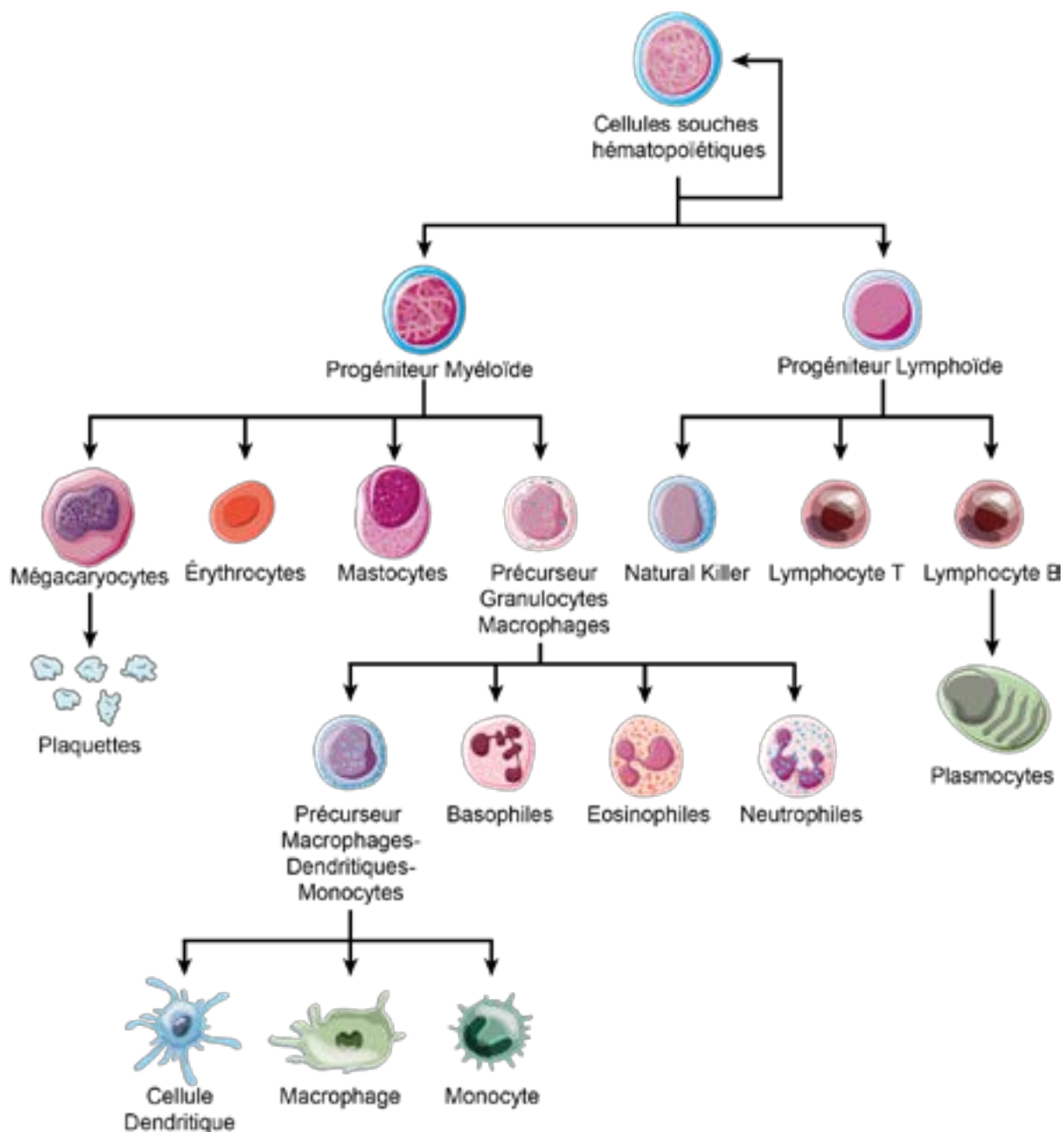


Figure 8 : Résumé de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

Image issue d'une réalisation originale, inspirée de la banque d'images libres de droits Servier Medical Art.

Toutes les cellules appartenant à l'immunité, c'est-à-dire intervenant directement dans les quatre principales fonctions du système immunitaire sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques, se trouvant dans la moelle osseuse (Figure 8). Deux principales lignées cellulaires proviennent des cellules souches hématopoïétiques :

- la lignée lymphoïde, regroupant les cellules NK (pour Natural Killer) et les lymphocytes B et T (principaux acteurs de l'immunité adaptative),
- la lignée myéloïde, regroupant les cellules n'intervenant pas directement dans la réponse immunitaire comme les mégacaryocytes (qui deviendront les thrombocytes, les plaquettes) et les érythrocytes, puis les cellules immunitaires, intervenant principalement dans l'immunité innée, les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), obtenues à partir d'une cellule précurseur et les mastocytes. Le précurseur des granulocytes peut se différencier en un autre type de précurseur, à l'origine des macrophages, monocytes (dont sont issus une partie des DCs et macrophages dans les tissus) et progéniteurs de DCs (Introduction, Partie 2-4-1) [82-84].

Ces cellules sont indispensables pour protéger le corps contre l'invasion de pathogènes mais elles évoluent au sein d'organes qui leur sont dédiés, les organes lymphoïdes primaires et secondaires :

- Organes lymphoïdes primaires : la moelle osseuse, productrice de cellules immunitaires, et le thymus, qui est nécessaire pour que les lymphocytes T puissent reconnaître le CMH propre de l'individu (sélection positive) et pour que les molécules qu'ils reconnaissent n'appartiennent pas à des composants du corps (sélection négative).
- Organes lymphoïdes secondaires : ils offrent un lieu de rencontre entre cellules immunitaires et de possibles pathogènes ayant contaminés les organes périphériques et la circulation sanguine ou lymphatique. La rate, à la fois réserve d'érythrocytes, n'est pas strictement indispensable à la survie de l'organisme. Les ganglions lymphatiques, réserve de cellules de l'immunité innée différenciées et sélectionnées par le thymus, mais encore immature, en attente de leur rencontre avec des CPA venant leur présenter un antigène.

Les cellules de l'immunité innée et adaptative, même si elles suivent des voies de développement différentes, doivent communiquer pour assurer les fonctions du système immunitaire. Par exemple, les lymphocytes T ne possèdent pas la capacité à reconnaître les pathogènes comme un danger et ne peuvent les reconnaître directement. Cette identification

indirecte se fait grâce aux cellules présentatrices de l'antigène (CPA), comme les macrophages, les DCs et les lymphocytes B qui possèdent des récepteurs de PAMPs et expriment des molécules du MHC nécessaires à la présentation d'antigènes.

2-2. La reconnaissance des signaux de danger

Pour l'organisme, le danger peut venir d'un microorganisme comme une bactérie, un virus ou une moisissure, mais également d'un parasite, d'une toxine bactérienne ou d'une molécule inerte ne provenant pas nécessairement d'un organisme vivant. Ces dangers peuvent être reconnus par le système immunitaire inné grâce aux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaire (*pattern recognition receptor*, PRR). Ces PRR incluent les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptors*, TLRs), les récepteurs de type NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*, NLR), les récepteurs de type RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-I-like receptor*, RLRs) et les récepteurs à lectine de type C (*C-type lectin receptors*, CLR).

2-2-1. Les Toll-like receptors

Les TLRs proviennent de la découverte du gène toll par Christiane Nüsslein-Volhard en 1985 chez la drosophile, *Drosophila melanogaster* [85]. En 1996, Jules Hoffmann démontre l'utilité de la protéine pour laquelle il code, le récepteur Toll, dans la protection antifongique de la drosophile via la phosphorylation et la dégradation de I κ B, qui empêche à l'état basal la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [86]. Un an plus tard, Charles Janeway démontre la présence de récepteurs identiques à ceux exprimés par la drosophile (*Toll-like*) chez les CPA humaines [87]. Par la suite, Bruce Beutler (partageant le prix Nobel de médecine de 2011 avec Jules Hoffmann) découvre, chez la souris, que TLR4 est le récepteur du LPS. Il démontre également que l'activation de TLR4 par le LPS déclenche une réponse inflammatoire et qu'une dose excessive de LPS peut entraîner un choc septique (diminution brutale de la pression sanguine, accompagné d'hyperthermie) [88].

Dans leurs structures, les TLRs ont en commun un domaine extracellulaire présentant des zones de répétitions riches en leucine (*leucine-rich repeats*, LRRs) qui consistent en un motif conservé de 20-30 acides aminés incluant la séquence « LxxLxLxxN ». Le domaine

intracellulaire des différents TLRs, nommé récepteur Toll/IL-1 (TIR), est également fortement conservé et présente une homologie avec le domaine intracellulaire du récepteur de l'IL-1 [89].

Une fois activé par son ligand, les TLRs s'assemblent en homodimère (par exemple : TLR3) ou en hétérodimère (par exemple : TLR1 + TLR2). Certains TLRs ont besoin d'un ou plusieurs corécepteurs pour induire leurs actions intracellulaires, comme c'est le cas du TLR4 avec ses corécepteurs CD14 (cluster de différenciation 14) et MD-2 (*myeloid differentiation protein*) [90]. La dimérisation du récepteur et sa rencontre avec ses corécepteurs est la seule façon d'activer la réponse des TLRs en cas de liaison avec leurs agonistes. Même si TLR4 est confronté à un agoniste complexe avec MD-2, il ne peut pas se dimériser en l'absence de CD14, et il n'y aura pas de réponse inflammatoire [91].

10 TLRs différents sont exprimés chez l'Homme, dans des compartiments cellulaires différents. Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont exprimés sur la membrane cellulaire alors que TLR3 est présent sur la membrane des endosomes et TLR7, TLR8 et TLR9 se trouvent sur la membrane des endolysosomes. Cette compartimentalisation est importante pour leur fonction [92]. Ainsi, TLR4 va reconnaître un composant des bactéries à Gram négatif, le lipopolysaccharides (LPS), qui est présent à leur surface et fréquemment libéré dans l'environnement. A l'inverse, les TLRs intracellulaires sont destinés à la détection d'acides nucléiques, peu stables dans le milieu extracellulaire mais présents lors de la capture et de la dégradation d'un pathogène : l'ARN (acide ribonucléique) viral monocaténaire (single-stranded ribonucleic acide, ssRNA ; TLR7, TLR8), bicaténaire (double-stranded RNA, dsRNA ; TLR3) ou l'ADN double brin à motifs CpG (TLR9).

La plupart des TLRs activent la voie de signalisation dépendant de MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), directement ou indirectement via un adaptateur TIRAP. Seule la signalisation de TLR3 fait un usage exclusif de TRIF, un adaptateur qu'il partage avec TLR4. Ces protéines adaptatrices présentent un domaine TIR comme les TLRs [93]. D'autres voies vont dépendre de TIRAP, comme la voie des MAPK1 et 3 (*Mitogen-activated protein kinase*), appartenant à la grande famille des kinases (enzymes à transfert de groupement phosphate) comme les ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*) ou les JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*). Les phosphorylations successives de ces intermédiaires conduisent à l'activation de facteurs de transcription, comme NF- κ B ou IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) [94].

2-2-2. Les C-type Lectin Receptors

Les CLR sont une famille de récepteurs possédant un ou plusieurs domaines de reconnaissance de carbohydrate (*Carbohydrate-recognition domain*, CRD), permettant de lier des sucres, les glycanes, polymères composés de monosaccharides. Le CRD est une région compacte de 110-130 acides aminés, fixant les sucres sur leur groupement hydroxyle avec comme cofacteur, le calcium (Ca^{2+}). Il existe 16 groupes de lectines de type-C différents, distinguables dans leur architecture et leurs fonctions [95, 96].

Les CPA, comme les DCs, expriment des CLR d'endocytose spécifiques comme DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*, ou CD209), appartenant au 2^e groupe des CLR. Ils se présentent sous la forme d'un récepteur transmembranaire avec un seul CRD à son extrémité et reconnaît spécifiquement les glucides de type mannose [97]. En se liant aux régions riches en mannose, plusieurs DC-SIGN vont se rassembler par phosphorylation de leur groupement intracellulaire de la tyrosine (motif d'acide aminés YXXL) [98]. La concentration de DC-SIGN liés à leur mannose a pour but de rassembler, dans une même zone, la substance ou le pathogène à endocyter [99]. De plus, DC-SIGN peut, par la voie Raf-1, acétyler la sous unité p50 de NF- κ B et influencer la réponse induite par les TLRs (production d'IL-10) [100, 101].

Les DCs et les macrophages expriment un autre type de CLR intervenant dans l'endocytose, un CLR de type VI, le récepteur au mannose (*mannose receptor*, MR ou CD206). Il se présente avec 8 CRDs extracellulaires, un domaine Fibronectine de type II et enfin, en N-terminal, un domaine riche en cystéine (*Cysteine-rich domain*, CR). Les domaines CRDs se lient aux complexes glucidiques se finissant en mannose, fructose ou N-acétylglucosamine (N-acétyl-D-glucosamine ou GlcNAc ou NAG). Le domaine Fibronectine de type II reconnaît les multimères de collagène de type I, II, III ou IV dénaturés. Enfin, le domaine CD reconnaît les glucides sulfatés se terminant par SO_4 -(3)-Gal-R ou SO_4 -(3/4)-GalNAc-R [102, 103]. Le MR est à la fois indispensable pour la régulation homéostatique des glycoprotéines sériques, mais aussi dans la reconnaissance du pathogène où il va avoir le même rôle que DC-SIGN dans la phagocytose et l'endocytose médiés par manteau de clathrine (Introduction, Partie 3-2-7) [104, 105].

Exprimée par les cellules de Langerhans et également un CLR de type II, la Langerin (ou CD2017) a un rôle similaire à DC-SIGN dans l'endocytose. Cependant, l'endocytose induite par la Langerin entraîne la formation de granules de Birbeck, des structures particulières « en forme de raquette de tennis » (observable en microscopie électronique). Ces structures sont caractéristiques de la capture d'un antigène par les cellules de Langerhans au moyen de leur Langerin et il semblerait que ce soit des compartiments d'endosomes recyclés, dont le rôle exact dans la cellule n'est pas encore défini [106-108].

D'autres sélécines, les CLR de type IV, n'interviennent pas dans la détection du signal de danger, mais dans l'adhésion cellulaire. Les P et E-selectines, exprimées par les cellules endothéliales et la L-sélectine, exprimée par les leucocytes, sont responsables de la diapédèse, le passage de cellulaires immunitaire de la circulation sanguine à une zone tissulaire [95, 109]. Cette fonction est indispensable au recrutement de cellules immunitaires sur les zones d'inflammation, par exemple [95, 96, 110].

2-2-3. Les NOD-Like Receptors

Les NLRs sont des récepteurs cytoplasmiques prévus pour détecter la présence de bactéries lorsque le cytosol de la cellule est contaminé. Il y a deux groupes dans la famille des NLRs : les récepteurs NOD1 et NOD2 d'une part, et un assemblage complexe multiprotéique, l'inflammasome d'autre part [92, 111, 112].

NOD1, exprimé de façon ubiquitaire, et NOD2, exprimé uniquement par les cellules phagocytaires (macrophages, DCs, neutrophiles) [113, 114], reconnaissent le peptidoglycane des parois des bactéries Gram-positives. Ces deux récepteurs ont en commun d'activer la famille des MAP-kinases, où la voie des JNK aboutie à l'activation du facteur de transcription c-Jun et la voie MAPK-p38 [111, 115, 116].

L'inflammasome est un complexe cytoplasmique comprenant les récepteurs NLRP1, NLRP3, NLRP4, NLRP6, NLRP7 et NLRP12. Tous ont leurs préférences dans les types de protéoglycane ou PAMPs de la paroi bactérienne qu'ils vont pouvoir fixer mais ils ont tous en commun un domaine de recrutement et d'activation de caspase (*caspase activation and recruitment domain*, CARD) [111, 112, 117]. L'aboutissement du recrutement de l'inflammasome et de la cascade de réactions métaboliques associées est d'entraîner la synthèse d'IL-1 β , d'IL-18 et l'activation de la caspase-1. Le recrutement de la protéine ASC (*Apoptosis-*

associated speck-like protein containing a CARD) au sein de l'inflammasome et l'activation de la caspase-1 peuvent induire une mort cellulaire programmée différente de l'apoptose, la pyroptose [118]. A mi-chemin entre la nécrose et l'apoptose, la cellule va créer des pores dans sa membrane externe, détruire son noyau mais ne va pas se fragmenter en corps apoptotiques ou en débris nécrotiques. Le but est d'ouvrir la membrane pour libérer toutes les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-18) à destination des cellules avoisinantes. NLRP3 n'est pas sensible seulement aux PAMPs, mais aussi à la formation de cristaux d'acide urique, aux microparticules polluantes (silice, amiante), à la lumière Ultra-Violet, et à des composés chimiques comme le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB) [117, 119, 120]

2-2-4. Les *Retinoic acid-inducible gene-1-Like Receptor*

Si les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés par les DCs et détectent le matériel génétique viral dans les endosomes, ce n'est pas le cas des RLRs, exprimés par tous les types cellulaires pour leur permettre de lutter contre les infections virales. Les RLRs sont au nombre de trois : RIG-I, MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) et LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*) [92]. Ces trois récepteurs vont pouvoir détecter l'ARN double brin (*double-stranded* (ds)RNA) utilisé par les virus à ARN lors de leur réplication intracellulaire [121, 122]. Ils possèdent tous une cassette DExD/H à hélicase d'ARN (DExD/H box RNA helicase), une famille de protéine qui va, par l'hydrolyse d'ATP, séparer les deux brins d'ARN viral et activer le récepteur [123]. Une fois actif, les RLRs vont entraîner l'activation de NF- κ B et d'IRF-3 et donc la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron (IFN) de type I (IFN- α , IFN- β) [124].

Seuls RIG-I et MDA5 possèdent un domaine CARD, permettant d'activer la voie caspase-3 et donc l'apoptose de la cellule [125]. LGP2 ne possède pas de domaine CARD et va agir comme rétrocontrôle négatif sur RIG-I [126].

2-3. Réponses immunitaires innées et adaptatives

2-3-1. L'ante-immunité

Les microorganismes potentiellement pathogènes sont maintenus hors de l'organisme grâce à l'ante-immunité, un système complexe de barrières physiques, chimiques et microbiologiques [127]. Au niveau de la peau, cette « immunité avant l'immunité » est en particulier due à la structure même des kératinocytes de la couche cornée, qui créent une barrière physique imperméable. Ces cellules créent également un environnement hostile à la prolifération de la plupart des microorganismes, par la génération d'un pH élevé et la libération d'enzymes [73]. Enfin, le microbiome de l'hôte, dont l'évolution a permis d'adapter aux conditions environnementales de la peau, limitent la prolifération des pathogènes par leur occupation de l'espace de prolifération disponible et la libération d'enzymes [69, 76].

2-3-2. La réponse immunitaire innée

L'immunité innée est la première composante du système immunitaire à protéger contre les pathogènes dès leur entrée dans l'organisme. Son rôle est de contenir le plus rapidement possible le pathogène. La nature (virus, bactérie, parasite), la charge (le nombre) et la virulence (le potentiel infectieux) sont les éléments conditionnant la réponse de l'immunité innée [128, 129]. Si l'infection dure moins de 4h, les cellules de l'immunité innée résidant en permanence dans les tissus sains éliminent l'invasion sans créer d'inflammation. Au-delà, d'autres cellules de l'immunité innée sont recrutées au niveau de la circulation sanguine pour éliminer l'infection mais toujours de façon aspécifique. Au-delà de 96h, l'immunité adaptative, activée par les CPA, peut intervenir pour contrer, de façon spécifique, l'invasion [130-132]. L'immunité innée comprend des intervenant à la fois moléculaires et cellulaires.

L'inflammation est un phénomène visible consécutif de l'action du système immunitaire inné, qui peut conduire à une perte partielle ou totale de la fonction de l'organe affecté. Ce phénomène est caractérisé par quatre symptômes [133, 134] :

- La sensation de chaleur ressentie, consécutive à l'activation des neurones thermorécepteurs (Introduction, Parties 3-4-4 et 3-4-5) et au second symptôme,
- La rougeur, due à la vasodilatation nécessaire au recrutement des cellules immunitaires,
- Le gonflement, ou œdème, une accumulation de liquide, principalement de la lymphe, conséquence de la perte d'étanchéité des cellules endothéliales à cause de la vasodilatation.
- La douleur, suite à l'activation des neurones nocicepteurs,

a. Le complément

Le complément est un ensemble de 25 molécules (les principales vont de C1 à C9) dont les cascades de réaction et leurs amplifications vont induire la destruction directe ou la phagocytose des pathogènes. Le complément est constitué de 3 voies, la voie classique (dépendante des anticorps, donc de l'immunité adaptative), la voie alterne et la voie des lectines [132, 135].

La voie alterne repose sur la reconnaissance de la protéine du complément C3, de sa sous unité b (protéine C3b) qui possède un groupe contenant des thioesters (thioester-containing domain, TED). En temps normal, le TED est inactif et attaché à C3a par une liaison avec un groupement hautement réactif aux thioesters. En présence de groupements hydroxyle ou amine exprimés à la surface des bactéries (Gram+ et Gram-), des virus, des parasites et mêmes des cellules infectées par des virus, C3 va se cliver et C3b va rester fixée sur le pathogène [136, 137]. La protéine C3b sur la cellule permet le recrutement du facteur B, sous l'action de la protéase plasmatique le facteur D va cliver le facteur B lié à C3b en facteur Ba et Bb. Le complexe nouvellement formé à la surface du pathogène C3bBb est aussi appelé C3 convertase, une enzyme qui va cliver toutes les protéines du complément C3 avoisinant pour qu'il y ait plus de C3b fixés sur le pathogène. C'est une réaction enzymatique en cascade qui, une fois initiée va s'amplifier pour entièrement recouvrir le pathogène de C3b. Cette protéine du complément est reconnue par les récepteurs au complément exprimés par les cellules phagocytaires [138, 139].

La voie des lectines repose sur la reconnaissance du complément de CLR's solubles fixés sur les pathogènes [140]. Les lectines de type-C lient le mannose (Mannose-binding lectin, MBL), par leur groupement de reconnaissance des carbohydrates, reconnaissent les arrangements mannoses et fructoses propres aux microorganismes. Une fois fixer, les MBL vont se regrouper en complexe pour recruter deux types de protéases associés aux sérines de MBL (*MBL-associated serine protease*, MASP-1 et MASP-2). Ces protéases vont cliver les molécules du complément C4 et C2 pour de former les complexes C4b2a à la surface des pathogènes [141, 142]. Ce complexe est également une C3 convertase qui va permettre l'accumulation des protéines C3b à la surface du pathogène. La protéine C3a a également son utilité, en se fixant sur son récepteur exprimé par les cellules endothéliales, elle va permettre d'augmenter la perméabilité des capillaires sanguins. L'augmentation de la perméabilité des capillaire et son action sur les cellules immunitaires circulantes dans le flux sanguin entraîne une migration des cellules phagocytaires au niveau du site de l'infection [143].

b. Les phagocytes

La majorité des cellules phagocytaires sont les macrophages résidant dans les tissus infectés. Les neutrophiles doivent quant à eux être recrutés au niveau du site d'infection pour remplir ce rôle de cellules phagocytaires. Le complément va participer à ce recrutement, mais des cellules produisant des facteurs solubles chimioattractants vont amplifier ce phénomène [132, 143].

Les macrophages et les neutrophiles vont fixer les pathogènes à leur membrane pour les englober. Il s'agit d'un processus d'endocytose particulier, la phagocytose [144]. Le phagosome, vésicule de la phagocytose, est formé par remodelage des filaments d'actine sous l'action des protéases et kinases de la voie des Rac GTPase, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂), phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) et CDC42 [132, 145]. Les prolongements de la membrane, les pseudopodes, vont s'étendre pour que la membrane entoure le matériel à endocyter et former le phagosome. Dans la cellule, le phagosome naissant fusionne avec des endosomes précoces, puis tardif et acquiert ainsi des pompes à proton servant à faire diminuer le pH à l'intérieur du phagosome [146, 147]. Cette diminution de pH est nécessaire pour l'action d'enzymes lytiques, comme l'élastase qui va créer des pores dans les bactéries Gram négatifs, lors de la dernière fusion du phagosome, maintenant tardif, avec un lysosome pour donner un phagolysosome [148, 149].

c. Mastocytes et basophiles

Les mastocytes et les basophiles participent à la création et l'amplification de l'état inflammatoire, tous deux possèdent des granules contenant de l'histamine [150]. Il existe 4 types de récepteurs à l'histamine (notés H₁R jusqu'à H₄R) exprimés différemment par la plupart des types cellulaires, ce sont tous des récepteurs couplés à une protéine G_{s/q11} (Introduction, Partie 3-4-6) [151]. Pour les cellules endothéliales, c'est un signal induisant une vasodilatation, pour les autres cellules immunitaires, c'est un signal de maturation et de production de cytokines pro-inflammatoire. Les mastocytes libèrent le contenu de leurs granules en cas d'activation par C3a ou de reconnaissance de la partie constante d'immunoglobulines Ig de type E (IgE) fixées à un pathogène [152].

2-3-3. La détection des antigènes

Contrairement aux cellules de l'immunité innée, les cellules du système immunitaire adaptatif dites « naïves » résident dans les ganglions lymphatiques et sont rarement en contact direct avec les pathogènes. De plus, les lymphocytes T (contrairement aux lymphocytes B), n'expriment pas les PRRs suffisant pour reconnaître directement les pathogènes et initier un signal de danger. Leur rôle principal est la reconnaissance spécifique de petites portions des molécules exprimées par les pathogènes : les antigènes.

Ces antigènes sont notamment reconnus par les immunoglobulines sécrétées (anticorps) par les lymphocytes B (LB). Les anticorps se présentent sous la forme de molécules en Y, composés de deux chaînes lourdes (heavy, H), reliées entre elles par deux ponts disulfures (liaison covalente de deux atomes de soufres contenus dans les cystéines) et deux chaînes légères (light, L), une par chaîne lourde, reliées à ces dernières par une seule liaison disulfure. La partie N-terminale constitue les deux extrémités des chaînes lourdes et légères et se nomme la région variable pendant que le reste de la partie C-terminale se nomme la région constante. C'est à l'extrémité que la région variable que se trouve la liaison de l'Ig avec l'antigène dont la force d'interaction se nomme affinité. Une Ig possède deux zones de liaison pour le même antigène [153, 154]. Il existe deux types différents de chaînes légères κ et λ pouvant s'assembler avec les cinq types différents de chaînes lourdes μ , δ , γ , α et ϵ , qui donnent en correspondance, les cinq types d'Ig existant : IgM, IgD, IgG, IgA, IgE.

Des récepteurs de reconnaissances antigéniques sont également présents à la surface des LB et LT [155]. Le TCR (T-cell receptor), exprimé par les LT, se constitue de deux chaînes, α et β , reliées entre elles par un pont disulfure avant leur partie transmembranaire. L'extrémité de ces deux chaînes représente la partie variable du récepteur, dont la fonction est la même que celle des immunoglobulines. Le TCR n'est activé que par des peptides « présentés » par une autre cellule : ces peptides antigéniques, issus de la dégradation de protéines endogènes ou exogènes, sont liés, de façon non covalente, aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I ou II. Le CMH-I est présent sur toutes les cellules nucléées et engage le TCR des LT CD8+.

Le CMH-II est l'apanage de cellules spécialisées dites Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA : LB, DCs, macrophages) et est reconnu par le TCR des LT CD4+. Le CMH-II peut également être induit par des cytokines proinflammatoires comme l'IFN- γ dans certaines cellules qui n'en possèdent à l'origine, comme les kératinocytes [156, 157]. Le BCR (*B-cell*

receptor) est constitué de l'anticorps sécrété par les LB, avec des chaînes lourdes équipées d'un domaine transmembranaire. Ces derniers peuvent reconnaître directement un pathogène, mais il est également possible qu'une autre cellule présente un peptide à leur BCR dans le contexte d'une molécule du CMH [158].

Les CMH de classe I sont codés par 3 gènes chez l'homme, HLA-A (*human leukocyte antigen-A*), HLA-B et HLA-C (Figure 9). En temps normal, le CMH-I est constamment « chargé », c'est-à-dire lié à un peptide du « soi » issu de la dégradation de protéines endogènes de la cellule. En cas d'infection, ces peptides endogènes incluent également des fragments des protéines virales se trouvant dans le cytoplasme de la cellule. Un complexe protéique, le protéasome, est à l'origine de la formation de ces peptides [159]. C'est un complexe tubulaire de 2000 kDa, composé d'une unité S20, l'unité protéase, entourée de deux unités S11, reconnaissant les protéines exogènes ou S19 servant à éliminer les protéines cellulaires ayant subi une polyubiquitination. L'ensemble de ce complexe est noté protéasome S26 et dégrade les protéines en peptides de 6 à 9 acides aminés qui, pour être chargés sur le CMH-I, sont pris en charge par des protéines exprimées à la surface cytosolique du réticulum endoplasmique [157]. Une de ces protéines, la tapasine, va stabiliser et diriger les peptides vers le transporteur associé à la présentation de l'antigène (*transporter associated with antigen presentation*, TAP), qui permet l'entrée dans la lumière du réticulum endoplasmique et l'assemblage des peptides avec le CMH-I [160-162]. Des peptides issus de protéines exogènes peuvent également être chargés sur le CMH-I, c'est ce qu'on appelle présentation croisée (*cross-presentation*) [163]. Ainsi, des composants bactériens endocytés ou provenant de portions de cellules infectées phagocytées peuvent être transférés par les TAP dans le cytoplasme, suite à la fusion de l'endosome précoce ou du phagosome précoce avec un endosome recyclé contenant des TAP. Ces composants bactériens vont être dégradés par le protéasome comme les protéines endogènes, puis les peptides ainsi générés sont transportés dans le réticulum endoplasmique pour charger le CMH-I (Figure 9) [164, 165].

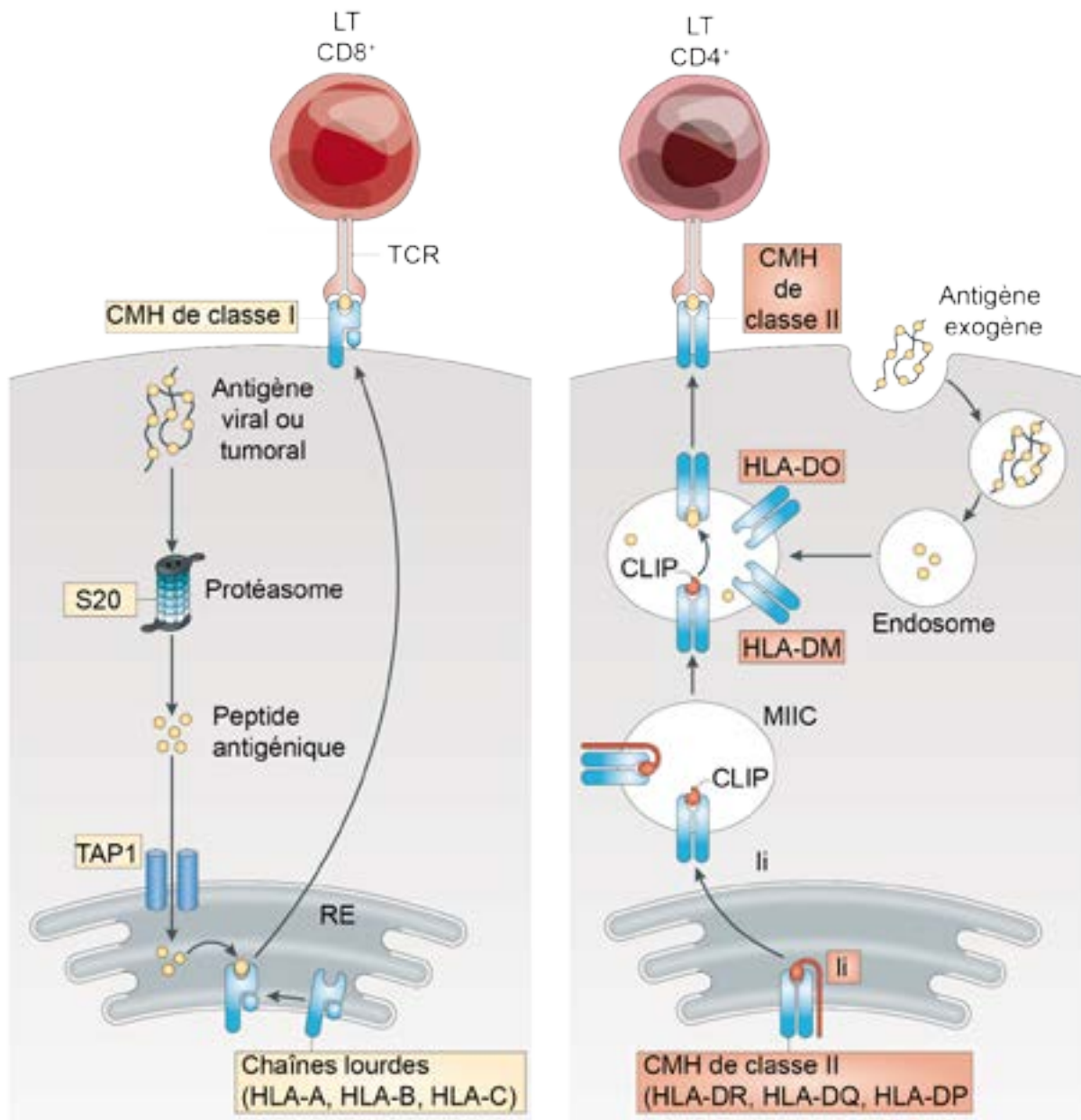


Figure 9 : Structure des Complexe Majeur d’Histocompatibilité de classe I et II et présentation de l’antigène.

La présentation d’antigène à partir du CHM de classe I est destinée à activer les Lymphocytes T (LT) CD8⁺, tandis que les antigènes chargés sur le CMH de classe II sont destinés à activer les LT CD4⁺. Image modifiée à partir de Kobayashi et al. (2012) *Nat Rev Immunol* [166].

Le CMH de classe II est encodé par 3 gènes chez l'homme, HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP (Figure 9). Les chaînes α et β sont assemblées dans le réticulum endoplasmique et associées avec une chaîne invariante (*invariant chain*, Ii). La vésicule réticulaire contenant le complexe Ii-CMH-II va fusionner avec d'autres endosomes contenant des protéases pour former le compartiment du CMH-II (*MHC class II compartment*, MIIC) [157, 167]. La chaîne invariante Ii sera digérée en laissant un peptide résiduel associé au site de liaison du CMH-II (*class II-associated Ii peptide*, CLIP). Dans les CPA, les phagosomes et les endosomes contenant des peptides antigéniques vont fusionner avec les MIIC. Le CLIP est détaché du CMH-II grâce à la chaperonne HLA-DM pour permettre la liaison du CMH-II avec ces peptides (Figure 9).

Les signaux de danger (activation des PRRs, libération de cytokines pro-inflammatoires) entraînent des changements phénotypiques et fonctionnels dans les CPA. En particulier, les DCs présentes dans les tissus périphériques passent par un processus dit « maturation ». Les DCs matures migrent via la lymphe pour aller présenter les peptides chargés sur les molécules du CMH aux LT présents dans les ganglions lymphatiques [168]. Il existe deux types de LT, se distinguant par l'expression de leur corécepteurs associés au TCR, les LT exprimant le CD8 ou T cytotoxiques (T_C) et les LT exprimant le CD4 ou T helpers (T_H). Les T_C sont activés par les antigènes présentés dans le contexte du CMH-I et vont avoir pour principal rôle d'identifier et de lyser, par la sécrétion de perforine, les cellules infectées par des virus ou les cellules tumorales [169]. Par la suite, nous nous concentrerons plus particulièrement sur le rôle des T_H.

2-3-4. L'activation et l'orientation des lymphocytes T helper

Les T_H naïfs, c'est-à-dire n'ayant jamais été exposés à l'antigène reconnu spécifiquement par leur TCR, sont soumis à 3 types de stimulation. De façon simplifiée, on peut distinguer 3 signaux : Signal I pour l'activation, Signal II pour la survie et Signal III pour la différenciation [170].

Le signal I est l'engagement durable du TCR par le complexe peptide/CMH-II, garantissant la spécificité antigénique. Le signal II est apporté par les molécules de la superfamille des B7 et de la superfamille des TNFR (*tumor necrosis factor receptor superfamily*, TNFRSF) : ces ligands dits de costimulation sont exprimés par les DCs, garantissant l'expansion clonale du T_H spécifique de l'antigène. Le signal III comprend les

cytokines et autres ligands de récepteurs exprimés par les LT, dont l'expression par les DCs est déterminée par le type de signal de danger et leur environnement : ces facteurs jouent un rôle déterminant dans la polarisation des TH. En effet, au terme de leurs différenciations, les LT CD4⁺ présentent un phénotype particulier qui, lorsqu'il est bien adapté au danger rencontré, va assurer l'efficacité de la réponse immunitaire adaptative [132, 169]. Nous nous limiterons ici aux principales polarisations décrites : TH1, TH2 et TH17 (Figure 10).

Le TCR se présente sous la forme d'un complexe entouré de deux CD3, molécule caractéristique des LT, qui joue le rôle de transducteur du signal du TCR, c'est-à-dire qu'il va transmettre l'information du TCR activé en signaux intracellulaires. Le signal I se termine quand le TCR se lie à son peptide spécifique présenté par le CMH-II pendant que son corécepteur, le CD4 se fixe sur la chaîne α du CMH-II, son fragment constant. Cette double reconnaissance est indispensable pour l'activation de la signalisation intracellulaire [171]. L'activation de CD4 entraîne l'activation de la Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), une kinase qui va phosphoryler les domaines d'activation intracellulaire du complexe CD3-TCR, les domaines ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). Cette phosphorylation des ITAM et la fixation de l'antigène sur le TCR entraîne l'activation de la tyrosine kinase associée aux ITAMs, la ZAP-70 (*ζ -chain-associated protein*) qui va permettre l'activation de la phospholipase C- γ (PLC- γ). Cette dernière kinase, par l'intermédiaire de cascades de réaction d'autres kinases comme les MAPK, permet l'activation de facteurs de transcription comme NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) et AP-1 (*Activator protein 1*) [155, 172].

Le signal II est une action synergique résultant de l'engagement de plusieurs récepteurs exprimés par le TH par leurs ligands exprimés à la membrane de la CPA [173]. La superfamille des récepteurs activateurs B7 regroupe des molécules de co-stimulation indispensables à l'activation du TH naïf. CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) sont exprimés par les DCs matures et se lient au récepteur CD28 des TH. L'engagement de CD28 permet le recrutement de kinases comme la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) et la protéine kinase B (PKB), toutes deux intervenant dans l'activation des facteurs de transcription comme NF- κ B. L'activation de ces signaux permet la prolifération des TH et augmente leur survie, par l'expression de la protéine Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*), un agent anti-apoptotique par inhibition de la voie des caspase-9. CD28 joue également un rôle dans la polarisation des TH, en synergie avec le signal III qu'ils perçoivent [174]. Une synergie avec l'IL-12 libérée par la DC oriente la différenciation de la cellule en lymphocyte T helper de type 1 (TH1). Au contraire, sous

influence de TGF- β (*transforming growth factor- β*), l'activation de CD28 entraîne une polarisation en lymphocyte T helper de type 17 (T_H17) [175].

Les facteurs issus des DCs permettant une polarisation des lymphocytes T helper de type 2 (T_H2) sont encore mal connus. Sous influence d'IL-2 et d'une activation particulièrement forte du CD28, le T_H produit de l'IL-4 et de l'IL-5, caractéristique d'une orientation vers le profil T_H2 et entraîne une inhibition de la maturation vers T_H17. OX40 (CD134), exprimé par les T_H et son ligand OX40L (CD252), exprimés par les DCs, sont des membres de la superfamille des TNFR/TNF [176]. L'activation de OX-40 entraîne également le recrutement et l'activation de kinases comme PI3K et PKB. L'activation d'OX40 va entraîner la production d'IL-4 et inhiber la production d'IFN- γ par les T_H0 [177].

Enfin, un fort engagement de CD28 peut aussi entraîner une différenciation des cellules en lymphocytes T régulatrices (T_{Reg}), des cellules intervenant dans la tolérance immunitaire, c'est-à-dire des cellules ayant un rôle anti-inflammatoire et immunomodulateur [178]. Les T_{Reg} sont à la fois utiles pour atténuer la réponse immunitaire quand l'organisme s'est débarrassé du pathogène, mais également pour limiter l'apparition de LT autoréactifs, qui reconnaissent des antigènes appartenant à l'organisme, comme c'est le cas pour les maladies auto-immunes. Cette différenciation T_{Reg} se caractérise par l'expression du gène FoxP3 (*forkhead box P3*) et du récepteur CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, ou CD152). CTLA4 étant aussi un récepteur pour les ligands CD80/CD86, les DCs matures vont donc participer à l'amplification de la réponse tolérogénique quand cette dernière est initiée par les T_H. Il existe deux catégories de T_{Reg} : ceux différenciés à partir d'un T_H « naïf » sont appelés T_{Reg} inductibles ou iTreg, par opposition aux T_{Reg} naturels (nTreg) dérivés à partir du thymus et spécifiques des antigènes du « soi » qui sont alors présentés à ce stade précoce de la différenciation des LT [177].

Le couple de co-stimulateurs ICOS (*inducible T cell co-stimulator*), exprimé par les T_H, et ICOSL (ICOS-ligand), exprimé par les DCs appartient à la même famille que CD28 et provoque une cascade intracellulaire similaire [173]. L'activation d'ICOS, en fonction du signal III associé, oriente la réponse vers T_H1 ou T_H2, comme CD28. Cependant, cette orientation est particulière, puisque ICOS va non seulement permettre la production d'IFN γ , pour les T_H1, ou d'IL-4, pour les T_H2, mais va en même temps entraîner l'expression du récepteur à chimiokine de type CXC 5 (*CXC-motif Receptor 5*, CXCR5) et la production d'IL-21. CXCR5 et IL-21 sont des marqueurs de la différenciation des lymphocytes T_H en lymphocytes T folliculaires helper (T_{FH}), une différenciation des LT particulière, pouvant appartenir aux population T_H1,

T_H2 ou T_H17, capable de soutenir l'activation des lymphocytes B (LB) et la production d'anticorps dirigés contre l'antigène spécifique du T_H. De plus, la stimulation des deux récepteurs CD28 et ICOS entraîne une différenciation des cellules vers T_H17 par activation du facteur de différenciation ROR- γ t (*retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t*), spécifique de la réponse T_H17 [179].

Le signal II peut être également source d'un rétrocontrôle des T_H sur les CPA. L'activation du CD40 des DCs matures par le CD40L des T_H entraîne pour la DC une potentialisation de la réponse NF- κ B, déjà engagée par la maturation et une augmentation de la survie. Ceci résulte en un accroissement de la production d'IL-12, qui aboutit à une réponse de type T_H1, tout en diminuant la réponse des cytokines qui oriente la réponse T_H2. L'engagement du CD40 exprimé par les LB permet aussi d'augmenter leur survie, leur différenciation et leur prolifération, en synergie avec l'IL-21 produit par les T_{FH}.

Le signal III implique des facteurs solubles importants dans la polarisation des T_H. Comme discuté ci-dessus, la libération des facteurs solubles et leurs effets sont dépendants en partie des autres signaux. Si les T_H se polarisent, c'est pour orienter la réponse immunitaire de façon à combattre de façon optimale un type de pathogène. Les différents types d'infection entraînent une prévalence d'un type de LT grâce à l'orientation de la maturation des DCs présentant l'antigène.

Les infections bactériennes et virales vont entraîner une orientation de la polarisation vers un phénotype T_H1 (productrice d'IFN- γ), grâce à la production d'IL12, d'IL18 et d'IL6 par les DCs (Figure 10). Les parasites et les toxines vont avoir une orientation T_H2 et T_{FH} (productrice d'IL-4, donc de type 2), grâce à la production d'IL-33 par les DCs et grâce à une stimulation d'IL-4 et d'IL-25. Une infection par des moisissures oriente la polarisation vers un phénotype T_H17, grâce à la production d'IL-1, d'IL-23, de TNF β et d'IL6 par les DCs. Les T_H17 sécrètent de l'IL-21 et permettent le recrutement de neutrophiles dans les zones inflammatoires (Figure 10).

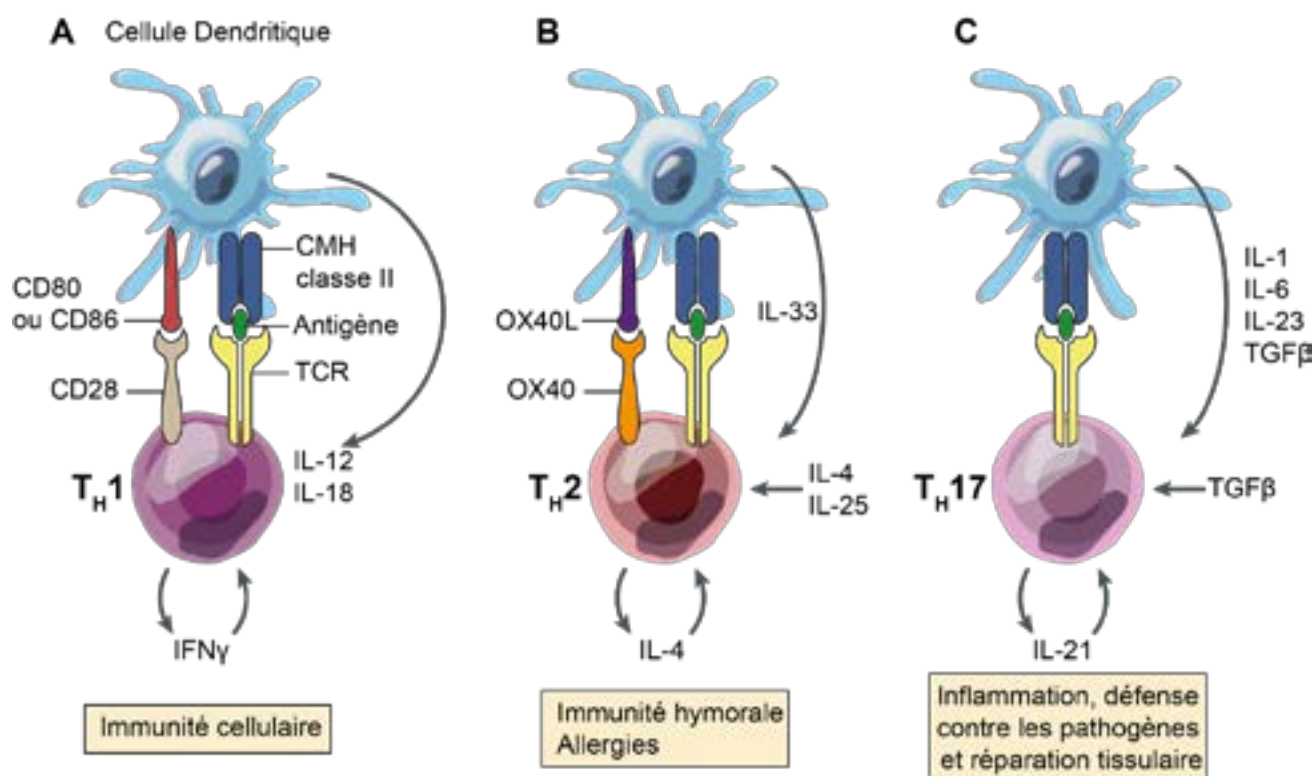


Figure 10 : Orientation helpers (TH) en fonction du signal II et III et leurs réponses immunitaires associées [180].

A. L'orientation TH1, par l'activation de CD28 par CD80/86 et la stimulation par l'IL-12 et l'IL-18 entraîne une production d'IFN γ et une réponse cellulaire, c'est-à-dire l'activation des T_C (CD8⁺) et des macrophages. **B.** L'orientation TH2, par l'activation de CD40 par CD40L et la stimulation par l'IL-33, l'IL-4 et l'IL-25 entraîne une production d'IL-4 et une réponse humorale, c'est-à-dire l'activation des LB, mastocytes et des éosinophiles. **C.** L'orientation TH17, par la stimulation par l'IL-1, l'IL-6, l'IL-23 et le TGF β entraîne une production d'IL-21 et une activation générale de cellules intervenant dans l'inflammation, comme les DCs, les macrophages mais aussi les neutrophiles. Image issue d'une réalisation originale, inspirée de la banque d'images libres de droits Servier Medical Art.

Même s'il y a une orientation préférentielle vers un type de TH, c'est-à-dire qu'il y ait une majorité de TH1 ou de TH2, il y aura toujours différenciation de l'autre population de TH, pour éviter l'apparition de pathologies associées au système immunitaire. Une réponse TH1-TH17 trop dominante peut entraîner l'apparition de maladies auto-immunes pendant qu'une réponse TH2 trop dominante peut entraîner l'apparition d'allergies. Le rôle des T_{Reg} (induites ou naturelles) est de réguler la réponse immunitaire et de contrôler l'inflammation, mais ils peuvent aussi avoir des conséquences délétères dans le cas de la lutte contre les tumeurs.

2-4. Les cellules dendritiques cutanées

2-4-1. Les différentes populations de dendritiques cutanées

Les cellules dendritiques (*Dendritic Cells*, DCs) sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) spécialisées et présentes dans tous les tissus, dont la peau. Elles sont capables de reconnaître un pathogène via leurs PRR, ce qui entraînent leur maturation fonctionnelle. Lors de la transition de l'état immature à l'état mature (présentation d'un antigène du pathogène via leur CMH-II, expression de récepteurs de costimulation et de cytokines), elles migrent hors de leur tissu de résidence via les vaisseaux lymphatiques et rejoignent les ganglions lymphatiques où elles activent les lymphocytes T naïfs. C'est cette maturation et la migration entre périphérie et organes lymphoïdes secondaires qui distinguent les DCs des autres CPA professionnelles (macrophages, LB), ainsi que leur capacité à activer les LT dits « naïfs », c'est-à-dire n'ayant jamais rencontrés l'antigène dont ils sont spécifiques (Introduction, Partie 2-3-4).

Il existe plusieurs populations de DCs et leurs études commencent avec la découverte des cellules dendritiques de l'épiderme par Paul Langerhans en 1868 [181]. Au moment de leur découverte, ces cellules étaient associées à la perception sensorielle cutanée par leur ressemblance avec les dendrites des neurones, sous la coloration au chlorure d'or (III). C'est grâce à leur isolation à partir de l'épiderme et la mise en évidence de l'expression du récepteur au fragment constant (Fc récepteur) et du récepteur au complément C3 (C3 récepteur), que les cellules de Langerhans, ont vu leurs fonctions associées au système immunitaire [182, 183].

Il existe deux grandes familles de DCs, les DCs conventionnelles (*conventional DCs*, cDCs) et les DCs dérivés de monocytes (*monocyte-derived DCs*, MonoDCs). Les cDCs ont pour origine le même précurseur hématopoïétique de la lignée myéloïde, le précurseur des monocytes, macrophages et DCs (*monocyte-macrophage/DC progenitors*, MDPs), une cellule multipotente qui peut s'autorenouveler ou se différencier en précurseur des cDCs (*common DC precursors*, CDPs), qui se retrouveront dans la circulation sanguine [184, 185]. Les CDPs sont des cellules souches unipotentes qui vont rester dans la moelle, qui peuvent se renouveler et se différencier en précurseur de cDCs (pré-cDCs). Ces pré-cDCs vont se retrouver dans la circulation sanguine et n'acquièrent leurs phénotypes finaux qu'après avoir rejoint leurs tissus de résidence (peau, intestins entre autres) (Figure 11).

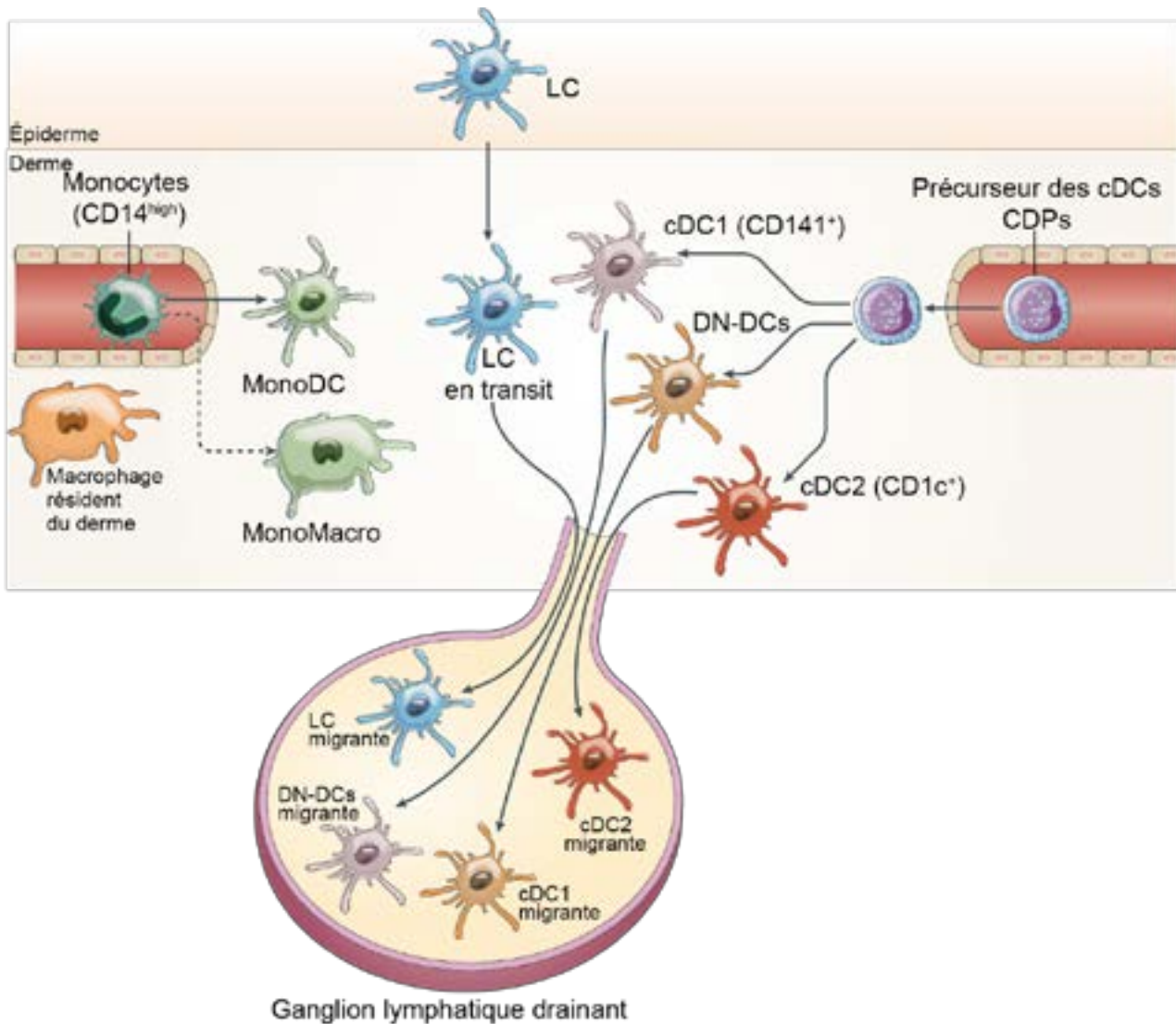


Figure 11 : Origine des cDCs dermiques dans la peau normale humaine.

Les différentes populations de cellules dendritiques conventionnelles (cDC), cDC1 CD141⁺, cDC2 CD1c⁺ et les DCs doubles négatives (DN-DCs) proviennent du même précurseur hématopoïétique pré-cDCs (*common DC precursors*, CDPs). Avec les cellules de Langerhans (LCs) qui résident dans l'épiderme et proviennent de progéniteurs dérivés de la vésicule vitelline, les cDC sont dotés de la capacité de migrer vers les ganglions lymphatiques drainant. Pour pallier à l'absence des cDCs, les monocytes CD14^{high} présents dans le sang vont migrer dans la peau et se différencier en DCs (MonoDCs, DCs dérivés de monocytes), une population de DCs à durée de vie plus courte, présente le temps que de nouvelles cDCs se différencient à partir des CDPs. Les monocytes peuvent également se différencier en macrophages (MonoMacro). Ces derniers ne doivent pas être confondus avec les macrophages résidents de la peau, provenant de la différenciation du même précurseur que les CDPs. Image modifiée d'après Malissen et al. (2014) *Nat Rev Immunol* [186].

Les cellules de Langerhans (LCs) sont les seules DCs de l'épiderme. Elles proviennent directement de cellules souches hématopoïétiques embryonnaires de la vésicule vitelline dans un premier temps (de 2 à 6 semaines de développement), puis des monocytes du foie fœtal (de 4 à 22 semaines), qui ont colonisés l'épiderme au moment de son développement embryonnaire [187-189].

Dans la peau non inflammée, on trouve principalement des cDCs, ainsi qu'une faible proportion de MonoDCs (Figure 11). Initialement divisées en deux populations par l'expression de CD1a (molécule analogue au MHC-I, utilisée pour la présentation d'antigènes lipidiques) ou de CD14 (corécepteur de TLR4) [190, 191], la nomenclature des cDCs du derme a été récemment revue suite à des études comparatives, chez l'homme et la souris, de leurs profils d'expression génique (*single-cell RNA sequencing* et *mass cytometry*), conduisant à la distinction des populations cDC1 (XCR1⁺ CD103⁺ Langerin⁺ DCs chez la souris, CD141⁺ DCs chez l'homme) et cDC2 (CD11b⁺ DCs chez la souris, CD1c⁺ DCs chez l'homme). Les « DCs » du derme humain exprimant CD14 ne sont maintenant plus considérées comme telles, car elles semblent ontologiquement proches des macrophages résidents et leur capacité à migrer vers les ganglions lymphatiques a été mise en doute [192].

	LCs	CD141 ⁺ DCs	CD1c ⁺ DCs	CD14 ⁺ DCs	ND-DCs
Equivalent chez la souris	LCs	cDC1	cDC2	MonoDCs	?
Localisation	Epiderme	Derme/sang/lymphe		Derme	
HLA-DR	+	+	+	+	+
CD209 DC-SIGN	+	+	+	+	+
CD141	-	high	-/+	-/+	-
CD1c	+	-	+	-	-
CD14	-	-	-	+	-
CD1a	high	-	+	-	+
CD11c	low	low	+	+	+
CD207 Langerin	+	-	-	-	-

Tableau 1 : Caractérisation phénotypique des sous-populations des DCs cutanés chez l'homme.

Toutes les DCs ont pour caractéristiques d'exprimer le CHM de classe II (HLA-DR) et CD209. Tableau inspiré de Kashem et al. (2017) *Annu Rev Immunol* [193].

Cette nomenclature a toutefois des limites, certaines populations rares identifiées chez la souris, comme les DCs doubles négatives (DN-DCs, n'exprimant ni XCR1 ni CD11b chez la souris) ne trouvant pas d'équivalent clair chez l'homme [193]. Chez l'homme, il y a également une population de DCs non définie (ND-DCs) qui ne trouve pas d'équivalent chez la souris et qui se caractérise par l'absence d'expression de CD141 et CD1c (Tableau 1) [184]. Il se pourrait que la diversité des sous-populations de cDCs humaines soit plus vaste que chez la souris. En séquençant l'ARN de DCs dermiques (*single-cell RNA sequencing*), Villani et al. ont mis en évidence 6 populations distinctes de DCs [194], montrant ainsi que les connaissances sur les DCs dermiques humaines ne sont pas figées [195].

Les différents types de cDCs expriment des PRR différents et semblent posséder des capacités fonctionnelles différentes. Suivant l'ancienne nomenclature, les cellules CD14⁺ entraînaient une orientation T_H2 alors que les DCs CD1a⁺ semblaient plutôt impliquées dans l'orientation T_H1 [185].

Chez la souris, la littérature montre le plus souvent que les cDC1 sont responsables d'une orientation T_H1, alors que la contribution des cDC2 semble plus variable, induisant des réponses T_H2 [196] ou T_H17 [197, 198]. Chez l'homme les CD141⁺DCs (cDC1) et CD1c⁺DCs (cDC2) donnent toutes deux une orientation T_H1 et T_H17 [185, 193, 199]. Toutefois, de telles spécialisations fonctionnelles des sous-populations restent sujettes à caution car elles dépendent très probablement des conditions d'expérimentation *in vivo* ou, chez l'homme, des méthodes d'isolation des DCs et de coculture avec les LT. En effet, les DCs font preuve d'une grande plasticité, due à leur sensibilité aux signaux de leurs environnements. Outre les résultats discordants concernant l'orientation TH par les cDC2, le fait que les cDC1 sont fréquemment présentées comme possédant une capacité hors du commun à la présentation croisée aux LT CD8⁺ n'exclut pas que les LCs en soient également capables, sous certaines conditions [200-202].

2-4-2. Les cellules de Langerhans

Grâce à leur prolongements (dendrites) pouvant s'étendre jusqu'à la couche cornée, les cellules de Langerhans sont les premières en contact avec les bactéries et représentent entre 2 et 3% de la population cellulaire totale de l'épiderme. Elles ont donc un double rôle, tolérogénique pour les bactéries commensales et antibactérien pour les pathogènes. A l'âge adulte, les LCs n'ont pas de progéniteurs connus circulant dans le sang, contrairement aux cDCs. Pour renouveler leur population, les LCs sont les seules DCs différenciées à pouvoir se multiplier [189, 203]. Cette propriété a été observée chez l'homme après une allogreffe où 2 à 7 % des LCs expriment le marqueur Ki-67, un protéine nucléaire associée à la prolifération. Ce pourcentage peut varier en fonction des pathologies où il peut atteindre entre 13 et 17% de LC proliférantes dans le cas de la dermatite atopique. La prolifération est soutenue par les kératinocytes sécrétant le TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) et l'IL-34 pendant la cicatrisation cutanée ou après une inflammation, pour renouveler les LCs ayant migré hors de l'épiderme [187, 204].

Les LCs expriment un PRR particulier, le CD207 aussi connu sous le nom de Langerin, une lectine-C de type II (CLRs) et, chez l'homme, surexpriment également le CD1a (phénotype CD1a^{high}), ces deux marqueurs étant couramment utilisés dans la détection des LCs en expérimentation [205]. Posséder des PRRs et être constamment en contact avec des bactéries ne fait pas migrer pour autant toutes les LCs hors de l'épiderme. Cet équilibre homéostatique entre la non-inflammation (*steady state*) et l'inflammation dépend beaucoup des kératinocytes et leur libération de cytokines constituant un frein à la migration des LCs. Le TGF- β 1 (également en autocrine par les LC) et le BMP7 (*bone morphogenetic protein 7*) libérés par les kératinocytes permettent d'entretenir l'état non inflammatoire. Le passage à un phénotype migratoire se fait par la diminution de l'expression d'E-cadhérine, récepteur d'adhésion épithéliale, par l'action du TNF α et sous l'influence de CCL19 (*chemokine C-C motif ligand 19*) et CCL21 produits par les cellules endothéliales lymphatiques, qui guident les LCs matures exprimant leur récepteur CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*) [206-208].

Les capacités d'orientation TH par les LCs restent controversées. A la suite de leur migration *ex vivo* hors d'explants de peau, les LCs humaines semblaient uniquement induire des réponses de type TH2, faisant ainsi des LCs des cibles thérapeutiques pour le traitement d'allergies [209]. Cependant, les LCs sont capable, *in vitro* et *in vivo*, sous des conditions spécifiques de stimulations, d'induire des réponses TH1 [210, 211] ou TREG [209, 212]. Ces expériences montrent la difficulté d'assigner le ciblage des LCs à une stratégie thérapeutique donnée.

Enfin, comme pour les autres DCs, l'induction d'une migration des LCs n'est pas uniquement dépendante d'une rencontre avec un pathogène, mais également du contexte : les cytokines et chimiokines libérées dans la peau et les signaux de dangers (UV, molécules irritantes) régulent l'activation de différents facteurs de transcription. L'activation du facteur de transcription PU.1 va entraîner un signal de développement, d'immunotolérance et donc va permettre aux LCs de rester dans l'épiderme, pendant qu'une activation de NF- κ B et d'IRFs (3 et 7) vont entraîner la migration des LCs avec respectivement une réponse pro-TH1 et pro-TH2 [206, 207].

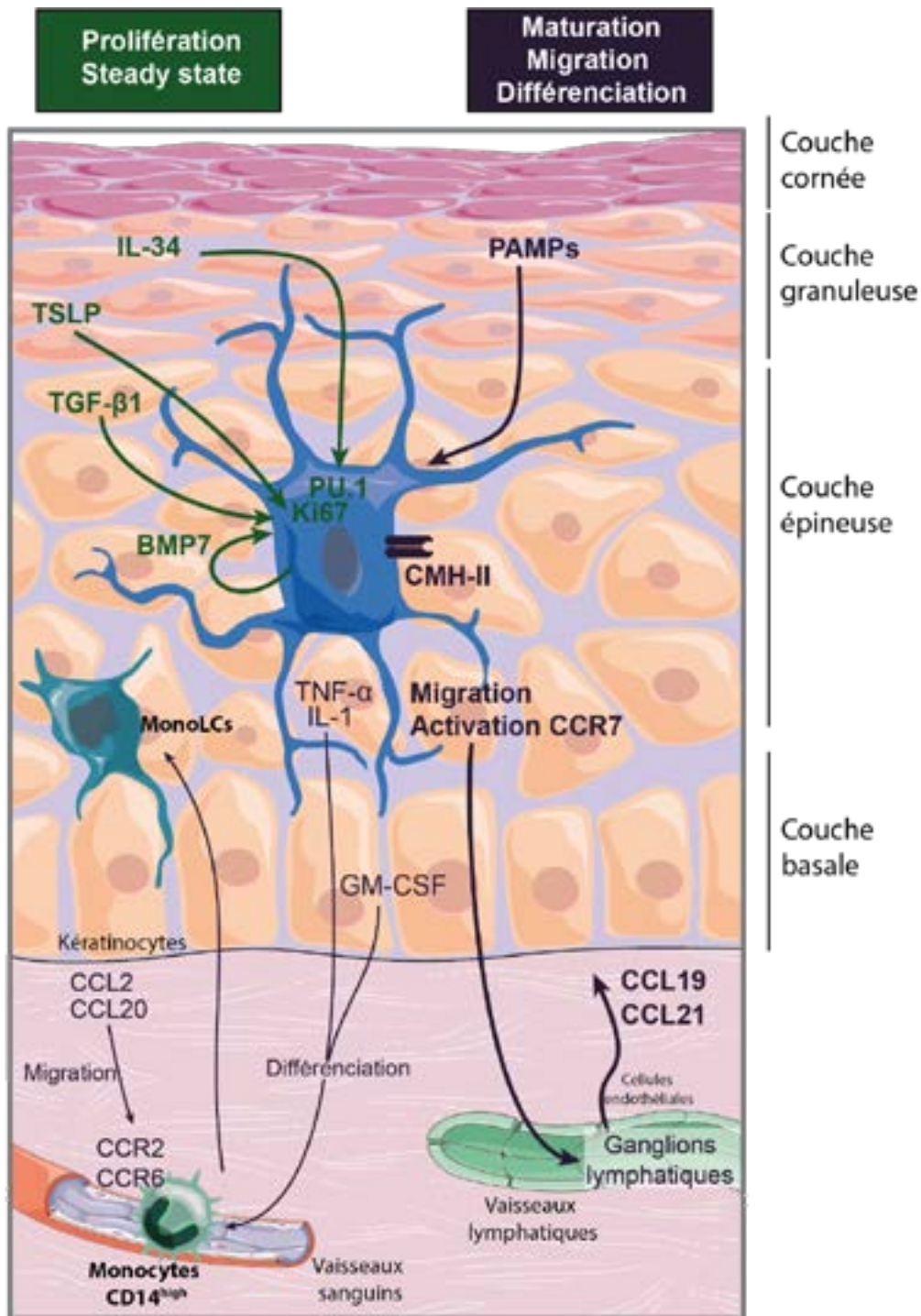


Figure 12 : Prolifération, maintien et maturation des cellules de Langerhans (LCs).

Les LCs sont les seules DCs de la peau capable de proliférer et maintiennent leur état indifférencié grâce à un ensemble de facteurs libérés par les kératinocytes. La maturation des LCs entraîne leur migration hors de la peau, dans les ganglions lymphatiques drainants et le recrutement de monocytes, dans l'épiderme. Les monocytes se différencient des MonoLCs, qui ne peuvent pas proliférer, pour compenser la migration des LC [212]. Image issue d'une réalisation originale, inspirée de la banque d'image libres de droit Servier Medical Art.

A la suite d'une inflammation intense (par exemple irradiation UVC), et donc d'une déplétion du réseau épidermique des LCs suite à leur migration, deux types de cellules sont détectées dans l'épiderme : les LCs résidentes, présentes dans l'épiderme depuis le développement embryonnaire et parfois qualifiées de *long-term* ou *long-lived* LCs, et les LCs dérivées de monocytes sanguins (MonoLCs), rejoignant le derme puis l'épiderme et se différenciant sur place (Figure 12). Cette population de Mono-LCs, n'est présente que pendant une courte période (d'où leur appellation de *short-term* ou *short-lived* LCs) [213]. Le but de ces MonoLCs serait d'aider à la prolifération des kératinocytes, à la cicatrisation de l'épiderme et au maintien de l'immuno-compétence épidermique le temps que les LCs résidentes se multiplient et recolonisent l'épiderme. Chez l'homme, ce sont les monocytes CD14^{high} qui vont migrer dans l'épiderme sous l'action chimiotactique des chimiokines CCL2 et CCL20, ligands respectifs de CCR2 et CCR6, produites par les kératinocytes de l'isthme et de l'infundibulum du follicule pileux [208, 214]. L'épiderme étant dans un contexte pro-inflammatoire, les cytokines comme le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*), liant le M-CSFR (*macrophage colony-stimulating factor receptor*) exprimé par les monocytes, l'IL-1 et le TNF- α vont permettre la différenciation des monocytes CD14^{high} en Mono-LC (Figure 12) [212, 215].

2-4-3. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes

Il existe 3 types différents de monocytes humains circulant dans le sang, différenciable par leur expression de CD14 (corécepteur de TLR4) et CD16 (ou Fc γ RIII, récepteur du fragment constant des IgG, type 3) :

- Les monocytes classiques, CD14^{high} et CD16⁻, représentant 85% des monocytes circulants,
- Les monocytes intermédiaires, CD14^{high} et CD16⁺, représentant 5% des monocytes circulants,
- Les monocytes « non-classiques », CD14⁺ et CD16^{high}, représentant 10% des monocytes circulants.

Les monocytes sortent de la moelle osseuse avec le phénotype « classique » et vont progressivement acquérir CD16 [186, 216, 217]. La migration des monocytes dans la peau se fait par chimiotactisme grâce à l'activation de leur CCR2 et à la production de ses ligands dans la peau en conditions inflammatoires [218]. Tous les types de monocytes peuvent être recrutés dans la peau et se différencier en DCs mais seuls les monocytes exprimant CD16 pourront se différencier en macrophages.

Les monocytes, sous l'action d'IFN- α et d'IL-12, vont activer le facteur de transcription IRF4 et commencer à exprimer faiblement le CMH-II (HLA-DR^{low}) et devenir des pré-MonoDCs. Les actions de GM-CSF, de TNF- α ou de TGF- β , activent les facteurs de transcriptions PU.1 et IRF8 des pré-MonoDCs pour finir leur maturation en MonoDCs exprimant le CMH-II et CD11c (intégrine α_x) [219, 220]. Il est possible d'induire une différenciation similaire *in vitro* avec des monocytes du sang humain, incubés avec de l'IL-4, qui va activer IRF4 et du GM-CSF, qui va activer IRF8 [221, 222].

Les MonoDCs sont des CPA efficaces, provoquant une orientation T_H semblable à celle induite par les cDC2. Ces deux populations ont souvent été confondues à cause de leur expression variable de CD141 et de leur expression de CD1c [223, 224]. Ces cellules, souvent désignées collectivement comme DCs inflammatoires (infDCs), persistent dans la peau de patients souffrant d'inflammation cutanée chronique (psoriasis, dermatite atopique) [225, 226]. Parmi elles, une sous-population dermique peut libérer du TNF- α et de l'oxyde nitrique par l'activation inductible de l'oxyde nitrique synthase (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS), les TNF- α /iNOS-*producing* DCs (TipDCs). On distingue également des IDECs (*inflammatory dendritic epidermal cells*) au niveau de l'épiderme. Les infDCs ne semblent pas être recrutées vers le ganglion, suggérant un rôle limité dans l'initiation des réponses T primaires. Cependant elles ont un rôle important de par leur capacité d'élimination des pathogènes et de recrutement et d'activation des LT mémoires résidents de la peau [186, 193, 218, 224].

3- L'innervation sensorielle cutanée

3-1. La perception

Le mot Perception provient du latin *percipio* (saisir, percevoir) qui, dans son sens philosophique aristotélicien se caractérisait par tout ce qui était perceptible par les 5 sens (la vue, l'ouïe, l'odorat, le goût et le toucher). En revanche, la Perception dans son sens physiologique, traduit toute caractéristique d'un changement d'état pouvant être détecté à la suite d'une stimulation [227]. Ainsi, la perception ne se limite plus aux sensations interprétées par un organisme pluricellulaire, mais au sens physiologique, englobe également la réaction d'une cellule isolée. Dans sa fonction la plus basique, la perception peut donc se limiter à l'action d'une molécule sur une autre molécule, entraînant un changement de comportement de la cellule [228].

Si le concept même de perception est déjà présent chez les procaryotes comme les eucaryotes, c'est que cette fonction est vitale pour tout organisme vivant, une bactérie doit posséder des fonctions sensorielles, comme la sensibilité aux variations de pH, au taux d'oxygène, ou aux enzymes sécrétées par d'autres bactéries, afin d'assurer sa survie. Ces procédés sont propres à toutes cellules isolées, même eucaryotes, mais la bactérie possède des sensibilités, dans le sens perception physique, comme la perception du champ magnétique terrestre [229], capacité retrouvée chez certains vertébrés, dont cette fonction est dédiée à un type cellulaire particulier [230].

Dans une bactérie, la perception d'une stimulation et le changement de comportement de la cellule en réponse ne nécessite que l'intervention de récepteurs ou d'organelles, puisque l'organisme entier se constitue d'une seule cellule. Pour les organismes pluricellulaires, c'est une cellule dédiée ou un organe à part entière qui prend en charge la perception sensorielle. Le neurone remplit cette fonction à la fois de cellule sensorielle mais également de cellule pouvant intégrer l'information pour modifier le comportement de l'organisme suite à la perception sensorielle.

3-2. Les neurones

Tout comme il y a des cellules spécialisées dans la perception, des cellules sont dédiées à la transmission de cette information et à sa centralisation. Ce réseau permet d'interpréter le signal et optimiser la réaction de l'organisme. Ces cellules ne sont autres que les neurones.

3-2-1. Une unité cellulaire fonctionnelle

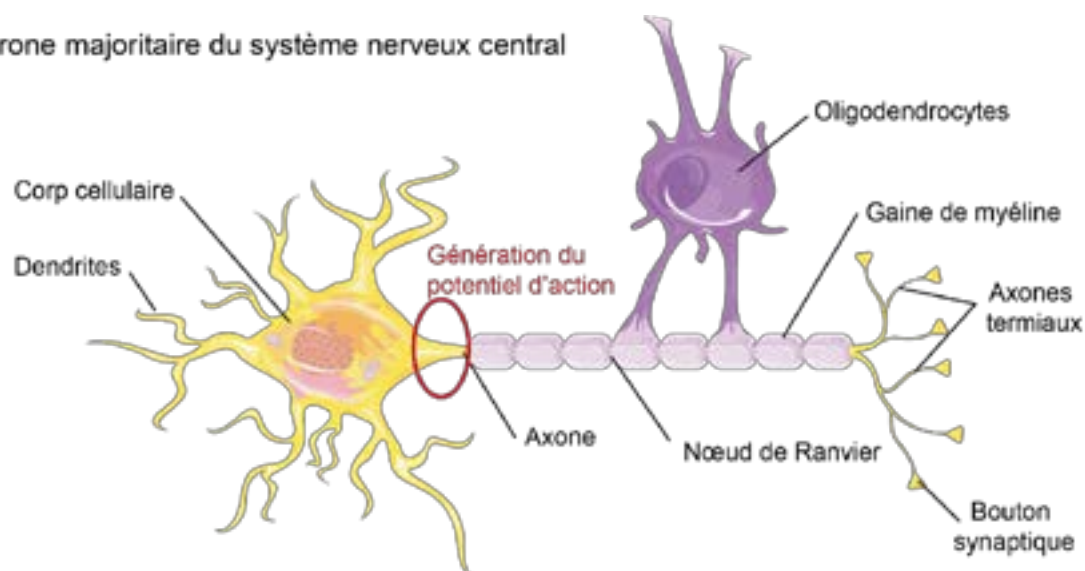
Elément à la fois senseur, reliant les organes sensoriels, vecteurs d'informations motrices et surtout constituant du centre organisateur de toutes ces informations, le cerveau, le neurone est le dénominateur commun de toutes ces constructions physiologiques.

Le neurone a été observé par Camillo Golgi en 1873, qui l'a également décrit comme compartimenté en 3 parties distinctes : le soma (corps cellulaire), les axones et les dendrites (ces derniers constituant une subdivision des neurites) [231]. En 1888, Santiago Ramon y Cajal, grâce à sa coloration combinant rouge carmin, bleu de méthyle et acide chromique, a mis en évidence *la contiguïté et non la continuité* des cellules nerveuses [232], faisant du neurone une cellule isolée et fonctionnelle. Cette découverte mit fin à la théorie réticulaire du cerveau au profit de la théorie cellulaire et Golgi et Cajal se voient attribuer le prix Nobel en 1906 pour leurs découvertes sur la structure du cerveau [233].

3-2-2. Organisation structurelle

Le neurone est une cellule spécialisée, excitable et polarisée servant à recevoir, intégrer et transmettre de l'information sous forme de fréquences de signaux électriques. La structure générale du neurone s'oriente autour de son corps cellulaire, aussi appelé *soma*, qui contient le noyau et l'appareil réticulaire, d'où bourgeonnent des dendrites, embranchements servant à recevoir les informations, et un axone, prolongement principal pour transmettre l'information intégrée par la cellule (Figure 15A) [231, 234].

A - Neurone majoritaire du système nerveux central



B - Neurone pseudo-unipolaire du système nerveux périphérique

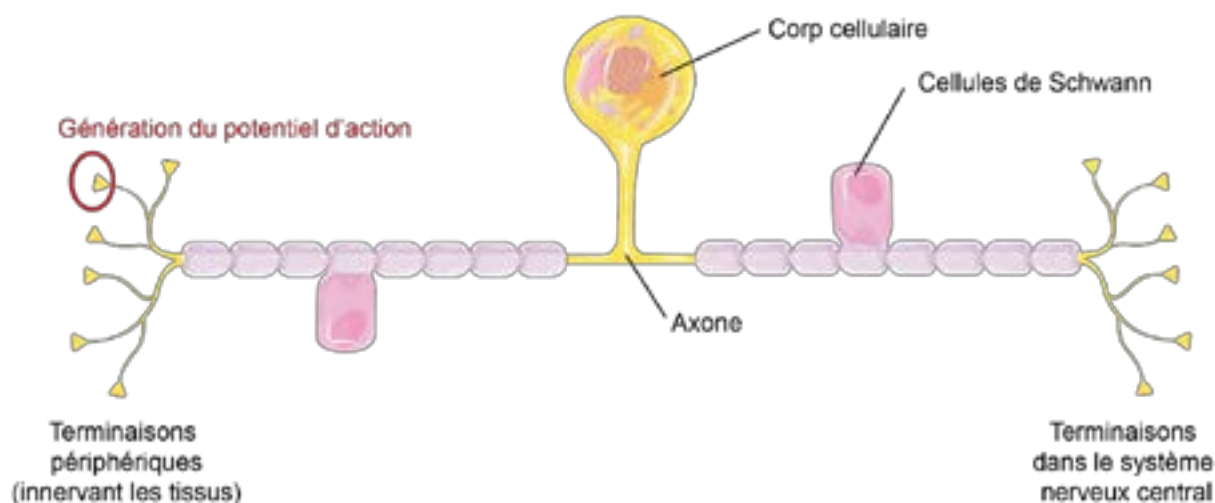


Figure 13 : Structure d'un neurone du système nerveux central (SNC) et d'un neurone du système nerveux périphérique.

Les neurones pseudo-unipolaires génèrent leurs potentiels d'action à partir de leurs terminaisons dans les tissus périphériques, contrairement aux autres neurones, générant leurs potentiels d'action à la base de leur corps cellulaire. Les neurones du SNP sont myélinisés par les cellules de Schwann pendant que les neurones du SNC sont myélinisés par les oligodendrocytes. Image issue d'une réalisation originale, inspirée de la banque d'images libres de droit Servier Médical Art.

Cette définition simpliste ne convient cependant pas à tous les types de neurones. Même si le neurone est déjà une cellule hyperspécialisée, de nombreux sous-types de neurones existent, en lien direct avec les fonctions qu'ils occupent. Plus de 200 types distincts de neurones et leur organisation structurale sont référencés, par exemple, dans la base de données NeuroMorpho.Org, regroupant des reconstructions 3D de neurones de plusieurs espèces à partir de la littérature scientifique [235]. Les neurones sensoriels présentent une morphologie différente (Figure 13B), ils sont pseudo-unipolaires, ne possèdent pas de dendrites mais un axone unique, ramifié à ses deux extrémités. Une de ces extrémités innerve les tissus et génère les potentiels d'actions, l'autre transmet l'information à la moelle épinière ou au cerveau.

Les neurones proviennent des cellules souches neuronales qui apparaissent au jour 28 du développement embryonnaire chez l'homme, avec la formation du tube neuronal. Les cellules souches neurales sont des cellules souches multipotentes, capables de s'autorenouveler et de se différencier en neurones immatures et en cellules gliales. Les neurones ne possèdent plus de capacité mitotique, de ce fait tous les neurones proviennent uniquement des cellules souches neurales [236, 237]. Chez l'adulte, la formation de nouveaux neurones, que l'on appelle la neurogénèse, est encore possible. Des zones dans le cerveau (zone subgranulaire, région du gyrus dentelé de l'hippocampe et zone subventriculaire du striatum) contiennent encore des niches de cellules souches neurales [238-240]. Ces zones ne servent pas uniquement à faire de nouveaux neurones : le cerveau humain étant composé d'approximativement 86 millions de neurones pour autant de cellules « non neuronales », les cellules gliales ont un grand rôle à jouer dans le fonctionnement des neurones [241]. Les cellules gliales dérivées des progéniteurs neuronaux sont les astrocytes, les cellules de Schwann et les oligodendrocytes. Les astrocytes sont, entre autres, des cellules de soutien, nourricières et régulatrices de l'activité des neurones. Les cellules de Schwann et les oligodendrocytes vont créer la gaine de myéline autour des axones des neurones (Introduction, Partie 3-4-2).

L'ensemble des neurones de l'organisme appartiennent au système nerveux. Tous les neurones se situant à l'intérieur de la gangue osseuse du crâne et de la moelle épinière appartiennent au système nerveux centrale (SNC) alors que tous les neurones se situant à l'extérieur appartiennent au système nerveux périphériques (SNP).

Le neurone se différencie des autres types cellulaires par l'expression de protéines, canaux et récepteurs qui lui permettent de générer des potentiels d'actions (Introduction, Partie 3-2-7), mais également par la composition de son cytosquelette, indispensable à sa compartimentation et à la formation et à la stabilité de l'axone.

3-2-3. Le cytosquelette

Le cytosquelette d'un neurone est constitué de microtubules, de microfilaments et de filaments intermédiaires spécifiques aux neurones, les neurofilaments. Le cytosquelette des neurones est plastique, c'est-à-dire qu'il va permettre à l'axone d'un neurone d'atteindre une cible donnée, de croître, de se réparer mais également de se réorganiser pour entretenir de nouvelles connections en fonction des informations qu'il reçoit [235, 242].

Les microtubules confèrent leur rigidité (support de la membrane) à toutes les cellules eucaryotes, indispensable pour la croissance et la division cellulaire [243]. Cette structure tubulaire a un diamètre compris entre 100 μ m et 25 μ m de diamètre. Les microtubules sont composés de 13 protofilaments, eux même composés des sous-unités α -tubuline et β -tubuline, organisées en dimères, ce qui donne une impression d'enroulement des sous-unités entre elles, formant une structure pseudo-hélicoïdale [244]. Dans cette pseudo-hélice, une extrémité des microtubules commence par une sous-unité α -tubuline, alors que l'autre extrémité finit par une sous-unité β -tubuline. Ces extrémités sont respectivement notées (-) et (+) et rendent les microtubules instables. Lorsque l'extrémité (-) n'est pas rattachée au centrosome, elle est soumise aux kinases pouvant la cliver et la dépolymériser, pendant que l'extrémité (+), par les actions de ces mêmes kinases, avec comme co-facteur le GTP, vont s'allonger, se polymériser [245]. Ce phénomène est connu sous le nom de « tapis roulant », observable *in vivo* et *in vitro* et est indispensable pour le transport de grosses organelles et pour la consolidation de l'espace cytoplasmique lors de la croissance axonale des neurones. Ce « tapis roulant » n'est le seul moyen de transport par les microtubules. Des protéines associées aux microtubules ou MAPs (microtubule-associated proteins), possédant une fonction de kinase à ATP, sont appelées protéines à moteur moléculaire. Elles se lient aux microtubules par ce moteur pendant qu'un groupement kinésine fixe le matériel à transporter. Ainsi, la Kinésine II permet de transporter des éléments du *soma* vers l'extrémité de l'axone (transport antérograde), pendant que la dynéine permet de transporter des éléments de l'extrémité de l'axone vers le *soma* du neurone (transport rétrograde) [242, 246]. A partir du moment où le transport fait intervenir les microtubules et leurs systèmes protéiques, les éléments transportés doivent être empaquetés par des membranes réticulaires, golgiennes ou dans des vésicules. Il s'agit du transport axonal dit rapide (entre 200-400 mm par jours), bidirectionnel, permettant d'amener des protéines, peptides, acides aminés, des mitochondries ou même un appareil réticulaire à l'extrémité de l'axone, pendant que les produits de dégradation ou les lysosomes vont revenir en direction du *soma* [246].

Les microfilaments, aussi connus sous le nom d'actine-F (filament) sont aussi des unités dynamiques, de 5nm de diamètre et de longueur constante, soit 50nm pour les neurones. L'actine F est constitué de deux chaînes de monomères d'actine-G (globulaire) avec une extrémité (-) dépolymérisante et une unité (+) polymérisante, toutes deux sous l'action de kinases à ATP et toutes deux se dépolymérisant et polymérisant à la même vitesse, créant ainsi le système de « tapis roulant » [247]. Intervenant normalement dans la mobilité ou la contraction des autres types cellulaires, chez le neurone ce système est le principal acteur de l'élongation des dendrites et surtout de l'axone [242].

L'axone est généré à partir d'un neurite dit dominant ou émergent. Une fois que l'axone a commencé à croître, les autres neurites vont devenir des dendrites.

- Stade I : **lamellipode**, cellule peu différenciée, avec une organisation en deux lames.
- Stade II : **bourgeonnement**, neurone qui émet des prolongements dynamiques
- Stade III : **période de croissance axonale**, apparition d'un début d'axone au détriment des autres prolongements, c'est la phase active de la croissance axonale
- Stade IV : **période de croissance dendritique**, mise en place l'arborisation dendritique
- Stade V : **Maturation neuronale**, acquisition des épines dendritiques à la surface des dendrites, stabilisation des synapses, myélinisation des axones (oligodendrocytes dans le SNC et cellules de Schwann dans le SNP)

Les filaments d'actine créent des filopodes, des digitations reliées à la membrane par des protéines transmembranaire de type caténine en intracellulaire et de type cadhérine en extracellulaire. L'espace entre les digitations va se remplir d'une arborisation d'actine, formant le lamellipode. Une fois ce dernier suffisamment large, les microtubules s'allongent pour le remplir. Cette formation se nomme le cône de croissance et représente l'unité fonctionnelle de la croissance axonale [234].

Une fois l'axone construit, des structures intermédiaires vont être synthétisées par le neurone pour consolider le cytosquelette et stabiliser les interactions entre les microtubules. Les filaments intermédiaires dans le système nerveux comportent 5 protéines spécifiques des neurones, allant de 50 kDa à 200 kDa ; la périphérine, spécifique du SNP ; l' α -intégrine, spécifique du SNC, et les 3 neurofilaments, distincts par leurs tailles et donc leurs masses moléculaires, les neurofilament-Light (NF-L, 68 kDa), Medium (NF-M, 160 kDa) et Heavy (NF-H, 200 kDa) [248-250]. D'autres filaments intermédiaires comme la nestine ou la vimentine sont exprimés par les neurones immatures pour permettre la migration de leur corps cellulaire et la formation des premiers lamellipodes [251].

Les filaments intermédiaires sont des polymères s'assemblant entre eux. Un NF-L commence avec une seule protéine qui se dimérise dans le même sens (N-terminal et C-terminal du même côté), puis deux dimères vont s'assembler en antisens par leurs hélices- α pour former un tétramère. L'alliance de tétramères forme une structure tubulaire, le filament définitif, consolidé par l'ajout des protéines des NF de plus grandes tailles. Les neurofilaments sont indispensables dans la consolidation de l'axone, l'attachement des microtubules et des filaments d'actines entre eux et avec la membrane.

Un cône de croissance axonale ne progresse pas de façon uniforme, mais de façon saccadée. Il est soumis à un phénomène de *stop-and-go* [252], phase d'expansion de la membrane, suivie par une phase de consolidation du cytosquelette. Ces deux phases ne peuvent s'exécuter en même temps et peuvent s'expliquer par la synthèse et le transport progressif des neurofilaments au niveau du *soma* vers les extrémités. Ce transport est lent (0,3 à 3 mm par jour), unidirectionnel (toujours du *soma* vers l'extrémité de l'axone) et se fait de façon sporadique, au fur et à mesure de la synthèse et polymérisation complète des neurofilaments [253, 254].

3-2-4. Le potentiel membranaire

Le but d'un neurone, en tant qu'unité fonctionnelle est de coder et transmettre une information. Cette information se présente sous forme de signal électrique, appelé potentiel d'action, observé pour la première fois par Hodgkin et Huxley en 1939. L'enregistrement du potentiel d'action, dans cette expérience, se présente sous la forme d'un pic (« spike » en anglais) de quelques millisecondes, répété 500 fois par seconde [255].

Ce signal électrique est possible grâce à la membrane du neurone, possédant une charge différente entre son côté intracellulaire et extracellulaire, ainsi que la possibilité d'inverser ces charges, se dépolariser. Cette charge, en s'inversant, permet la formation et la propagation du potentiel d'action. La différence de charge entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane se nomme potentiel membranaire.

Le neurone génère, maintient et inverse son potentiel grâce à l'imperméabilité de la membrane, et donc grâce à la différence de concentration en ions entre le cytosol et le milieu extracellulaire. La différence de concentration en ions n'est cependant pas suffisante pour créer un courant électrique. Même en concentrations différentes, les ions sont dans deux milieux

isolés et vont se répartir de façon homogène dans ces deux milieux. C'est ce qu'on appelle le principe de diffusion, théorisé par les lois de diffusion de Fick [256]. Ainsi, seule la membrane est porteuse des charges électriques. De ce fait, les milieux extérieur et intérieur de la cellule sont en équilibre électrique, tout comme la membrane dans sa totalité. Pour que sa membrane soit porteuse d'une charge électrique, le neurone doit créer un courant électrique, c'est-à-dire permettre le passage de charges électriques, d'ions, au travers de sa membrane.

Un courant électrique est appelé courant parce qu'il y a un mouvement de charge électrique entre une zone chargée positivement (la cathode) et une zone chargée négativement (l'anode). Ces deux zones sont situées de part et d'autre de la membrane du neurone et les charges sont les ions passant au travers de la membrane.

L'amplitude de déplacement des charges électriques est mesurée en ampères (A) et s'annote I dans les circuits électriques. Le courant électrique est déterminé par deux facteurs : le voltage et la conductance [257].

Le voltage, aussi appelé différence de potentiel, est la force qu'exerce une particule chargée et correspond à la différence, mesurée en volt (V), entre l'anode et la cathode. Du fait des propriétés isolantes des phospholipides composant la membrane, il y a une différence de charges entre la membrane côté interne (V_{intra}) et externe (V_{extra}), cette différence, appelée potentiel membranaire (V_m), équivaut à $V_{\text{intra}} - V_{\text{extra}} = V_m$ et est comprise entre -30 mV et -80 mV, dépendamment du type du neurone.

La conductance, de symbole g, est la capacité d'un corps à permettre le passage de charges électriques ; elle se mesure en siemens (S). La résistance est une autre mesure électrique décrivant les mêmes propriétés, mais à l'inverse. La résistance (R, mesuré en ohm, Ω ; $g = 1/R$) d'un corps est sa capacité à empêcher le passage de charges électriques. Dans le système du neurone, résistance ou conductance traduisent la perméabilité de la membrane du neurone aux ions.

Les caractéristiques de la membrane d'une cellule neuronale peuvent être résumés en se servant de la loi d'Ohm [257], où le courant de charges ioniques est dépendant de la porosité de la membrane et de son potentiel : $I = gV_m$

La loi d'Ohm permet d'expliquer la différence de potentiel entre le côté intra et extracellulaire de la membrane. C'est le passage des ions au travers de la membrane qui maintient ou fait varier cette différence de potentiel. Les ions se déplacent au travers de la membrane de façon passive, c'est-à-dire suivant leur potentiel d'équilibre.

Ions	Concentration extracellulaire mM	Concentration cytoplasmique mM	Rapport extérieur/intérieur Gradient	Potentiel d'équilibre à 37°C E_x en mV
K ⁺	20	400	1 : 20	-80
Na ⁺	150	15	10 : 1	62
Ca ²⁺	2	0,0002	10 000 : 1	123
Cl ⁻	150	13	11,5 : 1	-65

Tableau 2 : Valeurs moyennes des concentrations extra et intracellulaires des ions et leurs valeurs associées de potentiel d'équilibre.

E_x , calculé par l'équation de Nernst, représente le potentiel d'équilibre de l'ion, c'est-à-dire le potentiel de membrane à partir duquel l'ion se trouve à l'équilibre, conduisant à l'arrêt du flux ionique. Le maintien du potentiel de repos nécessite la sortie d'ion K⁺, l'entrée d'ion Na⁺ et l'entrée d'ion Cl⁻. Tableau issu d'une réalisation originale, inspiré de *Principles of Neuronal Science I, 5th Edition*, Kandel et al. Chap.6.

C'est ce potentiel d'équilibre, calculé mathématiquement par Walter Nernst en 1888 [258], qui explique la charge que les ions transportent au travers de la membrane en suivant leurs gradients de concentration (Tableau 2).

Un seul type d'ion n'est pas responsable du potentiel de repos ou du potentiel d'action d'un neurone. Le neurone a une perméabilité spécifique pour un ou plusieurs types d'ions [259]. Le courant des ions potassium (K⁺), sodium (Na⁺) et un léger courant de fuite d'ion chlorure (Cl⁻) permettent de maintenir le potentiel de repos, pendant qu'une entrée massive d'ions Na⁺ et calcium (Ca²⁺) permettent la génération du potentiel d'action (Tableau 2). Le potentiel de membrane dépendant de la perméabilité ionique de la membrane et de la concentration des ions se calcule par l'équation de Goldman [260].

3-2-5. Les canaux potassiques

La membrane phospholipidique elle-même est imperméable, grâce à son interface hydrophobe, et ne permet pas le passage des ions, ce qui crée le potentiel membranaire des neurones. Pourtant, pour obtenir toutes les propriétés de charge de la membrane décrites dans les paragraphes précédents, les ions doivent passer de façon régulée au travers de la membrane. Des protéines transmembranaires, possédant une région hydrophobe, vont s'assembler en polymères pour créer un pore, ou canal, au sein de la membrane. Ce pore n'est pas qu'une simple ouverture permettant le passage aléatoire des ions, les canaux ont leurs sélectivités propres. De part sa taille, le diamètre du pore va être sélectif pour la taille d'un ion. De plus, dans son ouverture, le canal possède un site de liaison qui va prendre en compte la charge de l'ion et des molécules d'eau de sa sphère hydrique, c'est le domaine P du canal.

Les canaux ioniques peuvent être de deux natures différentes :

- Les canaux passifs, dont l'ouverture, (le pore) va permettre le passage sélectif d'ions dans le sens de leurs potentiels d'équilibre.
- Les canaux actifs, aussi appelés pompes ioniques, dont l'ouverture ne sera jamais complète (pas de pore) puisqu'elle va forcer le passage des ions à l'opposé de leurs potentiels d'équilibre, moyennant une dépense d'énergie sous forme d'ATP.

La membrane du neurone contient un grand nombre de canaux K^+ , ion majoritaire pour le maintien du potentiel de repos. Tous les canaux strictement potassiques sont des canaux passifs, dont l'ouverture entrainer un flux d'ions dans le sens du gradient de concentration du potassium, de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. De plus, tous les canaux potassiques sont des tétramères dont le type de sous-unité va définir le type de canal potassique [261, 262]. Il y a 4 principales familles de canaux potassique, les *inwardly rectifying* ou canaux à rectification interne de courant, les *two-pore-domain* ou les canaux à deux domaine P, les *voltage-gated* ou canaux dépendant du voltage et les canaux activés par le calcium [259].

Les canaux *inwardly rectifying* (K_{ir}) ou canaux à rectification interne ou encore canaux à rectification entrante, sont des canaux potassiques subdivisés en 7 familles (notés K_{ir1} à 7) dont l'ouverture permet de corriger le potentiel de repos des cellules. Il se peut que le potentiel de la membrane soit plus bas que le potentiel d'équilibre de l'ion K^+ , les canaux K_{ir} sont alors ouverts pour permettre l'entrée du potassium dans la cellule et non sa sortie [263], comme par exemple en cas dans la phase d'hyperpolarisation du potentiel d'action (Introduction, Partie 3-5-7, Figure 15) [264, 265]. Leur ouverture peut être contrôlée de façon directe par activation

avec de l'ATP en intra ou extracellulaire [266], ou de façon indirecte par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G, ou grâce à un couplage avec d'autres récepteurs [267].

Les canaux *two-pore-domain* ou « domaine à deux pores » (K_{2P}) sont responsables du courant de fuite du potassium, c'est à dire qu'ils sont constitutivement ouverts dans les neurones et sont responsables de la majeure partie du courant positif sortant et donc du potentiel membranaire négatif à l'intérieur de la membrane [268, 269]. A ce jour, plus de 15 familles de K_{2P} ont été identifiées [270]. Même si toutes ne sont pas exprimés chez l'humain, il ne semble pas y avoir de répartition des différentes familles des canaux suivant leurs caractéristiques physiologiques [269]. Même si leur rôle est majoritairement de rester ouvert, il est possible de fermer ces canaux, en cas de variation du pH extracellulaire, de contraintes mécaniques de la membrane, de variations de températures, d'entrée de Ca^{2+} ou encore de l'action intracellulaires de protéines G [271]. Là encore, aucune famille de canaux ne semble être caractérisée par sa capacité de fermeture ou même par les antagonistes exogènes entraînant cette fermeture [272]. Ces canaux, grâce à leurs deux domaines P, ont une efficacité de perméabilité sélectivité du potassium presque identique à la vitesse de diffusion de l'ion et identique à sa vitesse de dissolution dans l'eau [273].

Les *voltage-gated* ou canaux dépendant du potentiel (K_V) sont fermés et n'interviennent pas dans le maintien du potentiel de repos. Le 4^e segment transmembranaire (S4) des K_V est sensible au potentiel de membrane du neurone et va contrôler l'ouverture des canaux en fonction de l'état d'activation du neurone [274]. Une fois ouvert et le potentiel de membrane revenu proche du potentiel de repos, le côté interne N-terminal du canal change de conformation, déplaçant un domaine protéique qui obstrue le canal avant que S4 n'en commande la fermeture. Ce mécanisme entraîne le canal dans un cycle ouverture-inactivation/blocage-fermeture où l'inactivation est primordiale pour le bon fonctionnement du neurone [275]. Le blocage des canaux ioniques dépendant du voltage par un domaine intracellulaire mobile est un mécanisme permettant au potentiel d'action d'avoir une propagation unidirectionnelle et donc au neurone de coder l'information transmise en fréquences de décharges de potentiels d'actions (Introduction, Partie 3-2-7 et partie 3-4-3) [276-278].

Les *calcium-activated* ou canaux potassiques activés par le calcium (K_{Ca}) se subdivisent en 5 groupes (K_{Ca1} à 5) mais se regroupent en 3 familles [279] : BK, SK et IK. Les BK (pour Big Potassium), possèdent un segment transmembranaire S4 sensible au voltage et une sous-unité β intracellulaire liant le calcium. Ils interviennent dans la régulation de l'activité cyclique des neurones, comme l'activité des cycles circadiens dans le cerveau et dans la régulation des axes réflexes cycliques dans la moelle épinière, comme la marche [280, 281]. Les SK et IK interviennent peu dans la régulation des potentiels d'action et dans l'activité cyclique des neurones [282]. Les SK servent principalement à éviter la cytotoxicité calcique des neurones, processus intervenant en cas de trop forte stimulation des neurones et donc d'une trop forte entrée de calcium intracellulaire [283, 284]. Les IK ont la même fonction pour tous les types cellulaires non neuronaux, ce qui inclut les cellules immunitaires [285, 286].

3-2-6. Les transporteurs et échangeurs ioniques

Le neurone consomme près des 2/3 de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) dans le maintien de son équilibre ionique [287]. Le K^+ , sorti du neurone pour le maintien du potentiel de repos, et le Na^+ , entré lors de la création d'un potentiel d'action, en suivant leurs gradients de concentration doivent aller contre ce gradient pour permettre le bon fonctionnement du neurone.

La pompe sodium/potassium

Le terme transporteur ou pompe désigne une molécule transmembranaire qui accompagne le passage, au travers de la membrane, des molécules (ici des ions) contre leur gradient de concentration en échange d'énergie. La pompe Na^+/K^+ -ATPase est un transporteur enzymatique ubiquitaire qui sert à réguler l'homéostasie des cellules en forçant la sortie de 3 ions Na^+ et l'entrée de 2 ions K^+ en hydrolysant une molécule d'ATP [288]. Cette pompe fait partie de la grande famille des ATPase de type-P (*P-type ATPase pumps*), où le P fait référence au groupement phosphorylé de l'ATP temporairement fixé au transporteur le temps du transfert des ions. Dans sa forme commune, la pompe Na^+/K^+ -ATPase un hétérotétramère composé de 2 sous-unités α et de 2 sous-unités β (Figure 14). Dans certaines cellules, comme c'est le cas pour les neurones, deux sous-unités γ (aussi connues sous le nom de protéines FXYD) peuvent venir compléter le transporteur. Il existe, chez l'humain, 4 isoformes de sous-unités α (α_1 à α_4), 3 types de sous-unités β (β_1 à β_3) et 7 types de sous-unités γ (FXYD1 à FXYD7) [289]. Plusieurs

combinaisons de ces isoformes vont s'assembler pour créer les différents types de pompes Na^+/K^+ -ATPase, avec une majorité de α_2 et α_3 , β_2 et β_3 , FXYD6 et FXYD7 exprimés par les neurones. Une seule cellule peut exprimer plusieurs isoformes en même temps et donc plusieurs types de pompes en même temps, les différentes isoformes des sous-unités permettant de réguler le fonctionnement du transporteur [290].

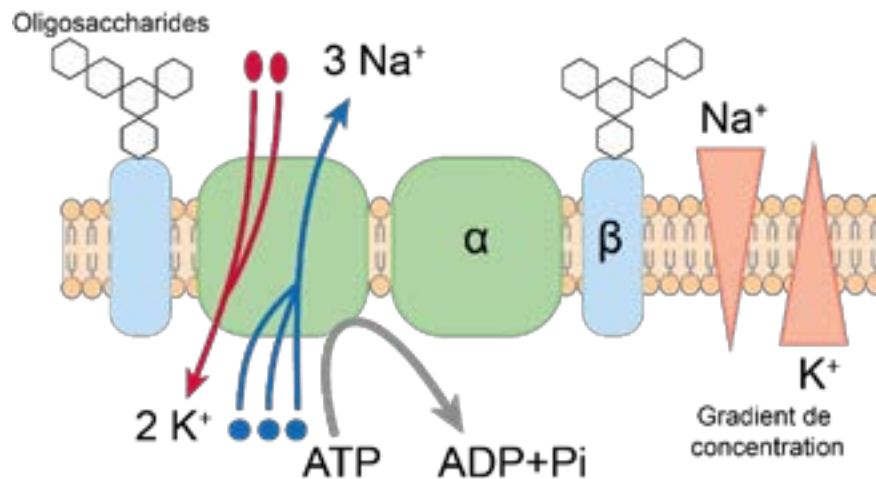


Figure 14: Structure de la pompe Na^+/K^+ -ATPase.

Dans sa forme ubiquitaire, la pompe comporte deux sous-unités α , responsables du transport vers l'intérieur de deux ions K^+ et vers l'extérieur de trois ions Na^+ par l'hydrolyse de l'ATP. Ce transport va à l'inverse du gradient de concentration des ions. Les deux sous-unités β du tétramère comportent des domaines glycosylés (oligosaccharides) permettant la liaison avec des cellules gliales. Image issue d'une réalisation originale.

Les deux sous-unités α du transporteur possèdent, dans la partie intracellulaire, une zone de liaison avec l'ATP et l'enzyme nécessaire à son hydrolyse. Ce sont également ces sous-unités qui vont jouer le rôle de transporteur, puisqu'elles possèdent 3 sites de liaison au Na^+ et 2 sites de liaison au K^+ . Au stade E1 du transporteur, 3 ions Na^+ et une molécule d'ATP vont se fixer en intracellulaire aux sous-unités α (Figure 14). La molécule d'ATP est hydrolysée en ADP (adénosine diphosphate) + phosphate (P_i). Les sous-unités β vont avoir un rôle extracellulaire plus important grâce à leurs groupements glycosylés. Elles permettent la liaison du transporteur avec d'autres cellules, comme les isoformes β_2 et β_3 , aussi connues sous le nom de molécules d'adhésion des cellules gliales (*adhesion molecule of glia*, AMOG). Cette liaison permet aux cellules gliales, notamment aux cellules de Schwann, de s'associer aux neurones et d'échanger directement des ions indépendamment de la concentration extracellulaire de ces derniers [291]. Les différentes isoformes des sous-unités β vont également avoir un impact sur l'affinité du transporteur pour les ions Na^+ , impactant la vitesse de transport des ions et donc

l'activité du transporteur [292]. Enfin, les sous-unité FXYP vont moduler l'affinité du transporteur au potassium, ainsi que la vitesse de transfert, en régulant l'activité du groupement enzymatique de la sous-unité α . Ce sont également des cibles d'action de nombreuses kinases intracellulaires, comme la PKC. Le but de ces sous-unités est d'adapter l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase à l'activité cellulaire et éviter toute dépense inutile d'énergie [289, 293].

Cette pompe Na^+/K^+ -ATPase est non seulement essentielle pour le maintien de l'homéostasie du neurone mais elle sert également pour le retour à cette homéostasie après un potentiel d'action (Introduction, Partie 3-2-7). C'est donc un outil important pour le neurone pour réguler ses fréquences de décharges. Et comme un neurone ne fonctionne jamais seul, cette pompe est importante pour la synchronisation des décharges de groupes de neurones et donc pour l'intégration de l'information [287, 294].

La pompe calcium

Une autre pompe de type P ATPase est exprimée par les neurones, surtout au niveau des synapses pour les neurones du SNC et par les extrémités pour les neurones du SNP, c'est la pompe membranaire plasmique Ca^{2+} -ATPase (*plasma membrane Ca^{2+} ATPase*, PMCA). Cette pompe force la sortie de 2 ions Ca^{2+} contre leur gradient de concentration, en échange de l'entrée de deux protons (H^+) et de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Dans les neurones, cette pompe permet le retour au potentiel de repos après ouverture de récepteur-canaux sélectifs aux ions bivalents comme le Ca^{2+} , ou pour les récepteurs métabotropiques qui vont induire l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique [295-297]. Ce mode d'activation par le calcium est particulièrement présent chez les neurones sensoriels cutanés (Introduction, Partie 3-4-5).

L'échangeur sodium/calcium

Il existe d'autres types de transporteurs qui ne sont pas de type-P, exprimés par les neurones et intervenant dans la régulation du potentiel de repos ou dans l'homéostasie du neurone suite à une activation de ses récepteurs. Il s'agit de transporteurs de la famille des échangeurs, ils ne vont pas avoir besoin de molécule d'ATP pour forcer le transport d'un ion contre son gradient de concentration mais ils vont utiliser le gradient de concentration d'un autre ion. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*sodium-calcium exchanger*, NCX), va forcer la sortie d'un ion de Ca^{2+} contre l'entrée de 3 ions Na^+ , qui eux suivent leur gradient de concentration [298].

Le Ca^{2+} est un ion divalent dont l'entrée peut induire une dépolarisation du neurone, mais il sert aussi de second messenger pour des facteurs de transcription (voie des protéine-kinases Ca^{2+} /calmoduline-dépendantes) et de cofacteur pour de nombreuses connections protéiques, comme l'exocytose de neurotransmetteurs (complexe SNARE, Introduction, Partie 3-2-8). Cependant, un excès intracellulaire de Ca^{2+} peut entraîner une dégénérescence des terminaisons du neurone et à terme sa mort, c'est la cytotoxicité calcique [299, 300]. Les pompes comme PMCA ou les échangeurs comme NCX peuvent être aussi bien exprimés sur le réticulum endoplasmique que sur la membrane plasmique du neurone et servent à réguler la concentration intracellulaire de calcium, plus que réguler le potentiel membranaire [298, 301].

3-2-7. Le potentiel d'action

La grande majorité des neurones comportent 3 compartiments : les dendrites recevant le signal, le corps cellulaire, contenant le noyau du neurone et intégrant ce signal, et l'axone, transportant ce signal au travers d'un potentiel d'action. Cela signifie qu'avant le début de l'axone et la fin du corps cellulaire, le signal électrique n'est pas présent sous forme de potentiels d'action.

Ce sont des potentiels post-synaptiques, c'est-à-dire des potentiels membranaires servant après que l'axone d'un autre neurone ait activé les récepteurs présents sur les dendrites du neurone après la synapse. Ces potentiels peuvent être excitateurs (potentiel post-synaptique excitateur, PPSE) et entraîner une dépolarisation, ou inhibiteurs (potentiels post synaptique inhibiteur, PPSI) et entraîner une hyperpolarisation de la membrane. Ces potentiels ne sont pas entretenus, c'est-à-dire qu'ils ne vont pas conserver la même intensité au cours du temps et en fonction de la distance parcouru sur les dendrites du neurone, ce sont des courants passifs. Il se peut que ces potentiels n'arrivent jamais au corps cellulaire si la stimulation de départ n'est pas assez importante, ou même s'additionner ou s'annuler en fonction des rencontres de PPSE et PPSI. La modulation des intensités des PPSE et PPSI dépendent de beaucoup de facteurs, comme l'arborisation des épines dendritiques et ces notions sont étudiées par une branche spécialisée des neurosciences, la plasticité neuronale/synaptique. Comme les neurones sensoriels cutanés ne possèdent pas de dendrites recevant les informations d'autres neurones comme c'est le cas pour les neurones du SNC, l'intégration des PPSE et PPSI par le neurone ne sera pas plus détaillée ici.

Pour les neurones possédant des dendrites, un potentiel d'action est la somme des PPSE et PPSI parvenant dans une zone particulière du neurone, la jonction entre l'axone et le corps cellulaire. Le potentiel d'action nécessite la dépolarisation du potentiel de membrane, c'est-à-dire une entrée de Na^+ dans le neurone. Les canaux sodiques sont responsables de la création, de l'entretien et de la propagation du potentiel d'action sur l'axone du neurone, ils sont sensibles au voltage et sont appelés des canaux voltages-dépendant ou « alimentés par le potentiel » (*voltage-gated*). Ces canaux sont des hétéromères composés d'une sous-unité α , possédant 4 domaines transmembranaire formant le pore et d'une ou plusieurs sous-unités β . Chez l'humain, 9 types de sous-unités α (Nav1.1 à Nav1.9) ont été fonctionnellement caractérisés, et il reste une dixième isoforme à caractériser Nax [302, 303]. Le potentiel d'action commence par l'ouverture des canaux Nav déclenchée par la dépolarisation des courants passifs, le segment S4 des domaines transmembranaires des canaux Nav étant sensible au potentiel membranaire. Les isoformes des canaux Nav ont des ouvertures sensibles à différents potentiels membranaires. Si la dépolarisation de courants passifs est suffisamment élevée et dépasse un certain seuil de potentiel membranaire, propre à chaque neurone car dépendant de l'expression des isoformes des Nav, tous les canaux sodiques voltage-dépendants s'ouvrent pour créer un pic de courant allant jusqu'à 40mV [304]. La durée de ce pic dépend de la cinétique d'ouverture des canaux sodiques, qui ne dépasse pas 1 milliseconde (ms). En même temps, les canaux potassiques K_v vont s'ouvrir en réponse à la forte dépolarisation créée par les canaux Nav et rétablir le potentiel membranaire. L'intense flux potassique entraîne une hyperpolarisation du potentiel membranaire, transitoire et rectifiée par les K_{ir} [305, 306].

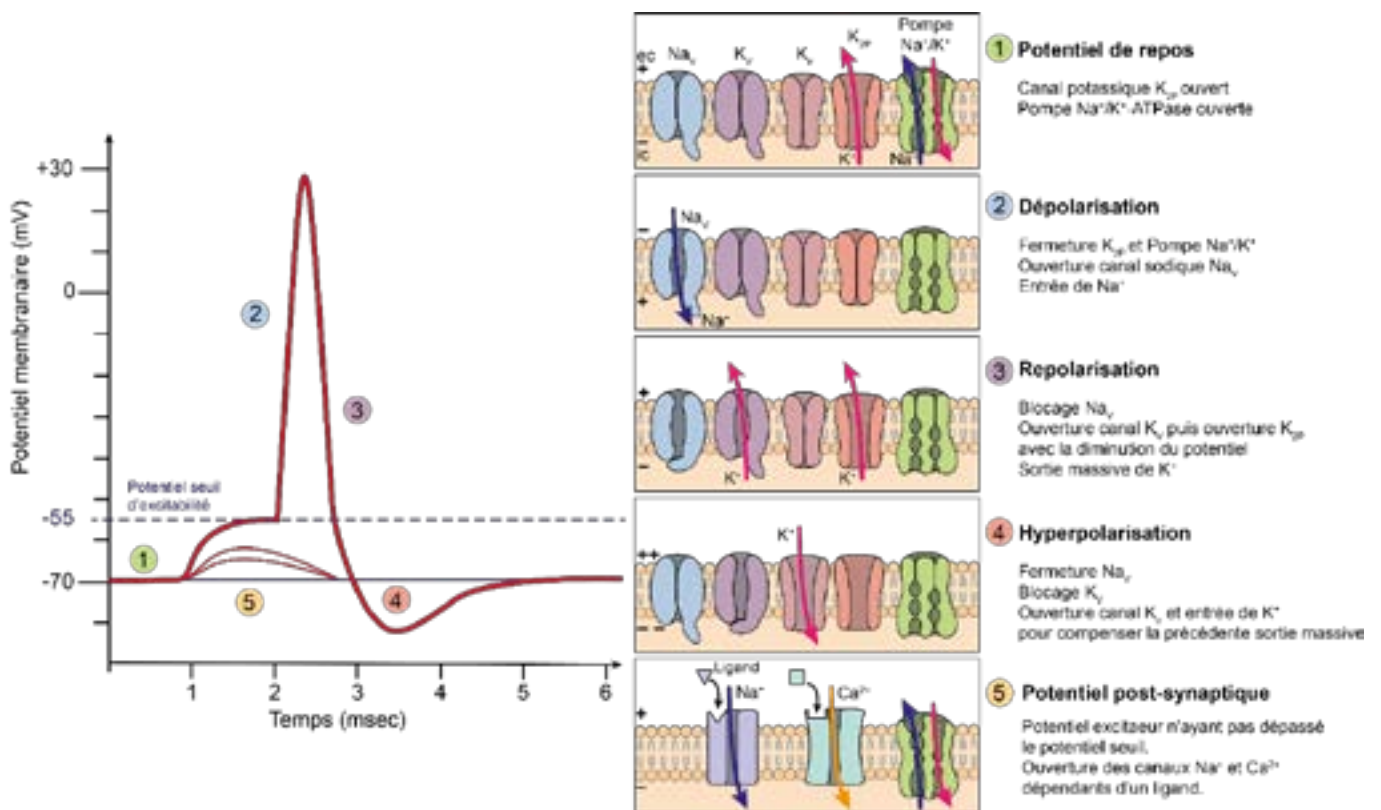


Figure 15 : Séquence des événements générant un potentiel d'action.

Le potentiel de repos (1) est maintenu par la sortie d'ions K^+ au travers du canal K_{2P} en suivant son gradient de concentration, qui est régulé par la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Le potentiel membranaire est de $-70mV$, où les charges sont négatives du côté intracellulaire (ic) et positives du côté extracellulaire (ec). Si un potentiel post-synaptique excitateur dépasse le potentiel seuil d'excitabilité du neurone, les K_{2P} se ferment et les canaux sodiques dépendant du potentiel membranaire (Na_v) s'ouvrent, créant un flux de Na^+ vers l'intérieur du neurone. Ce flux de Na^+ entrant dépolarise la membrane (2), inversant les charges aux surfaces de la membrane (positif en ic, négatif en ec). La dépolarisation est transitoire, les Na_v entrent en phase inactive (bloqués). Le changement de potentiel membranaire entraîne une ouverture des canaux potassiques dépendant du potentiel membranaire (K_v) et une sortie du K^+ . La repolarisation (3) entraîne l'ouverture des K_{2P} et une sortie plus massive des K^+ , menant à une hyperpolarisation (4). Cette phase est compensée par le blocage des K_v et une ouverture des K_{ir} qui permettent l'entrée de K^+ pour rétablir le potentiel de repos (1). Les potentiels post-synaptiques excitateurs sont générés par l'entrée de Ca^{2+} ou de Na^+ suite à l'activation directe ou indirecte de canaux-récepteurs. Si ces potentiels ne dépassent pas le seuil d'excitation, ils ne génèrent pas de potentiel d'action (5). Image issue d'une réalisation originale, inspirée de la banque d'images libres de droit Servier Medical Art.

Trois phases se dégagent d'un potentiel d'action, la dépolarisation, induite par le courant sodique, la repolarisation et l'hyperpolarisation, toutes deux induites par les courants potassiques (Figure 15). La durée totale du potentiel d'action est différente pour chaque type de neurone mais celui-ci reste unidirectionnel, c'est-à-dire qu'une fois initié, il ne va se propager que dans une direction sur l'axone, pour ne pas créer des potentiels d'action sur les dendrites et sur le corps cellulaire [305, 307]. La propriété unidirectionnelle du potentiel d'action est rendue possible par la nature même des Nav qui possèdent un groupement intracellulaire d'inactivation, bouchant le pore du canal. Pendant ce blocage (période réfractaire), le canal peut rester ouvert mais aucun ion Na^+ peut le traverser. Le canal sera de nouveau fonctionnel quand ce dernier se fermera, c'est-à-dire au retour du potentiel de repos. Entretemps, les canaux sodiques voisins se seront ouverts par l'élévation du potentiel membranaire, puis inactivés, en ouvrant par la même occasion les Nav voisins... Le potentiel d'action est une dépolarisation transitoire, voyageant le long de l'axone, en gardant toujours une même intensité car il est dépendant du potentiel d'équilibre du Na^+ .

La génération du potentiel d'action, son intensité et sa propagation le long de l'axone sont des propriétés dépendantes uniquement des canaux Nav . Ainsi, il n'est pas rare de trouver des composés agonistes ou antagonistes des canaux sodiques, comme la tétrodotoxine (TTX), produite par le fugu, un poisson globe. La TTX est l'antagoniste de la majorité des canaux sodiques du système nerveux central, empêchant la génération ou la propagation des potentiels d'action, mais elle se révèle inefficace sur les $Nav1.8$ et $Nav1.9$, exprimés par les neurones sensoriels et qualifiés de TTX-résistants [308].

Le fait que le potentiel d'action soit transitoire, de durée variable et unidirectionnel sont les conditions permettant la communication entre les neurones en fréquences de décharges ou nombre de répétitions des potentiels d'action. L'aboutissement du potentiel d'action est la synapse, c'est-à-dire la zone de communication entre l'axone d'un neurone et la dendrite d'un autre neurone. Le neurone, dans son fonctionnement, traduit un message chimique (liaison de ligand sur son récepteur), en message électrique (potentiel d'action), puis de nouveau en signal chimique (neurotransmetteurs) sur une cible, un autre neurone [309].

3-2-8. Synapse et neurotransmetteurs

Une synapse est l'espace séparant les membranes plasmiques de deux cellules, où celle avant la synapse est la cellule présynaptique et celle après la synapse est la cellule post-synaptique. Les éléments pré et post synaptiques ne sont pas obligatoirement des neurones mais la synapse est souvent associée au système nerveux. Dans le cas des neurones, la synapse se caractérise par la libération de neurotransmetteurs par le neurone présynaptique à la suite de l'arrivée d'un potentiel d'action sur la zone synaptique. Ces neurotransmetteurs vont se fixer sur leurs récepteurs associés dans le neurone postsynaptique et induire la formation de potentiel post-synaptique (excitateurs ou inhibiteurs, en fonction de la nature des neurotransmetteurs et de leur récepteurs), donc un courant passif [310].

Les neurotransmetteurs sont des molécules synthétisées par les cellules du système nerveux dont la fonction est d'avoir un impact sur le potentiel membranaire de l'élément post-synaptique, que ce soit une hyperpolarisation, une dépolarisation ou un maintien à la valeur de repos. Ces molécules peuvent être des acides aminés (glycine et glutamate) ou des dérivés d'acides aminés (dopamines et adrénalines, dérivées de la tyrosine ; le GABA, dérivé du glutamate), ou encore des peptides, comme la substance P (11 acides aminés) et le CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*, 37 acides aminés) [311-313]. L'acétylcholine, qui est le neurotransmetteur effecteur activant la contraction des fibres musculaires, fait office d'exception puisque c'est le seul ester parmi les neurotransmetteurs [314, 315].

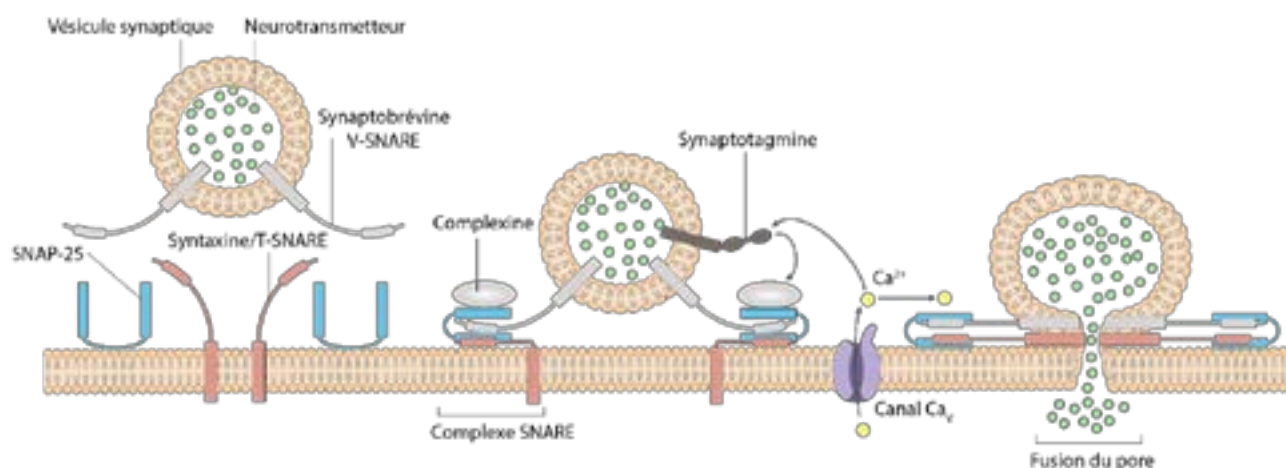


Figure 16 : Fusion de la vésicule synaptique avec la membrane plasmique [316].

Image issue d'une réalisation originale, inspirée de la banque d'images libres de droit Servier Medical Art.

Au moment de leur synthèse, à l'extrémité de l'axone ou au niveau du corps cellulaire, les neurotransmetteurs sont transportés dans des vésicules d'exocytose qui se rassemblent à la membrane plasmique proche de la fente synaptique (Figure 16) [317]. Ces vésicules d'exocytoses (vésicules synaptiques), composées d'une paroi double de phospholipides, comme la membrane plasmique, ont un diamètre de 40 à 50 nm et expriment, à leur surface externe, faisant face au cytosol, la synaptobrevine ou VAMP (*vesicle-associated membrane protein*) ou V-SNARE (*V - Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor*). La synaptobrevine est une protéine transmembranaire qui va permettre à la vésicule synaptique de se rapprocher le plus près possible de la membrane plasmique, sans qu'il n'y ait fusion de leurs parois. Elle se fixe sur la syntaxine ou T-SNARE, protéine transmembranaire plasmique, et à la SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein 25*), protéine membranaire plasmique [318-320]. L'alliance V-SNARE/T-SNARE/SNAP-25 forme le complexe SNARE, stabilisé par la complexine, protéine soluble cytoplasmique [321]. La complexine permet également la fixation au complexe SNARE de la synaptotagmine, molécule transmembranaire vésiculaire et senseur de Ca^{2+} . L'afflux de Ca^{2+} dans le neurone, à la zone du complexe SNARE, entraîne un rapprochement de la synaptotagmine vers la membrane plasmique et une fusion de cette dernière avec la membrane vésiculaire, créant un pore pour la libération des neurotransmetteurs (Figure 16) [316, 322].

Après la création de ce pore et la libération des neurotransmetteurs, le complexe SNARE est dissocié par l'action de l'enzyme NSF-ATPase (*N-ethylmaleimide sensitive fusion*) et de ses protéines adaptatrices, les α -, β -, et γ -SNAPs (*soluble NSF attachment proteins*) [323, 324]. La vésicule synaptique va entrer en phase d'endocytose en s'entourant d'un manteau de clathrine, un complexe protéique fait d'assemblages d'hétérotétramères, composés de 3 protéines de clathrine associé à une protéine AP-2 (*adaptor protein 2*). Le pore vésiculaire est refermé par l'action de la dynamine, une enzyme GTP-ase associée aux filaments d'actine. Le manteau de clathrine permet à la vésicule synaptique de conserver sa forme et sa taille, pendant que la dynamine, par l'hydrolyse de GTP, va permettre de séparer la vésicule de la membrane plasmique. La vésicule est recyclée dans un pool de réserve ou fusionnent ensemble pour former un endosome précoce, en attente de recevoir de nouveaux neurotransmetteurs [325-328].

La fusion de la vésicule synaptique avec la membrane plasmique dépend donc de la synaptotagmine, senseur à Ca^{2+} , donc de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule au passage d'un potentiel d'action. Cette entrée de Ca^{2+} se fait grâce à des canaux calciques voltage dépendant (Cav), dont le domaine S4 est sensible au potentiel membranaire et va entraîner l'ouverture du canal lors du passage d'un potentiel d'action.

3-3. Le système somatosensoriel

Le rôle d'un neurone, dans son fonctionnement, est de transmettre et intégrer une information. Les neurones sensoriels du SNP peuvent percevoir des signaux venant de l'extérieur de l'organisme, ce sont donc eux les premiers générateurs d'informations.

3-3-1. Les fonctions du système somatique

Ces informations brutes, non interprétées par le cerveau, sont appelées modalités sensorielles et font partie des fonctions du système nerveux somatique [329, 330]. Les modalités sensorielles ont pour but d'être perçues de façon inconsciente ou non par le cerveau, qui va les centraliser et les interpréter pour adapter au mieux le comportement de l'organisme en fonction de son environnement [331].

Les senseurs au travers du corps reçoivent un ensemble de stimulations qualifiées d'informations somatiques (du grec *soma*, corps). Ces informations, une fois intégrées par le cerveau forment l'ensemble du système somatosensoriel, tel que décrit pour la première fois

par Sir Charles Sherrington [332, 333]. Il se présente sous forme de trois fonctions ou modalités majeures : la proprioception, l'extéroception, l'intéroception.

La proprioception, (du latin *proprius*, « propre », « soi-même »), est l'ensemble des stimulations physiques et chimiques des nerfs sensitifs des muscles, tendons, articulations, oreilles internes, peau permettant de définir une représentation cérébrale de la posture, des mouvements et de l'orientation de notre propre corps [334]. La représentation du corps est indispensable à l'initiation de n'importe quel mouvement, volontaire ou réflexe, pour ajuster le positionnement des membres, du tronc, de la tête et l'intensité de la force de contraction exercée par les muscles, c'est la notion de kinesthésie [335].

L'intéroception représente la sensation du fonctionnement des organes internes, viscères et vascularisation. Il s'agit principalement de perceptions inconscientes, relatives au fonctionnement général du corps et la régulation des fonctions anatomiques, comme la digestion, les battements cardiaques, la respiration, le fonctionnement des reins... Comme dans les fonctions somatiques précédentes, l'intéroception possède ses propres afférences anatomiques, principalement le nerf vague (nerf crânien X), senseur du cœur (muscles et vaisseaux cardiaques), des principaux vaisseaux sanguins (artères et veines) ; de l'œsophage, du pharynx, de larynx, des bronches et de l'ensemble du tractus digestif [336]. Cette principale afférence possède un champ récepteur très large, c'est-à-dire qu'un seul neurone sensoriel innerve une large zone de l'organisme, rendant difficile à localiser consciemment et avec précision les douleurs d'origine viscérale ou vasculaire [337].

Généralement associé uniquement aux sens bruts, comme le toucher, l'odorat, le goût, la vue et l'ouïe, l'extéroception est la perception directe du monde extérieur par l'organisme. Le « toucher » comme on l'entend est en réalité une subdivision de différentes modalités. Pour percevoir consciemment la forme, la texture, la matière d'un objet, une multitude de récepteurs autre que des neurones sont nécessaires, pour saisir l'objet dans un premier temps et y appliquer la force adéquate [338]. Le contact, la pression, le frottement, la vibration, le mouvement, sont autant de modalités sous-jacentes de la perception de « toucher » un objet. Outre la reconnaissance d'objets, le toucher est indispensable pour l'activité motrice, il est important de reconnaître les parties mouvantes à la surface du corps, inconsciemment pour la proprioception mais ici, consciemment, pour saisir, frapper, caresser...

L'extéroception fait également intervenir la perception des températures chaudes ou froides. Cette indication est d'une importance cruciale pour maintenir les 37°C de température interne chez l'humain. Une fois de plus, l'information peut être perçue consciemment, comme c'est le cas pour la reconnaissance de la matière d'un objet, ou inconsciemment pour thermoréguler l'organisme. Éviter une brûlure fait intervenir ces deux composantes, le but étant d'éviter une lésion de l'organisme, la perception de la température extrême (chaude ou froide) se fait inconsciemment par un arc réflexe médullaire pour retirer le membre de la source de température extrême, puis consciemment, pour constater les éventuels dégâts [329].

Cette dernière perception fait intervenir la sensation douloureuse, où le signal d'une lésion physique, chimique ou thermique génère l'information brute, la nociception. Cette information sensorielle sera analysée par le cerveau ou intégrée dans un réflexe médullaire pour, comme pour la thermoception, protéger l'organisme des dangers extérieurs [339]. Ces modalités et perceptions seront plus profondément analysées dans leurs organisations et fonctionnements cellulaires et moléculaires.

3-3-2. L'organisation structurelle du système somatique

Les neurones du système sensoriel ont leur corps cellulaire dans les ganglions de la racine dorsale (*dorsal root ganglion*, DRGs), régions à proximité de la moelle épinière. Il y a 31 paires de DRGs le long de la moelle épinière, 8 au niveau des vertèbres cervicales (C1 à C8), 12 thoraciques (T1 à T12), 5 lombaires (L1 à L5), 5 sacrées (S1 à S5) et une paire coccygienne (Co). Chacun de ces DRGs innervent des zones de la peau et des tissus profonds (muscles, tendons...) délimitées, appelées dermatomes, qui peuvent être répertoriés sur une carte de distribution. Le C1 ne contient pas réellement de DRGs, uniquement des racines dorsales et ventrales (motrices). Le dermatome C1 correspond à l'innervation sensorielle de la peau visage assurée par les nerfs crâniens V (nerf trijumeau) et VII (nerf facial). Ces dermatomes montrent que les DRGs ont des compositions différentes en neurones sensoriels, pour répondre au mieux aux modalités sensorielles des zones innervées, mais aussi pour permettre une discrimination des origines des informations sensorielles dans le cerveau [340].

Les DRGs apparaissent au moment de la gastrulation, lors de l'apparition de la crête neuronale, entre le 28^e et le 32^e jour de développement embryonnaire chez l'humain. Cette phase se nomme la neurulation et permet la formation du tube neural, qui deviendra la moelle épinière, et des somites, qui deviendront les DRGs. Les neurones sensoriels de la peau vont

innervent la substance grise de la moelle épinière dans les zones ou lamina I, II, IV et V [341]. La substance grise est constituée des corps cellulaires des neurones de la moelle épinière, que ce soit des neurones générant des tractus ascendants ou des interneurons, des neurones connectant différentes zones de la moelle épinière ou servant d'intermédiaire entre deux ou plusieurs neurones de la même lamina.

Le but de l'information sensorielle est de se retrouver intégrée dans le cerveau, au niveau du thalamus, puis du cortex sensoriel primaire. La nociception restera une information sensorielle brute tant qu'elle ne sera pas intégrée par le cerveau et interprétée en douleur.

3-4. La nociception et la thermoception

Toucher se résume à une interaction physique entre l'organisme et un autre corps, pendant lequel les afférences se trouvant sous la peau enregistrent le maximum d'informations pour discriminer ce avec quoi notre organisme entre en contact. La peau n'étant pas homogène (épaisseur, présence de pilosité), l'innervation sensorielle sous sa surface ne l'est pas non plus. En fonction de la zone de l'organisme, un neurone sensoriel va avoir une zone plus ou moins large à couvrir. Plus la densité d'innervation est importante, plus il y a de neurones différents pour innervent une même zone, plus cette partie du corps va pouvoir, après interprétation du signal, discriminer finement des détails dans la sensation du toucher [342]. Ainsi, une plus grande variété de neurones (dans leur densité et sous-types) est allouée à la pulpe des doigts qu'aux bras par exemple.

3-4-1. Les types de fibres sensorielles et les cellules de Schwann

Les DRGs ont des compositions hétérogènes en neurones sensoriels, répondant à différentes modalités et se différenciant par leurs morphologies. Il y a 3 types de fibres sensorielles innervant la peau, les fibres A β , A δ et C. Il existe un quatrième type de fibre, les A α , avec un axone de gros diamètre (20 μ m), spécifiques de l'innervation sensorielle musculaire pour la proprioception. Les fibres A β ont un axone de diamètre moyen (12 μ m), par rapport aux fibres A δ au diamètre plus faible (5 μ m). Toutes les fibres A ont en commun d'être recouvertes d'une gaine de myéline, contrairement aux fibres C, non myélinisées et avec un axone de faible diamètre (1 μ m).

La gaine de myéline est constituée de plusieurs manchons faits d'enroulements de couches de membrane plasmique de cellules gliales, les oligodendrocytes pour le SNC et les cellules de Schwann pour le SNP [343, 344]. Un oligodendrocyte peut faire plusieurs manchons sur plusieurs axones différents, pendant que la cellule de Schwann s'enroule toute entière autour d'un seul axone, créant un seul manchon. Ces cellules gliales expriment la protéine basique de la myéline (*myelin basic protein*, MBP), protéine cytoplasmique indispensable puisqu'elle va annuler les charges intracellulaires des phospholipides, pour réduire au maximum l'épaisseur cytosolique et donc permettre la superposition des membranes plasmiques [345, 346]. La gaine de myéline est également une région riche en lipides, notamment en cholestérol [344, 347, 348].

Toutes ces caractéristiques font que les manchons de myélines sont imperméables aux ions et donc isolants. Cela signifie que des portions de 1mm (longueur moyenne des manchons) ne vont pas permettre le passage de courants ioniques. Les potentiels d'actions vont donc se propager sur la membrane non recouverte de myéline, au niveau des régions séparant deux manchons, appelées nœuds de Ranvier. Ce mode de propagation du potentiel d'action en passant par « saut » d'un nœud de Ranvier au suivant est appelé conduction saltatoire. Cette conduction est possible parce que les nœuds de Ranvier ont une forte concentration en canaux sodiques et également parce que, en recouvrant les axones et en ne laissant que des petites portions sans myéline, la gaine de myéline va forcer le passage des ions uniquement à ces endroits, augmentant fortement et localement la conductance ionique [349, 350]. En suivant la loi d'Ohm ($I=g.V$, Introduction, partie 3-2-4), et parce que l'intensité du potentiel d'action ne varie pas dans le temps (V), l'amplitude de déplacement des charges électriques (I) va alors augmenter si la conductance (g) augmente, rendant possible le « saut » des potentiels.

Dans le SNP, le rôle des cellules de Schwann ne s'arrête pas à la création de gaines de myéline. Il existe des cellules de Schwann non-myélinisantes, qui peuvent entourer les fibres de type C sans pour autant synthétiser de la myéline. Les cellules vont rester en contact avec les axones par l'intermédiaire de gap-junctions et exprimer aussi des canaux calciques, potassiques et sodiques dépendant du voltage, régulant ainsi l'équilibre unique des neurones en absence ou non de potentiels d'actions [351, 352]. Également sensibles aux mêmes facteurs neurotrophiques que les neurones, comme le NGF, (*nerve growth factor*), le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) et le GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*), les cellules de Schwann encore immatures vont pouvoir aider les axones en croissance, ou en régénération, à atteindre leurs cibles. Enfin, l'axone des neurones et les cellules de Schwann non myélinisantes, communiquent par l'exocytose de neurotransmetteurs comme l'ATP ou le glutamate. Les

cellules de Schwann peuvent notamment aider les neurones à réguler leur métabolisme et empêcher toute surexcitabilité du neurone, pouvant entraîner des inflammations [353-355].

Le fait qu'une cellule de Schwann immature va devenir myélinisante ou non dépend de la nature de l'interaction qu'elle a avec les neurones, conditionnée notamment par le diamètre de l'axone du neurone et donc la composition du cytosquelette de cet axone (Introduction, partie 3-2-3).

3-4-2. Les modalités tactiles

Parmi les différents types de fibres sensorielles cutanées, les A β sont obligatoirement attribuées à la perception du toucher et ont pour particularité d'avoir leurs terminaisons cutanées encapsulées dans des corpuscules ou des enchevêtrements de cellules spécialisées. Ces cellules sont, les corpuscules de Meissner et les disques de Merkel, proches de l'épiderme, et les corpuscules de Pacini et les corpuscules de Ruffini, structures du derme supérieur ou profond. Ce sont ces cellules spécialisées qui vont déterminer la modalité sensorielle perçue par les fibres A β (Figure 17).

Ces modalités sont, par exemple, les micro-vibrations induites par le contact avec un objet ou la tension de la peau résultant d'un pincement ou aplatissement de l'épiderme en contact avec une surface rugueuse. Les fibres A β , tout comme les fibres A δ et C vont innover les follicules pileux, pour percevoir les mouvements de l'air (Figure 17).

Les fibres A δ et C possèdent des terminaisons libres, c'est-à-dire que les extrémités de l'arborisation des axones n'ont pas besoin de cellules spécialisées pour percevoir leurs modalités sensorielles. Les fibres C, dites mécanosensibles à seuil bas (*low threshold mechanoreceptors*, LTMs) ou à adaptation lente, ou fibres-C polymodales, innervant l'épiderme, vont percevoir le contact de la peau avec sa propre peau ou une autre peau [150, 331, 356]. Les fibres A δ , tout comme les fibres C, innervent l'épiderme et toutes deux sont spécialisées dans la perception de la température.

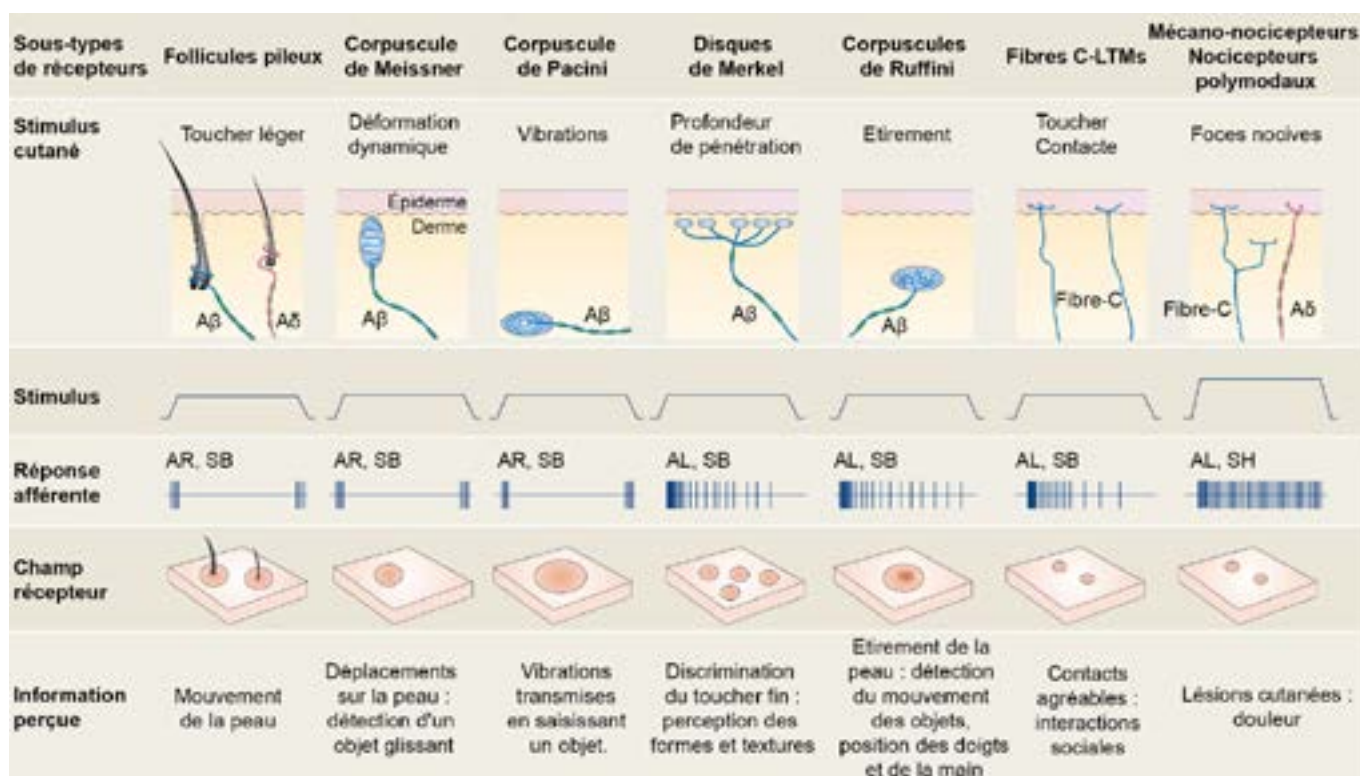


Figure 17 : Les récepteurs cutanés [357].

Les neurones mécanosensoriels cutanés se différencient en de nombreux sous-types fonctionnellement distincts, avec des sensibilités de seuil et des capacités de codage spécifiques. Les stimuli captés sont traduits par le neurone en fréquences de décharges particulières, correspondant à une intensité de stimulation particulière. Les fibres percevant le toucher léger, la déformation ou les vibrations ont des fréquences de décharges courtes, à adaptation rapide (AR), c'est-à-dire que les décharges s'effectuent uniquement au changement d'état et non tout au long de la stimulation. Les fibres à adaptation lente (AL) ont des fréquences de décharges qui perdurent pendant la stimulation. Seules les fibres nociceptives ont besoin d'une intensité de stimulation élevées, elles ont un seuil haut (SH) de détection de leur modalité, contrairement aux autres fibres qui ont un seuil bas (SB) de détection. Toutes ces fibres couvrent une surface cutanée qui leur est propre, c'est leur champ récepteur. Il est possible que les champs récepteurs se superposent, renforçant le détail des informations perçues. Image modifiée d'après Delmas et al. (2011) *Nat Rev Neurosci* [357].

Toutes ces modalités combinées peuvent être perçues et interprétées consciemment par le cerveau, pour l'identification d'objets, mais servent également à la perception inconsciente, pour appliquer la force nécessaire à saisir un objet sans le casser ou le lâcher. De plus, l'alliance de ces modalités fait intervenir la notion d'aire réceptrice, c'est-à-dire la surface de sensibilité pour une fibre sensorielle. Ces surfaces se superposent avec celles d'autres fibres sensorielles, pour la même modalité ou pour des modalités différentes.

3-4-3. Les fibres nociceptives et thermoceptives

La nociception (du latin *nocere*, « de nuire ou de blesser ») est l'information traduisant une lésion, un risque de lésion ou un mauvais fonctionnement d'un organe. Sir Charles S. Sherrington, en 1906, définit et explique la présence de nocicepteurs comme un sous-type fonctionnel distinct du neurone somatosensoriel, consacrés à la détection et à la transduction de stimuli nocifs et de haute intensité, capables de causer des lésions tissulaires et de provoquer des douleurs [358]. Les fibres A δ non associées aux follicules pileux, les fibres C-LTMs et les fibres C insensibles aux stimulations mécaniques (*mechanically-insensitive C-fibers*, CMI), interviennent dans la perception de cette modalité nociceptive.

Nociception et thermoception sont souvent des mécanismes associés puisqu'ils requièrent la mobilisation des mêmes types de fibres et les mêmes récepteurs. Les fibres A δ et C sont toutes deux des fibres nociceptives et thermoceptives, mais seules les fibres C seront abordées plus en profondeur ici. Les fibres A δ participant principalement dans la perception d'informations nocives dans le but de générer le réflexe médullaire de retrait, alors que les fibres C peuvent percevoir des stimulations inflammatoires en plus des modalités nociceptives et thermoceptives des fibres A δ , et surtout ont pour rôle de transmettre l'information nociceptive au cerveau pour son interprétation en message douloureux ou non [331].

Succinctement, le réflexe médullaire de retrait peut se comparer comme étant l'inverse du réflexe myotatique rotulien. Il se décompose en 4 grandes phases : (1) la perception de l'information nociceptive par les fibres A δ , (2) la transmission aux interneurons médullaires de la lamina I (corne dorsale de la moelle épinière). Ces interneurons vont (3) intégrer et transmettre l'information aux motoneurons, (4) inhibant les motoneurons des muscles extenseurs et activant les motoneurons des muscles fléchisseurs. La résultante de cette stimulation est un rapprochement des extrémités du corps vers le tronc, dans un réflexe médullaire, c'est-à-dire que son exécution se passe de l'intégration consciente ou inconsciente de l'information nociceptive par le cerveau, qui est un mécanisme plus lent. Ce réflexe de retrait est un mécanisme protecteur, il permet d'éloigner rapidement un membre de toute source danger (très forte ou très basse température, déchirure de l'épiderme ...), pouvant entraîner une éventuelle lésion tissulaire, ou aggraver une lésion déjà provoquée [357, 359].

Les fibres C sont donc discriminées en deux catégories, les fibres C-LTM, aux terminaisons principalement épidermiques, et les fibres CMi, aux terminaisons dermiques et épidermiques. Si les C-LTM sont activées par les stimulations mécaniques, c'est grâce à l'expression des canaux cationiques non sélectifs (laissant passer Ca^{2+} , Na^+ ou K^+) à 34 domaines transmembranaires, Piezo-1 et Piezo-2, qui s'ouvrent en cas de déformation de la membrane plasmique [360-362]. D'autres canaux cationiques, comme les canaux sodiques de la famille des ASICs (*acid-sensing ion channels*) n'interviennent pas directement dans la perception de modalité mécanique. Cependant, l'absence de leur expression chez la souris (ASIC-2 KO) entraîne une diminution de la sensibilité des C-LTM [363, 364]. De plus, des récepteurs métabotropiques, couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptor*, GPCR), comme le récepteur PAR-2 (*proteinase-activated receptors-2*) peut entraîner l'ouverture de canaux sodiques une fois activés par la phosphorylation de la protéine G_q (Introduction, Partie 3-4-5.). Les récepteurs ASIC-2 et PAR-2 interviennent également dans la perception de la sensation de démangeaison et sont activés par la stimulation mécanique de l'épiderme, le « grattage » (le *itch and scratch*) [331, 365, 366].

3-4-4. Les canaux *Transient receptor potential*

Une superfamille de canaux cationiques (principalement Na^+ et Ca^{2+}), les TRP (*Transient receptor potential*), ne sont pas directement ouverts par les changements de tension membranaire comme les Piezo-2. Les TRP interviennent également dans la perception de stimulations mécaniques. Cette superfamille a été initialement identifiée chez la drosophile et chez *Caenorhabditis elegans* comme mécanosenseur. Des protéines de liaisons (*linker*) connectent le canal TRP au cytosquelette (Mec2) ou à la matrice extracellulaire (Mec6), de telle façon qu'une modification mécanique de la cellule ou de son environnement entraîne l'ouverture du canal [367, 368]. Un mécanisme similaire, où les canaux sont reliés aux filaments d'actine, a été retrouvé chez le xénope et dans les cellules ciliées de l'oreille interne des vertébrés [369-372].

Les récepteurs de la superfamille des TRP sont également exprimés par les CMi, pour leurs propriétés de senseurs thermiques et nociceptifs.

Il y a 6 familles de TRP pour 28 sous-types de canaux exprimés chez l'humain : les TRPCs (*Canonical*) avec 7 sous-types différents, les TRPVs (Vanilloïd) avec 6 sous-types différents, les TRPMs (*Melastatin*) avec 8 sous-types différents, les TRPMLs (*Mucolipins*) avec 3 sous-types différents, les TRPPs (*Polycystins*) avec 3 sous-types différents et TRPA1 (*Ankyrin repeat*), le seul représentant de sa famille [373, 374]. Les TRPs ont tous en commun d'être des tétramères dont les sous-unités possèdent 6 domaines transmembranaires, avec la boucle P du pore placée entre les domaines 5 et 6. Tout comme les canaux potassiques, certains TRPs sont sensibles au voltage par l'intermédiaire de leur 4^e domaine transmembranaire. La différence entre les familles de récepteurs se fait principalement par la composition de leurs terminaisons N et C-terminales, toutes deux intracellulaires, et par leurs agonistes exogènes extracellulaires. Seules les propriétés des canaux TRPV1, TRPV4, TRPA1 et TRPM8, exprimés par les CMi et les A δ intervenant dans la thermoception et la nociception, vont être développées en détail ci-dessous [375-378].

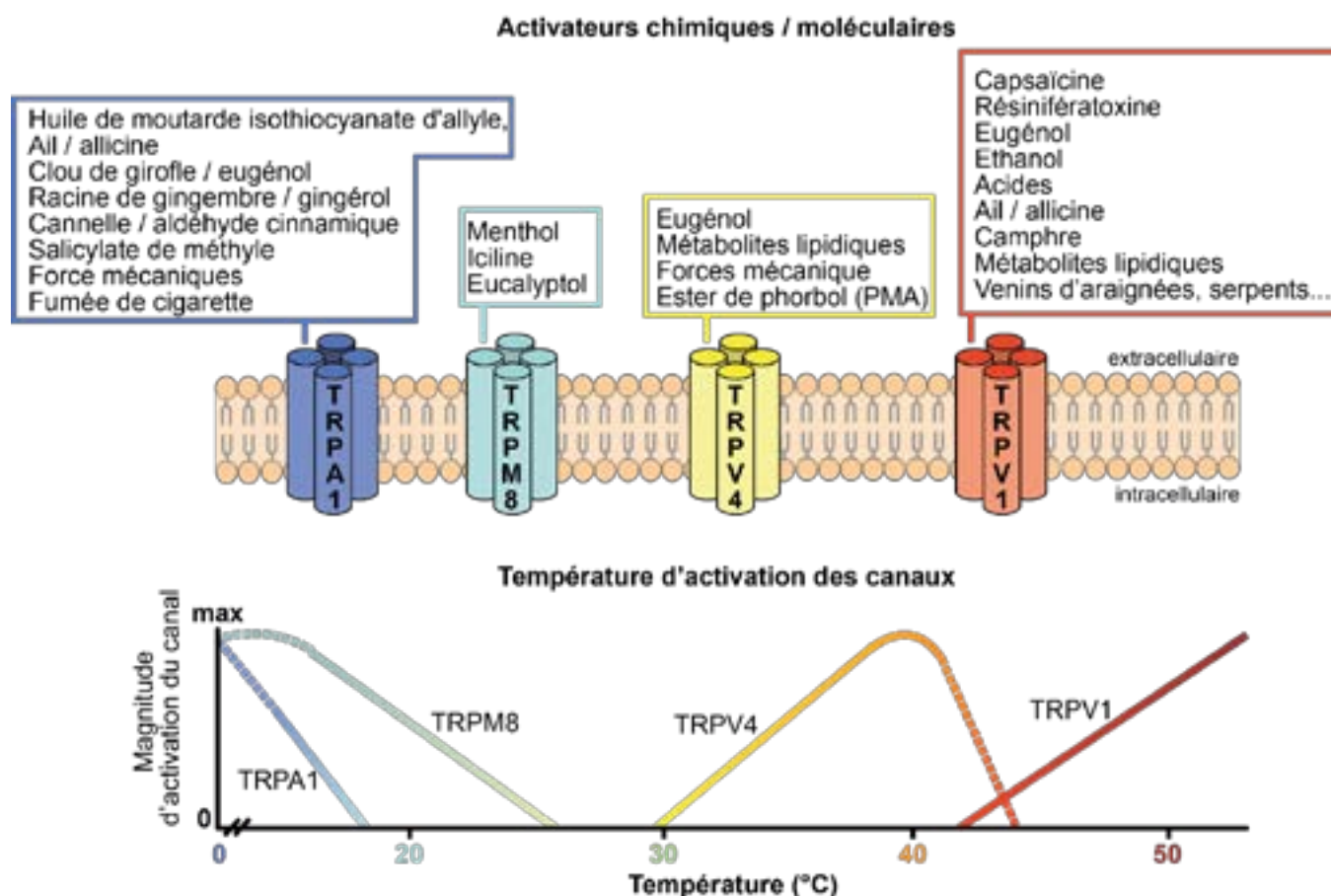


Figure 18 : Classification des canaux TRPs thermo-nocicepteurs TRPA1, TRPM8, TRPV4 et TRPV1 en fonction de leur température d'activation.

Ces canaux TRPs ont également la particularité d'avoir de nombreux agonistes ou activateurs exogènes et endogènes. Image issue d'une réalisation originale.

Ces 4 canaux-récepteurs sont directement impliqués dans la thermoception et la nociception puisqu'ils possèdent tous une température optimale à laquelle ils vont s'ouvrir (Figure 18). Les températures inférieures à 15°C (ouverture de TRPA1) et supérieures à 42°C (ouverture de TRPV1) sont interprétées comme températures nocives, donc entraînent systématiquement un signal de nociception. Il a été démontré, uniquement chez la souris, que le canal TRPV2 est activé à des températures extrêmes supérieures à 52°C, ce qui fait de ce canal un cas particulier, comme étant « le plus chaud » des thermo-TRP. C'est également un mécanosenseur chez les neurones murins embryocardiés et il a été envisagé comme cible thérapeutique contre les douleurs chroniques. Cependant, chez l'humain, aucun équivalent fonctionnel n'a été déterminé, malgré le fait que TRPV2 soit exprimé par les neurones sensoriels et les kératinocytes [379, 380]. Au-delà de leur fonction de thermosenseurs, TRPV1 et TRPA1 peuvent directement être activés par des changements de pH, en cas d'acidose

provoquée par une rupture de la barrière épidermique (pH entre 7 et 6,5). Ces canaux sont aussi bien exprimés par les fibres C que par les kératinocytes de la couche basale. Le stimulus nociceptif peut donc être généré par l'activation directe des neurones ou être perçu de façon indirecte, médié par les kératinocytes [2]. Ces deux récepteurs sont la cible de nombreuses molécules exogènes, ce sont donc également des senseurs de composés chimiques (Figure 18). Parmi les agonistes exogènes de TRPV1 majoritairement utilisés en laboratoire on retrouve la capsaïcine (molécule active du piment) [381], la résinifératoxine (RTX, produite par le cactus *Euphorbia resinifera*) [382] et l'eugénol (présente dans le clou de girofle) [383]. TRPA1 peut aussi être activé par la capsaïcine, mais il est surtout sensible à l'isothiocyanate d'allyle (huile de moutarde) [381, 384], à des composés organosulfurés comme l'allicine (produit chez l'ail et l'oignon) [385, 386], ou à d'autres composés organiques comme le 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène (DNCB, un puissant sensibilisateur utilisé dans le milieu médical dans les tests allergiques) [387].

Même si TRPA1 est activé par des températures inférieures à 15°C, considéré comme le seuil de la température nocive, les températures autour entre de 1 et 5°C ont un effet anesthésiant (absence de génération de potentiels d'action par les nocicepteurs). Plus bas, les températures inférieures à 0°C sont perçues comme fortement nocives par l'activation de toutes les fibres nociceptives [388, 389]. Ces observations montrent que différents neurones n'exprimant pas TRPA1 interviennent également dans la perception de la température. La particularité de TRPM8 est qu'il s'active à partir des températures inférieures à 26°C, pour la perception inconsciente de la température, la régulation de l'homéostasie thermique et la reconnaissance d'objets. A des températures inférieures à 15°C, l'activité des neurones exprimant TRPM8 va fortement augmenter pour transmettre, avec TRPA1, une information nociceptive [390]. De plus, quand TRPM8 est coexprimé avec TRPV1, les températures inférieures à 5°C entraînent une inhibition intracellulaire de TRPV1 par TRPM8 [391, 392]. Ainsi, la coexpression de TRPM8 avec TRPA1 et/ou TRPV1 permet la perception inconsciente du froid (entre 26°C et 15°C), la perception nocive du froid (entre 15°C et 5°C) et l'anesthésie par le froid (entre 5°C et 1°C) [393]. Cette anesthésie générée par le froid peut être induite par des agonistes exogènes de TRPM8, comme le menthol ou l'eucalyptol [394-396].

Entre la limite d'ouverture de TRPV1 (42°C) et celle de TRPM8 (26°C), d'autres thermo-TRP interviennent dans la perception des températures intermédiaires. La température optimale d'ouverture de TRPV4 est comprise entre 34°C et 38°C, proche de la température physiologique de l'organisme. Exprimé aussi par les neurones de l'hypothalamus dans le cerveau, son rôle comme thermosenseur intervient, au niveau du SNC, dans le maintien de l'homéostasie [397, 398]. Au niveau de la peau, le rôle de TRPV4 comme thermosenseur intervient dans la différenciation des kératinocytes qui l'expriment et dans le maintien des jonctions serrées. TRPV4 est un canal cationique non sélectif et le fait qu'il puisse être constamment ouvert à température physiologique augmente la concentration de Ca^{2+} intracellulaire des kératinocytes, qui est un facteur de différenciation indispensable à la stratification de l'épiderme (Introduction, Partie 1-2) [399, 400]. Également homéosenseur dans la peau, mais aussi mécanosenseur, TRPV4 va intervenir dans le maintien de messages nociceptifs déjà générés par les fibres C, conduisant à l'hyperalgésie, une sensibilité excessive à un stimulus nociceptif. L'hyperalgésie ne doit pas être confondue avec l'allodynie, qui est l'interprétation comme signal nociceptif de stimuli non-nociceptifs en conditions physiologiques normales, comme c'est le cas avec les allodynies mécaniques, consécutives d'une ouverture prolongée de TRPA1 [401]. Chez le rat, la délétion au niveau des DRGs ou l'inhibition locale de TRPV4 annule l'effet hyperalgésique du récepteur [402, 403].

3-4-5. Stimuli nociceptifs et inflammatoires médiées par les récepteurs couplés aux protéines

G.

Le rôle le plus important des TRPV1, TRPV4, TRPA1 et TRPM8 dans la nociception, et notamment dans la perception de stimuli nociceptifs apportée par l'inflammation cutanée, réside dans leur capacité à générer des potentiels d'actions aux extrémités des fibres nociceptives. Les TRPs sont coexprimés avec des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, les GPCR qui entraînent leur ouverture suite à une signalisation intracellulaire. Plusieurs modalités peuvent se discriminer à la suite de l'activation des TRPs par les GPCRs, la nociception « douloureuse », l'inflammation « douloureuse », la neuropathie « douloureuse » et la démangeaison [377, 404].

Une protéine G est une protéine intracellulaire, avec une composante intramembranaire. Dans sa forme inactive, c'est-à-dire couplée à son récepteur, une protéine G est un trimère composé des sous-unités α , β et γ (abrégées $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$), lié à une molécule de GDP (Guanosine diphosphate). En cas d'activation du récepteur, la protéine G lie une molécule de GTP (Guanosine triphosphate), qui sera hydrolysée par sa sous-unité α . Le monomère $G\alpha$ -GTP se sépare du récepteur et des sous-unités β et γ , pour moduler l'activité de son messenger intracellulaire effecteur. Le dimère $G\beta$ - $G\gamma$ se sépare aussi du récepteur pour moduler l'activité de son propre effecteur. Une fois l'hydrolyse de la GTP effectuée par le messenger effecteur, le monomère $G\alpha$ -GDP peut revenir se lier à son récepteur. La fin de l'activité du dimère $G\beta$ - $G\gamma$ replace le récepteur à l'état inactivé.

Dans le cadre de la détection des modalités par l'intermédiaire d'un GPCR, 3 types de protéines G, se caractérisant par trois types de $G\alpha$, interviennent : les $G\alpha_s$ ou G_s (pour *Adenylate Cyclase stimulator*), les $G\alpha_i$ ou G_i ou $G_{i/o}$ (pour *Adenylyl Cyclase inhibitor*) et les $G\alpha_{q/11}$ ou $G_{q/11}$.

La sous-unité $G\alpha_s$ active l'enzyme transmembranaire Adénylate Cyclase (AC), synthétisant de l'AMP cyclique (AMPc) à partir d'ATP. Cet AMPc est un second messenger activant des kinases (enzyme de transfert de groupement phosphate où sa cible est la protéine kinase A (PKA)). A l'inverse, la sous-unité $G\alpha_i$ va inhiber l'AC, diminuant la concentration cytosolique d'AMPc et donc diminuant l'activité de l'ensemble des voies métaboliques AMPc-dépendantes. De plus, le dimère $G\beta$ $G\gamma$ des protéines G_i active l'ouverture des K_{ir} , entraînant une hyperpolarisation du neurone [405, 406].

La sous-unité $G\alpha_{q/11}$ active l'enzyme transmembranaire Phospholipase C (PLC), enzyme catalytique qui, avec un ion Ca^{2+} comme cofacteur, hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). Le DAG est un second messenger entraînant l'activation de kinases comme la protéine kinase C (PKC). L'IP₃, également second messenger, se fixe sur les canaux calciques sensibles à l'IP₃, présents à la surface du réticulum endoplasmique, et entraîne une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique. Le Ca^{2+} est un cofacteur essentiel à une sous famille de PKC dite conventionnelles [407, 408].

Le résultat de l'activation de kinases comme la PKA et la PKC est la phosphorylation intracellulaire des TRPs, déclenchant leur ouverture. Il existe plusieurs sous-types de PKA et PKC, présentant chacune une spécificité d'activation pour un ou plusieurs TRP. Par exemple, la PKC ϵ activerait sélectivement TRPV1, faisant de cette kinase une potentielle cible thérapeutique pour la régulation de l'hyperalgésie et de la douleur locale médiée par l'activation des GPCR [409, 410]. L'action générale de la PKA et de la PKC reste l'activation des principaux TRPs intervenant dans la nociception, à savoir TRPV1, TRPV4 et TRPA1 [404, 406, 411-413].

Ainsi, il est possible de discriminer plusieurs populations de fibres de types C en fonction de leurs expressions de GPCRs et des 3 TRPs intervenant dans la génération des potentiels d'actions consécutifs à l'activation des GPCRs. Comme par exemple, les fibres C coexprimant TRPV1 et le récepteur à l'histamine H₁R, couplé à une protéine de type G_{q/11}. L'histamine étant libérée par les mastocytes en cas d'inflammation, la fibre C coexprimant ces types de récepteurs est compétente pour percevoir des stimuli pro-inflammatoires. Ces types de fibres expriment également des PRR, comme les TLR3, TLR4, TLR5 et TLR7 (Figure 19). Ce ne sont pas des GPCR, mais, par l'intermédiaire de leur adaptateur MyD88, les TLRs exprimés par les neurones peuvent stimuler l'activation de la Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) qui provoque l'ouverture des Nav1.8 ou des TRPV1 [9, 10].

Le dimère G β G γ des protéines G_s et G_{q/11} peut également arriver la PI3K [406, 414]. D'autres fibres C vont exprimer les MrgprA3 et C11, des chimiorécepteurs à protéine G_{q/11} appartenant à la superfamille des Mrgpr (*Mas-related G protein-coupled receptor*), et TRPA1 [412, 415]. Cette sous-population de fibres C est particulièrement impliquée dans la perception des stimuli chimiques, comme la chloroquine, agent anti-histaminergique utilisé dans le traitement de la malaria, qui est également un agent pruritogène (générateur de démangeaisons) puisque c'est un des ligands connus de MrgprA3 [416, 417]. Les fibres TRPA1/Mrgpr expriment également le TSLPR, récepteur à protéine G_{q/11}, activé par le TSLP libéré par les kératinocytes de la lame basale en prolifération ou activé par des substances chimiques pruritogènes [2, 418].

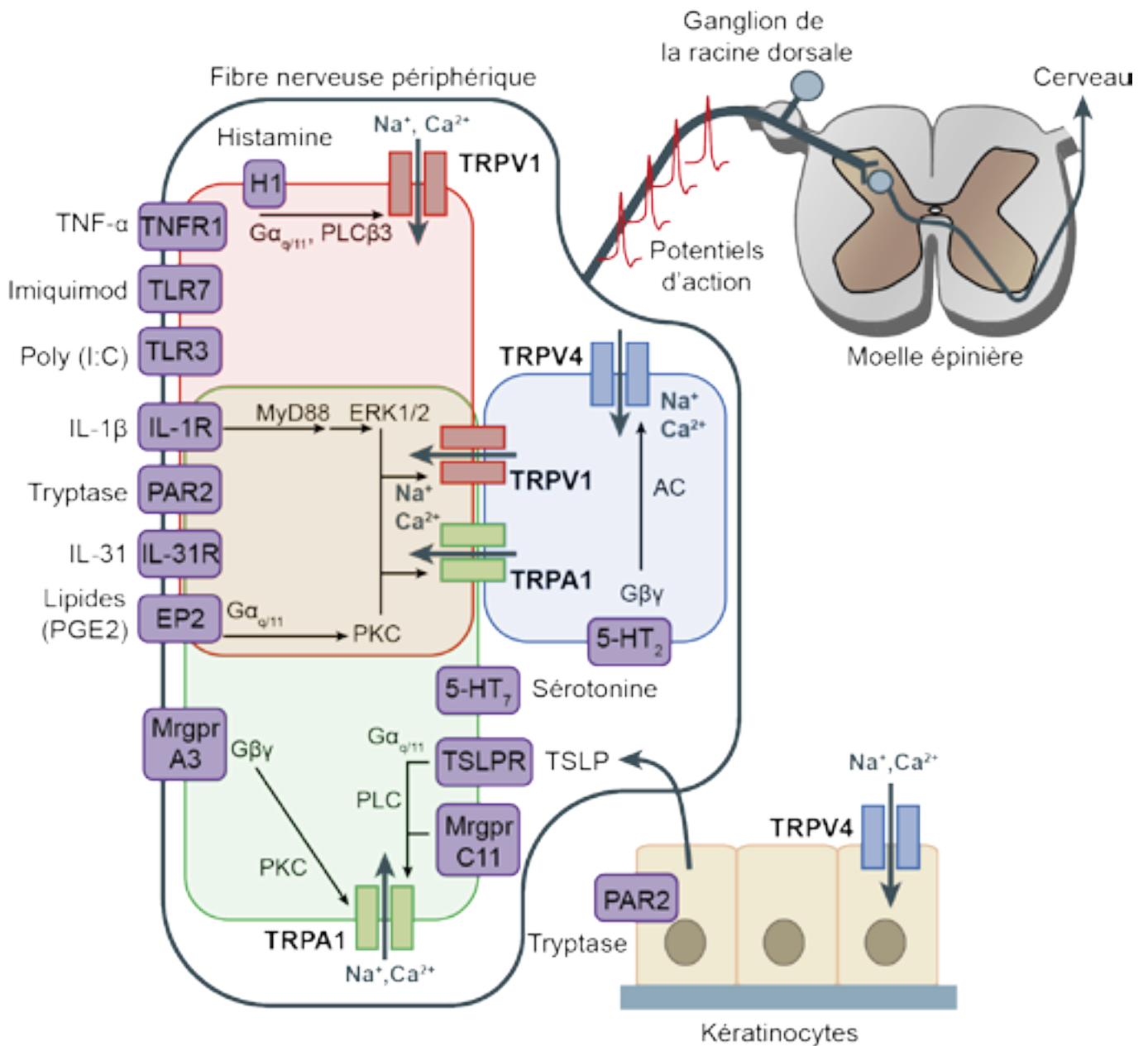


Figure 19 : Caractérisation des différentes fibres nociceptives par leur co-expressions de TRPV1, TRPA1 et TRPV4 avec des GPCRs.

Plusieurs modulateurs endogènes et exogènes vont générer des potentiels d'actions par activations intracellulaires des TRPs. Les kératinocytes exprimant TRPV4 peuvent être activés de la même façon et libérés du TSLP, qui va à son tour activer les neurones [419, 420]. Image issue d'une réalisation originale, inspirée de Kittaka et al. (2017) *Allergol Int* [419].

TRPV1 et TRPA1 peuvent être coexprimés, de même que le PAR-2 (*protease-activated receptor 2*) un récepteur activé par clivage par des protéases endogènes (tryptase libérée par les mastocytes) ou exogènes et qui, couplé à une protéine G_{q/11}, intervient de l'inflammation (Figure 19) [418]. La particularité des fibres C TRPV1/TRPA1/PAR-2 est qu'ils ne produisent pas de neuropeptides [331, 419].

3-4-6. La substance P et le *Calcitonin gene-related peptide*

Parmi la multitude de neurones coexprimant divers assemblages de GPCR et TRPs, les fibres C se distinguent par leur production ou non de neuropeptides. Le glutamate est le neurotransmetteur principal participant à la transmission de l'information nociceptive par les fibres C sur les neurones du tractus spino-thalamique, au niveau de la moelle épinière. Certains neurones impliqués dans la perception de la nociception d'origine inflammatoire (H₁R), chimique (Mrgpr) ou thermique ou dans la génération de démangaisons (*itch*), sont dit peptidergiques, c'est-à-dire produisant des neuropeptides comme neurotransmetteurs en plus du glutamate. Les neuropeptides majoritairement retrouvés dans la perception de ces modalités nociceptives particulières sont la Substance P (SP) et le CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*) [341].

La SP est un neuropeptide de 11 acides aminés, de la famille des tachykinines, produit de l'expression du gène *Tac1*. Le récepteur spécifique de la SP est le NK1R (*neurokinin 1 receptor*), un GPCR à 7 domaines transmembranaires, se présentant sous deux isoformes, NK1R *full-length* (fl), avec une terminaison intracellulaire de 96 acides aminés en C-terminal riche en résidus Ser/Thr pouvant être phosphorylés, et NK1R tronqué (tr), ne possédant pas le domaine intracellulaire de 96 résidus. NK1R est particulier puisqu'il peut, seulement dans son isoforme *full-length*, être couplé à une protéine G_s ou G_{q/11} sur sa 3^e boucle intracellulaire, alors que la protéine G couplée à l'isoforme tronquée n'a pas encore été identifiée (Figure 20) [421-423].

Ainsi, l'activation de NK1Rfl entraîne une augmentation intracellulaire d'AMPc, une activation de la PKA, de la PKCδ, un recrutement des voies de signalisation ERK et NF-κB et une élévation de la concentration de Ca²⁺ cytosolique. Le Ca²⁺ pouvant avoir pour origine le réticulum endoplasmique (par l'action d'IP₃) ou être d'origine extracellulaire (par l'action de la PKC et PKA sur des TRPs). L'activation de NK1Rtr n'entraîne ni une activation de la PKCδ, ni une augmentation de Ca²⁺ cytoplasmique, seulement un recrutement de la voie des ERK,

avec une cinétique d'activation plus longue, de l'ordre de 20 à 30 minutes après activation du récepteur tr, contre 1 minute pour le récepteur fl. L'expression de NK1R fl ou tr est ubiquitaire, avec une surexpression de l'isoforme tronquée chez les monocytes différenciés en DCs ou en macrophages [424].

La SP, une fois fixée sur NK1R, a besoin de l'action catalytique d'une métalloprotéase de surface, la néprilysine (*neutral endopeptidase*, NEP), pour se détacher du récepteur et permettre à ce dernier de retourner à son état de repos, c'est la désensibilisation. La conformation prise par NK1Rfl lors de sa liaison à la SP est un substrat pour la GRK (*G protein-coupled receptor kinase*), qui va phosphoryler les résidus Ser et Thr de la queue C-terminale, et permettre la fixation de la β -arrestine. Un fois fixée, la β -arrestine entraîne une endocytose du récepteur lié à la SP, qui dépend de la clathrine et de la dynamine. Dans la cellule, la vésicule d'endocytose prend le nom de signalome pour activer la voie des pERK. Le récepteur peut être rapidement recyclé et de nouveau exprimé à la surface cellulaire ou fusionné avec des endosomes tardifs dont le pH est plus bas pour permettre l'action de la métallopeptidase ECE-1 (*endothelin-converting enzyme 1*), dégradant la SP sur le récepteur et contrôlant son recyclage plus tardif [425]. Après de nombreuses stimulations par des fortes concentrations de SP, NK1R est ubiquitinylé et le signalome, après avoir activé la voie des ERK, fusionne avec un lysosome pour être définitivement dégradé [313, 421, 426-428].

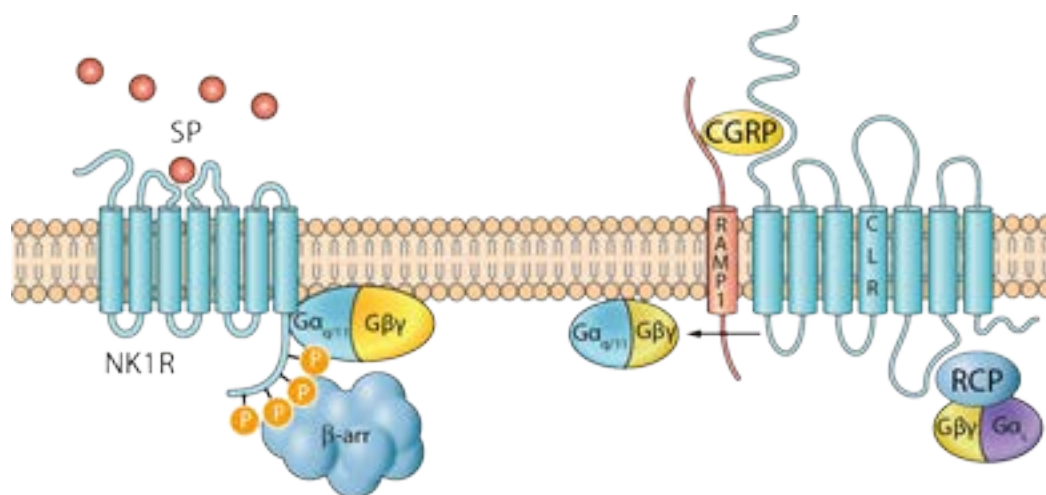


Figure 20 : Structures des récepteurs à la SP et au CGRP.

Le récepteur NK1R à la SP lie une protéine $G_{q/11}$ et une β -arrestine sur sa queue intracellulaire. Le couple CLR/RAMP1, qui reconnaît le CGRP, lie une protéine $G_{q/11}$ entre RAMP1 et CLR et une protéine G_s sur CLR par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice RCP (*receptor component protein*) [313, 429]. Image issue d'une réalisation originale.

Le CGRP est un peptide de 37 acides aminés, exprimé suivant deux isoformes présentant 90% d'homologie, l' α et le β CGRP. Les deux isoformes sont les produits de l'expression de deux gènes différents, le CALC I pour l' α CGRP et le CALC II pour le β CGRP. L'isoforme α CGRP est principalement exprimée par les neurones du SNC et du SNP, pendant que l'isoforme β CGRP est exprimée sélectivement par les neurones du système nerveux entérique. Le récepteur au CGRP est formé par le couple de récepteurs CLR (*calcitonin receptor-like receptor*), à 7 domaines transmembranaires, et RAMP (*receptor activity-modifying protein*), à un seul domaine transmembranaire. Il existe 3 isoformes de RAMP qui peuvent s'associer avec CLR. L'association CLR/RAMP2 donne le récepteur AM₁ et l'association CLR/RAMP3 donne le récepteur AM₂, qui peuvent tous les deux faiblement lier CGRP. La configuration CLR/RAMP1 est le récepteur proposant le plus d'affinité pour le CGRP, dont le site de liaison se trouve entre les deux parties N-terminales extracellulaires de RAMP1 et de CLR [430, 431]. Le duo CLR/RAMP1 est un GPCR, avec une protéine G_{q/11} au niveau de la première boucle intracellulaire de CLR, également lié à la partie intracellulaire de RAMP1, et avec une protéine G_s, liée par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice, la RCP (*receptor component protein*) à la 3^e boucle intracellulaire de CLR (Figure 20). L'activation du récepteur par le CGRP entraîne une activation de la PLC β 1 par la protéine G_{q/11}, conduisant à une activation de la PKC ϵ par la DAG et à une augmentation de la concentration de Ca²⁺ cytosolique par l'IP₃. L'activation de la protéine G_s de CLR dépend de l'expression de RCP par la cellule. La régulation de l'expression de RCP par la cellule est un moyen de contrôler l'activité du récepteur. L'absence de RCP ne change pas l'affinité de CGRP pour son récepteur, en revanche ce dernier ne pourra pas induire sa réponse médiée par le G_s, c'est-à-dire l'augmentation d'AMPc cytosolique et le recrutement des kinases dépendantes du second messager (PKA, ERK).

La désensibilisation de CLR/RAMP1 est similaire à la désensibilisation de NK1R, à part le fait que la NEP, la métalloprotéase extracellulaire, ne peut pas cliver le CGRP pour désensibiliser le récepteur. CLR doit lier une β -arrestine et être endocyté pour fusionner avec les exosomes tardifs contenant ECE-1, la métallopeptidase qui va dégrader la CGRP et recycler CLR (le réexprimer à la surface plasmique) [425, 432].

Les récepteurs à la SP et au CGRP ont des modes d'action intracellulaire et de désensibilisations similaires, et sont exprimés de façon ubiquitaire. De plus, les neuropeptides des nocicepteurs ne sont pas libérés uniquement dans la moelle épinière pour la transmission de l'information nociceptive. Les terminaisons des neurones dans la peau ont des vésicules synaptiques contenant des neurotransmetteurs, comme les neuropeptides. La génération du

potentiel d'action dans ces terminaisons est provoquée par les récepteurs TRPs, des canaux cationiques non sélectifs, mais entre autres calcique. Les vésicules apprêtées à la membrane se servent de cette augmentation de Ca^{2+} local pour entraîner la libération de leurs contenus, l'exocytose. Il y a donc libération des neuropeptides au site de génération du potentiel d'action, soit la zone de stimulation. De plus, le potentiel d'action est une élévation de courant membranaire entretenue et unidirectionnelle, c'est-à-dire que le potentiel d'action ne va se propager que dans un seul sens de la fibre nerveuse. Or, l'innervation sensorielle ne se résume pas à un axone unique pour un neurone, mais à une arborisation de prolongement axonaux, qui n'ont pas tous généré de potentiel d'action et qui peuvent donc être parcouru par un potentiel d'action généré par une extrémité de cette arborisation. Ainsi, un potentiel d'action ne va pas se propager uniquement d'une extrémité de l'innervation cutanée vers la moelle épinière mais aussi vers tous les prolongements du neurone, libérant ainsi les neuropeptides d'un seul et unique neurone autour de la zone de stimulation originelle.

La SP et le CGRP sont donc susceptibles d'agir sur toutes les cellules cutanées, stimulant la prolifération des kératinocytes et la génération de matrice extracellulaire par les fibroblastes, deux mécanismes indispensables au processus de cicatrisation et d'entretien de la peau [433-435]. Sur la vascularisation cutanée, les neuropeptides agissent sur les cellules endothéliales, entraînant une vasodilatation et augmentant la perméabilité des canaux lymphatiques [436-439]. Par action autocrine ou paracrine, les neuropeptides vont également engager les récepteurs à la SP et au CGRP de neurones nocicepteurs, participant ainsi à générer, amplifier ou entretenir des messages nociceptifs ou pruritogènes, pouvant conduire à une hyperalgésie [440, 441].

Même si ce ne sont pas les seuls à orienter la différenciation des fibres sensorielles, le trio de facteurs neurotrophiques NGF, BDNF et GDNF restent les principaux stimulateurs décidant de l'orientation peptidergique ou non des fibres, ainsi que les principaux facteurs à même de promouvoir la survie des neurones [442-444]. Le fait qu'un progéniteur devienne un neurone sensoriel myélinisé ou non, peptidergique ou non, dépend de l'expression des récepteurs Trk (*tropomyosin receptor kinase*) et du corécepteur RET (*receptor tyrosine kinase*) lors du développement. TrkA est le récepteur du NGF, TrkC est le récepteur du BDNF et RET est le corécepteur de GFRA1 (*glycosyl-phosphatidylinositol-anchored coreceptor*), récepteur du GDNF. Tous ces récepteurs se retrouvent exprimés chez tous les neurones sensoriels matures, mais c'est l'ordre d'expression de ces récepteurs pendant le développement qui va orienter la différenciation des fibres sensorielles. Ainsi une expression précoce de TrkC va

orienter les fibres sensorielles vers un profil myélinisé (fibres A δ) ; en y ajoutant l'expression précoce de TrkA, ces fibres myélinisées pourront produire des neuropeptides. L'expression tardive de RET entraîne la différenciation des fibres vers un phénotype sans myéline (fibres C) ; en y ajoutant l'expression tardive de TrkA, les fibres sans myéline pourront produire des neuropeptides [341, 445, 446].

4- Le génie tissulaire

4-1. L'utilisation de modèles de peau *in vitro*

4-1-1. Alternatives aux modèles animaux

L'expérimentation *in vitro* se présente comme une complémentarité, voire dans certains cas une substitution, aux expérimentations *in vivo*. Cependant, le choix d'un système *in vitro* ou *in vivo* dépend de l'analyse que l'on souhaite mettre en œuvre pour répondre à une hypothèse scientifique de la façon la plus adaptée. L'expérimentation *in vitro* ou *in vivo*, cherche donc à reproduire, mimer ou caractériser une fonction biologique, c'est-à-dire la « modélisation » de cette fonction où chaque modèle n'a son utilité qu'au travers de limites imposées par l'hypothèse de recherche.

Le choix d'un modèle *in vitro* se fait donc suivant la thématique de recherche ou l'objectif d'utilisation du modèle. Ces objectifs peuvent être multiples, comme vouloir modéliser la fonction biologique d'un type cellulaire ou d'un organe dans un environnement contrôlé, pour une étude fondamentale ou une exploitation industrielle. A ces objectifs, une dimension éthique a été mise en avant par William Moy Stratton Russell et Rex Leonard Burch en 1959 avec la règle des trois « R » (3-Rs) [447]. La Réduction, le Raffinement et le Remplacement régissent les bonnes pratiques d'expérimentation animale à l'heure actuelle. Un 4^e R est souvent ajouté, pour la Responsabilisation, rappelant que la vie animale est requise et nécessaire à l'avancement de la biologie, qu'elle doit donc être considérée avec respect, reflétant l'honnêteté et l'intégrité scientifique [448, 449].

4-1-2. Cadre légale de la modélisation *in vitro*

L'avantage de la modélisation *in vitro* est pouvoir directement travail avec du matériel humain pour se rapprocher des fonctions biologiques humaines et de s'affranchir de l'approximation inter-espèce. Ainsi, de plus en plus d'études de composés chimiques, de médicaments ou de matériaux à usage cosmétique se font au travers de tests normalisés *in vitro*, pour en prédire l'efficacité et la toxicité [450-454].

La normalisation de ces tests et la centralisation des données sont des composantes essentielles à la validation d'un modèle *in vitro*. Cette normalisation permet de s'assurer de la meilleure reproductibilité des résultats obtenus suite à l'utilisation de ces modèles [455]. Des organismes, comme le collectif AltTox, se proposent de recenser les modèle *in vivo* et leurs équivalents *in vitro* dans le cadre des tests de toxicité [456]. L'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE, *Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) regroupe 36 pays qui, entre autres, référencent et statuent sur la validité des modèles *in vitro* en publiant des guides pour la réalisation de tests de produits chimiques (*Guidelines for the Testing of Chemicals*) [457]. Les OECD *Test guidelines* (TG) sont numérotés, régulièrement mis à jour et servent de référence pour les tests nouvellement mis au point :

- OECD TG 431 : Méthode pour évaluer la corrosion sur un modèle de peau humaine
- OECD TG 439 : Méthode pour évaluer l'irritation sur un épiderme humain
- OECD TG 442 : Sensibilisation cutanée
 - o 442A et B = Test LLNA (*Local Lymph Node Assay*)
 - o 442C = Test DPRA (*Direct Peptide Reactivity Assay*)

Les nouveaux tests doivent être validés par des organismes officiels externes comme l'EURL ECVAM (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*). Les modèles sont proposés comme des alternatives à l'expérimentation animale et vont permettre l'élaboration de nouveaux médicaments ou de nouvelles substances chimiques, dont il est crucial pour la sécurité et la santé de tous que l'innocuité de ces produits soient évaluée au mieux.

La création d'un nouveau modèle et sa validation au travers des tests standardisés de l'OECD permettent d'exploiter ce modèle sous des dimensions économiques et industrielles. Le système de prestation de service, accessible aux industriels, comme aux laboratoires ayant pour objectif premier la recherche fondamentale, permet de confier à un tiers l'évaluation de la

sensibilisation cutanée la toxicité, du potentiel corrosif, irritant ou sensibilisateur d'un composé par un protocole dédié. Concernant la sensibilisation, il s'agit du protocole AOP (*Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation*) initialement OECD TG 168. Le protocole AOP se solde souvent par un test *in vivo* sur la souris, comme le test LLNA. Ce test repose sur l'application d'un composé sur l'oreille de la souris et l'étude de la prolifération de lymphocytes dans le ganglion drainant 6 jours après la stimulation.

4-1-3. Modèles *in vitro* en 2D

La Monocouche ou Monoculture

La peau étant un organe composé de plusieurs structures, la culture d'un seul type cellulaire composant sa structure représente un premier pas pour l'évaluation de l'impact d'une substance sur les cellules cutanées humaines. C'est le cas du test KeratinoSensTM (OECD 442D), qui utilise la lignée HaCaT de kératinocytes humains pour quantifier leurs réponses antioxydantes en réaction à des composés [458].

Cependant, la sensibilisation cutanée fait appel au système immunitaire pour s'établir, et ne peut se résumer à la réaction des cellules majoritaires de la peau, les kératinocytes ou les fibroblastes. Le test h-CLAT utilise une lignée humaine de monocytes leucémiques, THP-1, au comportement et à la morphologie similaire aux DCs, et évalue l'expression de CD86 suite à l'incubation avec un composé [459]. Le test MUSST (Myeloid U937 Skin Sensitization Test) observe les mêmes paramètres en utilisant la population de lignée cellulaire myéloïde U937, adoptant des caractéristiques similaires aux macrophages [460].

La co-culture

La co-culture en monocouche permet d'évaluer l'interaction entre les cellules structurelles et les cellules immunitaires. Plusieurs modèles se proposent de réunir les cellules HaCat et THP-1 et de réaliser les mêmes analyses que les tests KeratinoSensTM et h-CLAT, pour améliorer la fiabilité de ces deux tests en se basant sur le fait que les kératinocytes sont aussi sensibles aux signaux de danger et peuvent influencer la réponse des cellules immunitaires par la production de cytokines pro-inflammatoires [461-463].

Les lignées cellulaires, même si elles conservent leurs fonctions métaboliques et leurs phénotypes, peuvent, au fur et à mesure des passages, perdre leur identité [464, 465]. Un passage est un cycle d'amplification, de congélation et de décongélation. L'absence de structure tridimensionnelle, nécessaire à l'amplification, fait que les cellules vont perdre leur identité dite « tissulaire », c'est-à-dire leurs capacités à recréer leurs fonctions biologiques, pas seulement en tant que cellules isolées mais aussi en tant qu'élément d'un tissu communiquant avec d'autres types cellulaires. Ce phénomène est renforcé par le fait que les lignées cellulaires sont, comme les HaCat et THP-1, des cellules au profil cancéreux dont le génome ne correspond plus à celui d'une « cellule normale humaine ». L'effet de perte d'identité tissulaire est plus rapide avec les cellules non immortalisées issus de cultures primaires qui supportent beaucoup moins de passage que les lignées immortalisées.

Cependant, travailler avec des cellules primaires permet justement de modéliser au mieux la fonction biologique d'un tissu [466]. C'est ce que propose le test LCSEA (*Loose-Fit Coculture-Based Sensitization Assay*) en reproduisant l'analyse des tests KeratinoSensTM et h-CLAT à partir d'une coculture de kératinocytes de peau normale humaine et de DCs différenciées à partir de monocytes sanguins [467, 468].

4-1-4. Modèles *in vitro* 3D

Après la reproduction de l'interaction entre différents types cellulaires cutanés avec la coculture, la complexification du modèle passe par la reproduction de la structure de la peau.

L'épiderme et le derme peuvent être structurellement recréés dans des modèles de monoculture. La fonction barrière de l'épiderme peut être obtenue à partir d'une monocouche de kératinocytes, placée en interface air-liquide. Le contact avec l'air induit une différenciation des kératinocytes et déclenche la stratification de l'épiderme au fur et à mesure de leurs proliférations. La présence d'une barrière épidermique permet de choisir entre une application systémique d'un composé, dans le milieu de culture, ou une application topique, sur la surface de l'épiderme reconstruit, afin de tenir compte de la capacité du composé à pénétrer la peau. L'analyse de l'intégrité structurelle de l'épiderme pourra être un nouveau paramètre à prendre en compte pour l'évaluation d'un composé [469, 470].

Des modèles similaires existent avec uniquement des fibroblastes, produisant de la matrice extracellulaire, suite à l'ajout d'acide ascorbique au milieu de culture [471, 472]. Cette matrice, principalement composée de fibroblastes, permet d'évaluer la pénétration ou la persistance d'un composé dans le derme, ou sa capacité corrosive en se basant sur une analyse structurelle du modèle [473, 474].

L'organotypique et génie tissulaire

La peau est un organe à part entière et un épiderme ou un derme, séparés, ne peuvent pas être considéré comme des modèles de peau. La culture organotypique est la mise en œuvre des moyens techniques visant à la reconstruction d'un organe, aussi bien dans sa structure que dans sa fonction [475]. Le génie tissulaire est l'ensemble des techniques permettant la réalisation d'un modèle organotypique. Ces moyens techniques comportent le choix d'un support de culture adapté, le moyen d'ensemencement des différents types cellulaires et l'origine de ces types cellulaires [476, 477].

L'explant de peau normale humaine est un cas particulier de la modélisation organotypique. Il s'agit d'un modèle *ex vivo* répondant cependant à la définition d'un modèle organotypique. Pour être fonctionnel, ce modèle n'a ni besoin de support de culture ni d'étapes de culture cellulaire préalables et il peut être proposé comme alternative aux modèles animaux pré-cliniques [478-480]. L'inconvénient de ce modèle est justement le fait qu'il soit un explant. Cela signifie que le modèle se trouve privé de fonctions essentielles au sein de l'organisme, comme l'innervation sensorielle et la vascularisation lymphatique et sanguine. La privation de ces fonctions et la lésion tissulaire consécutives à l'extraction impactent la stabilité du système immunitaire et place l'explant dans un contexte pro-inflammatoire pouvant impacter la longévité du modèle ou la validité des tests pré-cliniques [434, 480].

Un autre moyen de s'affranchir d'un support de culture exogène est de faire synthétiser leur propre matrice aux fibroblastes, comme dans le modèle de derme seul [471, 472], puis d'y ajouter les kératinocytes et placer le modèle en interface air-liquide pour permettre la stratification de l'épiderme. Le support de culture sera uniquement composé de matrice endogène et il est possible de contrôler son épaisseur en empilant des feuillets de monocouches de fibroblastes et de créer un derme pseudo-vascularisé en installant également des cellules endothéliales. L'empilement des feuillets cellulaires entraîne leur fusion et donc la formation d'un tissu homogène, c'est la technique d'autoassemblage [481-484].

L'incorporation des cellules dans un support de culture tridimensionnel (*scaffold*) préexistant permet une meilleure différenciation des types cellulairesensemencés, ainsi qu'une meilleure prolifération des cellules colonisant la structure. La surface et l'épaisseur du modèle, ainsi que la densité cellulaire peuvent être plus facilement contrôlées en utilisant ces supports de culture [485, 486]. Pour travailler à partir d'une matrice extracellulaire d'origine endogène, il est possible d'utiliser un explant de peau décellularisée. La structure et la composition du support sont identiques à l'origine tissulaire des cellulesensemencées et offre donc une biocompatibilité parfaite. Cependant, la peau normale humaine décellularisée comporte des désavantages. Sur une surface donnée, la structure et la composition de la peau humaine ne sont pas homogènes. De plus, l'historique du donneur ajoute de la variabilité inter-individuelle aux modèles utilisant ce type de support de culture [487-489].

L'utilisation d'un support de culture artificiel, biocompatible, issu d'un protocole de synthèse normalisé permet d'accroître la reproductibilité et la répétabilité du modèle [485, 490]. Ce support de culture artificiel peut avoir des composants d'origine synthétique, comme le polycaprolactone (PCL), et le poly-ethylene-glycol (PEG) ou d'origine naturelle, comme le collagène (souvent bovin ou porcin) et le chitosan. Le collagène, même d'origine animale, va offrir la meilleure biocompatibilité pour les cellules humaines que des composants synthétiques. De plus, afin de respecter un des objectifs premiers de la modélisation *in vitro*, il est possible d'utiliser du collagène d'origine humaine [491].

Cependant, la matrice extracellulaire du derme humain n'est pas composée uniquement de collagène. L'ajout de chitosan à une matrice de collagène permet d'augmenter la résistance mécanique du support de culture. Le chitosan est un polymère biocompatible naturel, produit de la désacétylation de la chitine (carapace) de crustacés. La matrice de collagène-chitosan offre un maillage (structure poreuse tridimensionnelle) optimal pour les cellules la colonisant, accroissant leurs proliférations [492, 493]. Enfin, la fonction barrière de l'épiderme se trouve améliorée lorsque les kératinocytes se différencient sur ce type de matrice [494].

Vers une complexification des modèles de peau normale humaine

Jusqu'à présent, les modèles organotypiques étaient comparés suivant la composition de leur matrice extracellulaire et donc au travers de la prolifération des fibroblastes et la différenciation des kératinocytes. La composition kératinocyte/fibroblaste peut être suffisante pour l'étude de la cicatrisation et la régénération cutanée [486, 495, 496], la médecine régénératrice [12, 486, 497], ou encore le développement de nouveaux médicaments et l'étude de la sensibilisation cutanée [498]. La nécessité de complexifier ce système est une volonté de se rapprocher le plus possible du concept de modèle organotypique, parce que l'ajout de nouveaux types cellulaires signifie l'ajout de nouvelles fonctions et donc de nouvelles analyses possibles.

L'ajout de cellules endothéliales permet la formation d'une structure de pseudovaisseaux (sanguins ou lymphatiques) dans le derme. Ces pseudovaisseaux peuvent servir à la fois à l'étude de l'angiogenèse cutanée ou à compléter le derme avec une structure de soutien [499, 500]. Un modèle prévascularisé permet également d'accroître la guérison en cas de greffes de modèles [501].

L'immunocompétence peut être incluse sans culture 3D, comme dans le test LCSA. Les cellules immunitaires, notamment les cellules présentatrices d'antigène, sont importantes pour la mise en place de l'inflammation et offrent une grille de lecture supplémentaire avec l'étude de cette étape-clé de la sensibilisation cutanée. Des LCs, des DCs et des macrophages dérivés de monocytes sanguins sont les cellules les plus couramment ajoutées lors de la mise en place de l'immunocompétence des modèles [502-505]. De plus, ces cellules interviennent dans la génération de pathologies cutanées, comme la dermatite atopique et le psoriasis. Les dériver à partir du sang d'individus malades, permettrait de modéliser *in vitro* ces pathologies, afin de mieux les comprendre ou tester de nouveaux traitements [185, 502, 506, 507].

L'ajout d'une innervation sensorielle permettrait d'établir un modèle de peau sensible aux signaux nociceptifs. Ces signaux pouvant être d'origine chimique, l'innervation cutanée devient un atout non négligeable dans les études d'irritation et de sensibilisation [508, 509]. De plus, la libération de neuropeptides, consécutifs à l'activation des neurones sensoriels, a un impact significatif sur la croissance des kératinocytes et augmentent le processus de régénération et de cicatrisation de l'épiderme [4, 434, 438].

4-2. Les cellules souches pluripotentes induites

Toute modélisation, et reconstruction par génie tissulaire, implique d'abord l'extraction et/ou la culture des cellules avant leur intégration au modèle. Toutefois, des cellules comme les DCs immatures de la peau et les neurones sensoriels ont perdu leur capacité à proliférer avec l'acquisition de leur phénotype différencié. De plus, ces cellules comme les progéniteurs multipotents dont elles sont issues sont difficiles à extraire chez l'homme adulte. L'ajout d'une innervation d'origine humaine à un modèle reconstruit *in vitro* nécessite la génération de neurones ou de progéniteurs de cellules neuronales grâce à une reprogrammation cellulaire.

L'identité cellulaire, dans le cas d'un organisme pluricellulaire, est la notion selon laquelle la modulation de l'expression du génome entraîne la production de protéines propres aux fonctions spécialisées d'une cellule, travaillant en symbiose avec les autres cellules aux fonctions spécifiques [510]. Le paysage de Waddington est un concept permettant de visualiser la différenciation cellulaire comme une bille descendant une pente vallonnée. Plus elle s'enfoncera dans les vallons, plus elle sera différenciée et plus il lui sera difficile de franchir les crêtes, la séparant des autres vallons, c'est-à-dire des autres cellules différenciées (Figure 21B) [511]. Cette métaphore du développement a été proposée pour la première fois, en 1939, par Conrad Hal Waddington et est souvent mise à contribution pour expliquer les principes de la reprogrammation cellulaire, comme la transdifférenciation et la reprogrammation par étapes de pluripotence [512]. La transdifférenciation est la reprogrammation de cellule différenciées vers un autre type cellulaire (Figure 21C), différencié également, sans passer par un stade intermédiaire de cellules souches. La reprogrammation par étapes de pluripotence commence par une première étape de dédifférenciation, soit le passage d'une cellule différenciée à un stade de cellule souche. La seconde étape permet le passage de la cellule souche vers un stade différencié, c'est la redifférenciation (Figure 21D).

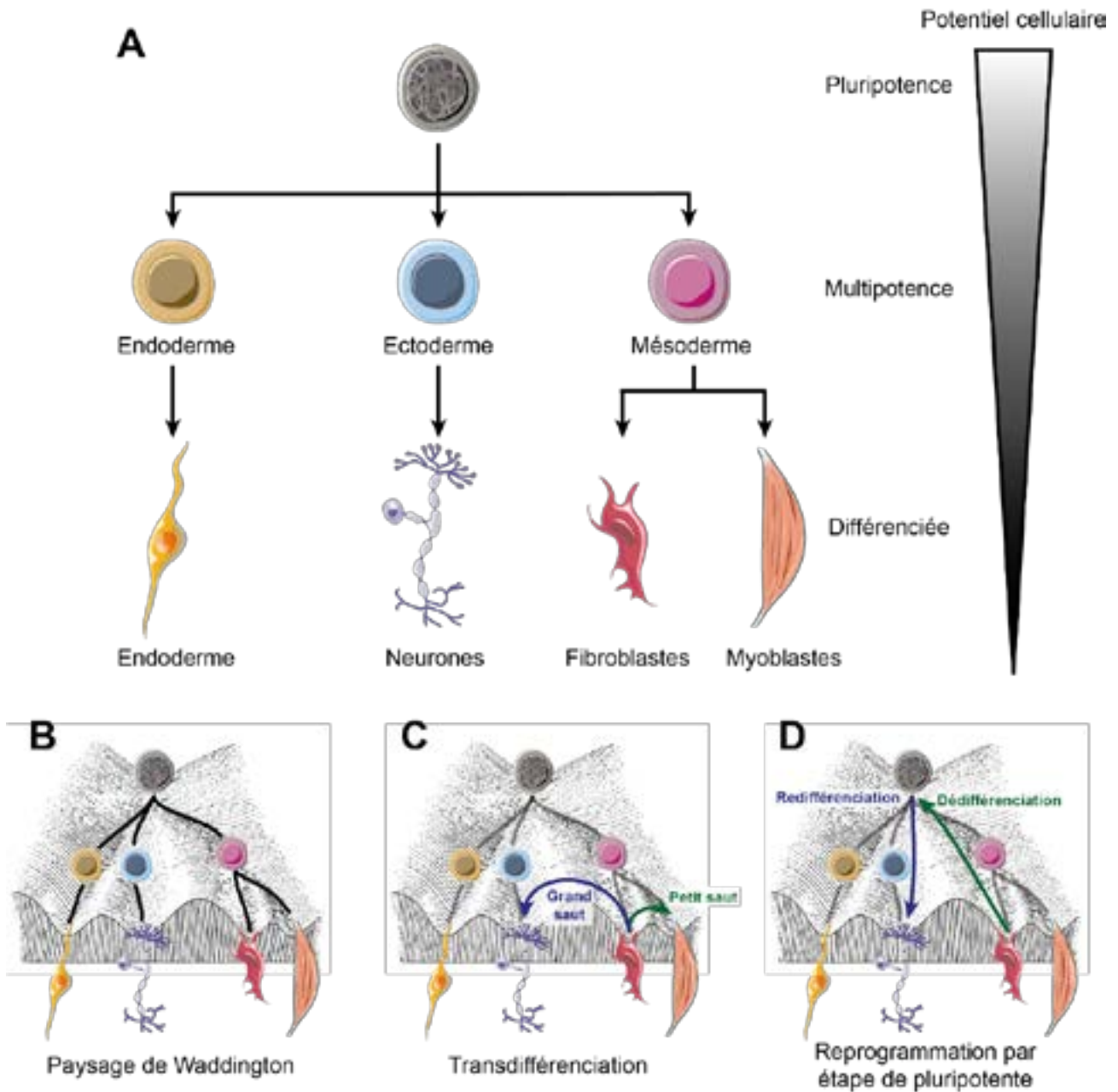


Figure 21 : Schématisation de la différenciation et de la reprogrammation cellulaire par la métaphore du paysage de Waddington.

Design original de Cécile Delance, utilisé et modifié avec autorisation et inspiré de la banque d'images libres de droits *Servier Medical Art*.

L'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines est une des premières solutions qui fut retenue pour l'obtention de neurones différenciés [513, 514]. Ces cellules sont des lignées, comme la UC06, obtenues à partir de dons de patientes traitées contre l'infertilité et sont souvent envisagées pour des traitements de thérapie cellulaire [513, 515]. Cependant, l'utilisation des cellules souches embryonnaires d'origine humaine est soumise à de nombreuses controverses éthiques, limitant leurs utilisations [516].

La transdifférenciation se présente comme une alternative plus simple, puisqu'elle ne requiert pas de culture préalable de cellules souches. Par expression ectopique d'une combinaison de facteurs de transcription, la cellule va quitter son statut de cellule différenciée et acquérir un profil intermédiaire, l'orientant vers la différenciation spontanée du type cellulaire voulu. C'est ce principe qu'a démontré en 1987 Davis, considéré comme un des pionniers de la transdifférenciation, avec le facteur MyoD, en générant des myoblastes à partir de fibroblastes [517]. A partir d'une culture de fibroblastes et en identifiant les facteurs de transcriptions adéquats, il est possible de générer tous types de neurones désirés [518], y compris les neurones sensoriels [519, 520]. Cette technique présente l'avantage de générer directement une culture de neurones sans toucher au génome des cellules, si la technique de reprogrammation choisie se base sur la transfection par ARN. La modélisation de pathologies, dépendantes de la conservation du patrimoine génétique de la cellule, devient alors possible en utilisant cette reprogrammation directe [521, 522]. Cependant la stabilité de la transdifférenciation pour les cellules proliférantes dépend de la robustesse de la transfection et du nombre de facteurs de transcription utilisés. Plus une cellule différenciée est éloignée, dans l'embranchement développemental, d'une autre cellule différenciée, plus il faudra de facteurs de transcription pour lui faire franchir les « grandes » crêtes du paysage de Waddington. Pour les cellules non-proliférantes, comme les neurones, le désavantage est de devoir réitérer la transfection à chaque fois que l'on souhaite obtenir une nouvelle culture [520].

Les cellules souches pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) représentent une alternative très intéressante aux cellules souches embryonnaires et à la transdifférenciation. La génération d'iPSCs repose sur un principe similaire à la transdifférenciation. Ici la combinaison de facteurs de transcriptions introduits dans la cellule, a été élaborée par l'analyse des facteurs oncogénétiques, c'est-à-dire ceux permettant le maintien du stade indifférencié. C'est Kazutoshi Takahashi et Shinya Yamanaka qui ont découvert, en 2006, la combinaison de quatre facteurs de transcriptions nécessaires à l'induction d'iPSCs à partir de fibroblastes murins, puis en 2007, à partir de fibroblastes humains adultes

[523, 524]. Les quatre facteurs, connus sous le nom de cocktail de Yamanaka sont : Oct3/4 ; Sox2 ; c-Myc et Klf4, remplaçant de Nanog initialement utilisé dans l'étude de 2006. A la suite de cette découverte, ce cocktail a été modifié par l'ajout de facteurs comme Lin28 [525], Esrrb [526] ou Tbx3 [527], dans le but d'augmenter le taux de transfection et la stabilité de la reprogrammation. Le taux de transfection correspond au pourcentage des cellules différenciées ayant intégré les facteurs de transcription et s'étant dédifférenciées. La méthode de reprogrammation, tout autant que le choix des facteurs de transcription, impacte significativement le taux de transfection. Il existe plusieurs méthodes de reprogrammation pour l'induction d'iPSCs mais 4 sont couramment utilisés : l'emploi d'un vecteur viral, intégratif ou non-intégratif, et l'emploi de matériel génétique nu, ARN ou ADN.

Les lentivirus sont des rétrovirus, c'est à dire des virus à ARN dotés d'une enzyme permettant la rétrotranscription de leur matériel génétique en ADN (la rétrotranscriptase) et l'intégration de cet ADN dans le génome de la cellule. L'emploi de ce type de vecteur pour l'induction iPSC offre le meilleur taux de transfection, cependant l'intégration, au hasard, des facteurs de transcription dans le génome de la cellule peut engendrer des problèmes pour la stabilité de l'iPSC ou pour la différenciation [528, 529].

L'ADN épisomal ou épisome ou ADN circulaire est un ADN extrachromosomique qui peut se répliquer de manière autonome. Cet épisome peut être utilisé au sein d'un vecteur viral, comme les adénovirus ou les Polyomavirus, ou peut être utilisé seul. Dans ce dernier cas, ne pas devoir utiliser de vecteur viral est une force de cette technique, pour le maintien de la culture de l'iPSC et ses utilisations futures, puisque le matériel viral doit être éliminé de la culture pour éviter tout risque de contamination. Cependant, même si le risque d'interaction aléatoire dans le génome des épisomes est faible, il est possible que les dommages de cette intégration portent préjudice à la culture d'iPSC [530, 531].

La reprogrammation par ARN messenger est une méthode non intégrative et, une fois la reprogrammation effectuée, robuste. Cependant cette méthode nécessite une grande quantité de matière à transfecter parce que le taux de génération d'iPSCs est faible et dépend énormément de la provenance des cellules. Par exemple, des cellules d'un patient jeune sont plus facilement reprogrammables par cette méthode que des cellules d'un patient âgé [530, 532, 533].

L'emploi de virus de Sendai, une méthode non intégrative et également à ARN, permet de générer des iPSCs. Du virus de Sendai permet un taux de transfection aussi élevé que les lentivirus, avec l'avantage de ne pas intégrer son matériel au génome de la cellule. Cette méthode permet également de transfecter très peu de cellules différenciées, comme des PBMCs de patients [530, 534, 535]. Le matériel viral doit être éliminé pour éviter tout risque d'interaction avec le génome de l'hôte et le principal problème actuel du virus est son élimination lente qui ne peut se faire qu'au terme de longues cultures des iPSCs [536-538].

L'obtention d'iPSCs représente un enjeu crucial dans la modélisation de pathologies, puisque les méthodes non-intégratives laissent le génome du patient intact. Le fait de pouvoir le maintenir en état indifférencié *in vitro* permet de constituer des banques cellulaires regroupant les différentes variabilités d'une seule pathologie [539-542]. De plus, la différenciation des iPSCs ne conduit pas obligatoirement vers un stade terminal de cellules différenciées fonctionnelles, elle peut se faire vers des stades intermédiaires de cellules multi ou unipotentes comme les progéniteurs neuronaux, les cellules souches hématopoïétiques ou les précurseurs de cellules dendritiques [543-547]. Enfin, comme les iPSCs peuvent être amplifiées et maintenues en culture, il est possible de différencier une même lignée d'iPSC en plusieurs types cellulaires différents. Cela permet la création de modèles *in vitro* recréant l'interaction de plusieurs types cellulaires provenant de la même lignée de cellule iPSC et donc du même individu, sain ou pathologique [546, 548-551].

4-3. Les interactions entre système nerveux et système immunitaire

L'interaction entre le système nerveux et le système immunitaire représente un enjeu incontournable pour la modélisation *in vitro*. En effet, dans la modélisation cutanée, les études de sensibilisations sont autant pertinentes sur des systèmes innervés ou immunocompétents et vont donner des informations différentes. Par exemple, un modèle immunocompétent sera plus à même de statuer sur le potentiel pro ou anti-inflammatoire d'un composé, alors qu'un modèle innervé sera plus compétent pour discriminer les composés au pouvoir irritant ou potentiellement nocicepteurs. Le système nerveux et le système immunitaire ont donc comme point commun d'être tous les deux compétents pour percevoir les signaux de danger. Certes, l'origine de ces signaux ne sont pas, dans tous les cas, les mêmes et les deux systèmes ont leurs propres moyens, par l'expression de récepteurs spécifiques, pour percevoir ces signaux de danger. Mais l'aboutissement de cette perception est l'intégration du signal pour permettre le

recrutement de mécanismes effecteurs servant à maintenir l'homéostasie [420]. La perception de signaux de danger, quelque soit le système les percevant, suppose donc une communication étroite entre neurones et cellules immunitaires.

Comme il a déjà été présenté, le système immunitaire impacte directement l'activation des neurones sensoriels nocicepteurs. La libération d'histamine par les mastocytes entraîne l'activation directe des neurones nocicepteurs par les récepteurs H₁ et H₄ (Partie 3-4-7). De plus, les neurones sensoriels peuvent être activés par d'autres cellules que les cellules du système immunitaire, comme les kératinocytes qui vont libérer du TSLP et du NGF en cas d'inflammation. Le TSLP va activer les fibres nociceptives exprimant le récepteur TSLPR. Le NGF peut également activer les neurones sensoriels par p75^{NTR}, qui est exprimé et activé par l'intermédiaire d'une liaison prolongée de TrkA et du NGF [552, 553].

Or, à la suite d'une activation les neurones peptidergiques libèrent de la SP et du CGRP directement dans la peau, influençant la porosité des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ces neuropeptides peuvent également agir sur les cellules immunitaires présentes dans la peau, en amplifiant la dégranulation des mastocytes, par exemple [554]. Il y a donc un dialogue entre le système nerveux sensoriel et le système immunitaire au niveau de la peau lors de l'inflammation.

Les CPA, comme les DCs, très utilisées dans la modélisation cutanée et étant au cœur la problématique qui nous intéresse, peuvent voir leurs réponses influencées par les neurones sensoriels. Ceci est dû à l'expression par les DCs et LCs des récepteurs NK1R et CLR/ RAMP1, qui les rend activables par leurs neuropeptides associés [313, 429].

Chez la souris, tout d'abord, une activation de NK1R *in vitro* sur des DCs différenciées de cellules de moelle osseuse (*Bone Marrow Derived Murine DCs*) entraîne une augmentation de la proportion de DCs activées, c'est-à-dire exprimant CD86. De plus, ces DCs avec leur NK1R activé ont un profil d'inflammation entraînant la sécrétion d'IL-12 et l'inhibition de la production d'IL-10, correspondant à un profil T_H1 [555]. La même équipe a démontré, *in vivo*, que l'activation de NK1R augmente la longévité des DCs dans les ganglions lymphatiques drainants [428].

Encore chez la souris, dans un modèle *in vitro*, des LCs extraites de digestions d'épiderme, préalablement stimulées avec du CGRP et mises en présence de LT, entraînent une orientation T_H2, par augmentation de la production d'IL-4 [556]. Cependant lorsque ces mêmes LCs sont mises en présence de cellules endothéliales préalablement stimulées par du CGRP,

elles vont induire une réponse de type T_H17 . Dans un modèle *in vivo* murin d'infection cutanée par *Candida albicans*, les dDCs et les LCs murines vont provoquer une réponse T_H17 , bien adaptée à cette infection fongique. Cette réponse T_H17 est potentialisée par la libération de CGRP par les neurones sensoriels directement activés par *C. albicans*. Le CGRP libéré dans la peau va entraîner la libération d'IL-23 par les dDCs CD301b⁺, qui vont activer une population de LT résidante de la peau, les $\gamma\delta T$ qui vont libérer de l'IL-17. Cette production d'IL-17 par les $\gamma\delta T$ n'est possible que parce que les dDCs sont activées par le CGRP [197].

Des observations similaires ont été rapportées dans un modèle *in vivo* murin de psoriasis. L'application d'imiquimod au niveau cutané est un modèle connu de psoriasis, entraînant l'augmentation de la production d'IL-23, d'IL22 et d'IL-17 par les cellules immunitaires, aboutissant à une hyperprolifération des kératinocytes caractéristique de la pathologie [557]. L'imiquimod activerait directement les nocicepteurs exprimant TRPV1, libérant de la Substance P et du CGRP dans la peau. Les dDCs activées par les neuropeptides vont libérer de l'IL-23, qui va activer les $\gamma\delta T$. Ce sont ces T résidents de la peau qui sont à l'origine de la libération d'IL-17 et d'IL22, responsables de la prolifération des kératinocytes [8]. Ainsi, les nocicepteurs sont des nouvelles cibles thérapeutiques envisagées dans des pathologies inflammatoires cutanées chroniques comme le psoriasis [554, 558].

Chez l'homme, je n'ai pas trouvé d'études permettant de conclure sur la possible orientation de la réponse des T_H par des CPAs sous influence de neuropeptides, ou encore sur l'influence qu'ont ces neuropeptides sur des DCs cutanées isolées de peau. En revanche, il a été démontré que les monocytes humains expriment NK1R et que son activation entraîne le recrutement de la voie des ERK [559]. De plus, l'activation par du CGRP de MonoDC humaines *in vitro* diminuerait leur expression de CD86 en cas de stimulation par du LPS [560].

Même si l'impact direct des cellules immunitaires et de leurs sécrétions sur les nocicepteurs est relativement bien connu, l'action retour de ces nocicepteurs sur les DCs cutanées reste flou. De plus, les DCs humaines ne sont pas sensibles aux mêmes stimuli que les fibres nociceptives. Par exemple, les DC humaines expriment faiblement TRPV1 à leur surface mais n'initient de réponse pro-inflammatoire suite à l'engagement de ce récepteur [561, 562].

L'étude de l'interaction neuro-immunitaire cutanée, notamment l'impact de l'activation des nocicepteurs sur l'orientation de la réponse immunitaire par les DCs, représente une perspective intéressante dans l'étude de pathologies comme le psoriasis ou de la réponse cutanée consécutive à l'application d'un sensibilisateur.

5- Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce travail de recherche constitue à recréer, par génie tissulaire, un modèle de peau humaine, comprenant un épiderme stratifié et un derme, avec une pseudo-vascularisation, une immunocompétence apportée par des cellules dendritiques, et une innervation sensorielle nociceptive. Ce modèle servira d'outil d'analyse à l'interaction entre système immunitaire et système nerveux cutané, à travers l'exemple des DCs et neurones nociceptifs.

5-1. Action de la substance P et du CGRP sur les cellules dendritiques humaines

En parallèle de la mise au point du modèle de peau, l'impact direct de la SP et du CGRP sur les DCs humaines sera évalué. Nous observerons la capacité des DCs à s'activer dans une monoculture *in vitro* et à migrer hors d'un explant de peau *ex vivo*, sous influence des neuropeptides.

5-1-1. Modulation de la maturation des DCs par les neuropeptides

L'utilisation de DCs différenciées *in vitro* par du GM-CSF et de l'IL-4 à partir de monocytes sanguins humains (MonoDCs) servira à l'étude de l'action de neuropeptides sur les DCs cutanées. Ces MonoDCs diffèrent de celles se différenciant naturellement dans la peau normale humaine en contexte pro-inflammatoire (Introduction, partie 2-4-3) par l'expression de CD1a et une faible expression de CD14. L'avantage des MonoDCs générées *in vitro* est d'avoir un phénotype immature après différenciation. Ces cellules sont ainsi capables induire des réponses T_H1 , T_H2 ou T_H17 *in vitro* en fonction des conditions de stimulation [563-565]. Il faut toutefois noter que la différenciation des monocytes sanguins en MonoDCs génère une population homogène ne pouvant pas refléter toutes les réponses de toutes les différentes populations de DCs cutanées en cas de stimulation [566]. Même si les MonoDCs restent un bon modèle *in vitro* de maturation et d'orientation de la réponse des T_H , leurs fonctions ne doivent donc pas être extrapolées à l'ensemble des réactions potentielles induites par les cDCs du derme et les LCs [565, 567].

La première étape dans l'utilisation des MonoDCs comme modèle sera de vérifier leurs expressions des récepteurs NK1R et CLR/RAMP1. La maturation des MonoDCs se fera avec du LPS et sera modulée par la SP et le CGRP. Leurs phénotypes après stimulation seront analysés par cytométrie en flux pour discerner les MonoDCs matures (HLA-DR^{high}, CD86⁺, CD83⁺) des immatures (HLA-DR⁺, CD86⁻, CD83⁻).

5-1-2. Modulation de la migration des DCs par les neuropeptides

La migration des DCs hors de leurs tissus pour la présentation de l'antigène est une caractéristique que les neuropeptides sont susceptibles de moduler. Un explant de peau normale humaine correspondant à l'épiderme et au derme supérieur sera placé sur un filtre en nylon à l'interface avec entre l'air et le milieu de culture. La mise en culture d'un explant place la peau dans un contexte pro-inflammatoire et une partie des DCs cutanées vont migrer hors du tissu et se retrouver dans le milieu de culture. Par analyse de cytométrie en flux nous distinguerons 3 populations de DCs migrantes, les LCs (CD207⁺), les DCs CD1a⁺ et les DCs CD14⁺.

5-2. Caractérisation physiologique et fonctionnel du modèle de peau immunocompétent et innervé par des neurones murins

En monoculture, les MonoDCs ne se maintiennent pas leur état immature sur de longues périodes après leur différenciation. Le simple ajout de ce type cellulaire dans un modèle de peau innervé, déjà caractérisé [12], représente une première problématique.

5-2-1. L'intégration des MonoDCs immatures dans un derme humain reconstruit

Le modèle de derme simple a été choisi pour évaluer l'intégration des MonoDCs et la compatibilité des cellules avec le support de culture et les fibroblastes et cellules endothéliales provenant d'autre donneurs. Les cellules endothéliales, à cause des facteurs chemoattractants, comme le CCL19 et le CCL21, qu'ils peuvent sécréter, représente un atout pour la stabilité des MonoDCs dans le modèle. Nous évaluerons, par observation en immunofluorescence, la quantité optimale de MonoDCs à ensemercer pour recréer une immunocompétence comparable à la peau normale humaine.

5-2-2. Caractérisation du phénotype des MonoDCs dans le modèle de peau et de leur capacité à migrer en cas d'activation

Une fois les MonoDCs intégrés au modèle de peau (derme, vascularisation et épiderme), nous chercherons à évaluer leurs phénotypes à la fin de la culture, nécessaire à la formation de l'épiderme. Nous chercherons à observer leurs états de maturation, suite ce long temps de culture et également leurs capacités à répondre à des activations au LPS. Cette réponse pourrait se traduire par une migration des MonoDCs hors du modèle et par l'expression de CD86 par les cellules restées hors du modèle.

5-2-3. Utilisation du modèle de peau innervé, vascularisé et immunocompétent comme outils de détections de molécules sensibilisatrices.

Assembler neurones issus d'embryons de souris et MonoDCs dans un modèle de peau vascularisé, avec un épiderme stratifié, nous permet d'étudier l'interaction entre le système nerveux et le système immunitaire cutané. Nous avons choisi le LPS comme activateur stricte des MonoDCs et la capsaïcine, comme activateur stricte des neurones murins. Ces deux contrôles vont nous permettre d'évaluer la réponse de notre modèle face à la stimulation de molécules sensibilisatrice. Ces molécules sont : le Dinitrochlorobenzene (DNCB), Acide-DL-Tartarique (TA), le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) et l'Ethylène glycol diméthylacrylate (EG), recensés du sensibilisateur le plus extrême au plus faible par le test LLNA. Nous cherchons comparer la classification d'un modèle de sensibilisation *in vivo* face aux réponses de notre modèle. La réponse du modèle s'observera par quantification de cytokines présents dans les surnageant de culture et pas observation de la morphologie des tissus par immunofluorescence.

Pour compléter l'étude, nous choisissons d'utiliser, 4 constructions :

- Modèle de peau avec un derme vascularisé et un épiderme stratifié : F + E + K
- Modèle de peau immunocompétente : F + E + K + MonoDCs
- Modèle de peau avec une innervation d'origine murine : F + E + K + DRGs
- Modèle de peau complète, vascularisée, immunocompétente avec innervation d'origine murine : F + E + K + DRGs + MonoDCs

Ces constructions vont permettre, la fois d'évaluer la pertinence de nos contrôles comme sensibilisateurs stricts d'un système, mais également de préciser le mode d'actions des sensibilisateurs.

5-3. Développement d'un modèle de peau innervée par des neurones sensoriels humain et des cellules de Schwann dérivés d'iPSCs

L'objectif final ce projet de recherche est d'allier les résultats précédemment obtenus pour orienter le modèle vers une construction comprenant uniquement des cellules d'origine humaine. Les neurones humains proviennent de la différenciation d'iPSCs et se doivent de respecter les mêmes caractéristiques morphologiques que fonctionnelles que les neurones murins.

Nous évaluerons le phénotype des neurones humain en culture 2D et intégrés au modèle de peau, notamment leurs expressions des TRPs et des neuropeptides. Les neurones murins et humain seront stimulés par des agonistes de TRPV1 et quantifier leurs capacités à sécréter de la SP et du CGRP.

La capacité d'innover un tissu faisant partie intégrante du bon fonctionnement d'un neurone sensoriel, les neurones humains doivent innover le modèle de peau au complet, c'est-à-dire le derme jusqu'à l'épiderme, comme les DRGs.

Ces résultats ont donné lieu à la soumission d'une publication, actuellement en cours de révision, dans le journal *Acta Biomaterialia*.

5-4. Transfert technologique

Cette thèse, servant de support au travail de recherche, a été réalisée en cotutelle entre l'Université de Strasbourg, en France, et l'Université Laval, à Québec, et s'est concrétisée par la collaboration en le Dr. Vincent Flacher, à l'UPR3572, au CNRS de Strasbourg et le Dr. Berthod au Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX ; Université Laval, Québec).

Le LOEX possède et développe la peau reconstruite par génie tissulaire et innervée par des neurones murins depuis 2003 [11]. L'UPR3572 maîtrise l'extraction et la différenciation des myocytes sanguins humains en MonoDCs, ainsi que leurs caractérisations phénotypiques par cytométrie en flux. Au travers de la cotutelle, mon rôle est de faire sorte en ces deux techniques soient implantées de façon fiable dans les deux laboratoires.

La concrétisation de cet objectif ne rendra le modèle que plus robuste, puisque sa construction sera reproductible dans deux laboratoires différents.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

1- Matériels

Produits et consommables

Produits	Fournisseur	Catégorie
Milieu de culture		
DMEM 4.5g/L Glucose w/ UltraGlutamine	Lonza	BE12-604F/U1
DMEM, high glucose, pyruvate	Gibco	11995073
DMEM:F12 1: 1 w/ UGln 1	Lonza	BE04-687F/U1
DMEM/F-12	Gibco	11320-082 11320-074
EBM-2 Basal Medium 500 ml	Lonza	CC-3156
EGM-2 Endothelial Growth SingleQuot Kit Supplment & Growth Factors	Lonza	CC-4176
PBS-1X w/o Ca, Mg	Lonza	BE17-516F/12
Additifs au milieu de culture		
Neurobasal Medium (1X) (-) L-Glutamine (-) Phenol Red	ThermoFisher	12348-017
N2-supplement (100X)	ThermoFisher	17502-048
B27-supplement (50X)	ThermoFisher	12587-010
2-Mercaptoethanol 1000X	ThermoFisher	21985-023
(+)-Sodium L-ascorbate	Sigma-Aldrich	A7631-100G
Y-27632 dihydrochloride	abcam	ab120129
200 mM L-alanyl-L-glutamine	Corning	25-015-CI
MEM NEAA (100X)	ThermoFisher	11140-050
Trace Element A 1000X	Corning	25-021-CI
Trace Element B 1000X	Corning	25-022-CI
Trace Element C 1000X	Corning	25-023-CI
SB431542	Sigma-Aldrich	S4317-5mg
LDN193189	Sigma-Aldrich	SML0559-5mg
CHIR99021	Sigma-Aldrich	SML1046-5mg
DAPT (GSI-IX)	Selleckchem	S2215
BDNF	Feldan	1D - 14 - 002b
GDNF	Feldan	1D - 14 - 014b
r. Hum. β -NGF	ThermoFisher	11050HNAC250
(+)-Sodium L-ascorbate	Sigma-Aldrich	A7631
Hydrocortisone, Chromatographic Standard	Calbiochem (Millipore)	386698-25MG
Insulin from bovine pancreas	Sigma-Aldrich	15500-250MG
Epidermal Growth Factor (EGF) human (RECOMBINANT)	AUSTRAL Biologicals (AMSBio)	GF-010-9
DL-Isoproterenol hydrochloride	Sigma-Aldrich	i5627
Recombinant Human IL-4	PeptoTech	200-04
Recombinant Human GM-CSF	PeptoTech	300-03

Enzymes de digestion		
Thermolysine from Bacillus thermoproteolyticus rokko	Sigma-Aldrich	T7902-100MG
Collagenase H from Clostridium histolyticum	Roche (Sigma)	11074032001
Papain, Lyophilized	Worthington	LS003119
Stempro accutase	ThermoFisher	A11105-01
Molécules de préparation de support de culture		
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma-Aldrich	P7280-5MG
Gelatin Type B (Laboratory)	ThermoFisher	10774751
Geltrex	ThermoFisher	A1413302
Kits et milieu d'extraction/purification		
Ficoll® HISTOPQUE 1077	Sigma-Aldrich	RNBD2044
Percoll®	Sigma-Aldrich	P1644-1L
CD31 MicroBead Kit, human, MACS	Milteny	130-091-935
Anticorps de cytométrie en flux		
FITC Mouse Anti-Human HLA-DR,DP,DQ Clone Tu39	BD Biosciences	550853
FITC Mouse Anti-Human CD86 Clone 2331 (FUN-1)	BD Biosciences	555657
PE Mouse Anti-Human CD1a (HI149)	BD Biosciences	555807
PE Mouse Anti-Human CD14 Clone MEM-18	ImmunoTools	21270144
PE Mouse Anti-Human Langerin (CD207) Clone 2G3	BD Biosciences	564727
PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD209 Clone DCN48	BD Biosciences	558263
APC Mouse Anti-Human CD1a Clone HI149	BD Biosciences	559775
APC Mouse Anti-Human CD3 Clone UCHT1	BD Biosciences	555335
APC Mouse Anti-Human CD83 Clone HB15e	BD Biosciences	551073
APC Mouse Anti-Human CD86 Clone 2331 (FUN-1)	BD Biosciences	555660
Alexa Fluor 700 Mouse Anti-Human HLA-DR,DP,DQ Clone L203	R&D	FAB4869
7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)	BD Pharmingen	559925
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 450	ThermoFisher	65-0863-14
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780	ThermoFisher	65-0865-14
Molécules de stimulation		
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB	Sigma-Aldrich	237329-10G
DL-Tartaric Acid	Sigma-Aldrich	T400-25G
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich	L4509-10G
Ethylene glycole dimethacrylate	Sigma-Aldrich	335681-5ML
DL-Lactic Acid	Sigma-Aldrich	69785-250ML
LPS-EB Ultrapure, E. coli 0111:B4	InvivoGen	13I06-MM
Capsaicin ≥95%, from Capsicum sp.	Sigma-Aldrich	M2028

Kits ELISA		
Human TNF ELISA Set BD OptEIA™	BD Biosciences	555212
Human IL-12 (p70) ELISA Set BD OptEIA™	BD Biosciences	555183
BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences	555214
Agents de perméabilisation et de fixation pour la microscopie et la cytométrie		
Triton X-100 Detergent	Bio-Rad	1610407
Paraformaldehyde Aqueous Solution -16%	Electron Microscopy Sciences	15710
issue-Tek O.C.T. Compound, 4oz	Sakura Finetek	4583
Fixation/Permeabilization Solution Kit (RUO), BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Biosciences	554714
Anticorps primaire pour l'imagerie en immunofluorescence		
myelin protein zero antibody (chicken)	Abcam	ab39375
Human CD31/PECAM-1 Antibody (sheep)	R&D Systems	AF806
cytokeratin 14 antibody (chicken)	Biologend	906004
Monoclonal anti-hNK1R (mouse)	R&D Systems	MAB66871
Polyclonal anti-S100 (rabbit)	Dako	Z0311
Anti-Beta3 Tubulin (TUBB3) (mouse)	Biologend	801202
Anti-beta III Tubulin polyclonal chicken	Abcam	ab107216
Purified anti-human HLA-DR Antibody (mouse)	Biologend	327002
Anti-cytokeratin 10 monoclonal rabbit	Abcam	ab76318
Anti-Neurofilament medium 160kD Mouse Mc (NF-09)	Abcam	ab65845

Tableau 3 : Références des produits, kits et consommables utilisés

Appareils et outils

Unité de lyophilisation pour la fabrication des éponges : FTS Systems Dura-Top Digital Programmer Bulk Tray Dryer Model BTD with Dra-Dry MP Microprocessor Control Corrosion Resistant Free-Dryer, Model FD2085C0000

Microscope : les images d'immunofluorescence ont été réalisées aux microscopes à module confocale LSM700 et LSM780 de Leica et au microscope Zeiss à module ApoTome.2

Cytomètres en flux : les cellules ont été analysées avec un Gallios 10 couleurs de Beckman Coulter, un FACSCalibur 4 couleurs de Beckman Coulter ou un FACSMelody 6 couleurs de BD Biosciences.

Logiciels

Logiciels d'imagerie microscopiques :

- L'acquisition des images s'est faite avec les logiciels ZEN 2010 (Zeiss), AxioVision4.8 (Zeiss) ou MetaMorph (Molecular Devices)
- Les images brut obtenues en .zvi ou .lsm ou .tif ont été analysées par les logiciels libres de droit Image J (dans sa version Fiji), ICY ou par le logiciel propriétaire Imaris version 7.2.3 (BitPlane)

Logiciels de cytométrie en flux :

- L'acquisition des données brutes a été réalisée par les logiciels propriétaires des cyrtomètres utilisés.
- Les analyses des données de cytométrie ont été effectuées sur le logiciel propriétaire FlowJo[®], dans sa version 7.6.5.

Les données statistiques et les histogrammes ont été obtenus à partir du logiciel GraphPad Prisme[®], version 6.

Les schémas, figures originales et tableaux ont été générés à partir des logiciels Illustrator et InDesign, de la suite Adobe CC, et à partir du logiciel propriétaire PowerPoint, de la suite Microsoft Office 2016.

La bibliographie de ce document a été générée par le logiciel EndNote[™] version X8.2.

2- Méthodes

2-1. Extraction et culture cellulaire

Toutes les cultures cellulaires sont réalisées dans une étuve à environnement humide, à 37°C dans une atmosphère à 5% CO₂.

2-1-1. Extraction des cellules cutanées.

Les fibroblastes, cellules endothéliales et kératinocytes sont isolés à partir de déchets opératoires issus d'abdominoplasties d'adultes (chirurgie esthétique) ou de prépuce de nouveau-nées (circoncision). Les échantillons ont été obtenus avec le consentement libre et éclairé des patients, en accord avec les règles d'éthiques en vigueur, approuvée en 2008 par le comité d'éthique de la faculté de Strasbourg, dans le cadre d'une recherche non interventionnelle, hors loi Jardé.

Sur les abdominoplasties, le tissu graisseux (hypoderme) est complètement enlevé et la peau est lavée à plusieurs reprises (5 à 10 fois) en PBS (*Phosphate-buffered saline*) supplémenté avec 300U/mL de Pénicilline, 75 µg/mL de Gentamycine et 15µg/mL de Fungizone. La peau est ensuite découpée en lames de 3x1,5cm et placée en boîte de Petri, avec 500 pg/mL de thermolysine (Sigma-Aldrich) dans 10 mL de tampon HEPES (*4(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulphonic acid*) + 1 mM de CaCl₂, en incubation sur la nuit à 4°C. A la suite de la digestion enzymatique, le derme et l'épiderme seront séparés à l'aide de deux pinces.

2-1-2. Culture des fibroblastes

Le derme, fraîchement séparé de l'épiderme, est coupé en petits morceaux de quelques millimètres à l'aide d'un scalpel et placé sous agitation dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium*) avec 0,125 U/mL (Unité par mL) de Collagénase H provenant de *Clostridium histolyticum* pour 3 à 4 heures à 37°C. La suspension cellulaire obtenue est filtrée au travers d'un filtre en nylon de porosité 100 µm. L'équivalent de 10 cm² de cellules de derme est ensemencé dans un flacon de culture à bouchon microfiltré de 75cm² (T75) avec du DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/mL de Pénicilline et 25 ng/mL de Gentamycine. Ce milieu de culture est appelé comme du DMEM complet et sera abrégé en DMEMc.

Les fibroblastes peuvent être congelés dans du SVF supplémenté avec 10% de Diméthylsulfoxyde (DMSO), conservés en azote liquide (-196,15 °C) pour former des banques cellulaires et être réutilisés au besoin.

Pour une culture optimale, 300 000 fibroblastes sontensemencés après décongélation en T75 dans 15 mL de DMEMc. Avec un changement de milieu de culture tous les 2 jours, les cellules seront à confluence (recouvrant 100% de la surface de culture) en 7 jours, pour un total compris entre 1,5 et 3 millions de fibroblastes obtenus par flacon. La culture de fibroblastes ne dépasse pas le 9^e passage, c'est-à-dire 9 cycles de décongélation et congélation des mêmes cellules.

2-1-3. Culture des kératinocytes

L'épiderme, fraîchement séparé du derme, est coupé en petits morceaux à l'aide d'un scalpel et placé sous agitation avec 0,05% de trypsine + 0,1% d'Éthylènediaminetétraacétique (EDTA) dans du PBS pendant 15 à 30 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée (saturée) par le SVF en ajoutant du DMEMc et après centrifugation, l'équivalent de 10 cm² d'épiderme estensemencé dans une T75 avec 1,5.10⁶ cellules 3T3, préalablement irradiées à 60 Gy, avec 20 mL de DMEM- Ham's F-12 medium (DMEM-F12), supplémenté avec 5% de SVF ; 5 mg/mL d'insuline bovine ; 10 ng/mL d'EGF recombinant humain ; 0,4 mg/mL d'hydrocortisone et 1.10⁻¹⁰ M de toxine du choléra. Ce milieu de culture complet sera nommé DHc par la suite. Les kératinocytes récoltés ici sont ceux ayant encore leur capacité de prolifération, ce sont donc des cellules souches de la membrane basale de l'épiderme.

Les cellules de la lignée 3T3 sont des fibroblastes murins immortalisés. Ils servent de cellules de soutien et de cellules nourricières aux kératinocytes. Ils sont cultivés de la même façon que les fibroblastes humains, à ceci près que le nombre de passages importe peu pour ces cellules immortalisées. Pour en limiter la prolifération quand ils sont co-cultivés avec des cellules humaines, il est nécessaire de les irradier suivant un protocole de 60 Gy rad.

Les kératinocytes ne doivent pas dépasser 80% de confluence avant de pouvoir être congelés en SVF+10%DMSO, sans quoi ils peuvent commencer à se différencier et perdre leur capacité de prolifération. Pour une culture optimale, 300 000 kératinocytes sont mis en cultures avec 1,5.10⁶ 3T3 irradiés en T75 avec 20 mL de DHc. En changeant de milieu tous les 2 jours, les kératinocytes attendront 80% de confluence (leur confluence maximum) en 7 jours pour un

total de 8.10^6 cellules récoltés à la fin de cette culture. Les kératinocytes ne sont pas entretenus au-delà du 3^e passage

2-1-4. Culture des cellules endothéliales

Les lamelles de dermes, fraîchement séparées de l'épiderme, sont pressées à répétition à l'aide du dos de pincettes courbes, dans une boîte de Petri. La pression appliquée sur les lamelles de derme va faire sortir les vaisseaux (sanguins et lymphatiques) en dehors du derme. L'extrait de vaisseaux est lavé en DMEMc et dissocié mécaniquement par des va-et-viens à la pipette et l'équivalent de 10 cm² de peau estensemencé dans un flacon de culture à bouchon microfiltré de 25 cm² (T25), dont le fond a été préalablement enduit de gélatine (solution à 0,5% de gélatine ; voir ci-dessous). Les cellules extraites sont cultivées avec 5 mL de milieu de culture EBM-2, avec les suppléments de facteurs de croissance et de sérum fournis par le fabricant. Après une nuit de culture, la T25 est rincée 3 fois avec du milieu de culture pour détacher un maximum de fibroblastes contaminants. Ces derniers ont une vitesse de prolifération supérieure aux cellules endothéliales dans le milieu de culture commercial EBM-2 enrichi en facteurs de croissance. Le flacon est laissé en culture entre 7 et 14 jours avec 10 mL d'EBM-2, sans changer le milieu de culture, le temps que les cellules prolifèrent suffisamment.

Une fois à confluence, les cellules endothéliales peuvent être congelées en SVF+10%DMSO, conservées en azote liquide (-196,15 °C) pour former des banques cellulaires et être réutilisées au besoin. Les cellules endothéliales ne peuvent pas adhérer directement sur le polypropylène de culture, il est donc nécessaire de leur offrir un support de culture approprié en recouvrant le plastique de culture avec de la gélatine. Ce recouvrement (« coating »), se fait en incubant la surface à recouvrir toute la nuit à 4°C avec une solution de gélatine 0,5% masse/volume dans de l'eau ultrapure. Pour une culture optimale, 375 000 cellules endothéliales sontensemencées dans une T75 avec 10 mL d'EBM-2. En changeant le milieu de culture tous les 2 jours, les cellules endothéliales seront à confluence en 7 jours pour un total de 6.10^6 cellules récupérées par T75. Les cellules endothéliales ne sont pas conservées au-delà du 6^e passage.

2-1-5. Isolation des Monocytes à partir de sang humain

Pour l'UPR3572, les échantillons de sang proviennent de dons réalisés auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS). Ces échantillons ont été préalablement

ultracentrifugés par l'EFS pour séparer le plasma, les érythrocytes et la partie contenant plaquettes et leucocytes, qui se nomme Buffy Coat.

La séparation des monocytes à partir de sang complet ou de Buffy coats repose sur 2 séparations successives par gradient de densité : la première au FICOLL afin d'isoler les PBMCs et la seconde au Percoll afin d'isoler les monocytes.

Dans un tube 50mL, contenant 15 mL de FICOLL à température ambiante (TA), 30mL de Buffy Coat dilué au 1/2 dans du PBS ou de sang non dilué sont ajoutés progressivement. Après 20 minutes de centrifugation à 1200g, sans accélération ni décélération, 4 phases peuvent être distinguées : la phase contenant le plasma (avec ou sans PBS) au-dessus, l'anneau de PBMC, le FICOLL, le culot de plaquettes et érythrocytes. L'anneau de PBMC est récupéré et lavé en PBS 1X 3 fois. Les cellules sont comptées et reprises dans un mélange de PBS+2%SVF+5mM EDTA (SE) à hauteur de 75 à 100.10⁶ cellules par mL. Un échantillon de PBMC est conservé pour l'analyse finale au cytomètre en flux.

Le Percoll commercialisé doit préalablement être rendu isotonique par ajout de PBS 10X au 1/10^e avant d'être dilué à 52% en PBS 1X. 6mL de cette solution isotonique de Percoll 52% sont répartis en tubes 15 mL, pour y déposer 3 mL de suspension cellulaire (entre 75 et 100.10⁶ cellules/mL). Après une centrifugation de 20 minutes à 1200g sans accélération ni décélération, 4 phases sont visibles : le SE au-dessus, l'anneau de monocytes, le Percoll 52% et en dessous, le culot de PBMC restant. Les cellules sont lavées 3 fois en SE et peuvent être différenciées en MonoDCs, ou bien congelées en SVF+10%DMSO et conservées en azote liquide. Avant utilisation ou congélation, un échantillon des monocytes est prélevé pour être analysé en cytométrie en flux afin de vérifier la pureté de l'isolation. Une pureté inférieure à 80% ne sera pas conservée pour la différenciation.

3.10⁶ monocytes fraîchement purifiés ou décongelés sont placés dans 4mL de RPMI1640 supplémenté 10%SVF, 5mL d'HEPES, 100 U/mL de Pénicilline, 25 ng/mL de Gentamycine (nommé ici RPMIc) + 200 ng/mL de GM-CSF et 10 ng/mL d'IL-4. Au jour +3, les cellules n'adhérant pas au support de culture, 1mL de RPMIc supplémenté par 200 ng/mL de GM-CSF et 10 ng/mL d'IL-4 est ajouté au volume total du milieu (5mL). Au jour +5 les 3.10⁶ monocytes se sont différenciés en environ 10⁶ DCs, majoritairement immatures. Le phénotype des MonoDCs différenciées *in vitro*, qui conservent une faible expression de CD14 (CD14^{low}) tout en exprimant CD1a, est différent des MonoDCs *in vivo* de la peau normale humaine (Introduction, Partie 2-4-3). Le phénotype des MonoDCs *in vitro* est analysé en

cytométrie en flux, où seules sont utilisées, pour la suite des expériences, les différenciations présentant 80% de cellules exprimant CD1a, avec moins de 10% de cellules CD86⁺ spontanément matures (MonoDCs immatures : HLA-DR⁺, CD209⁺, CD14^{low}, CD1a⁺ et CD86⁻).

Pour contrôler la capacité des cellules à s'activer, les MonoDCs sont incubées 24h avec 100ng/mL de LPS en RPMIc. Leur phénotype est analysé en cytométrie en flux et comparé au groupe non stimulé. Les MonoDCs activées par le LPS doivent à plus de 95% exprimer le récepteur de costimulation CD86 (HLA-DR^{high}, CD209⁺, CD1a⁺, CD86⁺, CD83⁺).

Ce protocole de différenciation des monocytes en DCs a déjà fait l'objets de publications scientifiques [91, 568]. Ayant fait mon stage de Master dans l'équipe de Vincent Flacher à l'UPR3572, j'ai participé techniquement à l'élaboration d'une de ces publication (Annexe 9).

2-1-6. Technique dite du « Crawl-Out » pour la récupération de cellules dendritiques à partir de peau normale humaine.

Un explant de peau normale humaine, de 4cm² de surface et de 800µm d'épaisseur est placé sur un filtre en nylon dans du RPMIc à 37°C pendant 4 jours. Le contexte pro-inflammatoire de la lésion tissulaire entraîne la migration d'une partie des cellules immunitaires hors de la peau. Les surnageant sont récoltés, regroupés et leurs populations cellulaires sont analysées par cytométrie en flux.

3 populations de DCs migrantes sont discriminées : les LCs (CD207⁺, CD1a⁺, CD14⁻), les DCs CD1a (CD207⁻, CD1a⁺, CD14⁻), et les DCs CD14 (CD207⁻, CD1a⁻, CD14⁺).

2-1-7. Extraction et mise en culture des neurones sensoriels murins

Les neurones sensoriels d'origine murine sont extraits à partir de DRGs d'embryons de souris BALB/c au stade E12.5.

Les souris gestantes sont sacrifiées au CO₂ ou par élongation cervicale. Après lavage de l'abdomen à l'alcool, les embryons sont extraits par hystérectomie et placés en PBS ou milieu L15 frais et stérile en boîte de Petri. Sous une loupe binoculaire, la moelle épinière, avec ses DRGs de chaque côté, est extraite de l'embryon par incision du dos. Les DRGs peuvent être détachés de la moelle épinière à l'aide d'un scalpel. Les DRGs sont lavés en PBS ou L15 froid

et placés dans 1mL de 60% de L15 ou RPMI et 40% de HBSS 1X avec 2 mg/mL de papaïne. Les DRGs sont digérés en bain marie à 37°C en agitation lente pendant 20 minutes. 10mL de milieu de culture avec 0,5mL de DNase sont ajoutés pour terminer la dissociation mécanique des DRGs pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées en DMEMc et peuvent être directement utilisées en culture, pour le modèle 3D ou sur un support recouvert de 1µg/mL de Poly-D-lysine, avec du milieu DMEMc supplémenté avec 10ng/mL de NGF. Les cellules extraites de DRGs ne peuvent pas être congelées pour une utilisation ultérieure.

2-1-8. Extraction et culture des cellules de Schwann murines à partir de nerf sciatique

Les nerfs sciatiques de souris BALB/c sont prélevés et placés dans 30mL de milieu L15 supplémenté avec 300U/mL de Pénicilline, 75 µg/mL de Gentamycine et 15µg/mL de Fungizone, placés dans la glace. Les explants de nerfs sciatiques sont lavés 10 fois dans le même milieu, toujours dans la glace. L'épinèvre est retiré à l'aide de pince, placée en DMEMc et le nerf est coupé en tronçons de 2 à 3mm, également placés en DMEMc. Les explants (nerfs et épinèvre) sont mis en culture en boîte de Petri pendant 3 semaines avec du DMEMc. Le « changement » de milieu consiste à un ajout de 1mL de DMEMc tous les 2 jours. Après 7 jours de culture, les explants sont changés de boîte de Petri. Le but est d'épuiser les explants en fibroblastes, qui prolifèrent tout comme les précurseurs des cellules de Schwann. Les explants sont digérés en DMEMc supplémenté en 1X d'HEPES ; 0,025g de collagénase IA (à 519U/mL final) et 0,02659g de dispase II pendant 4 heures à 37°C sous agitation lente et avec une trituration mécanique à la pince toutes les heures. Les cellules sont lavées en DMEMc puis ensemencées en Flacons de culture préalablement recouvert de 1 µg/mL de Poly-D-lysine. Les cellules récoltées de la digestion sont ensemencées à 50 000 cellules/cm² dans du DMEMc supplémenté avec 1X de N2 (solution mère à 100X) ; 1X de B27 (solution mère à 100X) ; 10µM de Forskoline ; 10ng/mL de Neureguline NRG1-b1/HRG1-b1 EGF humaine et 50µg/mL d'acide ascorbique. Le milieu est changé tous les 2-3 jours et une fois les cellules arrivées à confluence, elles peuvent être congelées dans du SVF+10%DMSO.

2-1-9. Reprogrammation de cellule humaine pour l'obtention de cellules souches pluripotentes induites

Les iPSCs (*induced pluripotent stem cells*) ont été obtenues à partir de fibroblastes ou de PBMCs humain, reprogrammés en cellules pluripotentes par le virus de Sendai chargé des facteurs de transcriptions Oct4, Sox2, Klf4 et Myc [569]. Les iPSCs sont générées, maintenues en culture et caractérisées par la plateforme iPSC Québec et se présentent sous forme de colonies en boîte de Petri.

2-1-10. Différenciation et culture des neurones sensoriels à partir de cellules souches humaines pluripotentes induites

Le protocole de différenciation des iPSCs humaines en neurones sensoriels est une adaptation et une optimisation du protocole préétabli par Maury Y. et collaborateurs en 2015 dans la revue Nature Biotechnology [5].

Les iPSCs sont dissociées pendant 5 minutes à 37°C avec 500µL de Stampro acutase supplémenté avec 5µM de ROCK inhibiteur (Y-27632).

Au jour 0, les cellules sontensemencées à hauteur de 300 000 par puits de plaque 12 puits (ou 850 000 par puits de plaque 6 puits, soit 90 000 cellules/cm²) sur un support recouvert de gélatine Geltrex. Pour recouvrir (coating) un support de Geltrex, ce dernier doit être manipulé froid (dans de la glace), dilué au 1/200^e dans du DMEM-F12 vierge, à raison de 350µL par puit de plaque 12 puits, et incubé 30 minutes à 37°C. Les puits sont rincés avec du DMEM-F12 vierge et gardés à 37°C avec du milieu de culture vierge le temps d'ensemencer les cellules. Les cellules sont incubées avec du DMEM-F12 vierge + du milieu Neurobasal volume/volume, le tout supplémenté avec 1X de N2 (solution mère à 100X); 1X de B27 (solution mère à 50X) ; 0,01mM de β-mercaptoethanol ; 50µg/mL d'acide ascorbique ; 5µM de ROCK inhibiteur (Y-27632) ; 1% de L-alanyl-Lglutamine ; 1% de MEM acides aminés non essentiels ; 0,01% de Trace elements A ; 0,01% de Trace elements B ; 0,01% de Trace elements C ; 40µM de SB431542 ; 0,2µM de LDN193189 ; 3µM de CHIR99021 ; 100 U/mL de Pénicilline et 25 ng/mL de Gentamycine. Ce milieu de culture est à préparer avant chaque changement quotidien.

Les cellules en différenciation sont proliférantes. En cas de confluence, l'étape de dissociation et de remise en culture, toujours sur support recouvert de gélatine, sera répétée. La confluence des cellules peut survenir aux jours 3, 5 et/ou 6 de la culture.

Au jour 5, le même milieu de culture est conservé pour un changement quotidien, mais cette fois sans SB431542 et LDN193189.

Au jour 7, le même milieu de culture est conservé pour un changement quotidien, mais cette fois, sans CHIR99021. C'est le dernier jour où il est possible de procéder à l'amplification des cellules. Si ces dernières sont à confluence ou sur le point de l'être, l'étape de dissociation et de remise en culture doit être répétée.

Au jour 9, le même milieu de culture est utilisé, cette fois supplémenté avec 10 μ M de DAPT (24-diamino-5-phenylthiazole) qui sera conservé dans le milieu de culture jusqu'au jour 13. Le DAPT est un bloqueur de la voie des Notch3 et va empêcher la prolifération cellulaire, étape indispensable pour la différenciation des cellules en neurones.

Au jour 11, le β -mercaptoethanol ; le L-alanyl-Lglutamine ; les MEM acides aminés non essentiels ; les Trace éléments A, B et C sont enlevés du milieu de culture, qui est également supplémenté avec 20ng/mL de BDNF et 10ng/mL de GDNF. A cette étape, les neurones immatures peuvent être dissociés suivant le même protocole qu'au jour 0. Ils peuvent être utilisés dans le modèle 3D pour finir leurs différenciations ou être congelés en solution d'albumine bovine à 20% pH7,4 dans du PBS avec 10%DMSO.

Au jour 13, le DAPT est enlevé du milieu de culture, qui est alors supplémenté avec 10ng/mL de NGF. Le milieu de culture complet pour cette dernière étape sera constitué de DMEM-F12 vierge + milieu Neurobasal 1 :1 (volume/volume), le tout supplémenté avec 1X de N2 ; 2% de B27 ; 50 μ g/mL d'acide ascorbique ; 5 μ M de ROCK inhibiteur (Y-27632) ; 20ng/mL de BDNF ; 10ng/mL de GDNF ; 10ng/mL de NGF ; 100 U/mL de Pénicilline et 25 ng/mL de Gentamycine.

Ce milieu de culture sera conservé pour toutes les expériences réalisées sur les monocultures de neurones sensoriels dérivés d'iPSCs humaines.

2-1-11. Différenciation et culture des cellules de Schwann différenciées à partir d'iPSCs humaines

Le protocole de différenciation des iPSCs humaines en cellules de Schwann est une adaptation et une optimisation du protocole établi par Faroni A. et al. en 2013 [570].

Au jour -1, les iPSCs sont dissociées pendant 5 minutes à 37°C avec 500µL de Stampro accutase supplémenté avec 5µM de ROCK inhibiteur (Y-27632) etensemencées à hauteur de 200 000 cellules/cm² en milieu commercial mTeSR (STEMCELL Technologies).

Au jour 0, les cellules sont placées en milieu essentiel minimum (*Minimum Essential Media*, MEM) supplémenté avec 1X de N2 ; 1 mM de β-mercaptoéthanol ; 5µM de Y-27632 ; 1% de L-alanyl-L-glutamine ; 1% de MEM non-essential amino-acides ; 0,1% de Trace elements A ; 0,1% de trace elements B et 0,1% de Trace elements C.

Du jour 1 au jour 3, le milieu de culture est changé quotidiennement. Dès le jour 1 de culture, le β-mercaptoéthanol est enlevé et les suppléments 1X de B27 sans vitamine A et 35ng/mL d'acide rétinoïque sont ajoutés au milieu.

Au jour 4, les cellules, qui doivent proliférer et être proches de la confluence, sont dissociées à la Strampro accutase etensemencées sur un support de culture recouvert de 1µg/mL de Poly-D-lysine. Elles sontensemencées à 90 000 cellules/cm² (approximativement 6.10⁶ cellules par T75, pour 12mL de milieu de cultures) en milieu commerciale STEMdiff Appel supplémenté avec 1X de N2 ; 1X de B27 sans vitamine A ; 5µM de Y-27632 ; 1% de L-alanyl-L-glutamine ; 1% de MEM non-essential amino-acides ; 0,1% de Trace elements A ; 0,1% de Trace elements B et 0,1% de Trace elements C ; 5ng/mL de PDGF-bb ; 10ng/mL de βFGF ; 14µM de Forskoline et 192ng/mL de NRG1. Le milieu de culture est changé quotidiennement jusqu'au 6^e jour de culture.

Au jour 7, la même composition de milieu est conservée mais le volume passe de 12mL par T75 à 20 mL par T75 et le milieu peut ensuite être changé tous les 2 jours jusqu'au jour 14.

Au jour 14, 5% de SVF est ajouté au milieu et ce dernier est changé quotidiennement jusqu'au jour 17.

Au jour 17, les iPSCs ont terminé leurs différenciations en cellules de Schwann et peuvent être dissociées en trypsine 0,25% avec 5mM d'EDTA, congelées en SVF+10%DMSO ouensemencées sur le modèle 3D. Il est aussi possible de continuer la culture en milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% SVF ; 5µM de Forskoline ; 50ng/mL de NRG1 ; 1X de N2 et 1% de L-alanyl-L-glutamine. Les cellules de Schwann à ce stade sont des précurseurs à la vitesse de prolifération lente.

2-2. Fabrication du support de culture tridimensionnel (3D)

Le support de culture 3D (*scaffold*) est composé d'une mixture de collagène bovin de type I et III non glyqué à 9µg/mL et du chitosan de type II à 2,5µg/mL dans du PBS avec 0,1% d'acide acétique glaciale. 0,5mL de ce mélange est placé au fond d'un puits de plaque 12 puits, avec un anneau de papier Whatman servant d'ancrage, puis lyophilisé. Le support résultant possède une épaisseur et une porosité légèrement variables, relatifs au procédé de fabrication, mais il aura toujours la même surface de culture, soit 2,7 cm².

La capacité du lyophilisateur est de 36 plaques au total. Le protocole se fera donc sur la base de la capacité maximum de ce dernier, soit 36x12 puits, soit, pour un total de 432 supports de cultures 3D, 432x0,5=216 mL. Afin d'avoir un mélange homogène, un volume total de 250mL sera réalisé, où collagène et chitosan seront préparés séparément.

2-2-1. Préparation de la solution de collagène bovin :

Pour un total de 250mL de mélange, 2,25g de collagène bovin de type I et III non glyqué est dissout dans 175mL d'eau ultrapure +0,1% d'acide acétique, préalablement chauffé à 37°C. Le collagène est placé sous agitation en bain marie à 37°C. Il est important que la température soit homogène et stable dans le temps, une variation de température au-delà de 40°C risque de dénaturer le collagène, tandis qu'une température en deçà de 30°C va empêcher la dissolution complète du collagène et donc la formation d'une solution homogène. Il faut minimum 1 heure à 37°C en agitation après une dissolution complète du collagène pour avoir une solution homogène.

2-2-2. Préparation de la solution de chitosan

Pour un total de 250mL de mélange, 0,625g de chitosan est dissous dans 50mL d'eau ultrapure +0,1% d'acide acétique sous agitation. Pour que la dissolution du chitosan soit complète, 5 gouttes d'acide acétique glacial pur sont ajoutées à la solution sous agitation, pendant 30 minutes à 1 heure.

2-2-3. Préparation du support à culture 3D

La solution de chitosan et 25mL d'eau ultrapure sont ajoutées doucement à la solution en agitation et à 37°C de collagène et laissée en agitation pendant 1h minimum pour une homogénéisation complète des deux solutions en un mélange transparent. 0,5mL du mélange est placé au fond des puits de plaque 12 puits où des anneaux de papier Whatman d'un diamètre extérieur de 22mm et intérieur de 18,45mm ont été préalablement placés. L'anneau en papier sert d'ancrage au support à culture 3D, formant une partie rigide pour la manipulation du support. L'anneau en papier ayant un diamètre de 18,5mm, la surface de culture utilisable pour la réalisation du modèle de peau est d'environ 2,5cm².

La lyophilisation du mélange au fond des puits est immédiate et se fait grâce au système FTS Dura-Top / Dura-Dry modèle FD2085C0000. Une fois lyophilisé, le support de culture prend un aspect blanc opaque et spongieux. Cette éponge de culture peut se conserver plusieurs mois à température ambiante.

2-3. Création du modèle de peau innervé vascularisé et immunocompétente par génie tissulaire

Ce protocole présente la construction du modèle de peau dite « complète », contenant un derme, fait de fibroblastes (F), des pseudo-vaisseaux formés à partir de cellules endothéliales (E), un épiderme stratifié composé de kératinocytes (K), une innervation sensorielle générée à partir de neurones provenant de ganglions de la racine dorsale d'embryons murins (DRGs) ou de neurones humains dérivés d'iPSCs, et enfin d'une immunocompétence composée de cellules dendritiques dérivés de monocytes sanguins humains (MonoDCs). Ce modèle complet est abrégé F + E + K + DRGs (ou neurones-iPSCs) + MonoDCs, résumant ses différents composants.

2-3-1. Formation du derme vascularisé (14 jours)

L'éponge de culture de collagène-chitosan est stérilisée toute la nuit à 4°C dans de l'éthanol ou de l'isopropanol à 70%. Un maximum d'alcool est enlevé et remplacé avec 4mL par puits de DMEM vierge supplémenté avec 300U/mL de Pénicilline, 75 µg/mL de Gentamycine et 15µg/mL de Fungizone. Les plaques sont incubées toute la nuit à 37°C. Le

DMEM supplémenté en antibiotique et antifongique est enlevé et remplacé par du DMEM vierge. Les plaques sont de nouveau placées à 37°C, au minimum pour une nuit, et maintenues à 37°C avant l'ensemencement des cellules.

Au jour 0, 800 000 fibroblastes et 800 000 cellules endothéliales sont ensemencées à la surface de l'éponge de collagène-chitosan dans 100µL de milieu de culture et incubées 2h à 37°C. Le puits est complété avec 3mL de mélange volume/volume de EBM-2 / DMEMc +50µg/mL d'acide ascorbique. Les cellules à ensemercer ne sont pas directement décongelées, elles nécessitent une pré-amplification en flacon pendant une semaine avant l'ensemencement en éponge. Le milieu de culture est changé tous les 2 à 3 jours. Le rouge de phénol présent dans le milieu de culture va servir d'indicateur de prolifération, si ce dernier passe du rouge-orangé (pH7,4 lorsque le milieu contient tous ses nutriments), à jaune (pH acide, lorsque les nutriments du milieu ont été consommés par les cellules), les éponges sont placées en plaques 6 puits pour augmenter le volume de milieu de culture (4 ou 5mL).

Au jour 7, l'éponge est retournée et 450 000 fibroblastes et 450 000 cellules endothéliales sont ensemencées à la surface de l'éponge dans 100µL de milieu de culture et incubées 2h à 37°C. Le milieu de culture est un mélange 1 :1 (volume/volume) de EBM2 et DMEMc, +50µg/mL d'acide ascorbique, en quantité suffisante pour la taille du puits. Le milieu doit être changé tous les 2-3 jours. Le derme sera complet, vascularisé et homogène à la fin de cette étape.

2-3-2. Formation de l'innervation (14 jours)

Au jour 14, étape d'ensemencement des neurones, l'éponge est maintenue en interface air-liquide par un support circulaire en plastique sur lequel repose l'anneau d'ancrage en papier. Le support circulaire est dentelé de façon à permettre un passage du milieu en dessous de l'éponge. Cette étape se fait impérativement en plaque 6 puits et le volume de milieu de culture est de 4mL.

Pour les neurones murins, 800 000 cellules extraites de DRGs murins au stade E12,5 sont ensemencées dans 100µL de milieu de culture au-dessus de l'éponge en interface air-liquide, avec un milieu DMEMc supplémenté avec 50µg/mL d'acide ascorbique et 10ng/mL de NGF. Le milieu de culture doit être changé tous les 2-3 jours pendant 14 jours.

Pour les neurones humains, 800 000 neurones dérivés d'iPSCs humain au stade Jour 11 sont ensemencés dans 100µL de milieu de culture au-dessus de l'éponge en interface air-liquide avec un milieu DMEMc supplémenté avec 50µg/mL d'acide ascorbique, 20ng/mL de BDNF, 10ng/mL de GDNF et 10ng/mL de NGF. Le milieu de culture doit être changé tous les jours pendant 7 jours puis tous les 2-3 jours pendant 7 jours.

2-3-3. Formation de l'immunocompétence (7 jours)

Au jour 28, l'éponge est retournée pour que les corps cellulaires des neurones soient face au fond du support de culture, sans support air-liquide.

200 000 MonoDCs au stade J5, c'est-à-dire différenciées et caractérisées, sont ensemencées dans 100µL de milieu de culture au-dessus de l'éponge et incubées 2h à 37°C, avant de rajouter 4 à 5mL de milieu de culture. La composition des suppléments du milieu de culture dépend des neurones présents dans l'éponge. Si aucun neurone n'est présent à ce stade de l'éponge, le milieu de culture sera du DMEMc supplémenté avec 50µg/mL d'acide ascorbique. Le changement de milieu se fait tous les 2-3 jours.

2-3-4. Formation de l'épiderme (21 – 28 jours)

Au jour 35, 800 000 kératinocytes préamplifiés en flacon de culture et à 80% confluence sont ensemencés au-dessus de l'éponge (préalablement débarrassée de son milieu de culture) dans 100µL de milieu de culture, incubé 2 à 3 heures à 37°C. Le milieu de culture à ajouter par la suite (4 à 5 mL) est du DHc supplémenté avec 50µg/mL d'acide ascorbique. Les autres suppléments à ajouter dépendent du type de neurones déjà présent dans l'éponge (10 ng/mL de NGF pour les neurones murins, 20ng/mL de BDNF, 10ng/mL de GDNF et 10ng/mL de NGF pour les neurones humains). Le milieu est à changer tous les 2-3 jours pendant 7 jours.

Au jours 42, l'éponge est placée en interface air-liquide sur son support dentelé avec un volume de 3,5mL de milieu. Cette étape permet la différenciation des kératinocytes pour la formation des différentes couches de l'épiderme, grâce au contact directe des cellules avec l'air, le dessus de l'éponge ne devant plus être humidifié à partir de cette étape. Le milieu de culture est composé de DMEM-F12 supplémenté avec 5% de SVF, 5 mg/mL d'insuline bovin ; 0,4 mg/mL d'hydrocortisone et 1.10^{-10} M de toxine du choléra (l'EGF ayant été enlevé par rapport au milieu précédent). Les autres suppléments à ajouter dépendent du type de neurones déjà présent dans

l'éponge. Le milieu est changé tous les 2-3 jours jusqu'à formation de l'épiderme. Ce processus peut prendre entre 14 et 21 jours, dépendamment de la compétence des kératinocytes à se différencier.

2-3-5. Peau normale humaine, innervée, vascularisé et immunocompétente (iV-ITES)

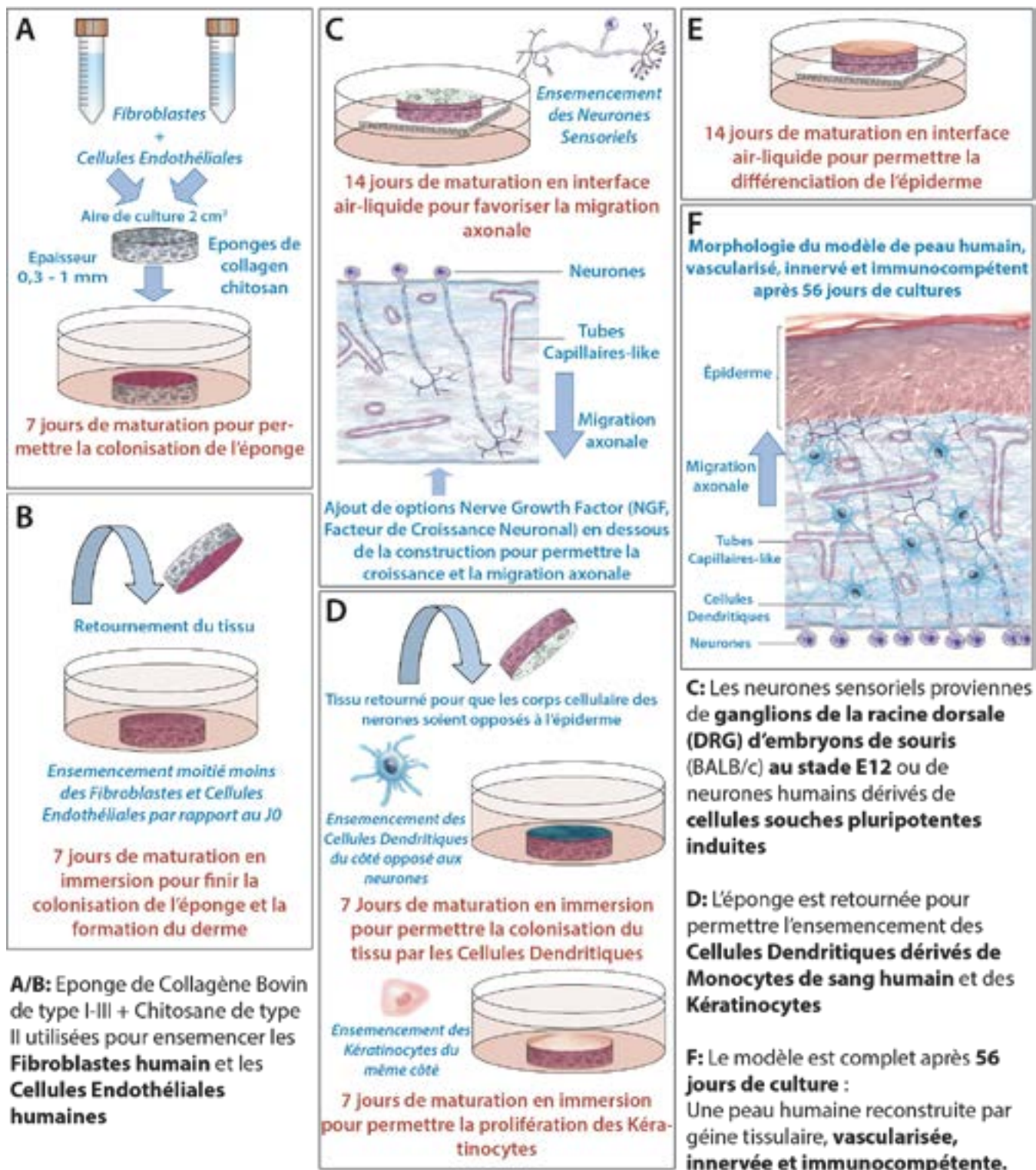


Figure 22 : Schéma récapitulatif de la construction du modèle de peau complet, innervé, vascularisé et immunocompétent.

Un total de 56 à 63 jours de culture 3D à partir du support sont nécessaires pour reconstruire, par génie tissulaire, le modèle de iV-ITES.

2-4. Conditions de stimulation et modèles d'éponges utilisés

Dans le cadre de l'utilisation du modèle comme outil de prédiction du potentiel sensibilisateur de molécules chimiques, 4 constructions d'éponges ont été utilisées :

- Modèle de peau avec un derme vascularisé et un épiderme stratifié : F + E + K
- Modèle de peau immunocompétente : F + E + K + MonoDCs
- Modèle de peau avec une innervation d'origine murine : F + E + K + DRGs
- Modèle de peau complète, vascularisée, immunocompétente avec innervation d'origine murine : F + E + K + DRGs + MonoDCs

Molécule	Dinitrochlorobenzene (DNCB)		Acide-DL-Tartrique (TA)		Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)		Ethylène glycol diméthacrylate (EG)	
Classification	Sensibilisateur		Non-Sensibilisant		Irritant		Sensibilisateur	
Réponse LLNA	Extrême		Modéré		Faible		Faible	
Utilisation clinique	Contrôle positif pour les tests d'hypersensibilité		Antiseptique, antioxydant alimentaire (E334)		Fongicide, bactéricide, détergeant		Monomère fonctionnel dans la fabrication de polymères	
Doses	5 µM	30 µM	25 µM	300 µM	15 µM	300 µM	100 µM	1 000 µM

Tableau 4 : Récapitulatif des sensibilisateurs, avec leurs doses, en application dans le milieu de culture des modèles de peau.

2-5. Analyses

2-5-1. Phénotypage des monocytes, MonoDCs différenciés et activés et des DCs de la peau par cytométrie en flux

Marquage par immunofluorescence directe des cellules pour l'analyse par cytométrie en flux.

Les monocytes extraits sont phénotypés par le marquage HLA-DR / CD14 / CD3, avec le 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) comme marqueur de mortalité cellulaire. Les anticorps, directement couplés aux fluorochromes (Matériel et méthode, Parti 1, Tableau 3), sont incubés avec les cellules 20 minutes à 4°C et dilués en quantité optimale en solution PBS+2%SVF+5mM EDTA (SE). Après lavage, les culots de cellules sont repris en SE contenant 1/100e de la solution stock de 7-AAD puis analysées au cytomètre en flux.

Les MonoDCs différenciées sont phénotypées par le marquage HLA-DR / CD14 / CD86 / CD2019 / CD1a, et les MonoDCs activées pendant 24 sont phénotypés par le marquage HLA-DR / CD83 / CD86 / CD2019 / CD1a, tous deux avec le Fixable Viability Dye (FVD) eFluor™ 450 ou 780 comme marqueur de mortalité cellulaire. Les cellules sont lavées en PBS et incubées 30 minutes à 4°C avec le marqueur de mort. Après lavage en SE, les anticorps, directement couplés aux fluorochromes (Matériel et méthode, Parti 1, Tableau 3), sont dilués en quantité optimale en solution SE et incubés avec les cellules 20 minutes à 4°C. Après un lavage en SE, les cellules sont analysées au cytomètre en flux.

Les cellules dendritiques sortantes de la peau, par de la technique dite du « Crawl-Out », sont phénotypées par HLA-DR / CD207 (marqueur intracellulaire) / CD209 / CD14 / CD86 avec le FVD eFluor™ 450 ou 780 comme marqueur de mortalité cellulaire. Les cellules sont lavées en PBS et incubées 30 minutes à 4°C avec le marqueur de mort. Après lavage en SE, les anticorps pour le marquage extracellulaire (HLA-DR, CD209, CD14 et CD86), directement couplés aux fluorochromes (Matériel et méthode, Parti 1, Tableau 3), sont dilués en quantité optimale en solution SE et incubés avec les cellules 20 minutes à 4°C. Les cellules sont perméabilisées et fixées en suivant le protocole du kit de Fixation/Perméabilisation BD Cytotfix/Cytoperm™. Les anticorps pour le marquage extracellulaire (ici, uniquement CD207), directement couplés aux fluorochromes (Matériel et méthode, Parti 1, Tableau 3), sont dilués en quantité optimale dans le tampon BD Perm/Wash™ et incubés avec les cellules 20 minutes à 4°C. Après lavage en solution SE, les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

Protocole d'analyse des populations cellulaires acquises par cytométrie en flux

Les données sont analysées par le logiciel FlowJo[®], dans sa version 7.6.5 et consiste en l'isolation numérique de populations cellulaires par l'intermédiaire de nuages de points (*Gating strategy*). Dans tous les cas, les cellules sont sélectionnées suivant leurs tailles et leurs granulosités (FSC/SSC) et seules les cellules vivantes sont prises en compte dans l'analyse final (négatives aux marqueurs 7-AAD ou FVD).

Le phénotypage des monocytes permet de conserver et utiliser uniquement les extractions ayant permises d'obtenir plus de 80% de monocytes (CD14⁺), avec un minimum de contaminant lymphocytaire (CD3⁺) (Figure 23-A). Après différenciation en MonoDCs, le phénotypage des cellules permet d'éliminer les extractions où les monocytes ne peuvent pas se différencier (CD209⁺ et CD1a⁺) à hauteur de 80%, avec moins de 10% de cellules de MonoDCs spontanément matures (CD86⁺) (Figure 28-B).

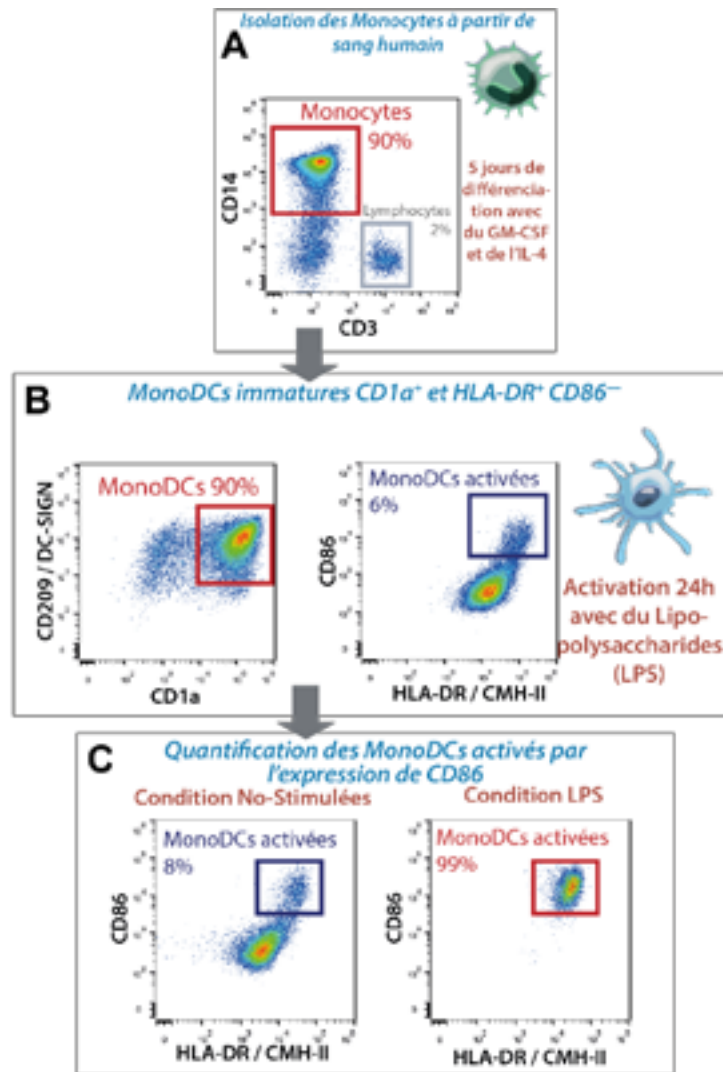


Figure 23 : Analyse de la purification et de la différenciation des monocytes en MonoDCs, puis analyse du phénotype mature des MonoDCs

Enfin, le phénotypage après activation, sur la base des MonoDCs exprimant toujours CD14a, permet de quantifier le pourcentage de cellules devenues matures en fonction de nos conditions de stimulation (Figure 28-C).

Par la technique dite du « Crawl-Out », une partie des DCs matures de la peau se retrouvent dans le milieu de culture, après 4 jours d'incubation (Figure 24-A). Le phénotypage des cellules obtenues, toujours en les discriminant suivant leurs tailles, leurs granulosités (FSC/SSC) et en analysant uniquement les cellules vivantes (négatives au FVD), nous discriminons 3 types de DCs différents, les LCs, les DCs $CD14^+$ et les DCs $CD1a^+$.

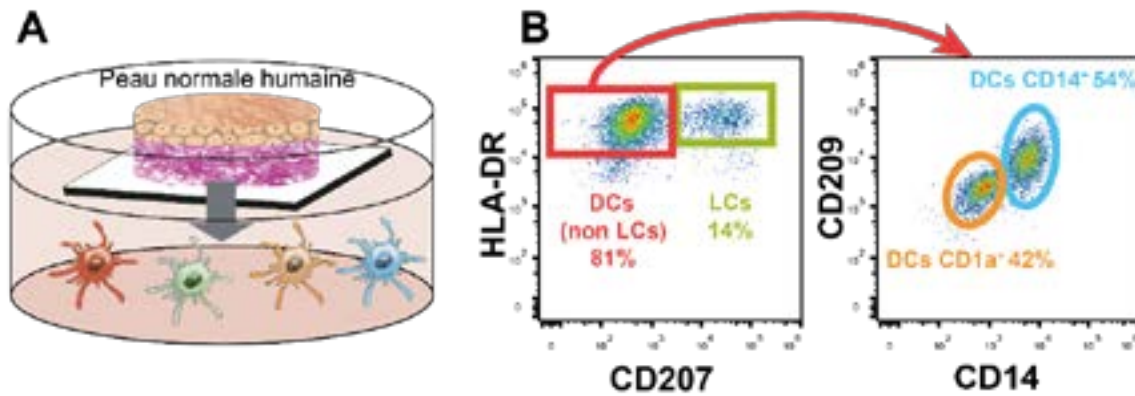


Figure 24 : Analyse des populations de DCs obtenus par la technique du « Crawl-Out » pour discriminer les LCs, les DCs CD14⁺ et les DCs CD1a⁺

Les LCs sont observées par leur expression de HLA-DR et de CD207. Les cellules exprimant HLA-DR mais n'exprimant pas CD207 sont sélectionnées pour observer leur expression de CD14 et discriminer les DCs CD14⁺, exprimant faiblement CD209 et les DCs CD1a⁺, exprimant CD209 (Figure 24B).

2-5-2. Quantification des cytokines par du milieu de culture pas technique ELISA

Kits ELISA utilisés :

- Quantification IL-12p70 : Human IL-12 (p70) ELISA Set, BD, Catalog No.555183
- Quantification TNF- α : Human TNF ELISA Set, BD, Catalog No.555212

Le protocole de réalisation des quantifications par technique ELISA provient du fournisseur des kits, BD Bioscience.

2-5-3. Protocole de marquages par immunofluorescence indirecte

Fixation et conservation des échantillons

Après la culture, les éponges et leur ancrage en papier sont fixés en Paraformaldéhyde (PFA) 4%, 20 minutes à température ambiante ou 45 minutes à 4°C. Après rinçage en PBS 1X, les échantillons sont partiellement déshydratés en Sucrose 30% masse/volume dans du PBS 1X. L'incubation minimum est sur toute la nuit à 4°C, les échantillons peuvent être conservés dans le sucrose ou dans du PBS1X jusqu'à utilisation.

Les éponges utilisées pour réaliser des coupes transversales sont débarrassées de leur encrage en papier, coupées en deux par leur milieu, et incluses dans le composant OCT (*Optimal cutting temperature compound*) et conservées à -80°C. Les coupes transversales de 5 μ m à 30 μ m d'épaisseur, sont réalisées sur un cryostat Leica CM3050 S, de façon à ce que l'épiderme et le derme soient coupés en même temps par la lame.

Technique de marquage par immunofluorescence indirecte

Les éponges et coupes transversales sont perméabilisées et saturées entre 1 et 4 heures (1 heure pour les coupes et jusqu'à 4h pour les éponges complètes) avec une solution de 2% d'albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin*, BSA), supplémenté avec 0,1% de Triton100X dans du PBS1X, puis lavées en PBS 1X. Les anticorps primaires, à la dilution optimale (autour de 100 et 200ng/mL) dans du PBS1X+BSA2% sont incubés toute la nuit à 4°C. Après une série de lavages en PBS, les anticorps secondaires, à la dilution optimale (entre 0,5 et 2µg/mL, suivant les recommandations du fournisseur) dans du PBS1X+BSA2%, sont incubés sur les échantillons entre 1 et 4 heures (entre 1 et 2 heures pour les coupes et jusqu'à 4h pour les éponges complètes) à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Un marquage de l'ADN (des noyaux des cellules, dans ce qui nous intéresse) au 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) peut être fait en même temps que l'anticorps secondaire à 0,5µg/mL ou 20 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière à 5µg/mL, dans du PBS.

Après de multiples lavages en PBS, les échantillons sont inclus dans du milieu de montage Fluoromount-G®. Les éponges complètes marquées par immunofluorescences indirectes sont incluses entre deux lamelles de verres, pour permettre une orientation adéquate au moment de l'observation au microscope. Une incubation de 24 à 48 heures, à température ambiante et à l'abri de la lumière, est nécessaire pour une polymérisation complète du milieu de montage.

Observation des échantillons marqués, acquisition et analyse des images

Les échantillons ont été observée au microscope Confocal LSM700 de chez Zeiss et les images ont été acquises par le logiciel propriétaire logiciel ZEN 2010. Les images brutes à l'extension .zvi ou .lsm ont été analysées par le logiciel libre de droit ImageJ dans sa version ImageJ-2 Fiji.

2-5-4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites en utilisant une analyse de la variance à un facteur (*one-way ANOVA*), corrigées par un test du comparaison multiple (test *post-hoc*) Bonferroni avec un risque d'erreur $\alpha=0,05$. Les résultats de comparaisons sont considérés comme significatifs quand le calcul de la p-valeur observée est inférieure au risque α . Les résultats sont exprimés en moyennes \pm leurs écart-types centrés sur la moyenne (*standard error of the mean*, SEM).

Chapitre III

Résultats

1- Effets de la substance P et du CGRP sur les MonoDCs.

1-1. Les MonoDCs expriment NK1R et RAMP1

Avant même de déterminer si les neuropeptides ont un impact sur les MonoDCs, il est nécessaire de savoir si ces cellules expriment les récepteurs adéquats. La littérature a uniquement statué sur l'expression de NK1R par les monocytes humains et l'expression de CLR/RAMP1 par des MonoDCs.

Les MonoDCs immatures CD1a⁺ (phénotype majoritaire recherché lors de la différenciation des monocytes sanguins humains) ont montré une expression claire du récepteur NK1R (Figure 24 a,b,c). Suite à l'activation de NK1R par la SP, le récepteur peut s'internaliser pour dégrader la SP (désensibilisation) ou être lui-même dégradé. Jusqu'à présent, l'effet des neuropeptides a été observé sur des cellules immatures ou sur des cellules résidentes de la peau et non sur des cellules matures. La persistance de l'expression du récepteur en fonction de l'activation, sur cellules humaines n'a pas été évaluée par la littérature.

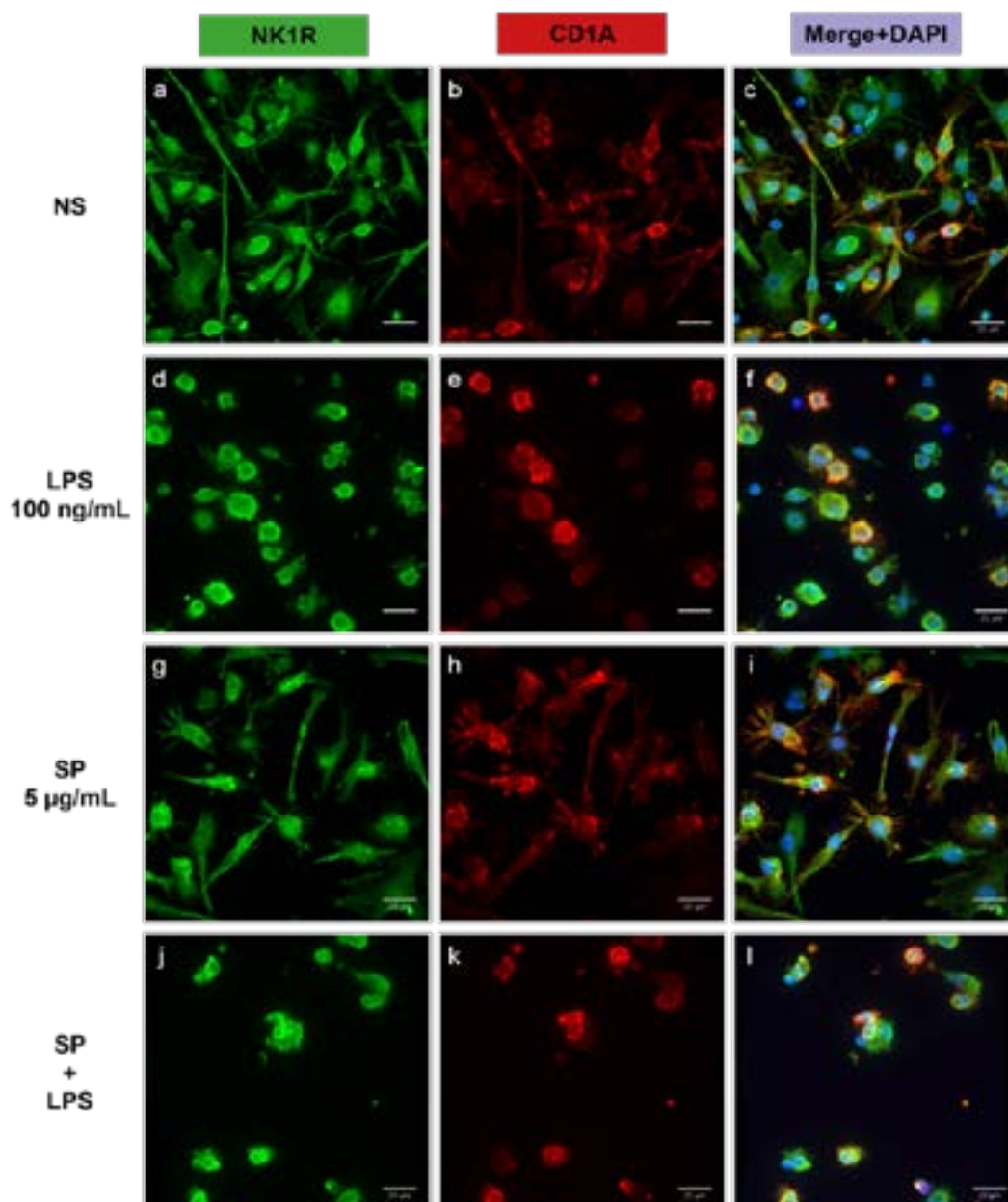


Figure 25 : Observation au microscope confocal d'immunofluorescence de MonoDCs.

Après 5 jours de différenciation à partir de monocytes, les MonoDCs ont été placées pendant 24h dans les conditions non-stimulées (NS, a,b,c), stimulées avec 100ng/mL de lipopolysaccharide (LPS, d,e,f), stimulées avec 5µg/mL ($3,7 \cdot 10^{-9}M$) de Substance P (SP, g, h, i) ou stimulées avec le LPS et la SP (j, k, l). Toutes les MonoDCs CD1a⁺ expriment le récepteur NK1R, quel que soit leur état d'activation.

Barre d'échelle : 20µm

Par immunofluorescence et observation en microscopie confocale, les MonoDCs ont conservé leur expression de NK1R en cas d'activation par 100ng/mL LPS (Figure 24 d,e,f), en cas de stimulation du récepteur par 5µg/mL ($3,7 \cdot 10^{-9}M$) SP (Figure 24 g,h,i) ou en cas d'activation par le LPS et la SP (Figure 24 j,k,l).

Cette observation a uniquement pu être effectuée en immunofluorescence et les tentatives pour reproduire l'expérience en cytométrie en flux n'ont pas abouti. Passer par la cytométrie en flux aurait permis de quantifier une éventuelle modulation de l'expression extracellulaire de NK1R en fonction de l'activation des MonoDCs. Enfin, les MonoDCs, quelque soit le stade d'activation, ont montré une coexpression de RAMP1 avec NK1R (Figure supplémentaire 1).

1-2. L'activation directe des neuropeptides sur les MonoDCs influence leur phénotype activé.

Chez la souris, l'activation de NK1R augmente son expression par des DCs dérivées de cellules souches de moelle osseuse [428, 555]. Cependant aucune donnée similaire n'a été présentée avec des DCs humaines. L'observation de l'activation des MonoDCs se fait par cytométrie en flux, à la suite de 24h de culture post-différenciation. La surexpression de HLA-DR et l'expression de CD86 par la même population de cellules traduit un phénotype activé (HLA-DR^{high}-CD86⁺) et l'expression de CD86 et de CD83 pour une même population de cellules traduit un phénotype fortement activé (CD86⁺ CD83⁺). Sans activation, les MonoDCs présentent toujours une population s'activant spontanément, de l'ordre de 8% de HLA-DR^{high} CD86⁺. Avec 100ng/mL de LPS pendant 24h, la population activée est de 99% de HLA-DR^{high} CD86⁺. Afin d'observer une éventuelle modulation de CD86 en fonction de l'activation des MonoDCs par les neuropeptides, des doses intermédiaires de 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10ng/mL de LPS ont été choisies.

Quelle que soit la concentration en LPS, la SP et le CGRP, séparément ou ensemble, n'ont pas modulé les taux de populations de MonoDCs HLA-DR^{high} CD86⁺ activées (Figure 25, A) ou CD86⁺ CD83⁺ fortement activées (Figure 25, B) par rapport au contrôle sans neuropeptides. Une stimulation unique, pendant 24h, de neuropeptides n'a donc pas eu d'influence sur ces marqueurs de la maturation. Il s'agit bien d'une application unique de neuropeptides, les concentrations de SP et CGRP subsistant dans le milieu de culture après activation n'ayant pas été évaluées. Dans le cadre d'une activation de DCs cutanées par des neurones nocicepteurs, l'activation des neuropeptides se fait de façon continue, contrairement au protocole expérimental présenté ici.

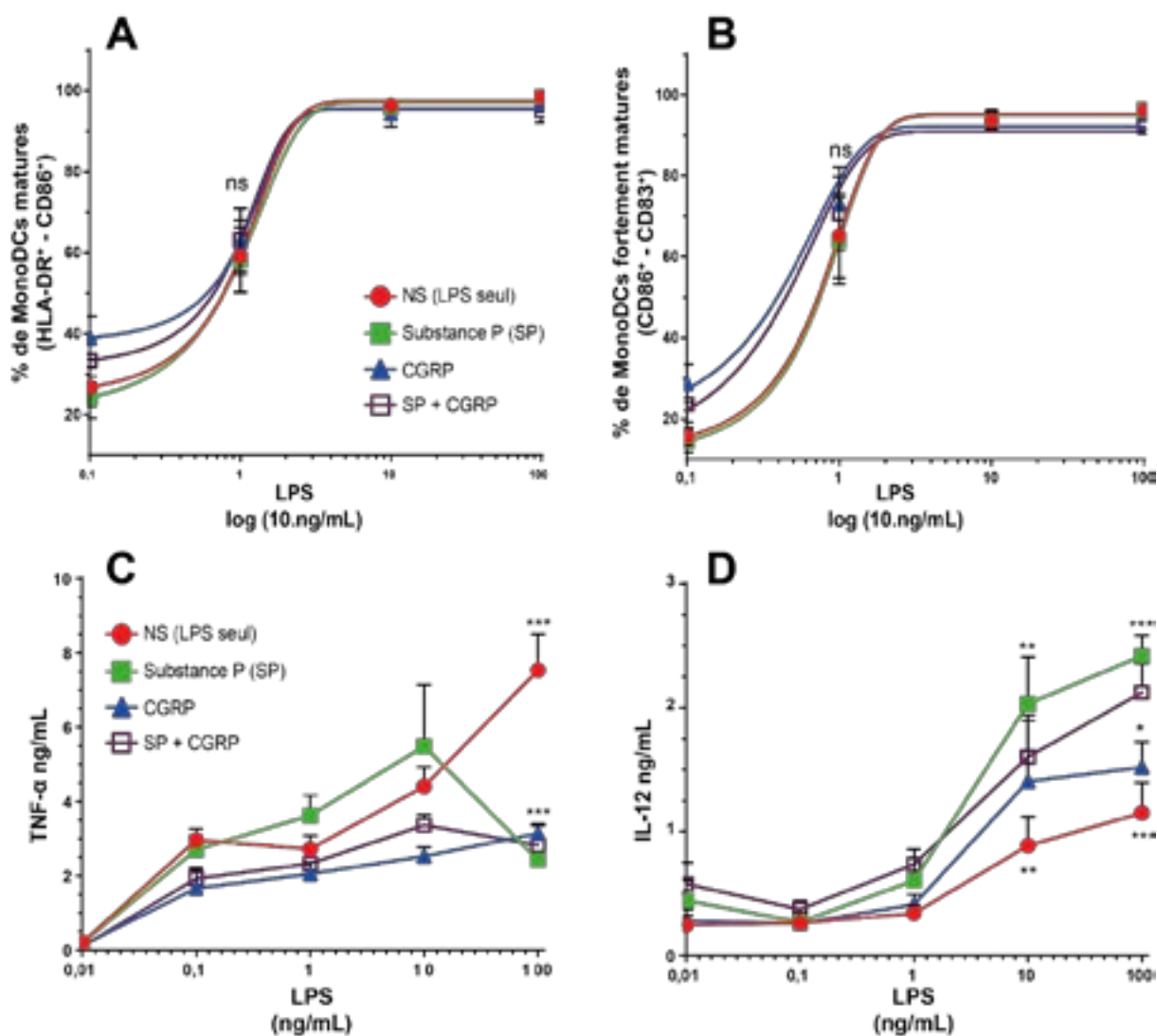


Figure 26 :

(A et B) Analyse par cytométrie en flux de l'activation des MonoDCs après 24h de d'activation, avec ou sans stimulation de SP et CGRP. (C et D) Quantification par ELISA de la concentration des surnageants de MonoDCs avec ou sans stimulation SP et CGRP.

Analyse statistique sur n = 6, ANOVA avec comparaison multiple Bonferroni *** p = 0,0004 ; **p = 0,0018 ; * p = 0,0117.

La capacité des MonoDCs à exprimer des molécules de costimulation comme CD86 ou CD83 n'est pas la seule caractéristique phénotypique caractérisant leur maturation. La sécrétion de cytokines par les DCs fait partie du signal III permettant la différenciation des LT et influence donc l'orientation de la réponse adaptative. Nous avons quantifié la sécrétion de TNF- α et d'IL-12p70 par analyse ELISA des surnageants des MonoDCs, après 24h dans les mêmes conditions de stimulation que pour l'analyse de l'activation par cytométrie en flux. Pour la plus

forte dose de LPS (100ng/mL), la SP et le CGRP ont diminué de façon significative la sécrétion de TNF- α (Figure 25, C) et augmentent la sécrétion d'IL-12p70 (Figure 25, D) par les MonoDCs activées. La prochaine étape pour déterminer si cette variation de phénotype a un impact sur l'orientation des T_H sera de mettre des LT CD4⁺ naïfs en présence de MonoDCs stimulées par des neuropeptides.

1-3. L'activation ou l'inhibition des récepteurs aux neuropeptides n'intervient pas dans la migration des différentes populations de DCs de la peau normale humaine.

Nos résultats *in vitro* ont montré que les neuropeptides ont une influence sur la sécrétion des cytokines par les MonoDCs activées. Dans un contexte pro-inflammatoire, une des caractéristiques essentielles des DCs est leur capacité à migrer hors de leur tissu de résidence pour jouer leur rôle de CPA dans les ganglions lymphatiques. La migration des DCs dans un contexte pro-inflammatoire est induite spontanément dans le modèle de culture *ex vivo* dit « Crawl-Out ». Un explant de 4cm² de d'épiderme et de derme supérieur d'épaisseur homogène (800 μ m) est placé à la surface de milieu de culture pendant 4 jours. A la fin de ces 4 jours, des dDCs et des LCs auront migré hors de la peau et pourront être récoltées dans le milieu de culture. Les différentes populations de DCs sortant, à savoir les LCs, les dDCs CD14⁺ et les dDCs CD1a⁺ sont quantifiées en cytométrie en flux. La substance P et le CGRP ont été ajoutés, en une seule application, au moment de la mise en culture. L'ajout de ces neuropeptides n'a pas modifié la proportion des populations sortant des explants de peau, par rapport au contrôle sans neuropeptides ajoutés (Figure 26, A).

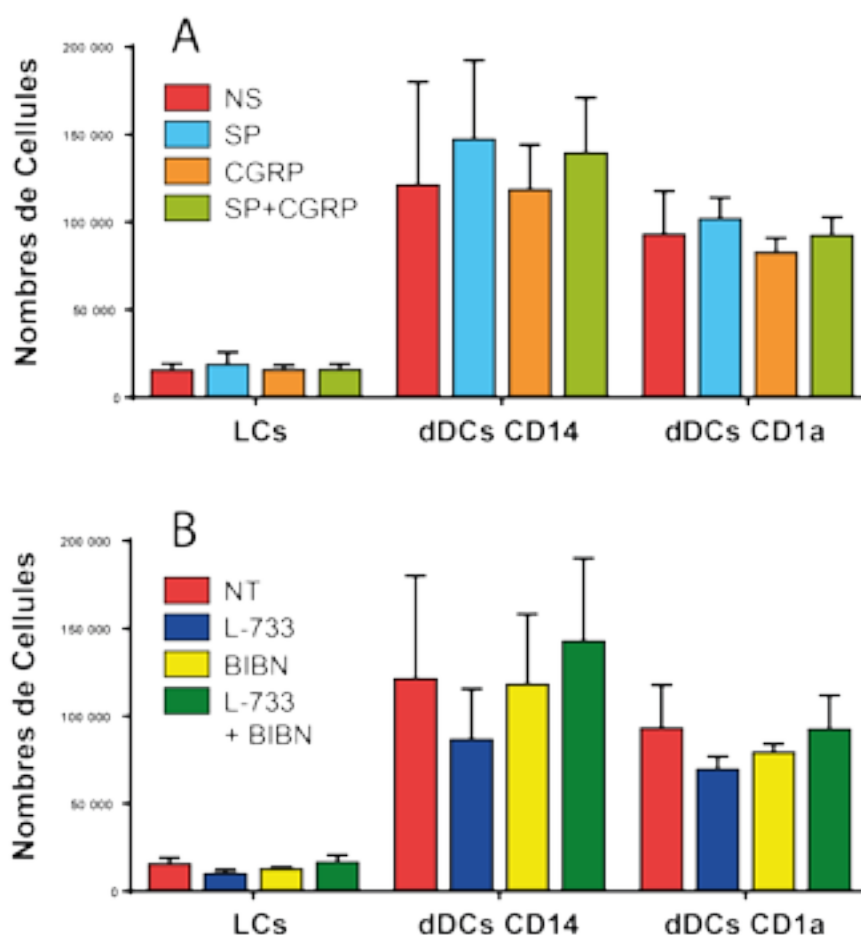


Figure 27 :

Analyse par cytométrie en flux des différentes populations de DCs sortant d'explants de peau normale humaine après 4 jours de culture. Trois populations de DCs sortant de la peau humaine sont identifiées, les LCs, les dDCs CD14⁺ et les dDCs CD1a⁺. (A) L'ajout de 5µg/mL substance P et de 5µg/mL de CGRP ne change pas la proportion de ces populations migrantes. (B) Le même résultat est observé en cas d'inhibition de NK1R par L-733,060 (L-733 ; 0,5 ng/mL) ou inhibition de CLR/RAMP1 par BIBN 4096 (BIBN ; 0,1 ng/mL). n=4, résultats non-significatifs après analyse ANOVA.

Le processus opératoire à l'origine des échantillons de peau humaine sépare les terminaisons nerveuses de leur corps cellulaire. Les terminaisons mortes dans la peau ne vont plus pouvoir maintenir leur équilibre ionique, entraînant une exocytose des vésicules contenant les neuropeptides. Ainsi, il est possible que l'ajout de neuropeptides au milieu de culture ne soit pas nécessaire ou ait un effet négligeable parce que les cellules immunitaires ont déjà été exposées aux neuropeptides. Cependant l'ajout d'un antagoniste à NK1R, le L-733,060 ou d'un antagoniste à CLR/RAMP1, le BIBN 4096, n'ont pas changé la proportion des populations de DCs sortant de l'explant (Figure 26, B).

Le dosage de SP ou de CGRP à la fin du Crawl-Out permettrait de valider l'hypothèse selon laquelle les DCs sont déjà activés par les neuropeptides avant la mise en culture. De plus, un seul type d'antagoniste a été utilisé et dans une seule dose, en suivant les recommandations du fournisseur. Une expérimentation dose-réponse permettrait de valider l'efficacité des antagonistes. Enfin, nous ne sommes pas parvenus à observer, par immunofluorescence, de marquages spécifiques de l'innervation de la peau normale humaine, avant ou après le Crawl-Out, renforçant l'hypothèse de la mort des neurones.

1-4. Conclusion de l'impact des neuropeptides sur les DCs humaines

Deux modèles ont été utilisés pour évaluer l'impact des neuropeptides sur les DCs humaines : un modèle *in vitro* en monoculture pour évaluer l'activation des cellules, et un modèle *ex vivo* d'explant de peau normale humaine pour évaluer le potentiel migratoire des DCs.

Des LCs dérivées de monocytes sanguins humains, dont le phénotype et la fonction diffèrent des MonoDCs « classiques », pourraient être utilisées, complétant ainsi le protocole *in vitro*. De plus, la sécrétion de seulement deux cytokines a été quantifiée. Pour évaluer l'impact des neuropeptides sur l'orientation du phénotype mature des MonoDCs, il serait intéressant d'évaluer la sécrétion de l'IL-10 et de l'IL-23, déjà étudiés *in vivo* chez la souris, ou encore l'IL-1 β et l'IL-6, connus pour induire une orientation T_H1, et enfin l'IL-1 α et l'IL-33, connus pour induire une orientation T_H2.

Ces mêmes analyses de cytokines pourraient être pratiquées sur le modèle *ex vivo*, pour savoir si ce modèle, dont la culture entraîne une inflammation difficilement contrôlable, est le plus adapté pour évaluer l'impact des neuropeptides sur la capacité de migration des DCs, et ainsi d'effectuer une comparaison avec un modèle tel que celui que nous avons mis au point, où les terminaisons nerveuses ne sont pas dissociées de leur corps cellulaire.

Enfin, le LPS, agoniste du TLR4, est le seul déclencheur de maturation des MonoDCs que nous avons testé au cours de cette série d'expériences. Pour compléter l'analyse, l'utilisation de molécules liant d'autres PRRs, comme le R848 (pour TLR7 et TLR8), pourraient être comparées au LPS. Les molécules sensibilisatrices, utilisées dans le modèle de peau complet (Matériel et Méthode, Partie 2-4 et Résultats, Partie 2-4) pourraient également être utilisées sur les MonoDCs, avec ou sans neuropeptides.

2- Construction d'un modèle de peau innervé par des neurones murins et immunocompétente pour l'étude de l'inflammation neurogénique.

La construction du modèle de peau innervée, vascularisée, immunocompétente et avec un épiderme stratifié repose sur la collaboration entre l'UPR3572 et le LOEX. La technique de différenciation des monocytes sanguins humains en DCs et les méthodes d'analyses immunologiques ont été établies à l'UPR3572 et le LOEX possède déjà un modèle innervé et vascularisé avec un épiderme stratifié.

2-1. Introduction des DCs dans le modèle de peau

La première étape a consisté à déterminer si le modèle de peau établi au LOEX permet l'incorporation de MonoDCs et le maintien de leur phénotype immature. Le protocole d'ensemencement du LOEX repose sur l'ensemencement successif dans la matrice de collagène de 800 000 cellules endothéliales, épidermiques, nerveuses ou fibroblastiques, pour une surface de culture de 2,7cm². Les DCs de la peau normale humaine ne constituent pas la population majoritaire du derme ou de l'épiderme. Ensemencer les MonoDCs dans la même proportion que les autres populations cellulaires ne reflèteraient pas la physiologie de la peau normale humaine.

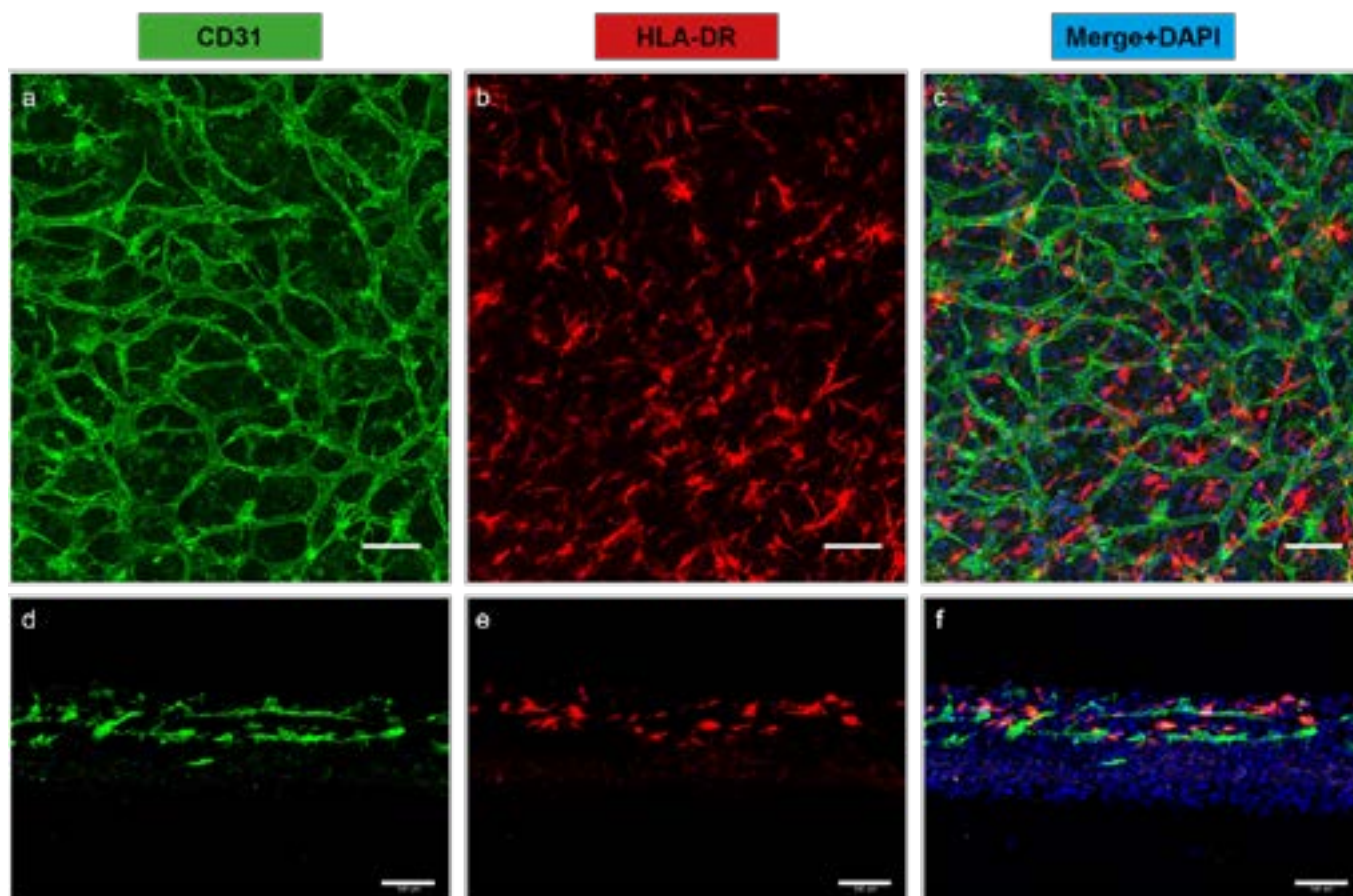


Figure 28 :

Immunofluorescence de derme reconstruit contenant des fibroblastes, des cellules endothéliales (CD31+), et 200 000 MonoDCs (HLA-DR+) après 23 jours de culture. L'observation est réalisée par microscopie confocale à la surface du derme (a,b,c) ou sur une coupe transversale du derme (d,e,f). Barre d'échelle = 100 μ m.

Plusieurs quantités de MonoDCs ont été testées (50 000, 100 000 ou 200 000 cellules par éponges, pour 2,7cm² de surface de culture approximative). L'ensemencement des MonoDCs a d'abord été expérimenté sur un modèle de derme avec ou sans pseudovaisseaux, dans l'hypothèse que la présence des cellules endothéliales pouvait influencer la stabilité des MonoDCs. Au terme de 23 jours de cultures (14 jours pour la formation du derme +7 jours après ensemencement de 200 000 MonoDCs), les MonoDCs (HLA-DR⁺) ont bien été détectées dans le derme et se sont réparties de façon homogène, à proximité des pseudovaisseaux formés par les cellules endothéliales (CD31⁺). Cette répartition a été observée depuis la surface du derme (Figure 27, a,b,c) ou au travers d'une coupe transversale du derme (Figure 27, d,e,f).

Cette première observation nous a permis d'évaluer la répartition des MonoDCs en fonction de leurs ensemencements ou de la présence de cellules endothéliales. En se basant

uniquement sur des coupes transversales, il semblerait que l'absence de cellules endothéliales impacte grandement la persistance des MonoDCs dans le derme. Ce phénomène est nettement visible pour 200 000 MonoDCs ensemencés (Annexe 2, d et h). En revanche, avec une observation de la surface du derme, la différence entre le nombre de MonoDCs ensemencées, avec ou sans cellules endothéliales, n'est pas aussi claire (Annexe 3). L'observation de coupes transversales a pu être biaisée par le plan de coupe et ne pas refléter correctement la répartition des MonoDCs dans le derme. De plus, à cause de l'épaisseur du derme et même avec une acquisition en microscopie confocale, l'immunofluorescence est limitée pour réaliser une analyse quantitative. Il serait préférable de réaliser une digestion totale du derme et de quantifier les populations cellulaires présentes par cytométrie en flux pour conclure sur l'utilité des cellules endothéliales dans la persistance des MonoDCs dans le modèle.

Au fur et à mesure des répétitions de cette expérience, la condition avec 200 000 MonoDCs présente la meilleure homogénéité de répartition des cellules en coupe transversale. C'est donc cette condition qui a été conservée pour la suite du développement du modèle.

2-2. Etude du comportement des MonoDCs dans le modèle de peau en cas d'activation

Pour rendre les MonoDCs utilisables dans l'analyse de l'interaction neuro-immunitaire cutanée, il est nécessaire de s'assurer que ces cellules restent immatures en absence de stimulation, acquièrent un phénotype mature en cas d'activation, et puissent migrer hors du modèle. Des expériences préliminaires ont été réalisées dans un modèle de peau complet mais sans innervation, stimulé ou non avec du LPS.

2-2-1. Phénotype des MonoDCs dans le modèle de peau

Pour se rapprocher de la caractérisation phénotypique des MonoDCs réalisée en cytométrie en flux, l'observation de la maturation des cellules *in situ* a été faite dans un premier temps par un marquage du CD86. Des MonoDCs en monoculture ont également été stimulées avec du LPS pour servir de contrôle aux modèles de peau. Pour éviter tout phénomène de dilution, la concentration du LPS utilisée pour stimuler les modèles de peau a été volontairement dix fois plus élevée que celle utilisée sur les MonoDCs en monoculture. En

effet, les MonoDCs présentes dans les modèles de peau sont entourées de nombreuses autres cellules susceptibles de capturer le LPS.

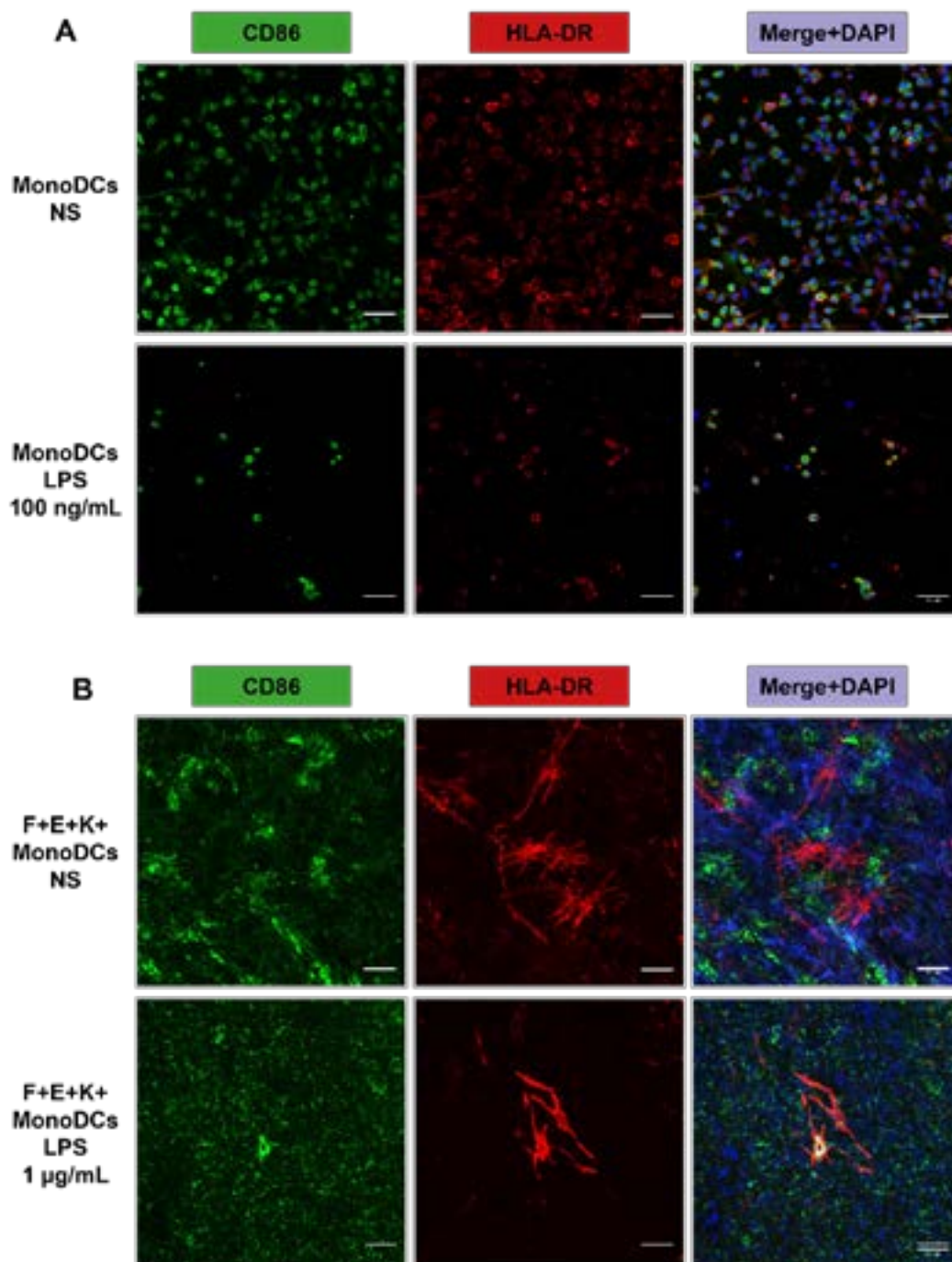


Figure 29 :

Observation par immunofluorescence de l'expression de CD86 sur MonoDCs (HLA-DR⁺) en monoculture (A) ou intégrées dans le modèle de peau reconstruit comprenant des fibroblastes, des cellules endothéliales et des kératinocytes (B). Conditions testées : cellules non stimulées (NS) ou stimulées au LPS (24h, 100ng/mL pour les MonoDCs en monoculture ou 1µg/mL dans le modèle de peau). Barre d'échelle = 50µm

Cependant, l'observation de l'expression de CD86, en fonction des conditions de stimulation, n'a pas été concluante en immunofluorescence. Le marquage CD86 était omniprésent sur les MonoDCs (HLA-DR⁺) en monoculture, quelque soit l'état d'activation (Figure 28, A). De plus, l'expression de CD86 n'était pas détectable sur les MonoDCs dans le modèle de peau (Figure 28, B). Plusieurs anticorps (monoclonaux et polyclonaux) anti-CD86, provenant de plusieurs espèces différentes ont été testés sans succès sur les MonoDCs en monocultures ou dans les modèles de peau.

Une alternative à l'analyse de l'expression de marqueurs d'activation membranaires tels que CD86 a été mise au point. L'emplacement des facteurs de transcription dans les compartiments de la cellule représente en effet fidèlement l'état de maturation des MonoDCs. Le facteur de transcription ATF-3 est un marqueur d'activation tardif, utilisé *in vitro* et *in vivo* pour observer l'activation des neurones dans les DRGs murins [571], et se trouve également impliqué dans la maturation des DCs. En cas d'activation de la cellule, ATF-3 va être phosphorylé et va entrer dans le noyau pour permettre la régulation de l'expression de ses gènes cibles. C'est cette translocation d'ATF-3 du cytoplasme au noyau que nous avons cherché à observer, par immunofluorescence, au cours de la maturation des MonoDCs en monoculture.

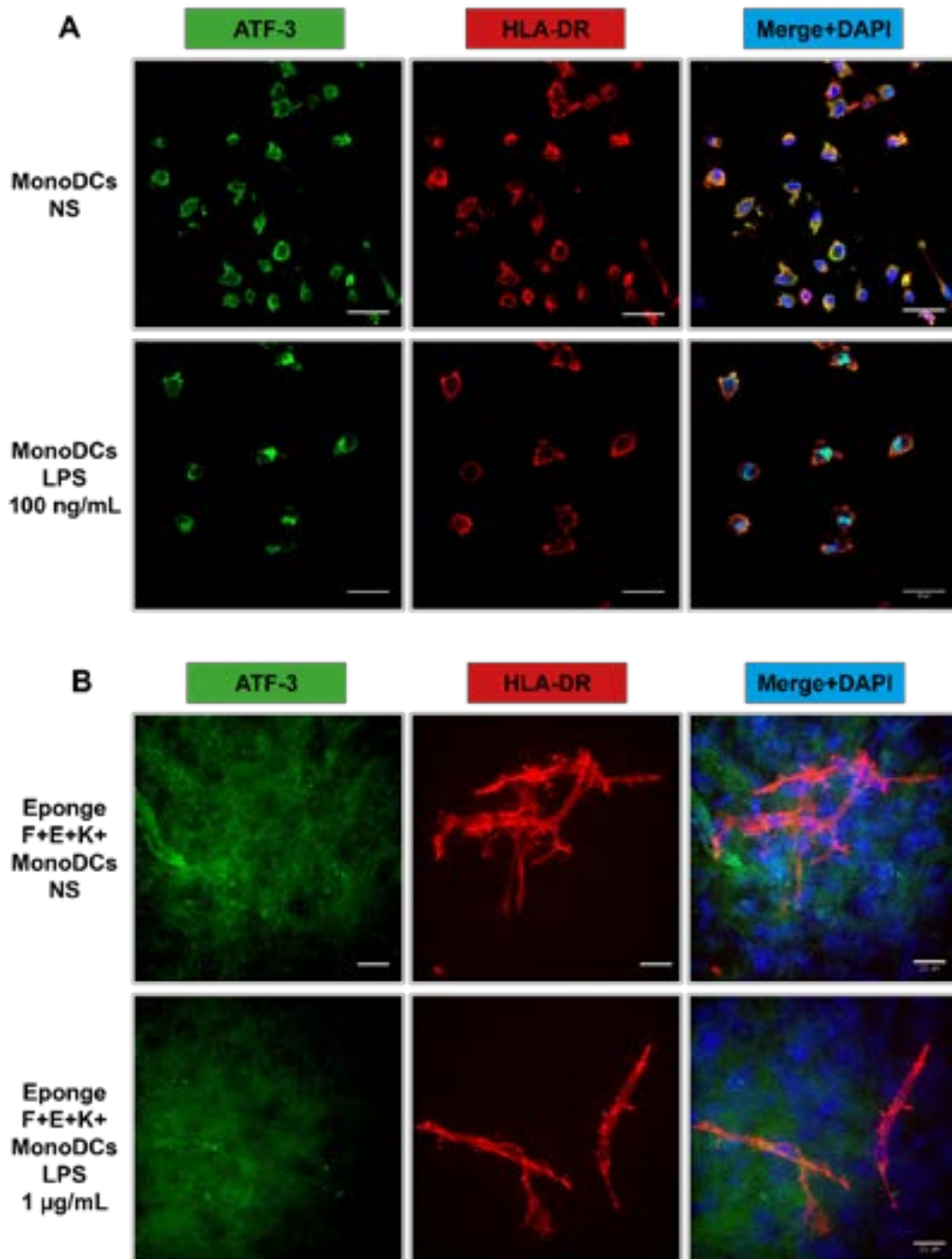


Figure 30 :

Observation par immunofluorescence de la translocation nucléaire d'ATF3 sur MonoDCs (HLA-DR⁺) en monoculture (A) ou intégrées dans le modèle de peau reconstruit comprenant des fibroblastes, des cellules endothéliales et des kératinocytes (B). La stimulation au LPS se fait pendant 24h, avec 100ng/mL de LPS pour les MonoDCs en monoculture et 1µg/mL dans le modèle de peau. Barre d'échelle = 25µm

Il est possible d'observer une plus forte concentration d'ATF-3 au niveau du noyau des MonoDCs (HLA-DR⁺) activées par le LPS, par rapport aux MonoDCs non stimulées (NS) (Figure 29, A). La translocation d'ATF-3, consécutive à la maturation des MonoDCs, représente donc un moyen prometteur pour observer l'activation des cellules en immunofluorescence. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à observer ATF-3 lorsque les MonoDCs se trouvent dans le modèle de peau, que ce soit dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules, avec ou sans activation (Figure 29, B). Il est possible que le bruit de fond généré par le derme et le collagène rendent cette observation plus difficile dans un modèle peau reconstruite. Les facteurs de transcription de la famille du NF- κ B pourraient également être détectés dans ce type d'approche.

De plus, les marqueurs habituellement utilisés en cytométrie en flux pour caractériser les MonoDCs, (comme CD1a ou CD14) ne fonctionnent pas en immunofluorescence sur les modèles de peau. Afin de pouvoir caractériser les MonoDCs ayant passé plusieurs semaines au sein du modèle de peau, il est nécessaire de les dissocier du modèle à la fin de la culture. Le derme reconstruit, dissocié mécaniquement de l'épiderme, a été digéré par le même procédé que celui que nous avons utilisé sur les dermes de peau normale humaine pour extraire les fibroblastes, c'est-à-dire par la collagénase H (Matériel et méthodes, Partie 2-1-2). Cette méthode a été choisie parce qu'elle ne repose pas sur l'utilisation de trypsine ou de dispase, ces enzymes pouvant cliver les molécules de surface caractéristiques des DCs. Cependant, lors de nos deux tentatives, les cellules du derme digéré ressortaient majoritairement positives au marqueur de mort (Fixable Viability Dye eFluor-450) et aucune MonoDCs n'a été détectée dans la population de cellules vivantes (données non présentées). Le protocole de digestion du derme reconstruit n'est donc pas au point et devra être optimisé. Il est également possible que les cellules ne soient pas mortes mais qu'elles ne soient pas détectables avec nos protocoles d'analyses habituels, à cause d'un possible changement morphologie induits pas la culture 3D.

Ces expériences ont néanmoins montré que les MonoDCs étaient toujours présentes dans le modèle de peau, même après formation de l'épiderme, ce qui représente un total de 28 jours de culture (Matériel et méthodes, parties 2-3-4 et 2-3-5) après la différenciation des monocytes en DCs. Cette observation est importante, puisqu'il aurait été inutile d'envisager de mettre les MonoDCs dans un modèle de peau contenant une innervation, si les cellules immunitaires ne pouvaient pas supporter de longs temps de cultures.

2-2-2. Migration des MonoDCs

La migration des MonoDCs hors du modèle de peau, au moment de l'activation, représente à la fois une caractérisation fonctionnelle et une alternative pour obtenir une suspension cellulaire analysable par cytométrie en flux. Cependant, des activations au LPS de 24h ou 48h n'ont pas entraîné de sorties de cellules hors du modèle de peau. Il est possible que la présence de pseudo-vaisseaux dans le derme nuise à la sortie des cellules hors du modèle. En effet, dans la peau normale humaine, les cellules endothéliales de vaisseaux lymphatiques sécrètent des facteurs chimiotactiques en cas d'inflammation, comme le CCL21, pour recruter les CPA activées et les faire entrer dans la circulation lymphatique (Introduction, Partie 2-4-2) [208]. En culture *ex vivo*, ce recrutement vers les vaisseaux conduit les cellules vers le surnageant, ce qui n'est probablement pas possible avec les pseudo-vaisseaux qui se forment dans notre modèle. De plus, le milieu de culture nécessaire à la stratification de l'épiderme et au maintien du modèle en culture à la fin de cette stratification contient de l'hydrocortisone, un glucocorticoïde anti-inflammatoire, empêchant peut-être la maturation des DCs humaines *in situ* [572, 573].

Nous avons cependant tenté d'ajouter du CCL21 au milieu de culture pendant l'activation des modèles de peau afin de permettre aux MonoDCs d'être guidées hors du modèle. Les modèles de peau ont été stimulés avec 1µg/mL de LPS et 250µg/mL de CCL21, en milieu de culture avec ou sans hydrocortisone (Annexe 4-A). Pour se rapprocher du modèle de migration des DCs de la peau normale humaine (Crawl-Out), les peaux reconstruites ont été stimulées ainsi pendant 72h, avant de récolter et centrifuger le surnageant de culture à la recherche de cellules émigrantes. Des culots cellulaires ont été détectés seulement dans les conditions de stimulation où le milieu de culture ne contenait pas d'hydrocortisone. Parmi ces conditions, seules les conditions LPS et LPS+CCL21 ont permis l'observation de cellules en immunofluorescence (Annexe 4-B). Il semblerait que ces cellules soient des MonoDCs, exprimant du CD14 et le HLA-DR.

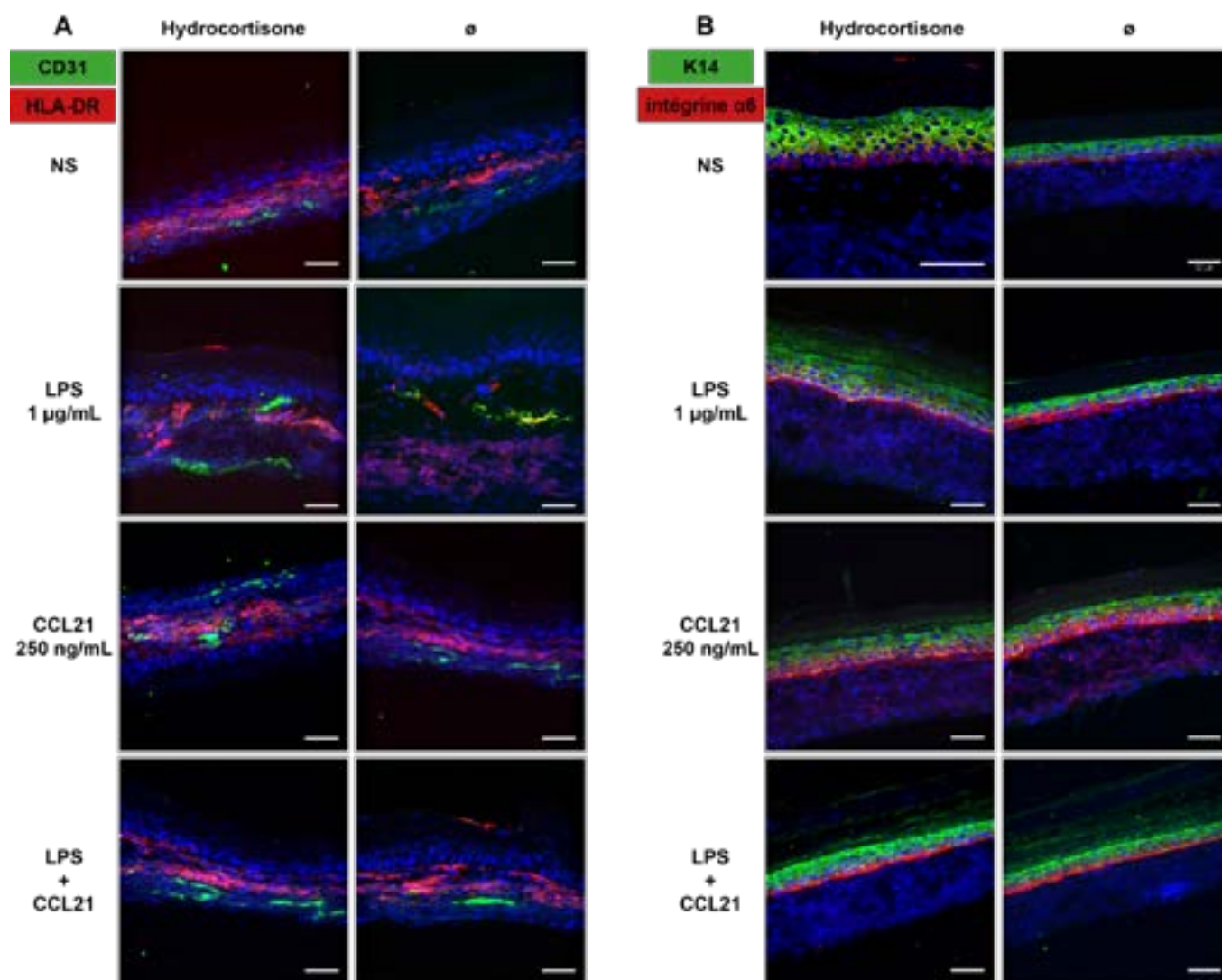


Figure 31 :

Observation par immunofluorescence de la morphologie des éponges stimulées avec ou sans hydrocortisone, pendant 24h. La morphologie du derme (A) observée par la présence des cellules endothéliales (CD31) et des MonoDCs (HLA-DR), ne varie pas en fonction des conditions de stimulation. Il en va de même pour les structures de l'épiderme (B), observées par l'expression de Kératine 14 (K14) et intégrine- $\alpha 6$. Barre d'échelle = 50 μ m

Cette expérience n'a pu être réalisée qu'à deux reprises, avec les mêmes observations à chaque fois. Elle nécessite donc d'être répétée pour statuer sur le phénotype des cellules sortantes. De plus, l'observation microscopique a permis de mettre en évidence des cellules pouvant correspondre à des MonoDCs mais l'immunofluorescence n'est pas la technique la plus adaptée pour réaliser un phénotypage complet. Il sera nécessaire de stimuler plusieurs éponges avec les mêmes conditions expérimentales pour obtenir le plus de cellules possibles dans les culots cellulaires et analyser les cellules migrantes par cytométrie en flux.

Cependant, l'observation des modèles de peau en immunofluorescence n'a démontré de différence dans la structure du derme (Figure 30A) ou de l'épiderme (Figure 30B) en présence ou en absence d'hydrocortisone. Si l'hydrocortisone est indispensable à la stratification de l'épiderme, une fois ce dernier formé, il n'est pas altéré en l'en privant le temps d'une stimulation de 24h.

2-3. La stratification de l'épiderme du modèle de peau reconstruite reproduit celle de la peau normale humaine.

Notre coculture 3D, contenant une pseudo-vascularisation, une innervation et une immunocompétence, doit également disposer d'un épiderme correctement organisé pour être qualifié de modèle de peau. Cette stratification a été analysée par le marquage des différents filaments intermédiaires et molécules d'adhésions exprimés par les kératinocytes au fur et à mesure de leurs différenciations (Introduction, Partie 1-2. L'épiderme).

L'épiderme du modèle de peau complet contenant des fibroblastes (F), cellules endothéliales (E), des kératinocytes (K), des neurones sensoriels murins (DRG) et des MonoDCs (Éponge F+E+K+DRGs+MonoDCs) a été comparé à l'épiderme d'une peau normale humaine. Les marquages de la molécule d'adhésion intégrine- $\alpha 6$, spécifique de la lame basale, et de la filaggrine, spécifique de la couche cornée, n'ont pas mis en évidence de différence entre les épidermes du modèle reconstruit et l'épiderme de la peau normale humaine (Figure 31, A). L'expression du filament intermédiaire, K10 (Kératine 10), caractéristique de la couche granuleuse et épineuse, a été trouvée au niveau des mêmes couches cellulaires dans les épidermes du modèle et de la peau normale humaine (Figure 31, B).

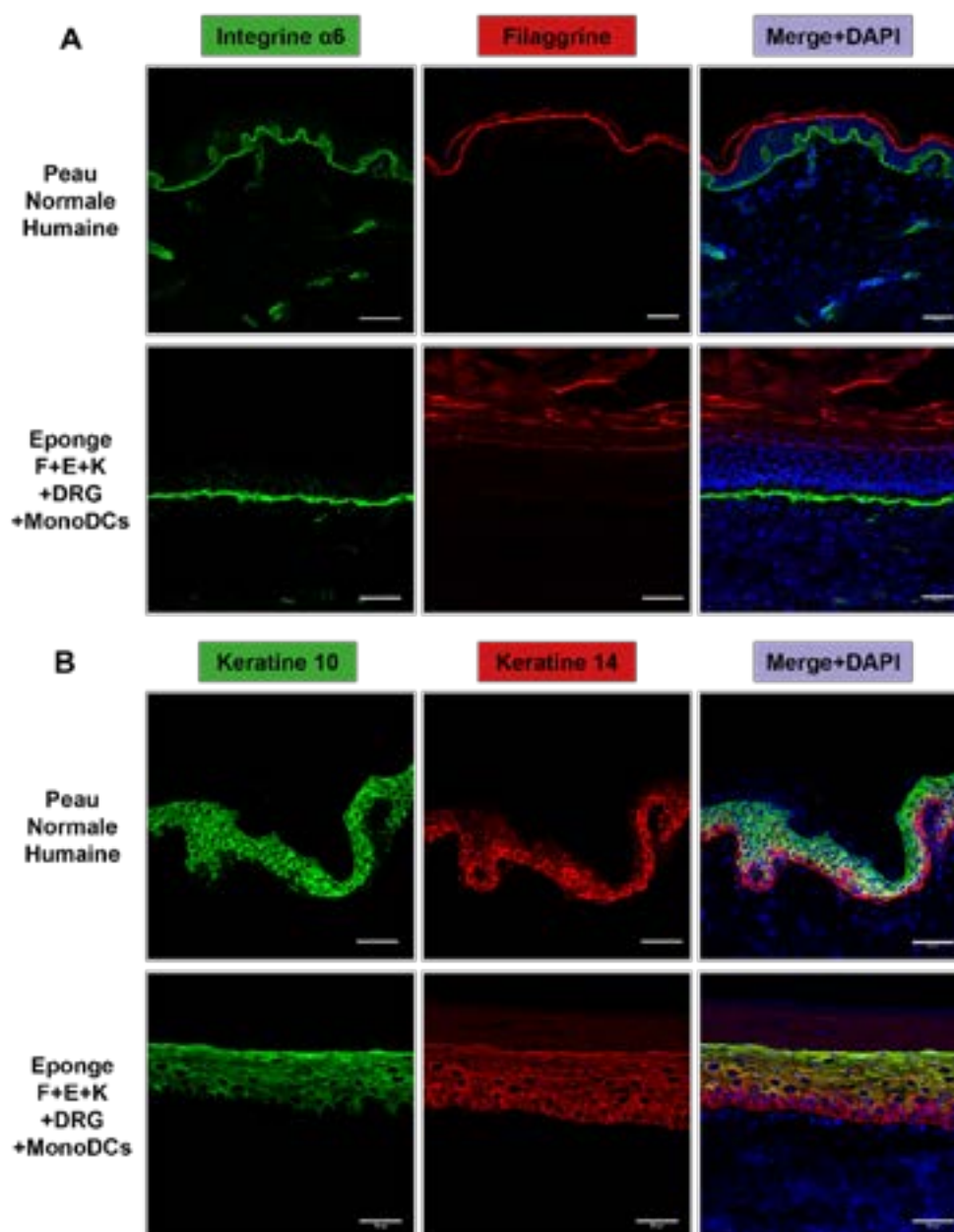


Figure 32 :

Immunofluorescences de coupes transversales de peau normale humaine et de modèle d'éponge complet contenant des fibroblastes (F), cellules endothéliales (E), des kératinocytes (K), des neurones sensoriels murins (DRG) et des MonoDCs. L'épiderme de la peau normale humaine et du modèle ont été comparés suivant l'expression d'intégrine $\alpha 6$, spécifique de lame basale et de filaggrine, spécifique de la couche cornée (A), mais également en fonction de la kératine 14, spécifique de la couche basale et de la Kératine 10, spécifique de la couche granuleuse et épineuse (B). Barre d'échelle = 100 μ m

Nous avons bien pu identifier un marquage du filament intermédiaire K14 dans la couche basale de l'épiderme reconstruit, comme observé dans l'immunofluorescence de la peau normale humaine. En revanche, dans l'épiderme du modèle reconstruit, l'expression de K14 a été détectée dans les couches supérieures de l'épiderme (Figure 31, B). Il est possible que la différenciation des kératinocytes du modèle de peau reconstruite ne soit pas complète, même s'ils expriment les marqueurs adéquats des couches supérieures.

Cette expression caractéristique de K14 dans le modèle a été retrouvée dans des constructions dont le derme contenait uniquement des fibroblastes. Cette différenciation incomplète peut dépendre du manque de stimulation mécanique des kératinocytes, ou bien du support de culture lui-même, soit l'éponge de collagène/chitosan. En effet, cette expression atypique de K14 n'est pas observée sur des modèles d'épiderme stratifié mis au point par d'autres équipes du LOEX [574, 575], qui travaillent principalement avec un derme généré par autoassemblage de feuillets de fibroblastes.

2-4. Activation du modèle de peau complet par des molécules sensibilisatrices

Après avoir observé la persistance des MonoDCs dans le modèle tout au long de la culture et caractérisé l'épiderme, la prochaine étape a consisté à réunir innervation et immunocompétence pour évaluer la capacité du modèle à s'activer sous l'influence de molécules sensibilisatrices.

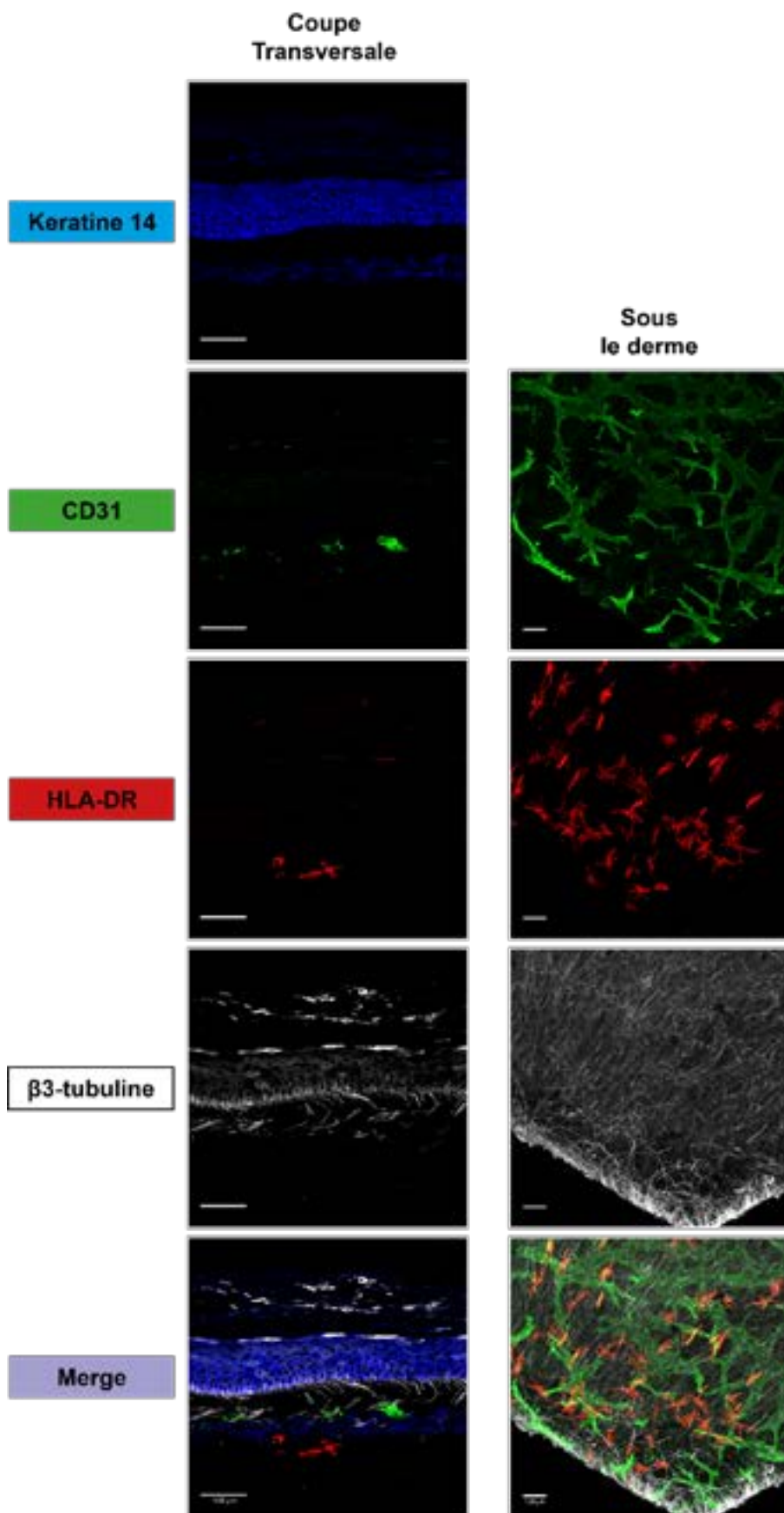


Figure 33 :

Caractérisation par immuno-fluorescence du modèle de peau complète, à partir de l'observation d'une coupe transversale et de l'observation par dessous du derme. Le modèle de peau complet comprend un épiderme fait de kératinocytes différenciés (Kératine 14), une pseudo-vascularisation faite de cellules endothéliales (CD31), un derme, dont l'immuno-compétence est assurée par des MonoDCs (HLA-DR), et une innervation sensorielle, où les axones des neurones murins extraits de DRGs (β 3-tubuline) innervent le derme jusqu'à l'épiderme.

Barre d'échelle : 100 μ m

Le modèle de peau complet utilisé pour ces expériences comprenait un épiderme stratifié et un derme innervé, vascularisé et immunocompétent. Le temps total de culture pour la mise en place de ce modèle est de 56 jours. Nous nous sommes assurés, par observation en immunofluorescence, que tous les types cellulaires étaient encore présents et identifiables au terme de la culture.

D'après les observations réalisées précédemment avec les dermes contenant des MonoDCs, les coupes transversales seules ne permettent pas de statuer de façon fiable sur la répartition et l'homogénéité de tous les types cellules présents. Une caractérisation en immunofluorescence, par observation au travers du modèle a donc été réalisée (Figure 32). Cette observation peut se faire uniquement à partir du dessous du modèle, car l'épiderme formé au-dessus génère trop d'auto-fluorescence. La coupe transversale de l'éponge a été utilisée ici pour vérifier que les neurones sensoriels innervent l'intégralité du derme, jusqu'à l'épiderme, et s'assurer ainsi que les terminaisons nerveuses puissent entrer en contact physique avec tous les types cellulaires du modèle.

Les sensibilisateurs ont été choisis parmi les molécules les mieux caractérisées par le test LLNA, et se distinguent par leurs pouvoirs sensibilisateurs (fort à faible ; **Tableau 5**). Pour cette première évaluation de l'action des sensibilisateurs sur le modèle, une concentration forte et une concentration faible ont été choisies d'après la banque de donnée de PubChem. La dose faible correspond à l'ED50 (*Effective dose 50*, dose efficace médiane), concentration à laquelle 50% des cellules humaines (immunitaires et non-immunitaires) sont activées dans un modèle *in vitro*. Pour éviter tout risque de trop forte dilution de ces produits à cause de la quantité de cellules le composant, et parce que les concentrations stipulées dans la banque de donnée PubChem correspondent à des tests sur cellules en monocouches, la dose forte que nous avons sélectionnée est volontairement une dose létale. Elle correspond à la LD30 (*lethal dose*, dose létale 30), concentration tuant 30% des cellules humaines (immunitaires et non-immunitaires) en modèle *in vitro*.

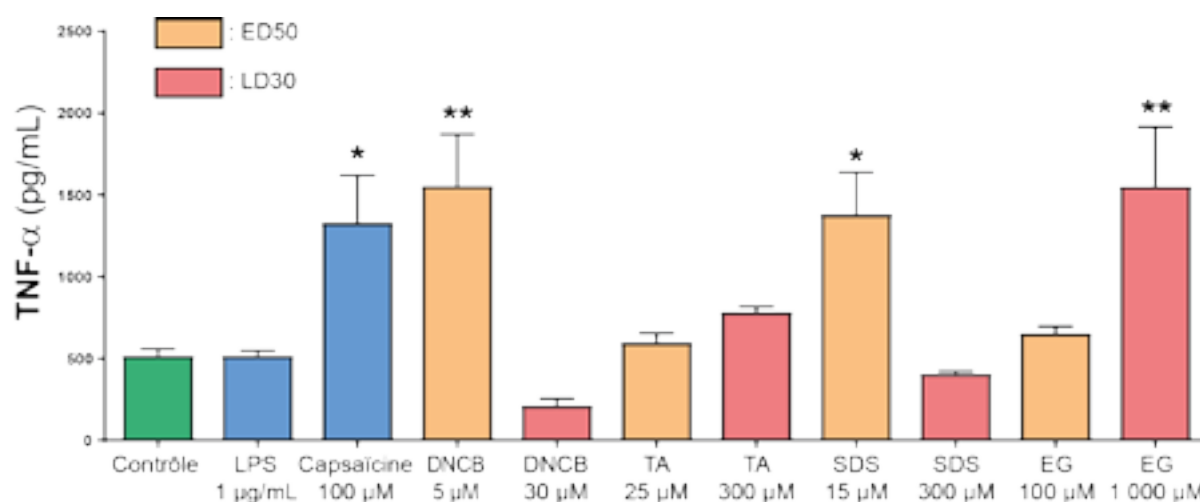


Figure 34 :

Quantification du TNF- α libéré par le modèle de peau complet après 24h de stimulation. Le TNF- α libéré par les cellules du modèle de peau (Fibroblastes + cellules endothéliales + kératinocytes + neurones de DRGs murin + MonoDCs) a été quantifié par ELISA après 24 heures de stimulation par le Dinitrochlorobenzène (DNCB), Acide-DL-Tartarique (TA), le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) et l'Éthylène glycol diméthylacrylate (EG), suivant une dose effectrice médiane (ED50) et une dose létale 30% (LD30). Le lipopolysaccharide (LPS) à 1µg/mL et la capsaïcine à 100µM servent de contrôle positif. $n=4$, écart-type centré sur la moyenne (SEM), test ANOVA et un test de comparaison multiple Bonferroni pour évaluer les variations significatives différentes par rapport au contrôle * $p=0,012$; ** $p=0,0025$.

Ces premières observations ont montré que le modèle de peau complète répond bien aux molécules sensibilisatrices en libérant du TNF- α dans le milieu de culture (Figure 33). Le modèle nous a permis de quantifier le potentiel sensibilisateur ou irritant d'une molécule, en se basant sur la libération du TNF- α en fonction des deux doses testées. Le TA n'a induit de production de TNF- α à aucune des concentrations testées. Le DNCB et l'éthylène glycol sont les deux sensibilisateurs où la prédiction du modèle correspond parfaitement à la classification du test LLNA. Le DNCB en faible dose (ED50, 5µM) a permis une libération de TNF- α significativement plus élevée que le contrôle, ce qui permet de le classer dans les sensibilisateurs forts. A l'inverse, l'éthylène glycol n'a entraîné une libération de TNF- α qu'en présence d'une dose élevée (LD30, 1 000µM), ce qui correspond à sa nature de faible sensibilisateur. De façon surprenante, le SDS a induit le même profil que le DNCB, bien qu'il ne soit pas considéré comme sensibilisateur, mais comme un simple irritant, incapable d'induire une réponse positive au test LLNA in vivo [576, 577]. La seule quantification de TNF- α sur deux doses de la molécule ne semble donc pas suffisante pour discriminer un sensibilisateur et un irritant.

Enfin, pour leurs doses les plus fortes (LD30) le DNCB et le SDS n'ont pas induit une sécrétion de TNF- α significativement supérieure au modèle non stimulé. Cette tendance pourrait s'expliquer par la mort des cellules productrices de TNF- α et sensibles à ces molécules. Un test complémentaire de viabilité cellulaire, comme la quantification de la Lactate Déshydrogénase (test LDH) dans les surnageants de cultures, permettrait de répondre à cette hypothèse [578].

Le dosage du TNF- α a été pratiqué sur le modèle de peau complet (F+E+K+DRGs+MonoDCs). Il sera intéressant de réaliser ce test sur des compositions de modèle de peau différentes :

- Modèle de peau vascularisé avec un épiderme stratifié, F + E + K
- Modèle de peau vascularisé avec un épiderme stratifié et une immunocompétence, F + E + K + MonoDCs
- Modèle de peau vascularisé avec un épiderme stratifié et une innervation sensorielle F + E + K + DRGs

Ces compositions permettront de déterminer quelles cellules sont particulièrement sensibles à l'une ou l'autre des molécules sensibilisatrices.

Le LPS n'a pas induit pas d'augmentation significative du TNF- α dans le surnageant, contrairement à la stimulation par la capsaïcine. Les MonoDCs ne sont pas les seules cellules à produire du TNF- α en cas d'inflammation cutanée, les kératinocytes pouvant être également directement activés par les molécules sensibilisatrices ou, indirectement, par l'intermédiaire des neuropeptides libérés par l'innervation sensorielle. Enfin, il faudra tenir compte dans les prochaines expériences que la maturation des MonoDCs puisse être limitée par la présence d'hydrocortisone dans le milieu de culture.

Molécule	Dinitrochlorobenzene (DNCB)		Acide-DL-Tartrique (TA)		Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)		Éthylène glycol diméthacrylate (EG)		
Classification	Sensibilisateur		Non-Sensibilisant		Irritant		Sensibilisateur		
Réponse LLNA	Extrême		Modéré		Faible		Faible		
Utilisation clinique	Contrôle positif pour les tests d'hypersensibilité		Antiseptique, antioxydant alimentaire (E334)		Fongicide, bactéricide, détergeant		Monomère fonctionnel dans la fabrication de polymères		
Prédiction par le modèle de peau complet	Sensibilisateur fort		Non-sensibilisateur		Faux positif ?		Sensibilisateur faible		
Doses									
EC50	LD30	5 µM	30 µM	25 µM	300 µM	15 µM	300 µM	100 µM	1 000 µM
Réponse à la dose EC 50		+		-		+		-	
Réponse à la dose LD 30		Mort cellulaire ?		-		Mort cellulaire ?		+	

Tableau 5 : Récapitulatif de l'action des sensibilisateurs chimiques sur le modèle de peau complet.

3- Development of an Innervated Tissue-engineered Skin with Human Sensory Neurons and Schwann Cells Differentiated from iPS Cells

Auteurs, affiliation et contributions

Quentin Muller^{1,2#}, Marie-Josée Beaudet^{1#}, Thiéry De Serres-Bérard¹, Sabrina Bellenfant¹, Vincent Flacher², François Berthod^{1*}

¹ Centre LOEX de l'Université Laval, Centre de recherche du CHU de Québec-UL, and Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec (Québec), Canada

² Laboratory CNRS UPR3572 Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry (I²CT), Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Author contribution:

QM and M-JB contributed to the conception, design and achievement of experiments TDSB and SB participated to the acquisition of data

VF participated in interpretation of data and critically revised the article

FB contributed to the study conception and design, analysis of data, drafting of the article and gave final approval of the submitted version

Résumé

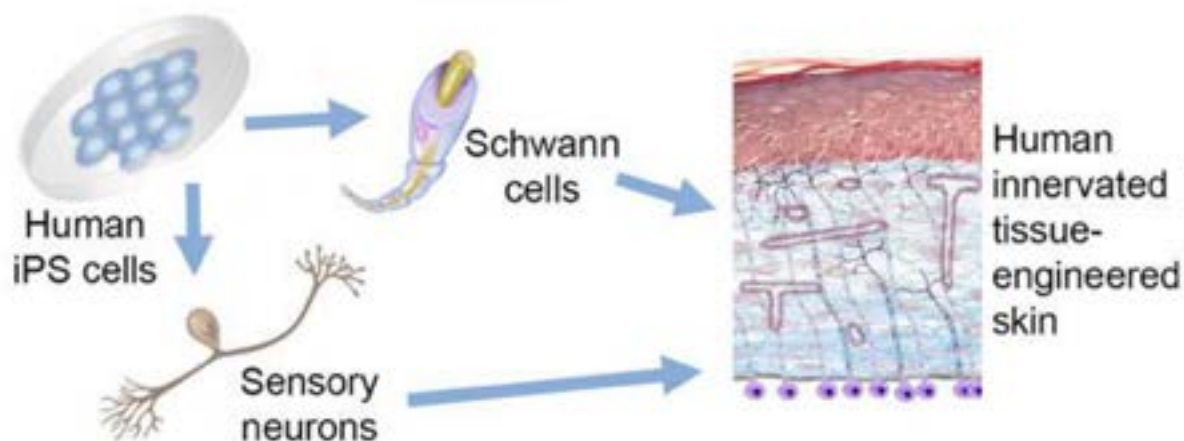
L'innervation cutanée est de plus en plus reconnue comme un élément majeur de la physiopathologie cutanée à travers l'inflammation neurogénique induite par les neuropeptides détectés par les cellules endothéliales et le système immunitaire. Pour étudier ce processus *in vitro*, des modèles de peau innervés, reconstruit par génie tissulaire, (*tissue-engineered skin*, TES) ont été développés, mais exclusivement avec des neurones sensoriels murins extraits des ganglions de la racine dorsale. Afin de construire un modèle entièrement humain de TES innervée, nous avons utilisé des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) générées à partir de fibroblastes cutanés humains. Près de 100 % des iPSC différenciés en neurones sensoriels montrent une expression des marqueurs neuronaux BRN3A et β 3-tubuline après 19 jours de maturation. De plus, ces cellules étaient également positives à TRPV1 et au neurofilament M, et certaines d'entre elles exprimaient la substance P, TrkA et TRPA1. Lorsqu'ils sont stimulés

avec des molécules induisant la libération de neuropeptides, les neurones dérivés d'iPSC libèrent la Substance P et le CGRP, à la fois dans une culture conventionnelle en monocouche et après ensemencement dans un modèle 3D d'éponge de collagène avec des fibroblastes. Les cellules de Schwann, partenaires essentiels des neurones pour leur fonctionnement et la migration axonale, ont également été différenciées avec succès d'iPSC humain, comme le montre leur expression des marqueurs S100, GFAP, p75 et SOX10. Lorsqu'ils sont cultivés pendant un mois supplémentaire dans le modèle TES, les neurones dérivés de l'iPSC ensemencés au fond de l'éponge forment un réseau de neurites couvrant l'ensemble du TES jusqu'à l'épiderme, mais seulement lorsqu'ils sont combinés avec des cellules de Schwann de souris ou dérivées d'iPSC. Ce modèle unique de TES avec une innervation d'origine humaine devrait être très utile pour l'étude de la neuroinflammation cutanée.

Abstract

Cutaneous innervation is increasingly recognized as a major element of skin physiopathology through the neurogenic inflammation driven by neuropeptides that are sensed by endothelial cells and the immune system. To investigate this process in vitro, models of innervated tissue-engineered skin (TES) were developed, yet exclusively with murine sensory neurons extracted from dorsal root ganglions. In order to build a fully human model of innervated TES, we used induced pluripotent stem cells (iPSC) generated from human skin fibroblasts. Nearly 100% of the iPSC differentiated into sensory neurons were shown to express the neuronal markers BRN3A and β 3-tubulin after 19 days of maturation. In addition, these cells were also positive to TRPV1 and neurofilament M, and some of them expressed Substance P, TrkA and TRPA1. When stimulated with molecules inducing neuropeptide release, iPSC-derived neurons released Substance P and CGRP, both in conventional monolayer culture and after seeding in a 3D fibroblast- populated collagen sponge model. Schwann cells, the essential partners of neurons for function and axonal migration, were also successfully differentiated from human iPSC as shown by their expression of the markers S100, GFAP, p75 and SOX10. When cultured for one additional month in the TES model, iPSC-derived neurons seeded at the bottom of the sponge were shown to form a network of neurites spanning the whole TES up to the epidermis, but only when combined with mouse or iPSC-derived Schwann cells. This unique model of human innervated TES should be highly useful for the study of cutaneous neuroinflammation.

Graphical abstract:



Introduction

Although the primary purpose of cutaneous sensory innervation is the perception of sense of touch, pain and temperature, it also plays a major role in skin physiology and pathology. Indeed, sensory neurons are able to trigger a neurogenic inflammation upon stimulation through the release of neuropeptides. This process induces microvascular vasodilation and an increase in vascular permeability, along with immune cells chemotaxis and activation [1]. Consequently, neuronal triggering is intimately combined with the local innate immune response early after an injury to promote tissue inflammation. Moreover, it has more recently been shown that sensory neurons are also involved in the direct recognition of pathogens through the same molecular pathways as immune cells, such as TLRs [2]. The density of cutaneous innervation as well as the high speed of neural action potentials constitute major advantages for the detection of danger signals. Thus, the *in vitro* development of a human skin integrating a nerve network represents an essential first step towards detailed studies on the interaction of nociceptor neurons with endothelial and immune cells and the regulation of neurogenic inflammation. We previously created an innervated TES including sensory neurons obtained from mouse embryos. These neurons were cultured underneath the tissue and were shown to build a dense nerve network that reached the epidermis through the whole thickness of the dermal compartment [3, 4]. Neurons released neuropeptides such as SP that was shown to enhance reepithelialization in an *in vitro* model of wound healing [5]. Whereas murine neuropeptides successfully activated human cells, their animal origin in a human tissue-engineered skin model could be a limitation for further studies, all the more that dorsal root

ganglion neurons are extracted at an early embryonic developmental stage (E12 to E14). To develop a more reliable innervated skin model, the use of human sensory neurons is highly desirable, especially for cosmetic research and development in Europe where the use of animal cells is banned. Fortunately, the technology allowing the differentiation of neuronal cells from human skin fibroblasts induced to become pluripotent stem cells (iPSC) is now widely available [6].

Some research groups succeeded in differentiating iPSC into sensory neurons, albeit with low degrees of purity and cell yields, and these studies did not attempt to create tridimensional networks [7-14]. To study neurogenic inflammation, it is crucial that the sensory neurons differentiated from human iPS cells express the transient receptor potential cation channel subfamily (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPA1) that regulate neuropeptides release [15]. Indeed, a challenge with hot temperature or irritant compounds like capsaicin or eugenol should drive activation of TRPVs and subsequent release of neuropeptides, mainly Substance P (SP) and Calcitonin gene-related peptide (CGRP), from peptidergic sensory neurons. Moreover, sensory neurons should express the tropomyosin receptor kinase A (TRKA) responsible for the binding to nerve growth factor (NGF), necessary for their survival [12].

Here, we propose a complete method to differentiate pure, functional sensory neurons and Schwann cells from human iPSCs and their combination in a 3D culture system to generate a fully human tissue-engineered skin model. It will be a highly valuable tool to study in vitro the relationship between human sensory nerves and skin physiopathology.

Materials and methods

1.1 Cell culture.

All human cells used in this work were obtained with informed consent from the donors; The study was approved by the CHU de Quebec-Université Laval research ethics review board. Fibroblasts and keratinocytes were isolated from human skin biopsies after breast reductive surgeries as previously described [16].

Human keratinocytes were cultured in flasks on a feeder layer of irradiated 3T3 mouse fibroblasts in DHc medium consisting of a 3:1 ratio of DMEM/Ham's F12 (Gibco, Gaithersburg, MD) with 36.54 mM NaHCO₃ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ), 0.18 mM L-adenine (Millipore Sigma, Oakville, Canada), 312.5 µl/l 2N HCL (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) and supplemented with 5% HyClone FetalClone II (Hyclone, Logan, UT), 2.5 µg/mL

insulin (Millipore Sigma), 0.2 µg/mL hydrocortisone (Millipore Sigma), 10⁻¹⁰ M cholera toxin (ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA), 10 ng/mL human epidermal growth factor (Austral Biologicals, San Ramon, CA), and antibiotics.

Human microvascular endothelial cells were extracted from foreskin as previously described [17] and grown in endothelial growth medium EBM-2 (Lonza, Mississauga, Canada).

Mouse DRG were extracted from E12.5 mice as previously described [3] and cultured in DME medium (Gibco) supplemented with 10% SVF (Wisent, St-Bruno, Canada) and with 10 ng/mL NGF (Sino Biological, Atlanta, GA), and were cultured in same conditions as iPS-derived neurons to serve as controls. All animal experiments were approved by the CHU de Québec-Université Laval animal care committee following the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

1.2 Differentiation of iPS cells into sensory neurons:

The iPS cells were obtained from the iPS-Québec platform of the CHU de Québec-Université Laval research center. They were derived from 2 different human skin fibroblast cell lines and from one human peripheral blood mononuclear cell line. The iPS cells were reprogrammed with the CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen, Carlsbad, Californie).

Differentiation into sensory neurons was performed following a protocol modified from reference [14]: iPS cells were passaged with Stempro accutase (Gibco) added with 5 µM Y-27632 (Abcam, Toronto, Canada), diluted in DMEM-F12 medium containing 25 µg/ml of penicillin-gentamycin (Sigma Chemicals) without serum. Cells were plated on Geltrex (Gibco) coating (1:200 dilution) in a 6 wells plate at a density of 90,000 cells/cm². Confluent iPS cells were passaged with Stempro accutase and 5 µM Y-27632 between day 0 to day 7 of differentiation. From day 0 to day 11 of differentiation, cells were cultured in a DMEM F12 : neurobasal A medium (Gibco) (vol:vol) supplemented with 2% B-27 (Gibco), 1% N2 supplement (Gibco), 0.01 mM β-mercaptoethanol (Gibco), 50 µg/mL ascorbic acid (Sigma Millipore), 5µM Y-27632, 1% L-alanyl-L-glutamine (Corning, New-York, NY), 1% MEM non-essential amino acids (Gibco), 0.1% trace elements A, 0,1% trace elements B, 0,1% trace elements C (Corning). From day 0 to day 5 of differentiation, medium was supplemented with 40 µM SB431542, 0.2 µM LDN193189 and 3µM CHIR99021 (Sigma Millipore). From day 5 to day 7 of differentiation, medium was supplemented with 3µM CHIR99021. From day 9 to day 11 of differentiation, medium was supplemented with 10 µM DAPT (Selleck Chemicals

LLC, Houston, TX). At day 11, cells were passaged with Stempro accutase and 5 μ M Y-27632 and plated on 1 μ g/ml Poly-D-lysine (Sigma Millipore) coated wells for 2D tests. Cells were seeded at 300,000 cells/cm² for purity tests, at 600,000 cells/cm² per well for ELISA tests and at 106 cells/3.6cm² when seeded over the 3D sponge model.

For the quantification of the sensory neuron purity, cells were seeded on poly-D-lysine surface in a 24-wells plate and the ratio of β 3Tub/BRN3A positive cells versus the number of unstained but Dapi-positive cells at day 18 was quantified using an axio imager M2 microscope (Zeiss, Toronto, Canada). Experiment was done in sextuplicates and 6 fields per well were evaluated using a 40x lens.

1.3 Differentiation of iPS cells into Schwann cells.

Differentiation of iPSC into Schwann cells was performed following a protocol modified from reference [18]. Up to day 6, iPSC cells were cultured in the same conditions than for sensory neuron differentiation in order to reach a neuronal precursor commitment. Then, cells were dissociated with accutase supplemented with 5 μ M Y-27632 and plated on a 9.6 cm² Geltrex coated well (1:200 dilution in cold DH medium) at a density of 130,000 cells/cm² in the day 7 medium from sensory neuron differentiation. At day 7, cells were cultured in minimum essential medium (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) with 1% N2 supplement, 1 mM β -mercaptoethanol, 5 μ M Y-27632, 1% L-alanyl-L-glutamine, 1% MEM non-essential amino acids (Gibco), 0.1% trace elements A, 0.1% trace elements B, 0.1% trace elements C. From day 8 to day 11, β -mercaptoethanol was removed and 35 ng/ml retinoic acid (Sigma Millipore) was added to the medium with 1% B27 supplement without vitamin A. At day 12, cells were passaged with accutase and plate on 1 μ g/ml Poly-D-lysine coated well at a density of 50,000 cells/cm². From day 12 to day 26, cells were cultured in STEMdiff Apel medium (STEMCELL Technologies) supplemented with 1% N2 supplement, 1% B27 supplement without vitamin A, 5 μ M Y-27632, 5 μ M Y-27632, 1% L-alanyl-L-glutamine, 1% MEM non-essential amino acids, 0.1% trace elements A, 0.1% trace elements B, 0.1% trace elements C, 5 ng/ml PDGF-bb, (Gibco), 10 ng/ml β FGF (Feldan, Quebec City, Canada), 14 μ M forskolin (Sigma Millipore), 192 ng/ml NRG1 (R&D System, Oakville, Canada). From day 26 until the end of the 2D culture, Schwann cells were maintained in DH medium supplemented with 10% SVF, 5 μ M forskolin, 50 ng/ml NRG1, 1% N2 supplement, 1% L-alanyl-L-glutamine. Schwann cells were cultured with 0.25 nM goat anti-rabbit IgG (Electron

microscopy sciences, Hatfield, PA) for 3 days before seeding cells on sponges [19]. For 2D coculture (Fig. 3D,H), 300,000 iPS Schwann cells were seeded with 600,00 iPS sensory neurons in 24-well plates. Cells were maintained in DMEM F12 : neurobasal A medium (vol:vol) supplemented with 1% B-27, 1% N2 supplement, 50 µg/mL ascorbic acid, 1% L-alanyl-L-glutamine, 20 ng/mL BDNF (Sino Biological), 10 ng/mL GDNF (Sino Biological) and 10 ng/mL NGF, 0.2 µg ml⁻¹ hydrocortisone, 2.5 µg ml⁻¹ insulin. Cells were cultivated 18 days before fixation.

1.4 Cell purity quantification.

To quantify the proportion of iPS cells effectively differentiated into sensory neurons, neurons at day 11 were seeded at a density of 300,000 cells/cm² in 24-wells plates on poly-D-lysine surface (n=6) and cultured as previously described for 7 days. Cells were fixed with PFA 4% and cell purity was assessed using a Zeiss axio imager M2 microscope. Purity was determined by quantification of the ratio of β3Tub/BRN3A positive cells compared to the number of Dapi-positive cells (Supplemental Fig. S2). For each well, 6 fields were evaluated using a 40x lens. The same method was performed for assessing Schwann cell purity by calculating the ratio of S100-positive cells over the number of Dapi- positive cells.

1.5 Preparation of the tissue-engineered 3D skin model

Collagen sponges were prepared as previously described [20] and seeded with 800,000 human fibroblasts alone (for ELISA tests) or in combination with 800,000 endothelial cells (for all other conditions) and cultured in DME (Life Technologies) supplemented with 10% SVF: EBM2 (Lonza, Mississauga, Canada) (vol:vol) and 50 µg/mL ascorbic acid for 7 days. Then, 400,000 fibroblasts (for ELISA tests) or in combination with 400,000 endothelial cells (for all other conditions) were seeded on the opposite side of the sponge. After 3 days, Schwann cells from mouse sciatic nerves [20] or derived from human iPSC were seeded (only when specified) at a density of 1 million per sponge on top of the sponge. All samples (with or without Schwann cells) were cultured for 7 days in DMEM-F12 medium supplemented with 10% SVF, 5 µM forskolin, 50 ng/ml NRG1, 1% N2 supplement, 1% L-alanyl-L-glutamine.

One million of iPS-derived sensory neurons matured for 11 days were then seeded on the opposite side (versus Schwann cells) of the sponge and cultured for two days in DMEM F12: neurobasal A medium (vol:vol), supplemented with 1% B-27, 1% N2 supplement, 50 µg/mL ascorbic acid, 5 µM Y-27632, 10 µM DAPT, 20 ng/mL BDNF (Feldan) and 10 ng/mL GDNF. The sponge was matured 6 additional days in DMEM F12, neurobasal A medium vol:vol, supplemented with 1% B-27, 1% N2 supplement, 50 µg/mL ascorbic acid, 5 µM Y-27632, 20 ng/mL BDNF (Sino Biological), 10 ng/mL GDNF (Sino Biological) and 10 ng/mL NGF.

Sponges were flipped upside down and 1 million of human keratinocytes were seeded on top of sponge (opposite side to neurons) under immersion in the culture medium. Samples were cultured 7 days in DMEM-F12 with 5% Hyclone serum supplemented with 20 ng/mL BDNF (Feldan), 10 ng/mL GDNF, 10 ng/mL NGF, 50 µg/mL ascorbic acid, 0.2 µg/ml hydrocortisone, 2.5 µg/ml insulin, 10 ng/mL human epidermal growth factor and 10^{-10} M cholera toxin.

Then, sponges were lifted up at air-liquid interphase to promote keratinocyte differentiation for 17 days in the same medium but without EGF.

1.6 ELISA analyses.

To quantify SP and CGRP secretion with Elisa kit (Phoenix Pharmaceuticals), sensory neurons differentiated from iPSC or extracted from mouse DRG were seeded at a density of 600,000 and 300,000 cells/cm² respectively in 24-well plates coated with poly-D-lysine. For ELISA quantification of the 3D tissue supernatants, sponges were seeded with 1 million sensory neurons derived from iPS or from DRG and were washed twice with DMEM-F12 without serum before treatment. For 2D or 3D tests, medium was replaced with 150 µl or 400 µl of DMEM-F12: Neurobasal A medium vol:vol pH 6.2, respectively. Capsaicin (Sigma Millipore) was dissolved in ethanol 99% for a final concentration of 10 µM. Cells were exposed with capsaicin or KCl (Fisher Chemical, Ottawa, Canada) for 5 minutes or with AITC (Sigma-Millipore), eugenol (Sigma Millipore) or NGF for 10 minutes before removing the supernatant for Elisa tests or fixation with PFA 4% for immunostaining.

1.7 Immunofluorescence.

Cells were fixed with 4% cold PFA for 20 min at 4°C, washed twice with cold phosphate- buffered saline (PBS) (composed of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) (Fisher Chemical), then incubated in immunofluorescence staining buffer, containing PBS, 0.3% triton X-100 (Biorad, Mississauga, Canada) and 5% serum, for 20 min at room temperature. Cells were stained overnight at 4°C with primary antibodies diluted in immunofluorescence staining buffer and were washed with PBS for 5 min then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies (1:500 dilution) in immunofluorescence staining buffer and finally were washed with PBS before mounting with fluoromount G with Dapi (Electron microscopy Sciences, Hatfield, PA).

The antibodies used were: mouse anti- β 3Tub (1:1000; Biolegend, San Diego, CA), rabbit anti-BRN3A (1:500; Millipore Sigma), mouse anti-substance P (1:1000; Abcam), goat anti-TRKA (1:200; R&D System), rabbit anti-TRPA1 (1:200; Abcam), sheep anti-TRPM8 (1:100; Novus Biologicals, Oakville, Canada), mouse or chicken anti-NFM and anti-NFH (1:500; Millipore Sigma), rabbit anti-TRPV1 (1:200; Novus Biologicals), goat anti-RAMP1 (1:50; Santa Cruz, Mississauga, Canada), rabbit anti-P75 (1:200; Abcam), rabbit or mouse anti-S100 (DAKOcytomation, Santa Clara, CA), mouse anti-MBP (1:500; R&D System), sheep anti-CD31 (R&D System), chicken anti-K14 (Biolegend), chicken anti- PGP9.5 (Abcam), mouse anti-SOX10 (1:500; R&D System), mouse anti-GFAP (1:500; Millipore Sigma), rabbit anti-GFAP (1:1000; Abcam), Alexa fluor 488 goat anti-rabbit (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 594 goat anti-mouse (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 594 goat anti-rabbit (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 488 goat anti-mouse (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 647 donkey anti-sheep (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 647 or 488 donkey anti-chicken (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 555 donkey anti-mouse (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit (1:500; Invitrogen).

1.8 Statistical analysis.

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA. Post-Hoc test was conducted using Bonferroni correction ($\alpha=0.05$). The differences were considered significant at $p < 0.05$. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Results

2.1 Sensory neurons were differentiated from human iPSC cells with high purity, high yield and expressed specific markers.

Human fibroblasts-derived iPSC was cultured on Geltrex-coated 6-well plates (2D culture) and allowed to differentiate for 22 days and were stained with specific markers for sensory neurons to confirm their identity. Based on the expression of BRN3A (a transcription factor expressed in the developing sensory neurons [21, 22], neurofilament M (NFM, 150 kDa [23]) and TRPV1, the optimal maturation time was observed at day 19, and was followed by a decrease in the number of cells at day 22 (Supplemental Fig. S1A-O). Mouse dorsal root ganglion (DRG)- derived sensory neurons expressed the same markers in a similar pattern (Supplemental Fig. S1P-R).

To determine the proportion of iPSC-derived cells that were efficiently differentiated into sensory neurons, cells were double-stained for BRN3A, and β 3Tub (staining for β III-tubulin, a generic marker of neurons [24]). Immunofluorescence images showed that nearly 100% ($98.9\% \pm 1.35$, $n=6$) of cells were positive for both markers (Supplemental Fig. S2). Over the whole maturation period, iPSC growth resulted in a 65 ± 15 fold increase ($n=10$) in the number of cells differentiated into sensory neurons, as compared to the initial number of iPSC seeded. This high yield could be explained at least in part by a more potent growth of cells as monolayer culture instead of neurospheres. Moreover, the culture medium was supplemented by additional nutrients compared to the protocol of Maury and coworkers and accutase, a mild digestion enzyme, was used instead of trypsin, allowing a more efficient cell recovery.

At day 19, in addition to BRN3A and β 3Tub, some of the differentiated cells expressed the neurofilament M and SP. In addition, most cells were positive to TRPV1 and TRPA1, with some of them expressing TrkA (the receptor for NGF) (Fig. 1A,C,E,G).

To incorporate the iPSC-derived neurons into the 3D model, it was not possible to first fully differentiate the neurons in 2D for 19 days, and then seed them over the sponge. Indeed, since matured neurons already displayed long neurites at day 19, their enzymatic digestion induced massive cell death precluding their use for 3D seeding. To overcome this limitation, iPSC-derived neurons were passaged with accutase at day 11 of differentiation (before neurite outgrowth) and seeded on the sponge 3D model. To confirm that the differentiation of the sensory neurons between day 11 and day 19 was as efficient in 3D than 2D, the expression of neuronal markers was assessed by immunofluorescent staining of whole sponges, followed by

en-face imaging. A similar pattern of expression of the markers BRN3A, β 3Tub, SP, NFM, TrkA and TRPA1 was observed, along with Ramp1 (a CGRP receptor) (Fig. 1B,D,F,H).

In addition, since these neurons can be maintained in 3D culture for a much longer time, numerous nerve fibers were observed after 49 days of culture to express the neurofilament H (200 kDa), which is a marker of larger caliber and more mature axons [25]. In addition, most of these NFH-positive fibers also expressed SP (Supplemental Fig. S3). Interestingly, iPSC-derived neurons showed a tendency to aggregate together into ganglion-like clusters from which large bundles of neurites elongated, in contrast with mouse DRG neurons that were homogeneously distributed throughout the sponge (Fig. 1I,J). Of note, a similar cluster formation was reported with iPSC-derived sensory neurons cultured in 2D after 2 weeks in culture [26]. The non-peptidergic marker P2X3 was not detected in 2D and 3D cultures (Data not shown).

2.2 TRP agonists trigger SP and CGRP release from iPSC-derived sensory neurons.

In order to test the capacity of the iPSC-derived sensory neurons to induce neurogenic inflammation, their potential to release neuropeptides upon TRPV activation was investigated and compared to mouse DRG neurons in conventional 2D culture as well as in 3D culture into the sponge (only populated with fibroblasts).

The TRPV1 agonists resiniferatoxin (at 100 nM) induced a significant increase in the release of SP from iPSC-derived neurons cultured in 2D compared to control ($p < 0.0001$; $n = 13$), while the effect of capsaicin (at 10 μ M) was not significant (Fig. 2A). Moreover, eugenol (at 1 mM), an agonist of TRPV1, 2 and 3 induced a significant increase of SP release ($p < 0.0001$; $n = 14$), as well as NGF (at 100 ng/ml), the agonist of TrkA ($p < 0.01$; $n = 16$). KCl (at 65 mM), which induces neuronal depolarisation independently of receptors, promoted the most potent rise of SP release ($p < 0.0001$; $n = 16$) (Fig. 2A). Of note, although TRPA1 was detected by immunofluorescence staining, exposure to its agonist AITC (300 μ M) did not result in a significant difference of SP secretion. As a control, 2D culture of mouse DRG neurons showed significant increases of SP release upon stimulation with capsaicin ($p < 0.0001$; $n = 5$), resiniferatoxin ($p < 0.0001$; $n = 6$), eugenol ($p < 0.01$; $n = 6$) and treatment with KCL ($p < 0.0001$; $n = 6$) (Fig. 2B).

When cultured in 3D in a fibroblast-populated sponge, iPSC-derived neurons released significantly higher amount of SP after stimulation with capsaicin ($p < 0.0001$; $n = 17$) and KCl ($p < 0.001$; $n = 16$), while resiniferatoxin, AITC and NGF did not have an effect (Fig. 2C). Stimulation of mouse DRG neurons in the same 3D culture scaffold produced significantly higher levels of SP upon treatment with capsaicin ($p < 0.01$; $n = 6$), resiniferatoxin ($p < 0.001$; $n = 5$) and KCl ($p < 0.0001$; $n = 7$) (Fig. 2D).

The secretion of CGRP by iPSC-derived neurons was significantly enhanced by eugenol ($p < 0.0001$; $n = 18$), AITC ($p < 0.001$; $n = 18$), NGF ($p < 0.001$; $n = 18$) and KCl ($p < 0.01$; $n = 18$) in 2D culture (Fig. 2E), and by eugenol ($p < 0.0001$; $n = 11$) and KCl ($p < 0.001$; $n = 17$) in 3D sponges (Fig. 2F). Mouse DRG neurons released significantly more CGRP upon stimulation with eugenol ($p < 0.0001$; $n = 7$), capsaicin ($p < 0.01$; $n = 11$) and resiniferatoxin ($p < 0.01$; $n = 11$) in 2D (Fig. 2G) and capsaicin ($p < 0.0001$; $n = 21$), resiniferatoxin ($p < 0.0001$; $n = 6$) and KCl ($p < 0.0001$; $n = 7$) in 3D (Fig. 2H).

The capacity of capsaicin to induce an action potential in iPSC-derived neurons was confirmed by the quantification of calcium entry into cells upon stimulation. Five seconds after addition of 10 μ M of capsaicin in the culture medium, an increase by 30% of the relative fluorescence intensity was observed in iPSC-derived neurons compared to the non-stimulated condition, which went back to initial values after 5 seconds (Supplemental Fig. S4). The fibroblasts used to generate iPSC did not show any increase in calcium upon capsaicin stimulation (Data not shown).

2.3 Efficient neurite outgrowth from iPSC-derived neurons throughout the tissue-engineered skin is dependent of the presence of mouse or iPSC-derived Schwann cells.

When iPSC-derived neurons were cultured in the tissue-engineered skin model, they failed to promote axonal outgrowth from the neuronal cell layer at the bottom of the tissue to the epidermis on top as observed with mouse DRG neurons (Fig. 4B vs A). One major difference with DRG neurons that could explain this limitation is the presence of Schwann cells that are extracted from DRG along with neurons. Thus, we hypothesized that Schwann cells might be an essential partner to promote axonal outgrowth. Indeed, when mouse Schwann cells were added in the tissue-engineered skin model prior to iPSC-derived neuron seeding, a much higher neurite outgrowth was observed in the tissue with numerous axons reaching the epidermis (Fig. 4C).

In order to develop a fully human model, the same iPSC used to generate neurons were differentiated into human Schwann cells. The resulting human iPSC-derived Schwann cells expressed the specific markers S100, GFAP, p75 and SOX10 (Fig. 3). When these cells were added in a 2D culture of iPSC-derived neurons, they aligned along the neurites as observed with mouse Schwann cells (Fig. 3D vs H). When the iPSC-derived Schwann cells were added in the dermal compartment of the tissue-engineered skin model before seeding and at the opposite side versus neurons, they were shown to induce a strong increase in axonal outgrowth toward the epidermis (Fig. 4D).

Discussion

Cutaneous sensory innervation is a major component of the skin through the transmission of sensitive informations (sense of touch, temperature and pain) [27]. Moreover, sensory nerves play a pivotal role in inducing neurogenic inflammation in response to skin injuries [2]. Thanks to the very fast response of nerves to a noxious stimulus through the release of neuropeptides, sensory nerves are essential for the efficient triggering of inflammation by increasing vascular vasodilatation and permeability, and attracting and activating immune cells [1]. In addition, we have shown that some neuropeptides were able to directly enhance reepithelialization during wound healing [5]. Because of their potential to induce neurogenic inflammation, sensory nerves are good candidates to be involved in the induction and/or maintenance of various inflammatory skin diseases, such as psoriasis or atopic dermatitis [28, 29]. In order to be able to investigate the interaction between sensory neurons and skin-resident or infiltrating cells, the development of in vitro models of tissue-engineered skin would be extremely useful, all the more if they are made of the patient's own cells. Whereas numerous models of tissue-engineered skin were developed over the past 30 years, only very few integrated sensory neurons, which were of animal origin [5, 30, 31] or featured human neural stem cells instead of mature neurons [32]. One reason for this scarcity in model diversity is the difficulty to obtain neurons, and the fact they don't expand in vitro, requiring animal extraction for each experiment.

The animal origin of neurons in these models does not seem to critically compromise their ability to interact with most human skin cells, notably because neuropeptides are highly conserved among species. However, interspecies differences cannot be ruled out. Finally, the use of animal cells has been banned in the European Union for cosmetic research and

development. Therefore, the replacement of animal neurons by human neurons remains highly desirable.

Since the advent of the iPSC technology, several protocols have been proposed to differentiate human sensory neurons from iPSC, but with some limitations, such as low neuron differentiation efficiency and low cell yields [7-14]. Moreover, none of these studies have unequivocally demonstrated the ability of these neurons to secrete neuropeptides following specific stimulations. Our purpose was to generate sensory neurons from human skin fibroblast-derived iPSC with high purity, high yield, and to demonstrate their capacity to release SP and CGRP upon stimulation of their TRP receptors.

In addition, we showed that these iPSC-derived neurons could be efficiently used in a 3D tissue-engineered skin model.

Thanks to the ability of this model to be maintained in culture over 50 days, in contrast to 21 days in 2D, neurons were shown to reach a higher maturation stage in 3D while maintaining their capacity to release neuropeptides upon stimulation. Moreover, a key feature of a functional innervated tissue-engineered skin model is the ability of neurites extending from neurons seeded at the bottom of the tissue to migrate through the dermal compartment and form a nerve network reaching the epidermis. Indeed, a direct contact of neurites with keratinocytes is mandatory to efficiently recapitulate skin physiopathology. A key finding of our work was to show that the coculture of iPSC-derived neurons with Schwann cells was necessary to induce a strong neurite outgrowth in 3D. In addition, human Schwann cells differentiated from the same iPSC used to generate neurons were able to support such neurite outgrowth. This was essential to maintain a fully human model. This new human innervated tissue-engineered skin model will have the major advantage to be reconstructed using patient's cells obtained from a single skin biopsy. It will be possible to develop disease-specific skin models and analyze the potential effect of sensory nerves in these models after induction of neuropeptide release upon stimulation with TRPV1 agonists. Such model would be particularly well-suited for the modelling of psoriasis, since this disease is highly suspected to be modulated by skin innervation [28, 33].

Conclusion

In conclusion, we were able to generate iPSC-derived neurons with a high yield and high purity. These neurons could release SP and CGRP upon stimulation with TRPV agonists. Once seeded in the 3D tissue-engineered skin along with iPSC-derived Schwann cells, the iPSC-derived neurons established a nerve network throughout the tissue reaching the epidermis. This human innervated tissue-engineered skin model will be a powerful tool to study the role of sensory nerves in various skin diseases, such as psoriasis or atopic dermatitis, especially since it could be fully made of patient's own cells. It represents an optimal base to build an immunocompetent skin model, with a strong potential for personalized medicine approaches.

Acknowledgments

The authors acknowledge Dr. Jack Puymirat and the iPS-Quebec platform of the CHU de Québec-Université Laval research center for the production of the human iPS cell lines used in this work.

Funding: This work was supported by the CQDM (Centre Québécois pour la Découverte du Médicament), Pierre Fabre

Dermocosmétique (Toulouse, France) and the Quebec Network for Cell and Tissue Therapies –ThéCell (a thematic network supported by the Fonds de recherche du Québec–Santé). QM and VF were supported by Région Alsace, LabEx Medalis, and Fondation pour la Recherche Médicale. QM was the recipient of travel grants of Fondation René Touraine and Mitacs Globalink-Campus France. These funding sources had no involvement in study design, interpretation of data and article writing.

Figure legends:

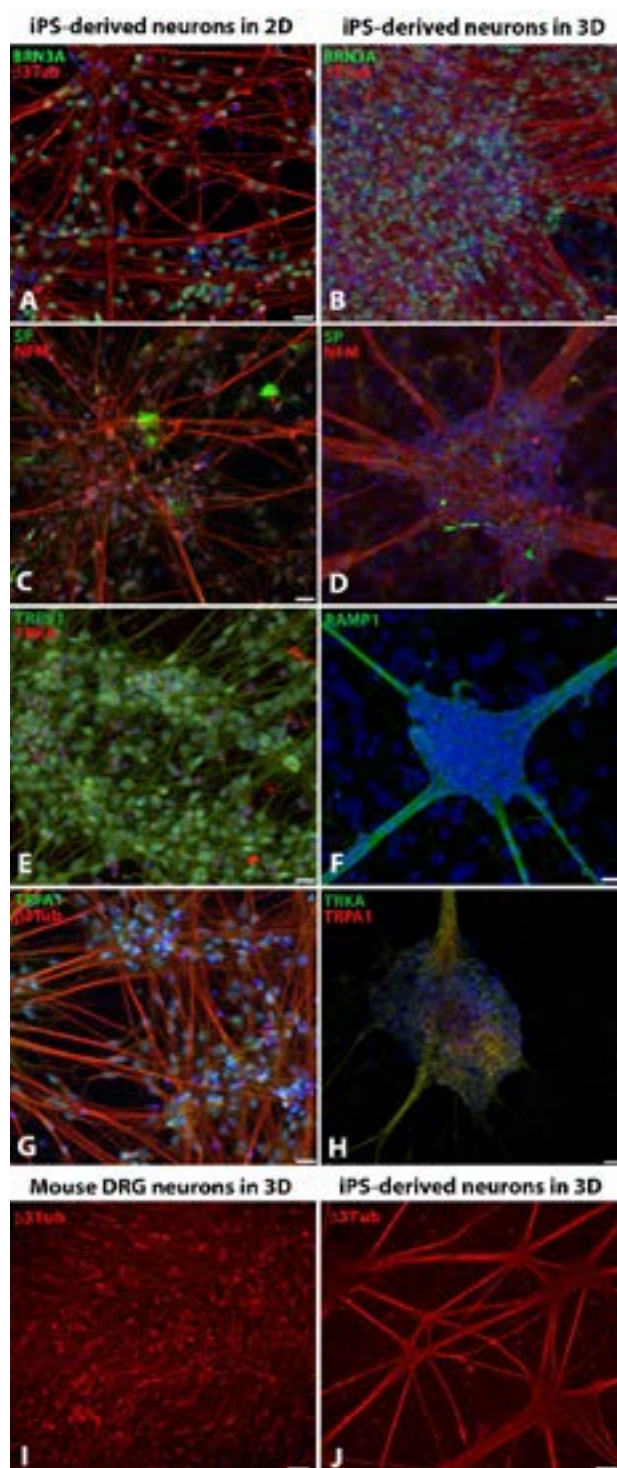


Figure 1 | Characterization by immunofluorescence of iPSC-derived neurons cultured in 2D and in 3D.

Cells were stained by immunofluorescence for POU class 4 homeobox 1 (BRN3A), Neuronal Class III β -Tubulin (β 3Tub), substance P (SP), tropomyosin receptor kinase A (TRKA), transient receptor potential cation channel member A1 (TRPA1), neurofilament medium (NFM), transient receptor potential cation channel subfamily V1 (TRPV1) and receptor activity modifying protein 1 (RAMP1). For 2D staining (A,C,E,G), cells were seeded at a density of 300,000 cells/cm² on poly-D lysine coated wells and matured until day 18. For 3D staining (B,D,F,H-J), neurons were cultured in the fibroblast-populated sponge for 19 days and pictures were taken from an above view of the sponge. Scale bar A-H = 20 μ m, I-J = 100 μ m.

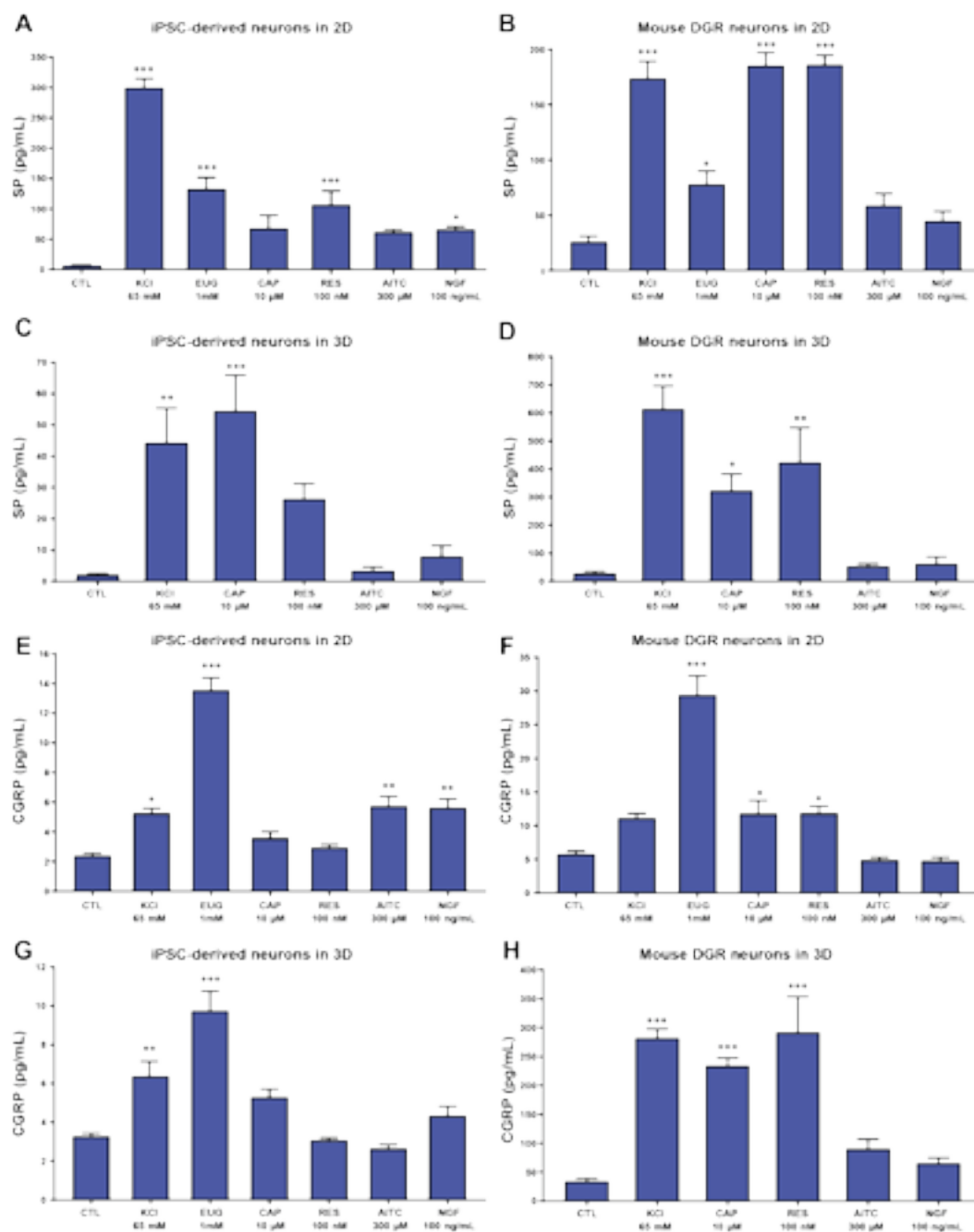


Figure 2 | Quantification of SP and CGRP release from iPSC-derived and mouse DRG neurons upon TRP stimulation.

Substance P (SP; A-D) and calcitonin gene-related peptide (CGRP; E-H) released from iPSC-derived neurons (used after 19 days of maturation) or mouse DRG neurons were quantified by ELISA after stimulation with 65 nM potassium chloride (KCl, induces neuronal depolarization), 10 μM capsaicin (CAP, ligand for TRPV1), 100 nM resiniferatoxin (RES, ligand for TRPV1), 1 mM eugenol (EUG, ligand for TRPV1,2,3), 100 μM allyl isothiocyanate (AITC, ligand for TRPA1), 100 ng/ml NGF (ligand for TrkA) cultured in monolayer (2D) or after seeding in a fibroblast-populated sponge (3D). Data are displayed as mean ± standard error of the mean (*p<0.01; **p<0.001; ***p<0.0001, n=5 to 21).

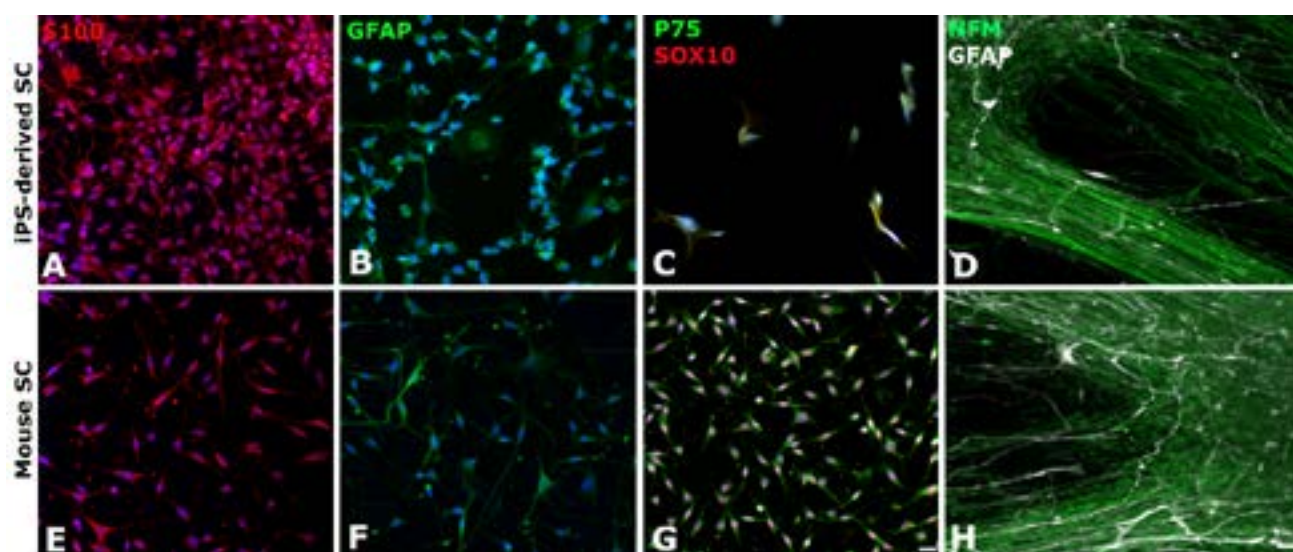


Figure 3 | Characterization by immunofluorescence of iPSC-derived Schwann cells cultured in 2D.

Human iPSC-derived Schwann cells (A-D) or mouse Schwann cells (E-H) were stained in 2D with the specific markers S100 (in red; A,E), GFAP (in green; B,F), P75 (in green; C,G) and SOX10 (in red; C,G). Schwann cells derived from iPSC (stained in white with GFAP) were cocultured with iPSC-derived neurons (stained in green with NFM) for 18 days (D,H). Scale bar = 20 μ m.

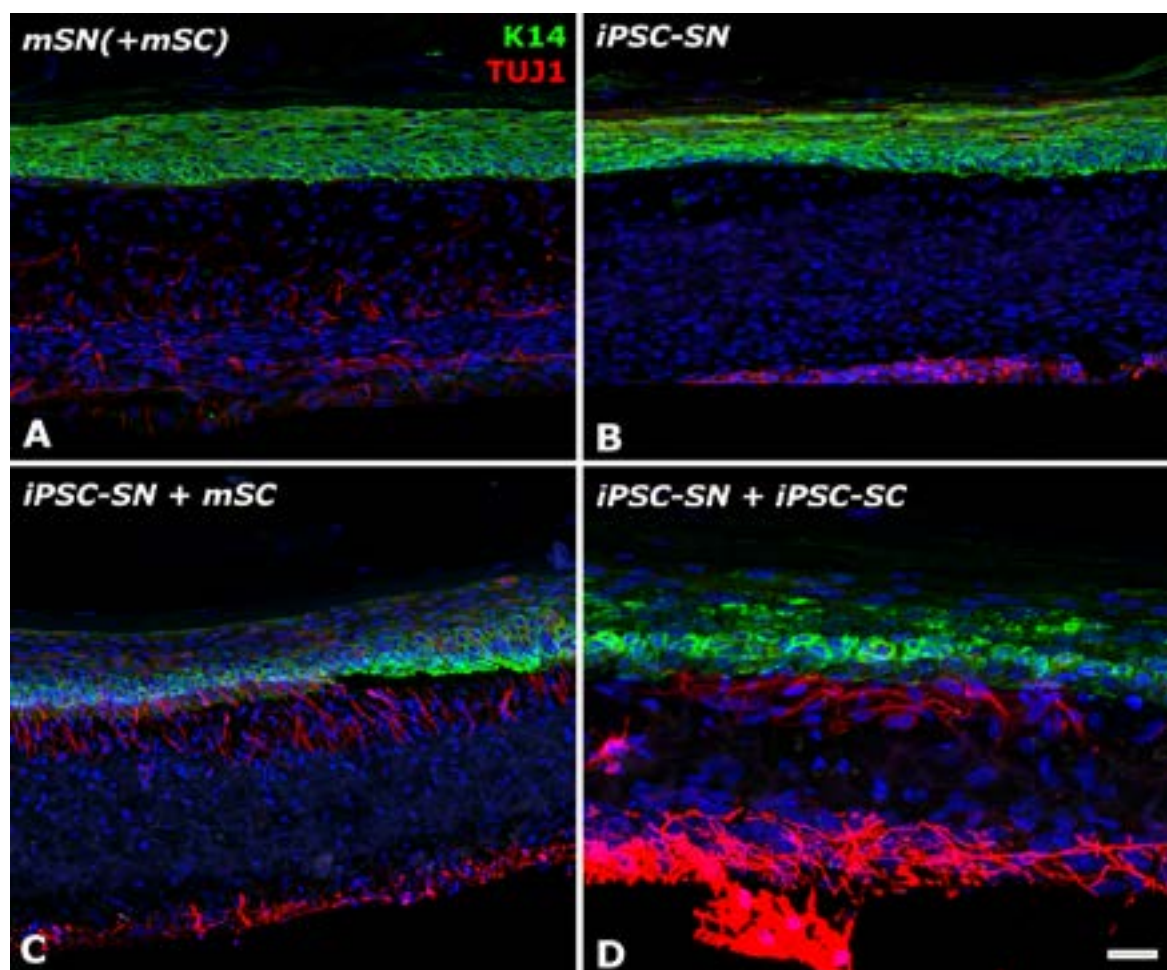


Figure 4 | Characterization by immunofluorescence of the capacity of the iPSC-derived neurons to form a 3D nerve network in the tissue-engineered skin.

The human reconstructed skin model made of keratinocytes (stained in green with Keratin 14), fibroblasts and mouse (A) or iPSC-derived (B-D) neurons (stained in red with β 3Tub) was cocultured or not (B) with mouse (C) or iPSC-derived Schwann cells (D). Scale bar = 50 μ m.

References

- [1] E.M. Peters, M.E. Ericson, J. Hosoi, K. Seiffert, M.K. Hordinsky, J.C. Ansel, R. Paus, T.E. Scholzen, Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance, *J. Invest. Dermatol.* 126(9) (2006) 1937-47.
- [2] I.M. Chiu, C.A. von Hehn, C.J. Woolf, Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology, *Nat. Neurosci.* 15(8) (2012) 1063-7.
- [3] M. Gingras, J. Bergeron, J. Dery, H.D. Durham, F. Berthod, In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth, *FASEB J.* 17(14) (2003) 2124-6.
- [4] V. Gagnon, D. Larouche, R. Parenteau-Bareil, M. Gingras, L. Germain, F. Berthod, Hair follicles guide nerve migration in vitro and in vivo in tissue-engineered skin, *J. Invest. Dermatol.* 131(6) (2011) 1375-8.
- [5] M. Blais, L. Mottier, M.A. Germain, S. Bellenfant, S. Cadau, F. Berthod, Sensory neurons accelerate skin reepithelialization via substance P in an innervated tissue-engineered wound healing model, *Tissue Eng. Part A* 20(15-16) (2014) 2180-8.
- [6] Y. Shi, H. Inoue, J.C. Wu, S. Yamanaka, Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16(2) (2017) 115-130.
- [7] K. Schrenk-Siemens, H. Wende, V. Prato, K. Song, C. Rostock, A. Loewer, J. Utikal, G.R. Lewin, S.G. Lechner, J. Siemens, PIEZO2 is required for mechanotransduction in human stem cell-derived touch receptors, *Nat. Neurosci.* 18(1) (2015) 10-6.
- [8] A. Eigentler, S. Boesch, R. Schneider, G. Dechant, R. Nat, Induced pluripotent stem cells from friedreich ataxia patients fail to upregulate frataxin during in vitro differentiation to peripheral sensory neurons, *Stem Cells Dev.* 22(24) (2013) 3271-82.
- [9] B.J. Wainger, E.D. Buttermore, J.T. Oliveira, C. Mellin, S. Lee, W.A. Saber, A.J. Wang, J.K. Ichida, I.M. Chiu, L. Barrett, E.A. Huebner, C. Bilgin, N. Tsujimoto, C. Brenneis, K. Kapur, L.L. Rubin, K. Eggan, C.J. Woolf, Modeling pain in vitro using nociceptor neurons reprogrammed from fibroblasts, *Nat. Neurosci.* 18(1) (2015) 17-24.
- [10] S.M. Chambers, Y. Qi, Y. Mica, G. Lee, X.J. Zhang, L. Niu, J. Bilsland, L. Cao, E. Stevens, P. Whiting, S.H. Shi, L. Studer, Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors, *Nat. Biotechnol.* 30(7) (2012) 715-20.
- [11] D. Pre, M.W. Nestor, A.A. Sproul, S. Jacob, P. Koppensteiner, V. Chinchalongporn, M. Zimmer, A. Yamamoto, S.A. Noggle, O. Arancio, A time course analysis of the electrophysiological properties of neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs), *PLOS One* 9(7) (2014) e103418.
- [12] J.W. Blanchard, K.T. Eade, A. Szucs, V. Lo Sardo, R.K. Tsunemoto, D. Williams, P.P. Sanna, K.K. Baldwin, Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory neurons, *Nat. Neurosci.* 18(1) (2015) 25-35.
- [13] L. Menendez, M.J. Kulik, A.T. Page, S.S. Park, J.D. Lauderdale, M.L. Cunningham, S. Dalton, Directed differentiation of human pluripotent cells to neural crest stem cells, *Nat. Protoc.* 8(1) (2013) 203-12.

- [14] Y. Maury, J. Come, R.A. Piskorowski, N. Salah-Mohellibi, V. Chevaleyre, M. Peschanski, C. Martinat, S. Nedelec, Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes, *Nat. Biotechnol.* 33(1) (2015) 89-96.
- [15] M.J. Caterina, Z. Pang, TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology, *Pharmaceuticals (Basel)* 9(4) (2016) 77.
- [16] L. Germain, M. Rouabhia, R. Guignard, L. Carrier, V. Bouvard, F.A. Auger, Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin, *Burns* 19(2) (1993) 99-104.
- [17] P.L. Tremblay, F. Berthod, L. Germain, F.A. Auger, In vitro evaluation of the angiostatic potential of drugs using an endothelialized tissue-engineered connective tissue, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315(2) (2005) 510-6.
- [18] A. Faroni, S.W. Rothwell, A.A. Grolla, G. Terenghi, V. Magnaghi, A. Verkhratsky, Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell phenotype induces expression of P2X receptors that control cell death, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e743.
- [19] N. Tzekova, A. Heinen, S. Bunk, C. Hermann, H.P. Hartung, B. Reipert, P. Kury, Immunoglobulins stimulate cultured Schwann cell maturation and promote their potential to induce axonal outgrowth, *J. Neuroinflammation* 12 (2015) 107.
- [20] M. Blais, M. Grenier, F. Berthod, Improvement of nerve regeneration in tissue-engineered skin enriched with schwann cells, *J. Invest. Dermatol.* 129(12) (2009) 2895-900.
- [21] M. Zou, S. Li, W.H. Klein, M. Xiang, Brn3a/Pou4f1 regulates dorsal root ganglion sensory neuron specification and axonal projection into the spinal cord, *Dev. Biol.* 364(2) (2012) 114-27.
- [22] R. Wilson, A.A. Ahmmed, A. Poll, M. Sakaue, A. Laude, M. Sieber-Blum, Human peptidergic nociceptive sensory neurons generated from human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC), *PLOS One* 13(6) (2018) e0199996.
- [23] F.J. Naves, J.J. Huerta, O. Garcia-Suarez, N. Urdangaray, I. Esteban, M.E. Del Valle, J.A. Vega, Distribution of immunoreactivity for cytoskeletal (microtubule, microtubule-associated, and neurofilament) proteins in adult human dorsal root ganglia, *Anat. Rec.* 244(2) (1996) 246-56.
- [24] P.F. Moskowitz, M.M. Oblinger, Sensory neurons selectively upregulate synthesis and transport of the beta III- tubulin protein during axonal regeneration, *J. Neurosci.* 15(2) (1995) 1545-55.
- [25] M.V. Rao, M.K. Houseweart, T.L. Williamson, T.O. Crawford, J. Folmer, D.W. Cleveland, Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation, *J. Cell Biol.* 143(1) (1998) 171-81.
- [26] A.J. Clark, M.S. Kaller, J. Galino, H.J. Willison, S. Rinaldi, D.L.H. Bennett, Co-cultures with stem cell-derived human sensory neurons reveal regulators of peripheral myelination, *Brain* 140(4) (2017) 898-913.
- [27] F. McGlone, C. Spence, The cutaneous senses: touch, temperature, pain/itch, and pleasure, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34(2) (2010) 145-7.

- [28] L. Riol-Blanco, J. Ordovas-Montanes, M. Perro, E. Naval, A. Thiriot, D. Alvarez, S. Paust, J.N. Wood, U.H. von Andrian, Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation, *Nature* 510(7503) (2014) 157-61.
- [29] C. Pincelli, M. Steinhoff, Recapitulating atopic dermatitis in three dimensions: cross talk between keratinocytes and nerve fibers, *J. Invest. Dermatol.* 133(6) (2013) 1465-7.
- [30] S. Cadau, S. Leoty-Okombi, S. Pain, N. Bechetoille, V. Andre-Frei, F. Berthod, In vitro glycation of an endothelialized and innervated tissue-engineered skin to screen anti-AGE molecules, *Biomaterials* 51 (2015) 216- 25.
- [31] D. Roggenkamp, S. Kopnick, F. Stab, H. Wenck, M. Schmelz, G. Neufang, Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model, *J. Invest. Dermatol.* 133(6) (2013) 1620-8.
- [32] S.E.L. Vidal, K.A. Tamamoto, H. Nguyen, R.D. Abbott, D.M. Cairns, D.L. Kaplan, 3D biomaterial matrix to support long term, full thickness, immuno-competent human skin equivalents with nervous system components, *Biomaterials* (2018)
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.044>.
- [33] S.M. Ostrowski, A. Belkadi, C.M. Loyd, D. Diaconu, N.L. Ward, Cutaneous denervation of psoriasiform mouse skin improves acanthosis and inflammation in a sensory neuropeptide-dependent manner, *J. Invest. Dermatol.* 131(7) (2011) 1530-8.

Supplemental material

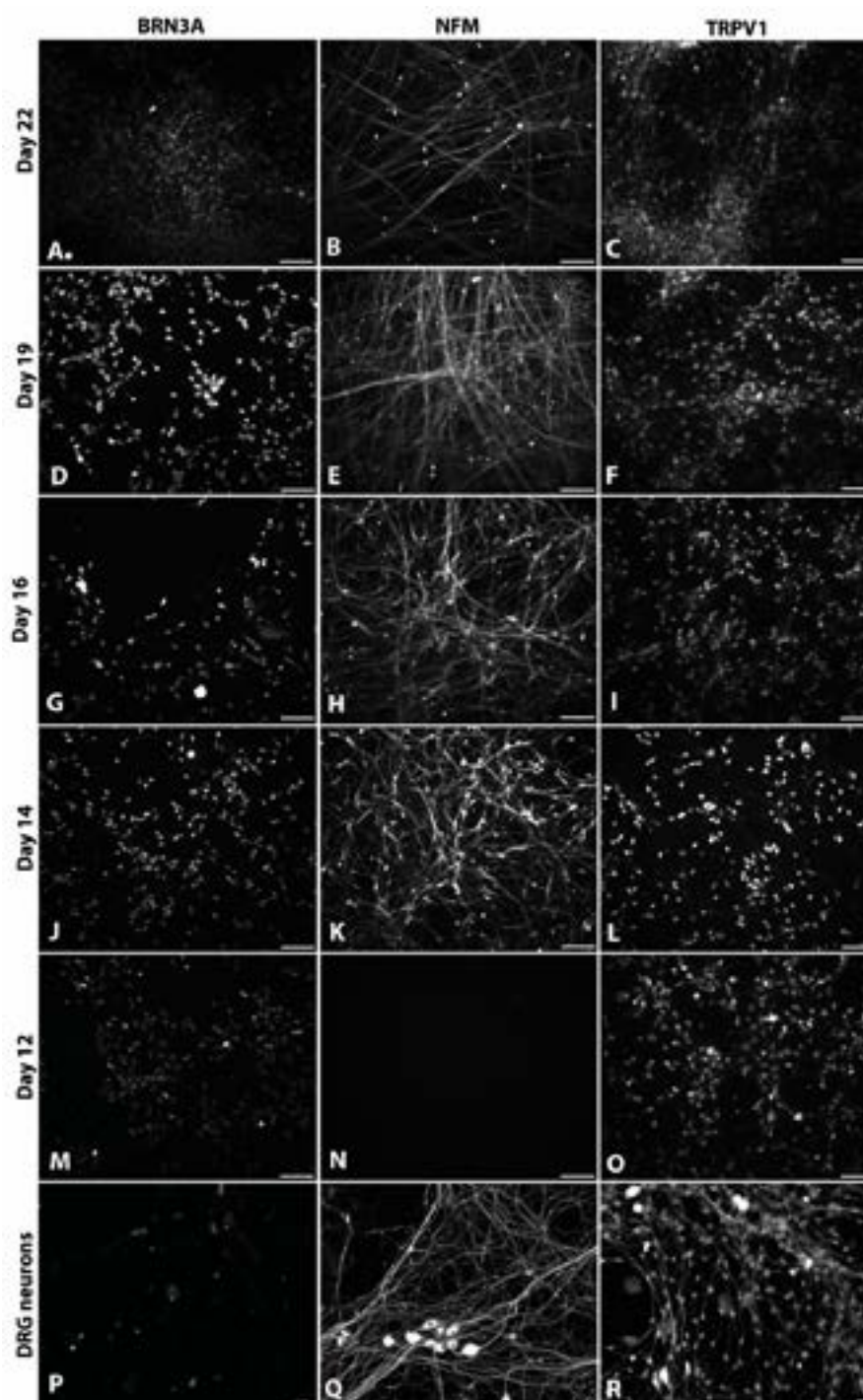


Figure S1 | Characterization of the kinetic of neuronal marker expression in iPSC-derived neurons over 22 days of maturation, compared with mouse DRG neurons

BRN3A, Neurofilament M (NFM) and TRPV1 were stained with specific antibodies after 12 to 22 days of iPSC differentiation into sensory neurons (A-O) compared to mouse DRG neurons (P-R). Scale bar: 50 μ m.

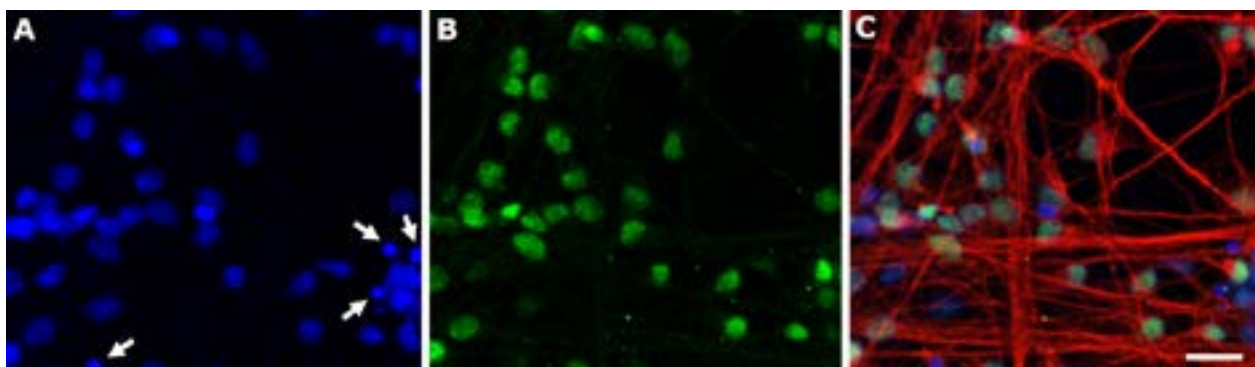


Figure S2 | Quantification by immunocytochemistry of BRN3A/ β III Tubulin-positive iPSC-derived neurons

The proportion of iPSC successfully differentiated into neurons was assessed after staining with BRN3A (B, in green) and β III Tubulin (C, in red) compared to the total number of Dapi-positive cells (A, in blue) of cells cultured for 18 days in 24-well plates coated with poly-D-lysine. The white arrows in A indicates cells that don't express the neuronal markers in B and C. C is a merge image of A and B in addition to β III Tubulin staining. Scale bar in C = 20 μ m.

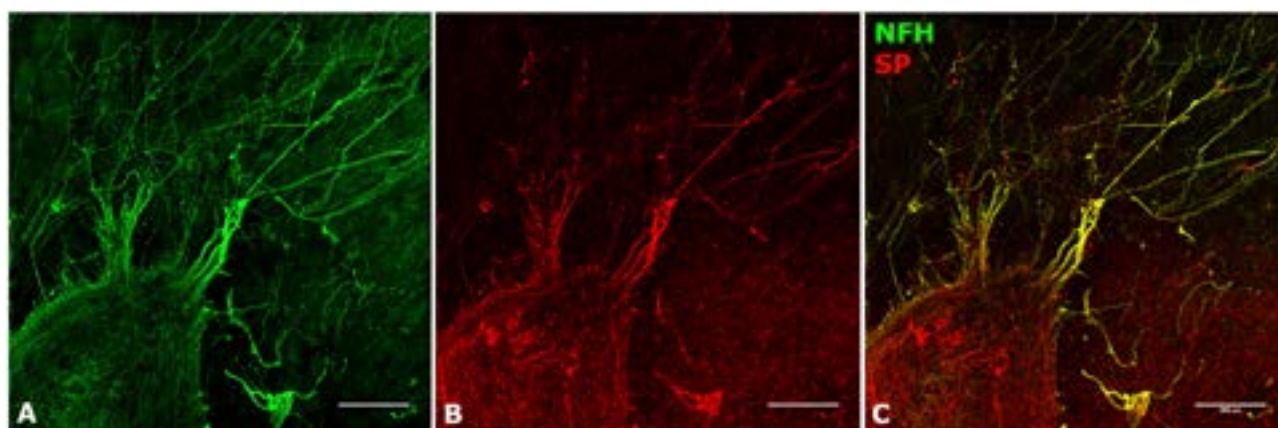


Figure S3 | Characterization by immunofluorescence of the expression of Substance P in neurofilament H-positive iPSC-derived neurons cultured in 3D for 49 days

The iPSC-derived neurons were cultured in the fibroblast-populated sponge for 49 days and pictures were taken from an above view. Most of the NFH-positive nerve fibers (in green in A and C) expressed by iPSC-derived neurons were also positive for SP (in red in B and C). Scale bar 200 μ m.

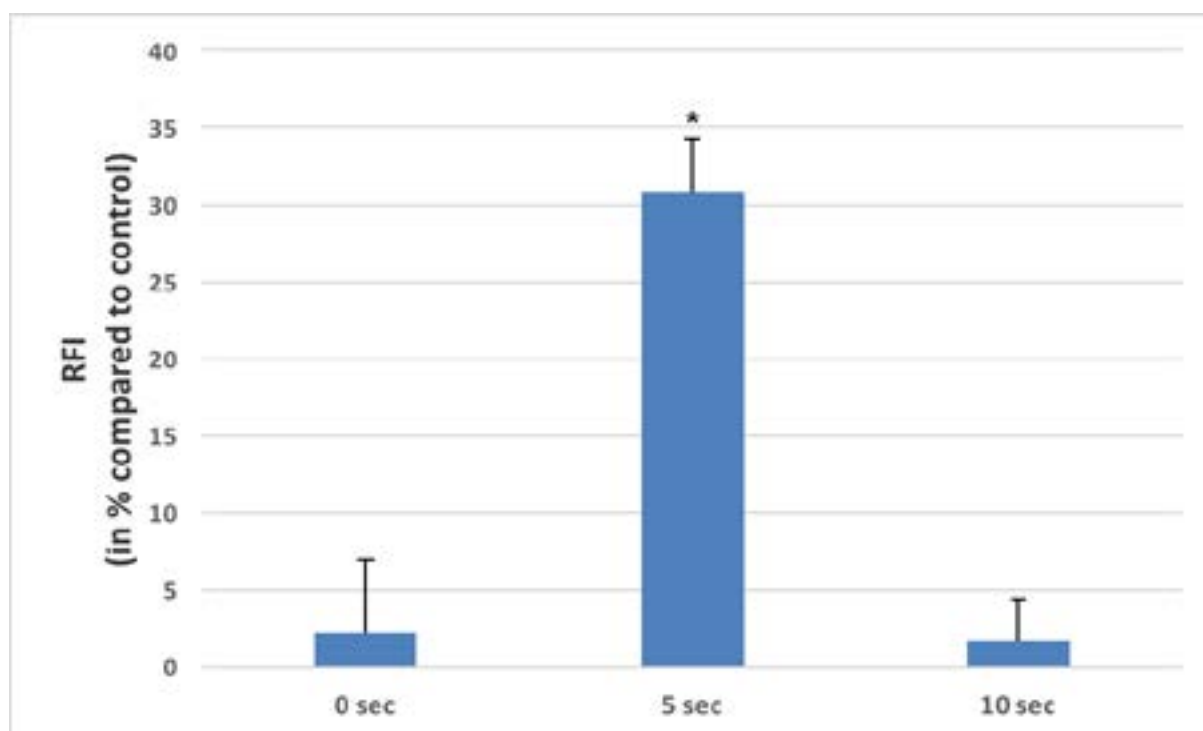


Figure S4 | Characterisation of iPSC-derived neuron excitability upon TRPV1 agonist stimulation by calcium quantification with Fura-2

Calcium flux was determined according to the manufacturer's instructions (Fura-2 no wash calcium assay kit, Abcam). Quantification of the Fura-2 ratiometric dye fluorescence induced by intracellular calcium content was performed using a Varioskan microplate reader (Thermo scientific) before and 5 and 10 seconds after stimulation with 10 μ M capsaicin of iPSC-derived neurons matured for 19 days. Results were expressed as the percentage of the relative fluorescence intensity compared to the control (no stimulation). No calcium increase was observed when fibroblasts were stimulated with 10 μ M capsaicin (data not shown). Data were expressed in relative fluorescence units (RFI) as mean \pm standard deviation (* $p < 0.0001$, $n = 6$).

Statement of Significance

The purpose of this work was to develop in vitro an innovative fully human tissue-engineered skin enabling the investigation of the influence of cutaneous innervation on skin pathophysiology. To reach that aim, neurons were differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) generated from normal human skin fibroblasts. This innervated tissue-engineered skin model will be the first one to show iPSC-derived neurons can be successfully used to build a 3D nerve network in vitro. Since innervation has been recently recognized to play a central role in many human skin diseases, such as psoriasis and atopic dermatitis, this construct promises to be at the forefront to model these diseases while using patient-derived cells.

Chapitre IV

Discussion et Perspectives

Ce travail de thèse a permis de créer, pour la première fois, un modèle de peau complète intégrant un système immunitaire, une innervation sensorielle, une pseudo-vascularisation et un épiderme stratifié. De plus, nous avons fait évoluer ce modèle dans l'objectif d'avoir toutes les composantes cellulaires de ce modèle d'origine humaine.

1- Immunocompétence du modèle de peau

Les MonoDCs, similaires aux cDCs du derme, ont été incluses au modèle pour introduire l'immunocompétence dans le modèle de peau innervé déjà existant au LOEX. Ce sont les seules cellules immunitaires dont la modulation de la maturation par les neuropeptides a été testée dans les résultats présentés ici. Or, les cDCs ne sont pas les seules cellules immunitaires présentes dans la peau normale humaine.

1-1. Monocytes, macrophages et cellules de Langerhans

Les macrophages et les cellules de Langerhans interviennent dans de nombreuses maladies auto-immunes cutanées, comme le psoriasis [215, 579]. En conservant le même modèle de cellules dérivées de monocytes, il serait possible de générer des macrophages dérivés de monocytes (MonoMacro) [219], ou des cellules de Langerhans dérivées de monocytes (MonoLCs) [580]. Ajouter ces deux types cellulaires représenterait une première approche dans l'utilisation du modèle de peau dans la modélisation de pathologies, comme le psoriasis [579].

De plus, les MonoLCs et les MonoMacro pourraient être utilisés en monoculture, pour étudier la modulation de leurs maturations par les neuropeptides. Il est déjà établi que les LCs expriment les récepteurs à la substance P et au CGRP [313, 429] et leurs maturations par le CGRP entraînent, chez la souris, une orientation de la réponse adaptative vers un profil T_H2 ou T_H17 [197, 556]. Les macrophages expriment également les récepteurs aux neuropeptides et leurs stimulations par la SP et le CGRP augmentent la libération de $TNF-\alpha$ et $IL-1\beta$, en cas d'activation par un herpes-virus [581]. En revanche, si les macrophages sont activés par leur TLR4, le CGRP stimule la production d' $IL-10$, qui a un rôle de régulation de l'inflammation [582]. La SP seule est capable d'induire la polarisation des macrophages en profil M2, intervenant dans la cicatrisation et la réparation, même sous influence d' $IFN-\gamma$, qui est la cytokine orientant la polarisation M1 (pro-inflammatoire) des macrophages [583].

Les monocytes seuls ont également leurs activités modulées par les neuropeptides. La substance P augmente la sécrétion de TNF- α , d'IL-1 et d'IL-6 [584, 585], ainsi que l'expression d'IL-1 β et d'IL-23 [586]. Les monocytes, sous l'action de LPS, peuvent produire du NGF, qui va activer les neurones, libérant à leur tour du CGRP. Ce CGRP entraîne la libération d'IL-10 par les monocytes préalablement activés par le LPS [587].

Toutes ces actions des neuropeptides sur les monocytes, LCs et macrophages peuvent être confirmées par l'expérimentation *in vitro* de monocultures dans un premier temps, puis grâce à l'intégration de ces types cellulaires dans le modèle de peau innervé. L'expérience consisterait à ajouter, séparément ou ensemble, les MonoLCs, MonoMacro et monocytes dans notre modèle de peau innervé, ou non, et d'observer si une stimulation spécifique des neurones sensoriels peut moduler les changements phénotypiques induits par la stimulation des cellules immunitaires par le LPS ou par des agonistes d'autres TLRs. La quantification de TNF- α et d'IL-12p70, comme réalisés sur les surnageants des monocultures de MonoDCs, constituerait une première analyse. Cependant, d'après les multiples influences des neuropeptides sur les cellules immunitaires rapportés par la littérature, il sera nécessaire de réaliser la quantification de la libération d'autres cytokines, comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL10 ou l'IL-23. De plus, il sera également nécessaire de phénotyper les cellules immunitaires placées dans le modèle de peau après stimulation, notamment les monocytes. L'influence même du milieu tridimensionnel, particulièrement des kératinocytes, pourrait induire une différenciation des monocytes en DCs, sans intervention de l'innervation [588].

1-2. L'utilisation de T_H naïf comme modèle de prédiction de l'orientation de l'immunité adaptative.

Un dernier type de population de cellule immunitaire à ajouter au modèle de peau serait les LT. L'action des neuropeptides sur les LCs et les DCs est susceptible d'intervenir dans l'orientation des T_H. Pour le moment, nous n'avons pas étudié cette fonction des neuropeptides au travers de nos modèles, monoculture ou peau reconstruite. La quantification de la sécrétion de seulement deux cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-12p70), dans les surnageants de culture, est insuffisante pour émettre une hypothèse sur la possible orientation des T_H par les MonoDCs sous influence de neuropeptides.

Les T_H naïfs peuvent être isolés à partir de PBMCs humains mais il est impossible de les introduire dans le modèle de peau, à cause de la réaction de rejet engendrée par la reconnaissance d'un CMH différent exprimé par les cellules présentes dans le modèle. En revanche, il est possible d'utiliser cette réaction de rejet de greffe avec les T_H naïfs dans un modèle *in vitro*, où elles sont mises en présence de MonoDCs matures, provenant d'un autre donneur [589]. C'est la technique de réaction leucocytaire mixte (*mixed leukocyte reaction*, MLR) où les MonoDCs matures vont induire la prolifération des T_H naïfs et leurs différenciations. En fonction de la stimulation préalable des MonoDCs, donc de leurs profils de maturations induits par cette stimulation, la polarisation des T_H induite par la technique de MLR sera différente. Il est possible d'analyser, au terme de la MLR, le profil d'expression de cytokines par les T_H par cytométrie en flux.

Cette technique pourrait notamment fonctionner avec les MonoDCs migrant hors du modèle de peau. Cependant, en l'absence de migration substantielle, nous avons envisagé d'induire une activation et une prolifération des T_H naïfs, en mimant l'interaction DC-T_H avec des billes de polystyrène recouverts d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 [590, 591]. Outre l'engagement du TCR, la polarisation des T_H se fera sous l'influence par les cytokines présentes dans le milieu de culture des éponges à la fin de la stimulation. Cette technique a cependant pour désavantage la perte des nombreux signaux de type II (récepteurs de surface) importants dans l'interaction directe des DCs et des T_H. La polarisation des T_H repose en outre entièrement sur la nature du milieu d'activation. Dans le cas du modèle de peau, il se peut que les cytokines soient trop diluées pour induire la polarisation des T_H ou que la différenciation se fasse sous l'influence de l'hydrocortisone, un composé nécessaire à la culture mais ayant des propriétés anti-inflammatoires [592].

2- L'hydrocortisone et le maintien en culture du modèle de peau

Le problème de l'hydrocortisone a été détecté tardivement dans le processus de stimulation des éponges. Toutes les stimulations par les molécules sensibilisatrices ont été effectuées dans un milieu de culture contenant de l'hydrocortisone. Jusqu'à ce que nous reproduisions nos résultats de stimulations sans hydrocortisone, il faudra s'interroger sur l'activation des MonoDCs dans nos expériences de stimulation par les sensibilisateurs. Ce problème témoigne que l'ajout d'un nouveau type cellulaire dans un modèle déjà établis doit également remettre en

cause la composition des milieux de culture, particulièrement lorsqu'il s'agit de modéliser un processus inflammatoire.

3- Les MonoDCs, un bon modèle de cDCs ?

Les MonoDCs sont les seules cellules immunitaires utilisées dans notre modèle. Elles proviennent de la différenciation *in vitro* de monocytes sanguins humains et ont été historiquement très utilisées pour l'étude de l'influence des DCs humaines sur les lymphocytes T. Ce modèle présente l'avantage de fournir des MonoDCs immatures, après différenciation des monocytes, permettant d'induire *in vitro* leurs maturations et de modéliser des réponses T_H1 , T_H2 ou T_H17 [563-565]. Cependant, ces cellules ne peuvent pas modéliser toutes les fonctions des cDCs. Elles sont, par exemple, incapables de réaliser une présentation croisée efficace [566].

La force d'un modèle est conditionnée notamment par la précision des limites qui lui sont imposées. Nous avons choisi de définir nos MonoDCs suivant le phénotype $CD1a^+$, $CD14^{low}$, $CD209^+$, $HLA-DR^+$ et $CD86^-$ à la fin de leur différenciation [221, 593]. La différenciation dépend grandement de la provenance des monocytes, extraits à partir du sang de donneurs, générant ainsi les MonoDCs soumises à une variabilité inter-individuelle non négligeable. De plus, la différenciation des monocytes en DCs n'engendre pas une population homogène : il y a toujours une portion de cellules n'exprimant pas CD1a, pouvant représenter des monocytes ne s'étant pas différenciés, ou des MonoDCs maturant spontanément. Le principal désavantage de l'utilisation des MonoDCs comme modèle de cDCs *in vitro* est cette variabilité interindividuelle [594]. Pour éviter tout biais d'interprétation des résultats, nous avons choisi de ne garder que les lots de monocytes pouvant induire plus de 90% de MonoDCs, avec une population spontanément mature ($HLA-DR^{high}$, $CD86^+$) inférieure à 10%.

Une alternative à l'utilisation des monocytes, permettant d'éliminer les risques de variabilité interindividuelles serait d'utiliser des lignées de cellules souches hématopoïétiques et de les différencier en DCs. Les lignées provenant de leucémies monocytaires, comme THP-1, ou de leucémies myéloïdes, comme KG-1 ou MUTZ-3, peuvent être différenciées en DCs immatures [595, 596]. Cependant, cette technique nécessite l'utilisation de lignées cellulaires d'origine cancéreuse, avec les risques de prolifération non contrôlée ou de perte d'identité

tissulaire [464-466], créant un risque de mauvaise intégration des DCs dérivés de ces lignées dans le modèle de peau.

Les cDCs différenciées et immatures résidant dans les tissus périphériques sont, comme les neurones, des cellules non proliférantes. Une autre alternative à l'utilisation des MonoDCs, serait de différencier les DCs directement à partir d'iPSCs [597-599], ou de passer par une étape intermédiaire de différenciation en cellules souches hématopoïétiques [600, 601]. Cette dernière option présenterait l'avantage de pouvoir maintenir les cellules souches hématopoïétiques à un stade indifférencié en culture et d'induire leur différenciation en DCs sans devoir repartir d'une lignée d'iPSC. Un protocole a été établi et expérimenté (Annexe 5), malheureusement les premiers tests ne permettaient pas le maintien en culture des progéniteurs hématopoïétiques obtenus.

4- Les neuropeptides, modulateurs de réponses immunitaire

4-1. Activateurs et environnement de maturation

D'après les actions multiples de la SP et du CGRP sur les cellules immunitaires, leur rôle exact ne peut pas être considéré simplement comme pro- ou anti-inflammatoire. [559, 560]. La modulation qu'apporte ces neuropeptides dépend vraisemblablement de la nature du signal de danger détecté par les cellules immunitaires (Discussion, partie 1-1).

Dans nos études sur MonoDCs en monoculture, nous avons choisi d'utiliser uniquement le LPS comme activateur de la maturation des cellules. Pour dégager une fonction modulatrice plus précise des neuropeptides, nous pourrions utiliser d'autres déclencheurs de la maturation, comme le R848 (Resiquimod) ou des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α .

4-2. Ordre et temps de stimulation des MonoDCs par les neuropeptides

L'ordre de rencontre avec des signaux de danger ou des molécules modulatrices d'activité a son importance dans la maturation des DCs. La même équipe a montré que des LCs simultanément activées par un signal de danger et par les neuropeptides provoquent une réponse TH1. Mais si les LCs sont préalablement maturées par un signal de danger, puis mises en présence de cellules endothéliales activées par les NP, elles induiront une réponse TH1. Nous avons choisi de stimuler les MonoDCs par le LPS et les neuropeptides en même temps.

Or, un neurone nocicepteur innerve une surface cutanée bien plus vaste que la surface couverte par une DC. Il est donc possible qu'un neurone perçoive un signal de danger sans que des DCs éloignées de la zone de danger en soient capables. D'autre part, certains dangers pourraient ne pas être détectables par les DCs, par défaut des récepteurs adéquats. Dans ces cas de figure, les neuropeptides libérés par les neurones vont stimuler les cellules immunitaires avant que ces dernières ne soient activées par un signal de danger. A l'inverse, si une DC reçoit un signal de danger avant les nocicepteurs, elle sera activée par le signal de danger perçu avant d'être stimulée par les neuropeptides. Pour tenir compte de ces activations séquentielles, il serait intéressant de pré-stimuler les MonoDCs avec les neuropeptides, avant d'appliquer l'activateur, ou, à l'inverse, commencer avec l'activateur, puis ajouter les neuropeptides.

La cinétique d'application des neuropeptides n'a pas été pris en compte lors des stimulations des MonoDCs. En cas de douleur neuropathique (initiée par les neurones mais d'origine intrinsèque), d'allodynie, d'hypersensibilité ou d'inflammation répétées de la même zone, les nocicepteurs peuvent libérer des neuropeptides en continu. C'est cette activation durable des fibres C qui pourrait être à l'origine des plaques cutanées dans le psoriasis, par stimulation continue des DCs de la peau par la SP [8]. Une application régulière de doses de neuropeptides sur les MonoDCs, activées ou non, permettrait d'évaluer plus précisément le rôle des neuropeptides, et notamment leurs capacités à induire ou à moduler la maturation des MonoDCs. La demi-vie des neuropeptides dans le milieu de culture sera alors un paramètre à prendre en compte. Nous avons estimé par dosage HPLC que la SP avait une demi-vie d'environ 2h dans le RPMIc à 37°C (données non présentées). Ce résultat préliminaire devra être confirmé par dosage ELISA avant de proposer un protocole expérimental étudiant ces questions.

4-3. Le peptide vasoactif intestinal

Les neurones sensoriels cutanés produisent et sécrètent dans la peau d'autres neuropeptides que la SP et le CGRP. Le VIP (*vasoactive intestinal peptide*) est le 3^e neuropeptide majoritairement exprimé par les neurones, avec des actions connues sur les cellules cutanées. Sur des DCs immatures (murines, dérivées de moelle osseuse, ou humaines, dérivées de monocytes), le VIP entraîne une augmentation de l'expression de CD86 et oriente les LT vers une polarisation T_H2. Contrairement à la SP ou au CGRP, le VIP seul peut induire une maturation des DCs [602, 603]. A cause de cette action stimulatrice sur les DCs, le VIP a

été envisagé comme cible thérapeutique pour prévenir les symptômes de l'eczéma ou du psoriasis [604].

Lorsque les DCs sont activées par du LPS, le VIP entraîne une diminution de l'expression de CD80 et CD86, ainsi qu'une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. En revanche, si les DCs sont stimulées par du TNF- α , le VIP augmente leur expression de CD83 et leur sécrétion d'IL-12 [602]. Ces observations confirment l'hypothèse selon laquelle les neuropeptides n'auraient pas un rôle pro- ou anti-inflammatoire, mais plutôt un rôle modulateur, dépendant de l'état de maturation des DCs et de la nature des agents déclencheurs de la maturation.

5- Caractérisation des neurones dérivés d'iPSCs

5-1. L'interaction neuro-immunitaire

Pour que nos futures interprétations du dialogue entre neurones et cellules immunitaires soient complètes, il est nécessaire de connaître dans quelle mesure les stimuli appliqués sont susceptibles d'agir sur l'un ou l'autre type cellulaire. En conséquence, nous devons caractériser l'expression des récepteurs aux cytokines inflammatoires et des TLRs sur les neurones dérivés d'iPSCs ou de DRGs [420]. Une fois ces informations connues, nous pourrions reproduire la quantification de la sécrétion de SP et CGRP par les neurones sous stimulation de molécules pro-inflammatoires pouvant agir directement sur les nocicepteurs de la peau. Les premiers candidats pour cette caractérisation pourraient être les récepteurs de l'IL-1 β , de l'histamine et du CCL2 (Introduction, partie 3-4-5) [419, 420].

Pour la modélisation de la communication neuro-immunitaire, le principal problème sera donc de choisir des stimulateurs spécifiques des systèmes immunitaires ou nerveux. En effet, une sensibilité des deux systèmes aux mêmes signaux de danger rendra difficile l'étude de la communication entre eux. Nous pourrions cependant compter sur une des forces de notre modèle, sa modularité. Le fait d'avoir réalisé l'intégration simultanée ou séparée de MonoDCs et de neurones humains dérivés d'iPSCs rend possible l'application des mêmes conditions de stimulation sur différentes constructions du modèle et l'identification du type cellulaire à l'origine de la réponse observée.

5-2. Organisation structurelle des fibres nerveuses

La caractérisation des neurones dérivés d'iPSCs s'est principalement orientée sur leurs expressions des récepteurs TRPs, leurs capacités à produire et sécréter des neuropeptides et à innover le modèle de peau (*Muller et al.*). En observant leurs organisations structurelles par le dessous du modèle de peau, il semblerait que, en présence de cellules de Schwann, les corps cellulaires des neurones se regroupent en formations pseudo-ganglionnaires. Ce phénomène est moins observé pour les neurones murins (DRGs) ou pour les neurones dérivés d'iPSCs sans cellules de Schwann (*Muller et al.* Figure1 et FigureS3 + Annexe 6).

Les neurones sensoriels sont considérés comme pseudo-unipolaires, avec des terminaisons dans le système nerveux central et dans la peau. De cette polarisation résulte une différence dans la composition de canaux membranaires sur les axones avant et après le ganglion de la racine dorsale, mais également au niveau du soma et également entre les sous-types de fibres sensorielles [605]. Cette différence est présente notamment au niveau de l'expression des canaux potassiques (K_v , K_{ir} et K_{CaBK} , Introduction partie 3-2-5.) et des canaux sodiques ($Nav1.7$, $Nav1.8$ et $Nav1.9$) [606, 607]. L'analyse de l'expression de ces canaux ioniques et leurs emplacements sur les neurones dérivés d'iPSCs permettrait à la fois de discriminer les fibres au profil A δ et les fibres au profil C, et aussi de connaître l'orientation des axones des neurones. Si les neurones dérivés d'iPSCs ne peuvent pas innover le derme sans cellules de Schwann, c'est peut-être dû à un défaut de polarisation des axones [417, 608-610].

5-3. Les étapes de la différenciation des iPSCs en neurones et cellules de Schwann

La différenciation des iPSCs en neurones sensoriels s'est faite par étapes successives, dont une, particulièrement importante, consistait à induire l'arrêt de la prolifération des cellules en différenciation (Matériel et Méthode, partie 2-1-10). De plus, avant même l'arrêt de la prolifération des cellules, nous avons utilisé les cellules en différenciation pour induire des cellules de Schwann. On peut donc supposer, sans l'avoir déterminé directement, que les cellules en différenciation passent par un stade de progéniteurs neuronaux, qui se ne sont plus des iPSCs et peuvent donner des neurones ou des cellules gliales.

Il serait intéressant de réaliser une analyse des différences d'expression de certains gènes caractéristiques des cellules souches (NANOG, POU5F1) et des neurones sensoriels (TAC1, RUNX1, SCN9A et SCN10A) ou des cellules gliales pour suivre les différentes étapes de la différenciation [611]. De plus, en gardant l'analyse de l'expression de gènes spécifiques de neurones sensoriels, nous pourrions effectuer un comparatif entre les neurones dérivés d'iPSCs maintenus en culture 2D et ceux intégrés au modèle de peau. Cela permettrait de savoir si la culture dans un environnement tridimensionnel, avec un épiderme (facteur de polarisation), entraîne l'apparition d'une plus grande diversité de sous-types de neurones sensoriels [612].

6- Les perspectives du modèle de peau complet

6-1. Un outil de détection de composés sensibilisateurs et/ou irritants

Le modèle de peau, dans sa composition innervée par des neurones issus de DRGs murins, vascularisée et immunocompétente, a permis de confronter la classification LLNA de molécules bien connues et l'action proinflammatoire que vont induire ces molécules sur le modèle.

Proposer un nouvel outil de prédiction de composés sensibilisateurs ou irritants requiert une grille de lecture simple basée sur des quantifications et non des observations qualitatives comme les immunofluorescences. Cependant, notre grille de lecture pour évaluer le potentiel sensibilisateur ou irritant des molécules s'est limitée pour l'instant à une quantification du TNF- α libéré par les cellules d'une du modèle de peau complet.

Nous souhaiterions à présent, dans un premier temps, réaliser le dosage d'autres cytokines ou chimiokines. Il est possible de faire une quantification de plusieurs cytokines et chimiokines par ELISA Multiplex (ex : IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-23, IL-33, TSLP). Notre but sera ensuite de choisir les 3 ou 4 cytokines discriminant au mieux le potentiel irritant ou sensibilisateur des composés. La quantification par ELISA des neuropeptides pourra aussi venir s'ajouter à celui des cytokines et chimiokines pour permettre une meilleure discrimination. Enfin, pour pouvoir statuer sur la toxicité des doses employées, un test LDH viendra compléter la grille de lecture.

Par la suite, il importera de comparer la production des facteur solubles retenus dans le contexte des quatre constructions possibles du modèle (Matériel et Méthodes, partie 2-4). Ainsi, nous pourrons déterminer le type cellulaire à l'origine de l'action induite par les molécules.

Une autre perspective pour améliorer l'utilisation du modèle sera dans le changement du mode de stimulation. Tous les composés ont été administrés directement dans le milieu de culture pour mimer une stimulation systémique. Or, nous avons créé un modèle avec un épiderme stratifié et caractérisé. Il sera donc possible de réaliser une application topique des composés à tester, c'est-à-dire directement sur l'épiderme. C'est aussi pourquoi nous avons travaillé à optimiser l'innervation par les neurones dérivés d'iPSCs : pour envisager l'application topique de composés, l'innervation de l'épiderme par des neurones représente un point clé dans le développement des perspectives d'utilisation du modèle de peau.

6-2. Les enjeux économiques de l'exploitation en industrie

6-2-1. Le coût théorique et les avantages d'une éponge par rapport aux modèles existant

Nous souhaitons proposer notre modèle innovant, quand une grille de lecture aura été établie, sur le principe économique de la prestation de service. Pour le présenter comme un modèle alternatif d'évaluation de l'effet sensibilisateur ou irritant d'un composé, il faut s'intéresser au coût de fabrication d'une éponge. Notre modèle, dans sa composition innervée avec des neurones humains dérivés d'iPSCs, vascularisée et immunocompétente n'étant pas encore établi en routine, le prix exact de tous les composants et de la main d'œuvre associée sera difficile à évaluer. Cependant, il est possible d'établir un coût préliminaire de fabrication du modèle en se basant sur les principales innovations apportées, c'est-à-dire la différenciation des iPSCs en neurones sensoriels.

Pour ensemer une seule éponge, la dépense brute en termes de consommables peut être estimée à 30€ (Annexe 7). Cette approximation vaut pour les étapes de fabrication d'une seule éponge, et non pour l'évaluation d'un composé. En respectant nos protocoles expérimentaux, il faut utiliser de quatre éponges pour évaluer l'effet d'un seul composé à une dose. Pour évaluer le potentiel sensibilisateur ou irritant d'une seule dose d'un seul composé, le coût en termes de fabrication d'éponges représenterait 120€ (30x4). Or, avec le test KeratoSens™, l'ECVAM recommande l'évaluation de 12 concentrations différentes pour le même composé [613]. Si nous voulions respecter ces recommandations, le coût de notre modèle s'élèverait à 1 440€ pour l'évaluation d'un seul composé chimique. Ce coût reste une approximation basse, puisqu'il ne comporte que le coût de différenciation des iPSCs en neurones humains, mais pas les tests quantitatifs afférents. En comparaison, le KeratoSens™

est proposé à 96€ pour l'évaluation d'un composé, avec 12 concentrations différentes [613], alors que le test LLNA coûte 3 000\$US par composé [614].

Le test KeratoSensTM a été évalué par le protocole AOP de l'ECVAM comme un test préliminaire (« phase 2 ») permettant d'évaluer simultanément l'effet au niveau cellulaire d'un grand nombre de composés (*screening*), avec différentes concentrations pour dégager une dose effectrice. Le test LLNA (phase 4 du protocole AOP : effet sur l'organisme) n'a pas pour but d'évaluer plusieurs concentrations pour un même composé. Les étapes précédentes, dont le KeratoSens fait partie, est justement d'estimer une concentration à utiliser dans l'évaluation *in vivo*, dans le respect de la règle des 3Rs.

Dans son approche éthique, notre modèle équivaut au KeratoSensTM, mais dans sa complexité et dans son coût, il se rapproche d'un LLNA. Si nous choisissons d'utiliser notre modèle suivant le contexte économique de la prestation de service, il ne pourrait pas être utilisé à l'évaluation de l'effet dose/réponse d'un composé en concentrations variables. Notre modèle pourrait s'approcher de la phase 3 du test AOP (effet d'un composé sur un organe). De plus, contrairement au KeratoSensTM, notre modèle a l'avantage de disposer d'un épiderme stratifié : il sera donc envisageable de réaliser des stimulations topiques. Notre modèle de peau, à l'instar du LLNA, représenterait une alternative terminale de test-précliniques, destinés à identifier la mauvaise estimation de doses ou d'applications de composés, pouvant se retrouver fatal pour les tests cliniques.

6-2-2. Les modèles tridimensionnels alternatifs

Notre protocole de création du modèle de peau repose sur des étapes successives d'ensemencement d'une matrice pour recréer, système par système, toutes les composantes cellulaires d'une peau normale. Des sociétés commerciales, comme EPISKIN[®] (centre de recherche, filiale du Groupe L'Oréal) utilisent le même principe pour la création et la commercialisation de leur modèles [615, 616]. Cette technique, qui vise à reconstruire la structure d'un organe pour reproduire ses fonctions, n'est pas la seule existante en génie tissulaire.

Les sphéroïdes, aussi appelés microtissus, sont des modèles construits en se basant sur la capacité des cellules à s'agréger par leurs molécules d'adhésion. La technique la plus couramment utilisée pour créer ces petits organes sphériques consiste à ensemercer les cellules

dans une goutte de milieu suspendue à un support par capillarité, pour aider les cellules à s'agréger avec la gravité : c'est la technique de la goutte suspendue. Des systèmes de plaques percées, permettant d'ensemencer les cellules et de changer le milieu d'un côté, et à la goutte de se former au côté opposé, sont commercialisées, par la société InSphero par exemple [617, 618]. Ce type de plaque à faible adhérence cellulaire est disponible en format 96 ou 384 puits, permettant de produire de façon reproductible un grand nombre de modèles. De plus, la société SYNTIVIA produit et commercialise des sphéroïdes d'épiderme, où le mini-organe reproduit la stratification de l'épiderme. Ce genre d'approche, combinant a priori les reconstitutions structurelle et fonctionnelle, trouve surtout son utilité dans l'échantillonnage de molécules, plus que dans la reconstruction des fonctions d'un organe [619].

Les systèmes *organ-on-a-chip* sont des modèles à mi-chemin entre la culture classique en 2D et la modélisation 3D. Le principe est d'utiliser une chambre ou un bioréacteur perfusé, pour reproduire une circulation par système microfluidique. Ces chambres ou bioréacteurs peuvent être de la taille d'une lame de microscopie, composés de deux compartiments séparés par des membranes semi-perméables etensemencées avec des cellules de vaisseaux lymphatiques ou sanguins pour recréer des modèles de capillaires [620, 621]. Pour aller plus loin, des modèles de *skin-on-a-chip* proposent des compartiments pour intégrer un modèle de peau, avec derme et épiderme. Supplémenté par le système de microfluidique, le modèle de peau vascularisé devient un modèle d'étude de la diffusion de substances au travers de l'épiderme et du derme, et permet la mesure de leurs concentrations à la sortie du système circulatoire [453, 622, 623].

Ces modèles, plus éloignés de l'aspect organotypique que nous privilégions, ont également des objectifs différents des nôtres. Là où ces modèles vont essayer de reproduire à la perfection une seule fonction de la peau, nous cherchons à en combiner plusieurs, non seulement pour leurs intérêts dans le cadre d'un modèle de détection, mais également pour l'étude de l'interaction entre ces fonctions.

6-3. Un outil d'étude de l'interaction neuro-immunitaire pour la recherche académique

Notre modèle réunissant système nerveux et système immunitaire a été jusqu'à présent étudié par des techniques de dosages par ELISA ou d'imagerie par immunofluorescence. La construction de notre système, par retournement successif de la matrice dermique, offre une certaine maniabilité au modèle de peau, avec les corps cellulaires des neurones directement en dessous du derme, hors de la matrice qui le constitue. Pour déterminer l'activation de ces neurones in situ, nous pouvons envisager d'utiliser l'imagerie calcique, pour les perspectives à court terme ou la technique de patch-clamp, pour les perspectives à long terme [611, 624]. Cela permettrait d'observer une action directe de l'application topique de composés se voulant spécifiques du système immunitaire ou du système nerveux. Une limitation de ce type d'approche est que le modèle de peau ne peut pas être réutilisable sur le long terme. Si un neurone peut avoir une activité sporadique, en fonction des signaux perçus, les MonoDCs de notre modèle ne peuvent pas revenir du stade mature au stade immature.

En observant le modèle par immunofluorescence, au niveau du dessous du derme, les neurones présentent une organisation en pseudo-ganglions. Il existe des modèles de formation de moelle épinière à partir de neurones d'iPSCs, pour l'étude des facteurs trophiques nécessaire à la différenciation des neurones spinaux [625]. Il serait possible d'induire une formation de DRGs à partir des neurones sensoriels humains de notre modèle pour étudier les facteurs trophiques nécessaire à la polarisation des neurones sensoriels. De plus, nous pourrions comparer l'efficacité d'innervation du modèle de peau induite par l'ensemencement de neurones dissociés ou de ganglions induits.

7- Conclusion générale et perspectives à court terme

Ce projet de recherche se base sur la collaboration de deux laboratoires, le LOEX, avec le Dr. François Berthod, et l'unité CNRS UPR3572, avec le Dr Vincent Flacher. Une des composantes les plus importantes de ma thèse fut d'assurer la pérennité du modèle de peau reconstruite au sein de ces deux laboratoires. La technique de différenciation des MonoDCs et leur méthode d'analyse a été instauré au LOEX, pendant que la technologie de la création de peau par génie tissulaire a été initié à l'UPR3572.

Un transfert technologique de cette ampleur fait partie intégrante du processus de recherche. Il permet de confronter les protocoles et analyses à des environnements matériels et techniques différents, participant ainsi à la reproductibilité du modèle. L'introduction de nouvelles technologies dans un laboratoire est un processus long et peu productif en termes de résultats pouvant être intégrés à une thématique de recherche. Cependant, les résultats interprétables obtenus ne proviennent ni d'un seul laboratoire, ni du travail d'une seule personne, renforçant ainsi leur robustesse. De plus, l'introduction de nouvelles technologies permet aux laboratoires d'envisager de nouvelles expérimentations et de diversifier ses travaux de recherches.

Par exemple, le modèle de peau tels qu'expérimenté ici, représente l'intégration d'un système nerveux et d'un système immunitaire au sein d'un même modèle. Les cellules sont stables et fonctionnelles pour la plupart. Les prochaines étapes, pour assurer la pérennité du système dans les deux laboratoires, est d'optimiser cultures, stimulations et conditions expérimentales pour caractériser au mieux notre système.

Il s'agit du premier modèle de peau reconstruite alliant tous ces systèmes pour en étudier l'interaction. Cette interdépendance pourrait s'observer en microscopie en « *live* », par fluorescence. La monoculture nécessaire pour tous les types cellulaires, avant la leur ajout dans le modèle, permettrait de transfecter les cellules d'intérêt (neurones ou MonoDCs) pour leur faire produire des protéines fluorescentes (GFP, RFP, YFP).

Nous l'avons vu en intégrant les MonoDCs, le protocole de reconstruction de la peau permet l'ajout de nouveaux types cellulaires. Pour la modélisation de pathologies, il ne s'agirait pas d'ajouter de nouveaux types cellulaires mais d'en modifier la provenance. Choisir des kératinocytes de patients psoriasiques ou atteints de dermatites atopique, serait un premier pas dans la modélisation de ces pathologies. La technologie de reprogrammation des iPSCs nous

offre, pour des perspectives à long terme, la possibilité d'induire des banques de cellules souches de patients. Ces iPSCs de patients pourraient être différenciées en tous les types cellulaires composants le modèle. Cette perspective nous ouvre la porte de la médecine personnalisée, avec un modèle de peau pour chaque variation d'une même pathologie. C'est ce qu'on appelle, le modèle « One Patient ».

Bibliographie

1. Palucka, K., J. Banchereau, and I. Mellman, *Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets*. *Immunity*, 2010. **33**(4): p. 464-78.
2. Gouin, O., et al., *TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization*. *Protein Cell*, 2017.
3. Douglas, S.D. and S.E. Leeman, *Neurokinin-1 receptor: functional significance in the immune system in reference to selected infections and inflammation*. *Ann N Y Acad Sci*, 2011. **1217**: p. 83-95.
4. Cadau, S., et al., *In vitro glycation of an endothelialized and innervated tissue-engineered skin to screen anti-AGE molecules*. *Biomaterials*, 2015. **51**: p. 216-25.
5. Maury, Y., et al., *Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes*. *Nat Biotechnol*, 2015. **33**(1): p. 89-96.
6. Grochmal, J., et al., *Skin-derived precursor Schwann cell myelination capacity in focal tibial demyelination*. *Muscle Nerve*, 2014. **50**(2): p. 262-72.
7. Peters, E.M., et al., *Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(9): p. 1937-47.
8. Riol-Blanco, L., et al., *Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation*. *Nature*, 2014. **510**(7503): p. 157-61.
9. Liu, X.J., et al., *TLR signaling adaptor protein MyD88 in primary sensory neurons contributes to persistent inflammatory and neuropathic pain and neuroinflammation*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 28188.
10. Okun, E., K.J. Griffioen, and M.P. Mattson, *Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease*. *Trends Neurosci*, 2011. **34**(5): p. 269-81.
11. Gingras, M., et al., *In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth*. *FASEB J*, 2003. **17**(14): p. 2124-6.
12. Gingras, M., I. Paradis, and F. Berthod, *Nerve regeneration in a collagen–chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice*. *Biomaterials*, 2003. **24**(9): p. 1653-1661.
13. Wilkinson, P.F.M., R., *Skin*. Cambridge: Cambridge University Press., 2009.
14. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.-M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. *Experimental Dermatology*, 2008. **17**(12): p. 1063-1072.
15. Blanpain, C. and E. Fuchs, *Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(3): p. 207-17.
16. M'Boneko, V. and H.J. Merker, *Development and morphology of the periderm of mouse embryos (days 9-12 of gestation)*. *Acta Anat (Basel)*, 1988. **133**(4): p. 325-36.
17. Akiyama, M., et al., *Periderm cells form cornified cell envelope in their regression process during human epidermal development*. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(6): p. 903-9.
18. Koster, M.I. and D.R. Roop, *Mechanisms regulating epithelial stratification*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 93-113.
19. Fuchs, E. and S. Raghavan, *Getting under the skin of epidermal morphogenesis*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(3): p. 199-209.
20. Noske, K., et al., *Mitotic Diversity in Homeostatic Human Interfollicular Epidermis*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(2).
21. Muroyama, A. and T. Lechler, *Polarity and stratification of the epidermis*. *Semin Cell Dev Biol*, 2012. **23**(8): p. 890-6.
22. Poulson, N.D. and T. Lechler, *Asymmetric cell divisions in the epidermis*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012. **295**: p. 199-232.
23. Zhu, X.J., et al., *BMP-FGF signaling axis mediates Wnt-induced epidermal stratification in developing mammalian skin*. *PLoS Genet*, 2014. **10**(10): p. e1004687.
24. Strudwick, X.L., et al., *Combination of low calcium with Y-27632 rock inhibitor increases the proliferative capacity, expansion potential and lifespan of primary human keratinocytes while retaining their capacity to differentiate into stratified epidermis in a 3D skin model*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0123651.
25. Charles, A. and F.G. Smiddy, *The Tonofibrils of the Human Epidermis1*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1957. **29**(5): p. 327-338.

26. Sandilands, A., et al., *Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 9): p. 1285-94.
27. Ishida-Yamamoto, A., et al., *Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(5): p. 1137-44.
28. Eckhart, L., et al., *Cell death by cornification*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3471-3480.
29. Gonzales, K.A.U. and E. Fuchs, *Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche*. Dev Cell, 2017. **43**(4): p. 387-401.
30. Solanas, G. and S.A. Benitah, *Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(11): p. 737-48.
31. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(2): p. 231-41.
32. Lundstrom, A. and T. Egelrud, *Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation*. Acta Derm Venereol, 1991. **71**(6): p. 471-4.
33. Matsui, T. and M. Amagai, *Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum*. Int Immunol, 2015. **27**(6): p. 269-80.
34. Smith, L.T., K.A. Holbrook, and P.H. Byers, *Structure of the Dermal Matrix during Development and in the Adult*. Journal of Investigative Dermatology, 1982. **79**(1): p. 93-104.
35. Cole, M.A., et al., *Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging*. J Cell Commun Signal, 2018. **12**(1): p. 35-43.
36. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
37. Woodley, D.T., *Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing*. Dermatol Clin, 2017. **35**(1): p. 95-100.
38. Pigeon, H., H. Zucchi, and D. Asselineau, *Distinct and complementary roles of papillary and reticular fibroblasts in skin morphogenesis and homeostasis*. Eur J Dermatol, 2012. **22**(3): p. 324-32.
39. Stunova, A. and L. Vistejnova, *Dermal fibroblasts-A heterogeneous population with regulatory function in wound healing*. Cytokine Growth Factor Rev, 2018. **39**: p. 137-150.
40. Swerlick, R.A., *The Structure and Function of the Cutaneous Vasculature*. The Journal of Dermatology, 1997. **24**(11): p. 734-738.
41. Potente, M. and T. Makinen, *Vascular heterogeneity and specialization in development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(8): p. 477-494.
42. Di Russo, J., et al., *Vascular laminins in physiology and pathology*. Matrix Biol, 2017. **57-58**: p. 140-148.
43. Marelli-Berg, F.M., et al., *An immunologist's guide to CD31 function in T-cells*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 11): p. 2343-52.
44. Huggenberger, R. and M. Detmar, *The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation*. J Invest Dermatol Symp Proc, 2011. **15**(1): p. 24-32.
45. Sato, H. and J. Coburn, *Leptospira interrogans causes quantitative and morphological disturbances in adherens junctions and other biological groups of proteins in human endothelial cells*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(7): p. e0005830.
46. Braverman, I.M., *The cutaneous microcirculation*. J Invest Dermatol Symp Proc, 2000. **5**(1): p. 3-9.
47. Johnson, R.S., J. Titze, and R. Weller, *Cutaneous control of blood pressure*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016. **25**(1): p. 11-5.
48. Birbrair, A., et al., *Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology*. Clin Sci (Lond), 2015. **128**(2): p. 81-93.
49. Jha, S.K., K. Rauniyar, and M. Jeltsch, *Key molecules in lymphatic development, function, and identification*. Ann Anat, 2018. **219**: p. 25-34.
50. Banerji, S., et al., *LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan*. The Journal of Cell Biology, 1999. **144**(4): p. 789-801.
51. Petrova, T.V., *Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor*. The EMBO Journal, 2002. **21**(17): p. 4593-4599.

52. Podgrabinska, S., et al., *Molecular characterization of lymphatic endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16069-74.
53. Baluk, P., et al., *Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels*. J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2349-62.
54. Johansson, R.S. and A.B. Vallbo, *Tactile sensibility in the human hand: relative and absolute densities of four types of mechanoreceptive units in glabrous skin*. The Journal of Physiology, 1979. **286**(1): p. 283-300.
55. Paus, R. and G. Cotsarelis, *The biology of hair follicles*. N Engl J Med, 1999. **341**(7): p. 491-7.
56. Blume-Peytavi, U., A. Tosti, and R.M. Trüeb, *Hair Growth and Disorders*. 2008.
57. Purba, T.S., et al., *A primer for studying cell cycle dynamics of the human hair follicle*. Exp Dermatol, 2016. **25**(9): p. 663-8.
58. Moran, M.M., et al., *Transient receptor potential channels as therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(8): p. 601-20.
59. Thody, A.J. and S. Shuster, *Control and function of sebaceous glands*. Physiol Rev, 1989. **69**(2): p. 383-416.
60. Cheng, J.B. and D.W. Russell, *Mammalian wax biosynthesis. II. Expression cloning of wax synthase cDNAs encoding a member of the acyltransferase enzyme family*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37798-807.
61. Randall, W.C., *Quantitation and Regional Distribution of Sweat Glands in Man*. J Clin Invest, 1946. **25**(5): p. 761-7.
62. Bologna, J., J.L. Jorizzo, and J.V. Schaffer, *Structure and Function of Eccrine, Apocrine, Apoeccrine and Sebaceous Glands*, in *Dermatology*. 2012, Elsevier Saunders: Philadelphia. p. 539–544.
63. Langbein, L. and J. Schweizer, *Keratins of the human hair follicle*. Int Rev Cytol, 2005. **243**: p. 1-78.
64. Plikus, M.V., et al., *Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration*. Nature, 2008. **451**(7176): p. 340-4.
65. Byrd, A.L., Y. Belkaid, and J.A. Segre, *The human skin microbiome*. Nat Rev Microbiol, 2018. **16**(3): p. 143-155.
66. Kong, H.H., *Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes*. Trends Mol Med, 2011. **17**(6): p. 320-8.
67. Grice, E.A., et al., *Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome*. Science, 2009. **324**(5931): p. 1190-2.
68. Scholz, C.F. and M. Kilian, *The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus Propionibacterium to the proposed novel genera Acidipropionibacterium gen. nov., Cutibacterium gen. nov. and Pseudopropionibacterium gen. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2016. **66**(11): p. 4422-4432.
69. Chen, Y.E., M.A. Fischbach, and Y. Belkaid, *Skin microbiota-host interactions*. Nature, 2018. **553**(7689): p. 427-436.
70. Naik, S., et al., *Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature*. Nature, 2015. **520**(7545): p. 104-8.
71. Ramsey, M.M., et al., *Staphylococcus aureus Shifts toward Commensalism in Response to Corynebacterium Species*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1230.
72. Ridaura, V.K., et al., *Contextual control of skin immunity and inflammation by Corynebacterium*. J Exp Med, 2018. **215**(3): p. 785-799.
73. Proksch, E., *pH in nature, humans and skin*. J Dermatol, 2018.
74. Schommer, N.N. and R.L. Gallo, *Structure and function of the human skin microbiome*. Trends Microbiol, 2013. **21**(12): p. 660-8.
75. Chen, Y.E. and H. Tsao, *The skin microbiome: current perspectives and future challenges*. J Am Acad Dermatol, 2013. **69**(1): p. 143-55.
76. Pascale, A., et al., *Microbiota and metabolic diseases*. Endocrine, 2018.
77. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's immunobiology*. 9th edition. ed. 2016, New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC. xx, 904 pages.

78. Riedel, S., *Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination*. Baylor University Medical Center Proceedings, 2017. **18**(1): p. 21-25.
79. Gordon, S., *Elie Metchnikoff: father of natural immunity*. Eur J Immunol, 2008. **38**(12): p. 3257-64.
80. Janeway, C.A., *Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1989. **54**(0): p. 1-13.
81. Beck, G. and G.S. Habicht, *Immunity and the Invertebrates*. Scientific American, 1996. **275**(5): p. 60-66.
82. Poltorak, M.P. and B.U. Schraml, *Fate mapping of dendritic cells*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 199.
83. Williams, M., et al., *Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species*. Immunity, 2016. **45**(3): p. 669-684.
84. Williams, M., et al., *Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(8): p. 571-8.
85. Hansson, G.K. and K. Edfeldt, *Toll to be paid at the gateway to the vessel wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1085-7.
86. Lemaître, B., et al., *The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle*/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-983.
87. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
88. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
89. Akashi-Takamura, S. and K. Miyake, *TLR accessory molecules*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(4): p. 420-5.
90. Guo, S., et al., *Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14*. Am J Pathol, 2013. **182**(2): p. 375-87.
91. Flacher, V., et al., *Mannoside Glycolipid Conjugates Display Anti-inflammatory Activity by Inhibition of Toll-like Receptor-4 Mediated Cell Activation*. ACS Chem Biol, 2015. **10**(12): p. 2697-705.
92. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol, 2011. **30**(1): p. 16-34.
93. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Toll-like receptors and innate immunity*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(4): p. 621-5.
94. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.
95. Varki, A., *Essentials of glycobiology*. Third edition. ed. 2017, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. xxix, 823 pages.
96. Mayer, S., M.K. Raulf, and B. Lepenies, *C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity*. Histochem Cell Biol, 2017. **147**(2): p. 223-237.
97. Zhou, T., et al., *DC-SIGN and immunoregulation*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(4): p. 279-83.
98. Lepenies, B., J. Lee, and S. Sonkaria, *Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(9): p. 1271-81.
99. Menon, S., et al., *Binding-site geometry and flexibility in DC-SIGN demonstrated with surface force measurements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11524-9.
100. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 33-43.
101. Iborra, S. and D. Sancho, *Signalling versatility following self and non-self sensing by myeloid C-type lectin receptors*. Immunobiology, 2015. **220**(2): p. 175-84.
102. East, L., *The mannose receptor family*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2002. **1572**(2-3): p. 364-386.
103. Taylor, P.R., S. Gordon, and L. Martinez-Pomares, *The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition*. Trends Immunol, 2005. **26**(2): p. 104-10.
104. Gazi, U. and L. Martinez-Pomares, *Influence of the mannose receptor in host immune responses*. Immunobiology, 2009. **214**(7): p. 554-61.

105. Lee, S.J., et al., *Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis*. *Science*, 2002. **295**(5561): p. 1898-901.
106. Valladeau, J., et al., *Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules*. *Immunity*, 2000. **12**(1): p. 71-81.
107. Valladeau, J., et al., *Identification of Mouse Langerin/CD207 in Langerhans Cells and Some Dendritic Cells of Lymphoid Tissues*. *The Journal of Immunology*, 2002. **168**(2): p. 782-792.
108. Mc Dermott, R., et al., *Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(1): p. 317-35.
109. Moore, K.L., *Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells*. *The Journal of Cell Biology*, 1992. **118**(2): p. 445-456.
110. Norgard-Sumnicht, K., N. Varki, and A. Varki, *Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells*. *Science*, 1993. **261**(5120): p. 480-483.
111. Bortoluci, K.R. and R. Medzhitov, *Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR*. *Cell Mol Life Sci*, 2010. **67**(10): p. 1643-51.
112. Oviedo-Boyso, J., A. Bravo-Patino, and V.M. Baizabal-Aguirre, *Collaborative action of Toll-like and NOD-like receptors as modulators of the inflammatory response to pathogenic bacteria*. *Mediators Inflamm*, 2014. **2014**: p. 432785.
113. Inohara, et al., *NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease*. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 355-83.
114. Carneiro, L.A., et al., *Nod-like proteins in inflammation and disease*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 136-48.
115. Kumar, S., et al., *Recognition of bacterial infection by innate immune sensors*. *Crit Rev Microbiol*, 2013. **39**(3): p. 229-46.
116. Schulze-Osthoff, K., et al., *Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades*. *Immunobiology*, 1997. **198**(1-3): p. 35-49.
117. Franchi, L., et al., *The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(3): p. 241-7.
118. Alnemri, E.S., *Sensing cytoplasmic danger signals by the inflammasome*. *J Clin Immunol*, 2010. **30**(4): p. 512-9.
119. Eisenbarth, S.C., et al., *Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants*. *Nature*, 2008. **453**(7198): p. 1122-6.
120. Williams, A., R.A. Flavell, and S.C. Eisenbarth, *The role of NOD-like Receptors in shaping adaptive immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(1): p. 34-40.
121. Kang, D.C., et al., *mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(2): p. 637-42.
122. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 730-7.
123. Fuller-Pace, F.V., *DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(15): p. 4206-15.
124. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. *Trends Immunol*, 2006. **27**(8): p. 352-7.
125. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. *Nature*, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
126. Rothenfusser, S., et al., *The RNA Helicase Lgp2 Inhibits TLR-Independent Sensing of Viral Replication by Retinoic Acid-Inducible Gene-1*. *The Journal of Immunology*, 2005. **175**(8): p. 5260-5268.
127. Pasparakis, M., I. Haase, and F.O. Nestle, *Mechanisms regulating skin immunity and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(5): p. 289-301.
128. Boehm, T. and J.B. Swann, *Origin and evolution of adaptive immunity*. *Annu Rev Anim Biosci*, 2014. **2**: p. 259-83.
129. Kotas, M.E. and R.M. Locksley, *Why Innate Lymphoid Cells?* *Immunity*, 2018. **48**(6): p. 1081-1090.

130. Bennett, J.E., R. Dolin, and M.J. Blaser, *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Eighth edition. ed. 2015, Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. 2 volumes.
131. Lazar, T., *Immunology of Infectious Diseases*. *Emerging Infectious Diseases*, 2002. **8**(11): p. 1362b-1363.
132. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's Immunobiology, 9th edition*. 2016: CRC Press.
133. Rankin, J.A., *Biological Mediators of Acute Inflammation*. AACN Clinical Issues: Advanced Practice in Acute and Critical Care, 2004. **15**(1): p. 3-17.
134. Chandrasoma, P. and C.R. Taylor, *Concise pathology*. 3rd ed. 1998, Stamford, Conn.: Appleton & Lange. xiv, 1,040 pages.
135. Janeway, C. and P. Travers, *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 3rd ed. 1997: Current Biology ;. 1 volume (various pagings).
136. Sahu, A. and J.D. Lambris, *Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity*. *Immunol Rev*, 2001. **180**: p. 35-48.
137. Janssen, B.J., et al., *Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity*. *Nature*, 2005. **437**(7058): p. 505-11.
138. Gros, P., F.J. Milder, and B.J. Janssen, *Complement driven by conformational changes*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(1): p. 48-58.
139. Janssen, B.J., et al., *Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity*. *Nature*, 2006. **444**(7116): p. 213-6.
140. Wallis, R., et al., *Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation*. *Immunobiology*, 2010. **215**(1): p. 1-11.
141. Degn, S.E., et al., *MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation*. *J Immunol*, 2009. **183**(11): p. 7371-8.
142. Gal, P., et al., *A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(39): p. 33435-44.
143. Coulthard, L.G. and T.M. Woodruff, *Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth*. *J Immunol*, 2015. **194**(8): p. 3542-8.
144. Ostrowski, P.P., S. Grinstein, and S.A. Freeman, *Diffusion Barriers, Mechanical Forces, and the Biophysics of Phagocytosis*. *Dev Cell*, 2016. **38**(2): p. 135-46.
145. Cebrian, I., et al., *Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells*. *Cell*, 2011. **147**(6): p. 1355-68.
146. Lukacs, G.L., O.D. Rotstein, and S. Grinstein, *Determinants of the phagosomal pH in macrophages. In situ assessment of vacuolar H(+)-ATPase activity, counterion conductance, and H+ "leak"*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(36): p. 24540-8.
147. Botelho, R.J. and S. Grinstein, *Phagocytosis*. *Curr Biol*, 2011. **21**(14): p. R533-8.
148. Fairn, G.D. and S. Grinstein, *How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(8): p. 397-405.
149. Richards, D.M. and R.G. Endres, *The mechanism of phagocytosis: two stages of engulfment*. *Biophys J*, 2014. **107**(7): p. 1542-53.
150. Andersen, H.H., J. Elberling, and L. Arendt-Nielsen, *Human surrogate models of histaminergic and non-histaminergic itch*. *Acta Derm Venereol*, 2015. **95**(7): p. 771-7.
151. Panula, P., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors*. *Pharmacol Rev*, 2015. **67**(3): p. 601-55.
152. Theoharides, T.C., et al., *Mast cells and inflammation*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(1): p. 21-33.
153. Stanfield, R.L. and I.A. Wilson, *Antibody Structure*. *Microbiol Spectr*, 2014. **2**(2).
154. Yang, G., et al., *Probing Antibody-Antigen Interactions*. *Microbiol Spectr*, 2014. **2**(1): p. AID-0010-2013.
155. Edwards, L.J. and B.D. Evavold, *T cell recognition of weak ligands: roles of signaling, receptor number, and affinity*. *Immunol Res*, 2011. **50**(1): p. 39-48.

156. Cole, D.K., et al., *Human TCR-Binding Affinity is Governed by MHC Class Restriction*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(9): p. 5727-5734.
157. Vyas, J.M., A.G. Van der Veen, and H.L. Ploegh, *The known unknowns of antigen processing and presentation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 607-18.
158. Heesters, B.A., et al., *Antigen Presentation to B Cells*. Trends Immunol, 2016. **37**(12): p. 844-854.
159. Vigneron, N., et al., *An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome*. Science, 2004. **304**(5670): p. 587-90.
160. Neerincx, A. and L.H. Boyle, *Properties of the tapasin homologue TAPBPR*. Curr Opin Immunol, 2017. **46**: p. 97-102.
161. Bailey, A., et al., *Selector function of MHC I molecules is determined by protein plasticity*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14928.
162. Leonhardt, R.M., et al., *Three tapasin docking sites in TAP cooperate to facilitate transporter stabilization and heterodimerization*. J Immunol, 2014. **192**(5): p. 2480-94.
163. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 823-36.
164. Alloatti, A., et al., *Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters!* Immunol Rev, 2016. **272**(1): p. 97-108.
165. Groothuis, T.A. and J. Neefjes, *The many roads to cross-presentation*. J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1313-8.
166. Kobayashi, K.S. and P.J. van den Elsen, *NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(12): p. 813-20.
167. Wieczorek, M., et al., *Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 292.
168. Vander Lugt, B., et al., *Transcriptional determinants of tolerogenic and immunogenic states during dendritic cell maturation*. J Cell Biol, 2017. **216**(3): p. 779-792.
169. Beier, K.C., T. Kallinich, and E. Hamelmann, *Master switches of T-cell activation and differentiation*. Eur Respir J, 2007. **29**(4): p. 804-12.
170. Ford, M.L., A.B. Adams, and T.C. Pearson, *Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(1): p. 14-24.
171. Morel, P.A., *Differential T-cell receptor signals for T helper cell programming*. Immunology, 2018.
172. Donermeyer, D.L., et al., *The Study of High-Affinity TCRs Reveals Duality in T Cell Recognition of Antigen: Specificity and Degeneracy*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(10): p. 6911-6919.
173. Granucci, F., M.B. Lutz, and I. Zanoni, *The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal 2*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 42.
174. Tai, X., et al., *CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 152-62.
175. Purvis, H.A., et al., *Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4829-37.
176. Croft, M., et al., *The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 173-91.
177. Bakdash, G., et al., *The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 53.
178. Hubo, M., et al., *Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 82.
179. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
180. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nat Immunol, 2015. **16**(4): p. 343-53.
181. Langerhans, P., *Ueber die Nerven der menschlichen Haut*. Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin, 1868. **44**(2-3): p. 325-337.

182. Stingl, G., et al., *Epidermal Langerhans cells bear Fc and C3 receptors*. Nature, 1977. **268**(5617): p. 245-246.
183. Tamaki, K., G. Stingl, and S.I. Katz, *The Origin of Langerhans Cells*. Journal of Investigative Dermatology, 1980. **74**(5): p. 309-311.
184. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
185. Haniffa, M., M. Gunawan, and L. Jardine, *Human skin dendritic cells in health and disease*. Journal of Dermatological Science, 2015. **77**(2): p. 85-92.
186. Malissen, B., S. Tamoutounour, and S. Henri, *The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 417-28.
187. Chorro, L., et al., *Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3089-100.
188. Romani, N., C.H. Tripp, and P. Stoitzner, *Langerhans cells come in waves*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 766-8.
189. Collin, M. and P. Milne, *Langerhans cell origin and regulation*. Curr Opin Hematol, 2016. **23**(1): p. 28-35.
190. Angel, C.E., et al., *CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts*. Int Immunol, 2007. **19**(11): p. 1271-9.
191. Nestle, F.O., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 679-91.
192. Haniffa, M., et al., *Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 371-85.
193. Kashem, S.W., M. Haniffa, and D.H. Kaplan, *Antigen-Presenting Cells in the Skin*. Annu Rev Immunol, 2017. **35**: p. 469-499.
194. Villani, A.C., et al., *Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors*. Science, 2017. **356**(6335).
195. Collin, M., et al., *Human dendritic cell deficiency: the missing ID?* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(9): p. 575-83.
196. Kumamoto, Y., et al., *CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity*. Immunity, 2013. **39**(4): p. 733-43.
197. Kashem, S.W., et al., *Nociceptive Sensory Fibers Drive Interleukin-23 Production from CD301b+ Dermal Dendritic Cells and Drive Protective Cutaneous Immunity*. Immunity, 2015. **43**(3): p. 515-26.
198. Igyarto, B.Z., et al., *Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 260-72.
199. Durai, V. and K.M. Murphy, *Functions of Murine Dendritic Cells*. Immunity, 2016. **45**(4): p. 719-736.
200. Stoitzner, P., et al., *Langerhans cells cross-present antigen derived from skin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7783-8.
201. Flacher, V., et al., *Murine Langerin+ dermal dendritic cells prime CD8+ T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(9): p. 1191-204.
202. Henri, S., et al., *CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells*. J Exp Med, 2010. **207**(1): p. 189-206.
203. Kanitakis, J., et al., *Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft*. Exp Dermatol, 2011. **20**(2): p. 145-6.
204. Ghigo, C., et al., *Multicolor fate mapping of Langerhans cell homeostasis*. J Exp Med, 2013. **210**(9): p. 1657-64.
205. Mizumoto, N. and A. Takashima, *CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers*. J Clin Invest, 2004. **113**(5): p. 658-60.
206. Hieronymus, T., et al., *The clash of Langerhans cell homeostasis in skin: Should I stay or should I go?* Semin Cell Dev Biol, 2014.
207. Clayton, K., et al., *Langerhans Cells-Programmed by the Epidermis*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1676.

208. Doebel, T., B. Voisin, and K. Nagao, *Langerhans Cells - The Macrophage in Dendritic Cell Clothing*. Trends Immunol, 2017. **38**(11): p. 817-828.
209. Romani, N., P.M. Brunner, and G. Stingl, *Changing views of the role of Langerhans cells*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 2): p. 872-81.
210. Matsui, K., S. Tamai, and R. Ikeda, *Effects of Macrolide Antibiotics on Th1 Cell and Th2 Cell Development Mediated by Langerhans Cells*. J Pharm Pharm Sci, 2016. **19**(3): p. 357-366.
211. Matsui, K., A. Mori, and R. Ikeda, *Langerhans cell-like dendritic cells stimulated with an adjuvant direct the development of Th1 and Th2 cells in vivo*. Clin Exp Immunol, 2015. **182**(1): p. 101-7.
212. Deckers, J., H. Hammad, and E. Hoste, *Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 93.
213. Sere, K., et al., *Two distinct types of Langerhans cells populate the skin during steady state and inflammation*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 905-16.
214. Dalmas, E., K. Clement, and M. Guerre-Millo, *Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue*. Trends Immunol, 2011. **32**(7): p. 307-14.
215. Singh, T.P., et al., *Monocyte-derived inflammatory Langerhans cells and dermal dendritic cells mediate psoriasis-like inflammation*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13581.
216. Zawada, A.M., et al., *SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset*. Blood, 2011. **118**(12): p. e50-61.
217. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.
218. Boltjes, A. and F. van Wijk, *Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 131.
219. Tamoutounour, S., et al., *Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 925-38.
220. Lehtonen, A., et al., *Differential Expression of IFN Regulatory Factor 4 Gene in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and Macrophages*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(10): p. 6570-6579.
221. Randolph, G.J., *Differentiation of Monocytes into Dendritic Cells in a Model of Transendothelial Trafficking*. Science, 1998. **282**(5388): p. 480-483.
222. Sallusto, F., *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. Journal of Experimental Medicine, 1994. **179**(4): p. 1109-1118.
223. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, *Monocyte-derived dendritic cells*. Semin Immunol, 2005. **17**(4): p. 313-8.
224. Leon, B. and C. Ardavin, *Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 320-4.
225. Wollenberg, A., et al., *Immunomorphological and Ultrastructural Characterization of Langerhans Cells and a Novel, Inflammatory Dendritic Epidermal Cell (IDEC) Population in Lesional Skin of Atopic Eczema*. Journal of Investigative Dermatology, 1996. **106**(3): p. 446-453.
226. Hansel, A., et al., *Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 787-94 e1-9.
227. Hatfield, G., *Perception: History of the Concept*. International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences, 2001: p. 11202–11205.
228. Spiro, S.D., R., *Sensory Mechanisms in Bacteria: Molecular Aspects of Signal Recognition*. 2010: Norfolk, UK : Caister Academic Press, c2010. 268.
229. Keim, C.N., et al., *Multicellular life cycle of magnetotactic prokaryotes*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **240**(2): p. 203-8.
230. Eder, S.H., et al., *Magnetic characterization of isolated candidate vertebrate magnetoreceptor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(30): p. 12022-7.
231. Golgi, C., *On the structure of the nerve cells of the spinal ganglia*. 1898. J Microsc, 1989. **155**(Pt 1): p. 9-14.

232. Finger, S., *Origins of neuroscience : a history of explorations into brain function*. 1994, New York: Oxford University Press. xviii, 462 p.
233. Ramon, Y.C.S., *Structure and connections of neurons*. Bull Los Angel Neuro Soc, 1952. **17**(1-2): p. 5-46.
234. Kandel, E.R., *Principles of neural science*. 5th ed. 2013, New York: McGraw-Hill Medical. I, 1709 p.
235. Peters, A., S.L. Palay, and H.d. Webster, *The fine structure of the nervous system : neurons and their supporting cells*. 3rd ed. 1991, New York: Oxford University Press. xviii, 494 p.
236. Green, S.A., M. Simoes-Costa, and M.E. Bronner, *Evolution of vertebrates as viewed from the crest*. Nature, 2015. **520**(7548): p. 474-482.
237. Gage, F.H., *Mammalian Neural Stem Cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-1438.
238. Ernst, A., et al., *Neurogenesis in the striatum of the adult human brain*. Cell, 2014. **156**(5): p. 1072-83.
239. Bergmann, O., K.L. Spalding, and J. Frisen, *Adult Neurogenesis in Humans*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(7): p. a018994.
240. Ernst, A. and J. Frisen, *Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals*. PLoS Biol, 2015. **13**(1): p. e1002045.
241. Herculano-Houzel, S., *The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain*. Front Hum Neurosci, 2009. **3**: p. 31.
242. Leterrier, C., P. Dubey, and S. Roy, *The nano-architecture of the axonal cytoskeleton*. Nat Rev Neurosci, 2017. **18**(12): p. 713-726.
243. Pilhofer, M., et al., *Microtubules in bacteria: Ancient tubulins build a five-protofilament homolog of the eukaryotic cytoskeleton*. PLoS Biol, 2011. **9**(12): p. e1001213.
244. Weisenberg, R.C., *Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations*. Science, 1972. **177**(4054): p. 1104-5.
245. Walker, R.A., *Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies*. The Journal of Cell Biology, 1988. **107**(4): p. 1437-1448.
246. Vale, R.D., *The molecular motor toolbox for intracellular transport*. Cell, 2003. **112**(4): p. 467-80.
247. Gunning, P.W., et al., *The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments*. J Cell Sci, 2015. **128**(11): p. 2009-19.
248. Yuan, A., et al., *Peripherin is a subunit of peripheral nerve neurofilaments: implications for differential vulnerability of CNS and peripheral nervous system axons*. J Neurosci, 2012. **32**(25): p. 8501-8.
249. Yuan, A., et al., *Neurofilaments at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 14): p. 3257-63.
250. Nixon, R.A. and T.B. Shea, *Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective*. Cell Motil Cytoskeleton, 1992. **22**(2): p. 81-91.
251. Lariviere, R.C. and J.P. Julien, *Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease*. J Neurobiol, 2004. **58**(1): p. 131-48.
252. Brown, A., L. Wang, and P. Jung, *Stochastic simulation of neurofilament transport in axons: the "stop-and-go" hypothesis*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 4243-55.
253. Brown, A., *Slow axonal transport: stop and go traffic in the axon*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(2): p. 153-6.
254. Hoffman, P.N., *The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons*. The Journal of Cell Biology, 1975. **66**(2): p. 351-366.
255. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre*. Nature, 1939. **144**(3651): p. 710-711.
256. Brogioli, D. and A. Vailati, *Diffusive mass transfer by nonequilibrium fluctuations: Fick's law revisited*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2001. **63**(1 Pt 1): p. 012105.
257. Tenny, K.M. and S.C. Dulebohn, *Ohm's Law*, in *StatPearls*. 2018: Treasure Island (FL).
258. Nernst, W., *Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper*. Zeitschrift für Physikalische Chemie, 1888. **2**(1).

259. Catterall, W.A., *Molecular properties of a superfamily of plasma-membrane cation channels*. Current Opinion in Cell Biology, 1994. **6**(4): p. 607-615.
260. Goldman, D.E., *Potential, Impedance, and Rectification in Membranes*. The Journal of General Physiology, 1943. **27**(1): p. 37-60.
261. Kuang, Q., P. Purhonen, and H. Hebert, *Structure of potassium channels*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(19): p. 3677-93.
262. MacKinnon, R., *Potassium channels*. FEBS Letters, 2003. **555**(1): p. 62-65.
263. Kubo, Y., et al., *International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 509-26.
264. Chen, R. and D.R. Swale, *Inwardly Rectifying Potassium (Kir) Channels Represent a Critical Ion Conductance Pathway in the Nervous Systems of Insects*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 1617.
265. Lopatin, A.N., *The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines*. The Journal of General Physiology, 1995. **106**(5): p. 923-955.
266. Miki, T., et al., *ATP-sensitive potassium channels participate in glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(6): p. E1178-84.
267. Hansen, S.B., X. Tao, and R. MacKinnon, *Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2*. Nature, 2011. **477**(7365): p. 495-8.
268. Cohen, A., Y. Ben-Abu, and N. Zilberberg, *Gating the pore of potassium leak channels*. Eur Biophys J, 2009. **39**(1): p. 61-73.
269. Goldstein, S.A., et al., *Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(3): p. 175-84.
270. Goldstein, S.A., et al., *International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 527-40.
271. Enyedi, P. and G. Czirjak, *Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels*. Physiol Rev, 2010. **90**(2): p. 559-605.
272. Lotshaw, D.P., *Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2007. **47**(2): p. 209-256.
273. Masetti, M., et al., *Multiscale Simulations of a Two-Pore Potassium Channel*. J Chem Theory Comput, 2016. **12**(12): p. 5681-5687.
274. Armstrong, C.M. and B. Hille, *Voltage-Gated Ion Channels and Electrical Excitability*. Neuron, 1998. **20**(3): p. 371-380.
275. Jensen, M.O., et al., *Mechanism of voltage gating in potassium channels*. Science, 2012. **336**(6078): p. 229-33.
276. Sigworth, F.J., *Voltage gating of ion channels*. Quarterly Reviews of Biophysics, 1994. **27**(01).
277. Bischoff, U., W. Vogel, and B.V. Safronov, *Na⁺-activated K⁺ channels in small dorsal root ganglion neurones of rat*. The Journal of Physiology, 1998. **510**(3): p. 743-754.
278. Pongs, O., et al., *Functional and Molecular Aspects of Voltage-Gated K⁺ Channel beta Subunits*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1999. **868**(1 MOLECULAR AND): p. 344-355.
279. Wei, A.D., et al., *International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 463-72.
280. Ge, L., et al., *Big Potassium (BK) ion channels in biology, disease and possible targets for cancer immunotherapy*. Int Immunopharmacol, 2014. **22**(2): p. 427-43.
281. Contet, C., et al., *BK Channels in the Central Nervous System*. Int Rev Neurobiol, 2016. **128**: p. 281-342.
282. Skibsbye, L., et al., *Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria*. Cardiovasc Res, 2014. **103**(1): p. 156-67.
283. Rohmann, K.N., et al., *Activation of BK and SK channels by efferent synapses on outer hair cells in high-frequency regions of the rodent cochlea*. J Neurosci, 2015. **35**(5): p. 1821-30.

284. Honrath, B., et al., *Small conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in the plasma membrane, mitochondria and the ER: Pharmacology and implications in neuronal diseases*. *Neurochem Int*, 2017. **109**: p. 13-23.
285. Krabbendam, I.E., et al., *Mitochondrial Ca(2+)-activated K(+) channels and their role in cell life and death pathways*. *Cell Calcium*, 2018. **69**: p. 101-111.
286. Littleton, J.T. and B. Ganetzky, *Ion Channels and Synaptic Organization*. *Neuron*, 2000. **26**(1): p. 35-43.
287. Howarth, C., P. Gleeson, and D. Attwell, *Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012. **32**(7): p. 1222-32.
288. Skou, J.C., *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1957. **23**: p. 394-401.
289. Geering, K., *Functional roles of Na,K-ATPase subunits*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008. **17**(5): p. 526-32.
290. Blanco, G., *Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation*. *Semin Nephrol*, 2005. **25**(5): p. 292-303.
291. Gloor, S., *The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase*. *The Journal of Cell Biology*, 1990. **110**(1): p. 165-174.
292. Geering, K., *The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases*. *J Bioenerg Biomembr*, 2001. **33**(5): p. 425-38.
293. Geering, K., *FXYP proteins: new regulators of Na-K-ATPase*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(2): p. F241-50.
294. Zylbertal, A., Y. Yarom, and S. Wagner, *The Slow Dynamics of Intracellular Sodium Concentration Increase the Time Window of Neuronal Integration: A Simulation Study*. *Front Comput Neurosci*, 2017. **11**: p. 85.
295. Usachev, Y.M., et al., *Activation of protein kinase C in sensory neurons accelerates Ca²⁺ uptake into the endoplasmic reticulum*. *J Neurosci*, 2006. **26**(1): p. 311-8.
296. Khariv, V. and S. Elkabes, *Contribution of Plasma Membrane Calcium ATPases to neuronal maladaptive responses: Focus on spinal nociceptive mechanisms and neurodegeneration*. *Neurosci Lett*, 2018. **663**: p. 60-65.
297. Jensen, T.P., L.E. Buckby, and R.M. Empson, *Expression of plasma membrane Ca²⁺ ATPase family members and associated synaptic proteins in acute and cultured organotypic hippocampal slices from rat*. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004. **152**(2): p. 129-36.
298. Yu, S.P. and D.W. Choi, *Na⁺-Ca²⁺ Exchange Currents in Cortical Neurons: Concomitant Forward and Reverse Operation and Effect of Glutamate*. *European Journal of Neuroscience*, 1997. **9**(6): p. 1273-1281.
299. Marambaud, P., U. Dreses-Werringloer, and V. Vingtdeux, *Calcium signaling in neurodegeneration*. *Mol Neurodegener*, 2009. **4**: p. 20.
300. Grienberger, C. and A. Konnerth, *Imaging calcium in neurons*. *Neuron*, 2012. **73**(5): p. 862-85.
301. DiPolo, R. and L. Beauge, *Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(1): p. 155-203.
302. Catterall, W.A., *Forty Years of Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Epilepsy*. *Neurochem Res*, 2017. **42**(9): p. 2495-2504.
303. Yu, F.H. and W.A. Catterall, *Overview of the voltage-gated sodium channel family*. *Genome Biol*, 2003. **4**(3): p. 207.
304. Katz, E., et al., *Role of sodium channel subtype in action potential generation by neocortical pyramidal neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(30): p. E7184-E7192.
305. Bean, B.P., *The action potential in mammalian central neurons*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(6): p. 451-65.
306. Brown, A.M., *Ion channels in action potential generation*. *Hosp Pract (Off Ed)*, 1992. **27**(10): p. 125-30, 132.

307. Kole, M.H., et al., *Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment*. Nat Neurosci, 2008. **11**(2): p. 178-86.
308. Deuis, J.R., et al., *The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators*. Neuropharmacology, 2017. **127**: p. 87-108.
309. Lodish, H.F., B. A., and Z. SL., *Neurotransmitters, Synapses, and Impulse Transmission*, in *Molecular cell biology*, W.H. Freeman, Editor. 2000, W.H. Freeman: New York. p. xxxvi, 1084, G-17, I-36 p.
310. Stevens, L.M. and S.C. Landis, *Developmental interactions between sweat glands and the sympathetic neurons which innervate them: effects of delayed innervation on neurotransmitter plasticity and gland maturation*. Dev Biol, 1988. **130**(2): p. 703-20.
311. Snyder, S.H. and R.B. Innis, *Peptide neurotransmitters*. Annu Rev Biochem, 1979. **48**: p. 755-82.
312. Assas, B.M., J.I. Pennock, and J.A. Miyan, *Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis*. Frontiers in Neuroscience, 2014. **8**.
313. Steinhoff, M.S., et al., *Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease*. Physiol Rev, 2014. **94**(1): p. 265-301.
314. Tiwari, P., et al., *Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2013. **3**(5): p. 413-420.
315. Morris, G., et al., *Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons*. Neuron, 2004. **43**(1): p. 133-43.
316. Kavalali, E.T., *The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release*. Nat Rev Neurosci, 2015. **16**(1): p. 5-16.
317. Jahn, R. and D. Fasshauer, *Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles*. Nature, 2012. **490**(7419): p. 201-7.
318. Acuna, C., et al., *Microsecond dissection of neurotransmitter release: SNARE-complex assembly dictates speed and Ca²⁺(+) sensitivity*. Neuron, 2014. **82**(5): p. 1088-100.
319. Georgiev, D.D. and J.F. Glazebrook, *The quantum physics of synaptic communication via the SNARE protein complex*. Prog Biophys Mol Biol, 2018. **135**: p. 16-29.
320. Xue, M., et al., *Binding of the complexin N terminus to the SNARE complex potentiates synaptic-vesicle fusogenicity*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(5): p. 568-75.
321. Chen, X., et al., *Three-Dimensional Structure of the Complexin/SNARE Complex*. Neuron, 2002. **33**(3): p. 397-409.
322. Sudhof, T.C., *A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1227-31.
323. Chang, L.F., et al., *Structural characterization of full-length NSF and 20S particles*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(3): p. 268-75.
324. Hussain, S. and S. Davanger, *The discovery of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex and the molecular regulation of synaptic vesicle transmitter release: the 2010 Kavli Prize in neuroscience*. Neuroscience, 2011. **190**: p. 12-20.
325. Takei, K. and V. Haucke, *Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger*. Trends in Cell Biology, 2001. **11**(9): p. 385-391.
326. Calakos, N., et al., *Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking*. Science, 1994. **263**(5150): p. 1146-1149.
327. Sundborger, A., et al., *An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 1): p. 133-43.
328. McMahon, H.T. and E. Boucrot, *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(8): p. 517-33.
329. Willis, W.D., Jr., *The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain*. Brain Res Rev, 2007. **55**(2): p. 297-313.
330. Julius, D. and A.I. Basbaum, *Molecular mechanisms of nociception*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 203-10.
331. Davidson, S. and G.J. Giesler, *The multiple pathways for itch and their interactions with pain*. Trends Neurosci, 2010. **33**(12): p. 550-8.

332. Burke, R.E., *Sir Charles Sherrington's the integrative action of the nervous system: a centenary appreciation*. Brain, 2007. **130**(Pt 4): p. 887-94.
333. Levine, D.N., *Sherrington's "The Integrative action of the nervous system": a centennial appraisal*. J Neurol Sci, 2007. **253**(1-2): p. 1-6.
334. Sherrington, C.S., *On the proprioceptive system, especially in its reflex aspect*. Brain, 1907. **29**(4): p. 467-82.
335. Proske, U. and S.C. Gandevia, *The proprioceptive senses: their roles in signaling body shape, body position and movement, and muscle force*. Physiol Rev, 2012. **92**(4): p. 1651-97.
336. Janig, W., *Neurobiology of visceral afferent neurons: neuroanatomy, functions, organ regulations and sensations*. Biol Psychol, 1996. **42**(1-2): p. 29-51.
337. Ceunen, E., J.W. Vlaeyen, and I. Van Diest, *On the Origin of Interoception*. Front Psychol, 2016. **7**: p. 743.
338. Robles-De-La-Torre, G. and V. Hayward, *Force can overcome object geometry in the perception of shape through active touch*. Nature, 2001. **412**(6845): p. 445-8.
339. Bowsher, D., *The anatomophysiological basis of somatosensory discrimination*. Int Rev Neurobiol, 1965. **8**: p. 35-75.
340. Ladak, A., R.S. Tubbs, and R.J. Spinner, *Mapping sensory nerve communications between peripheral nerve territories*. Clin Anat, 2014. **27**(5): p. 681-90.
341. Lallemand, F. and P. Ernfors, *Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons*. Trends Neurosci, 2012. **35**(6): p. 373-81.
342. Vallbo, A.B. and R.S. Johansson, *Properties of cutaneous mechanoreceptors in the human hand related to touch sensation*. Hum Neurobiol, 1984. **3**(1): p. 3-14.
343. Clarke, D.L., *Generalized Potential of Adult Neural Stem Cells*. Science, 2000. **288**(5471): p. 1660-1663.
344. Monk, K.R., M.L. Feltri, and C. Taveggia, *New insights on Schwann cell development*. Glia, 2015. **63**(8): p. 1376-93.
345. Inouye, H. and D.A. Kirschner, *Folding and function of the myelin proteins from primary sequence data*. J Neurosci Res, 1991. **28**(1): p. 1-17.
346. Wood, D.D. and M.A. Moscarello, *The isolation, characterization, and lipid-aggregating properties of a citrulline containing myelin basic protein*. J Biol Chem, 1989. **264**(9): p. 5121-7.
347. Salzer, J.L. and B. Zalc, *Myelination*. Curr Biol, 2016. **26**(20): p. R971-R975.
348. Hartline, D.K., *What is myelin?* Neuron Glia Biol, 2008. **4**(2): p. 153-63.
349. Min, Y., et al., *Interaction forces and adhesion of supported myelin lipid bilayers modulated by myelin basic protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3154-9.
350. Raphael, A.R. and W.S. Talbot, *New insights into signaling during myelination in zebrafish*. Curr Top Dev Biol, 2011. **97**: p. 1-19.
351. Samara, C., et al., *Neuronal activity in the hub of extrasynaptic Schwann cell-axon interactions*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 228.
352. Griffin, J.W. and W.J. Thompson, *Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells*. Glia, 2008. **56**(14): p. 1518-31.
353. C. Lehmann, H. and A. Hoke, *Schwann Cells as a Therapeutic Target for Peripheral Neuropathies*. CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 2010. **9**(6): p. 801-806.
354. Irnich, D., et al., *ATP affects both axons and Schwann cells of unmyelinated C fibres*. Pain, 2001. **92**(3): p. 343-350.
355. Faroni, A., et al., *Deletion of GABA-B receptor in Schwann cells regulates remak bundles and small nociceptive C-fibers*. Glia, 2014. **62**(4): p. 548-65.
356. Azimi, E., J. Xia, and E.A. Lerner, *Peripheral Mechanisms of Itch*. Curr Probl Dermatol, 2016. **50**: p. 18-23.
357. Delmas, P., J. Hao, and L. Rodat-Despoix, *Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(3): p. 139-53.
358. C., S., *The Integrative Action of the Nervous System*. Oxford ed. 1906: Oxford University Press.

359. Lumpkin, E.A. and M.J. Caterina, *Mechanisms of sensory transduction in the skin*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 858-65.
360. Nilius, B. and E. Honore, *Sensing pressure with ion channels*. Trends Neurosci, 2012. **35**(8): p. 477-86.
361. Bautista, D.M. and E.A. Lumpkin, *Perspectives on: information and coding in mammalian sensory physiology: probing mammalian touch transduction*. J Gen Physiol, 2011. **138**(3): p. 291-301.
362. Woo, S.H., et al., *Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception*. Nat Neurosci, 2015. **18**(12): p. 1756-62.
363. Lingueglia, E., et al., *A Modulatory Subunit of Acid Sensing Ion Channels in Brain and Dorsal Root Ganglion Cells*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(47): p. 29778-29783.
364. Hughes, P.A., et al., *Localization and comparative analysis of acid-sensing ion channel (ASIC1, 2, and 3) mRNA expression in mouse colonic sensory neurons within thoracolumbar dorsal root ganglia*. J Comp Neurol, 2007. **500**(5): p. 863-75.
365. LaMotte, R.H., X. Dong, and M. Ringkamp, *Sensory neurons and circuits mediating itch*. Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(1): p. 19-31.
366. Omerbasic, D., et al., *ASICs and mammalian mechanoreceptor function*. Neuropharmacology, 2015. **94**: p. 80-6.
367. Walker, R.G., A.T. Willingham, and C.S. Zuker, *A Drosophila mechanosensory transduction channel*. Science, 2000. **287**(5461): p. 2229-34.
368. Li, W., et al., *A C. elegans stretch receptor neuron revealed by a mechanosensitive TRP channel homologue*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 684-7.
369. Shin, J.B., et al., *Xenopus TRPN1 (NOMPC) localizes to microtubule-based cilia in epithelial cells, including inner-ear hair cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12572-7.
370. Sidi, S., R.W. Friedrich, and T. Nicolson, *NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction*. Science, 2003. **301**(5629): p. 96-9.
371. Inoue, R., Z. Jian, and Y. Kawarabayashi, *Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology*. Pharmacol Ther, 2009. **123**(3): p. 371-85.
372. Martinac, B., *Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 12): p. 2449-60.
373. Minke, B., *TRP channels and Ca²⁺ signaling*. Cell Calcium, 2006. **40**(3): p. 261-75.
374. Clapham, D.E., *TRP channels as cellular sensors*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 517-24.
375. Marwaha, L., et al., *TRP channels: potential drug target for neuropathic pain*. Inflammopharmacology, 2016. **24**(6): p. 305-317.
376. Kobayashi, K., et al., *Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors*. J Comp Neurol, 2005. **493**(4): p. 596-606.
377. Veldhuis, N.A., et al., *The G protein-coupled receptor-transient receptor potential channel axis: molecular insights for targeting disorders of sensation and inflammation*. Pharmacol Rev, 2015. **67**(1): p. 36-73.
378. Cohen, S.P. and J. Mao, *Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications*. BMJ, 2014. **348**: p. f7656.
379. Peralvarez-Marín, A., P. Donate-Macian, and R. Gaudet, *What do we know about the transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) ion channel?* FEBS J, 2013. **280**(21): p. 5471-87.
380. Shibasaki, K., *Physiological significance of TRPV2 as a mechanosensor, thermosensor and lipid sensor*. J Physiol Sci, 2016. **66**(5): p. 359-65.
381. Hui, K., B. Liu, and F. Qin, *Capsaicin Activation of the Pain Receptor, VR1: Multiple Open States from Both Partial and Full Binding*. Biophysical Journal, 2003. **84**(5): p. 2957-2968.
382. Szallasi, A. and P.M. Blumberg, *Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper*. Neuroscience, 1989. **30**(2): p. 515-520.
383. Yang, B.H., et al., *Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol*. J Dent Res, 2003. **82**(10): p. 781-5.

384. Simons, C.T., M.I. Carstens, and E. Carstens, *Oral irritation by mustard oil: self-desensitization and cross-desensitization with capsaicin*. *Chem Senses*, 2003. **28**(6): p. 459-65.
385. Bautista, D.M., et al., *Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(34): p. 12248-52.
386. Macpherson, L.J., et al., *The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin*. *Curr Biol*, 2005. **15**(10): p. 929-34.
387. Saarnilehto, M., et al., *Contact sensitizer 2,4-dinitrochlorobenzene is a highly potent human TRPA1 agonist*. *Allergy*, 2014. **69**(10): p. 1424-7.
388. Campero, M., et al., *Slowly conducting afferents activated by innocuous low temperature in human skin*. *The Journal of Physiology*, 2001. **535**(3): p. 855-865.
389. McKemy, D.D., W.M. Neuhauser, and D. Julius, *Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation*. *Nature*, 2002. **416**(6876): p. 52-8.
390. Yudin, Y. and T. Rohacs, *Regulation of TRPM8 channel activity*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **353**(1-2): p. 68-74.
391. Daniels, R.L., Y. Takashima, and D.D. McKemy, *Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(3): p. 1570-82.
392. Liu, B. and F. Qin, *Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. *J Neurosci*, 2005. **25**(7): p. 1674-81.
393. Mickle, A.D., A.J. Shepherd, and D.P. Mohapatra, *Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015. **131**: p. 73-118.
394. Hensel, H. and Y. Zotterman, *The effect of menthol on the thermoreceptors*. *Acta Physiol Scand*, 1951. **24**(1): p. 27-34.
395. Peier, A.M., et al., *A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol*. *Cell*, 2002. **108**(5): p. 705-715.
396. Macpherson, L.J., et al., *More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds*. *Mol Cell Neurosci*, 2006. **32**(4): p. 335-43.
397. Tansey, E.A. and C.D. Johnson, *Recent advances in thermoregulation*. *Adv Physiol Educ*, 2015. **39**(3): p. 139-48.
398. Shibasaki, K., et al., *Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4*. *J Neurosci*, 2007. **27**(7): p. 1566-75.
399. Sokabe, T., et al., *The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(24): p. 18749-58.
400. Kida, N., et al., *Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes*. *Pflugers Arch*, 2012. **463**(5): p. 715-25.
401. Lollignier, S., N. Eijkelkamp, and J.N. Wood, *Mechanical allodynia*. *Pflugers Arch*, 2015. **467**(1): p. 133-9.
402. Alessandri-Haber, N., et al., *TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator*. *Pain*, 2005. **118**(1-2): p. 70-9.
403. Alessandri-Haber, N., et al., *Hypotonicity Induces TRPV4-Mediated Nociception in Rat*. *Neuron*, 2003. **39**(3): p. 497-511.
404. Patapoutian, A., S. Tate, and C.J. Woolf, *Transient receptor potential channels: targeting pain at the source*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(1): p. 55-68.
405. Dascal, N., *Signalling Via the G Protein-Activated K+ Channels*. *Cellular Signalling*, 1997. **9**(8): p. 551-573.
406. Birnbaumer, L., *Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(4): p. 772-93.
407. Ellis, M.V., et al., *Catalytic Domain of Phosphoinositide-specific Phospholipase C (PLC)*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(19): p. 11650-11659.

408. Essen, L.O., et al., *Structural mapping of the catalytic mechanism for a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C*. *Biochemistry*, 1997. **36**(7): p. 1704-18.
409. Bhave, G., et al., *Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12480-5.
410. Numazaki, M., et al., *Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(16): p. 13375-8.
411. Minke, B. and B. Cook, *TRP channel proteins and signal transduction*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 429-72.
412. Mollanazar, N.K., P.K. Smith, and G. Yosipovitch, *Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out?* *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016. **51**(3): p. 263-292.
413. Geppetti, P., et al., *G Protein-Coupled Receptors: Dynamic Machines for Signaling Pain and Itch*. *Neuron*, 2015. **88**(4): p. 635-49.
414. Karpova, A., P.P. Sanna, and T. Behnisch, *Involvement of multiple phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways in the persistence of late-phase long term potentiation expression*. *Neuroscience*, 2006. **137**(3): p. 833-41.
415. Bader, M., et al., *MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs*. *Pharmacol Rev*, 2014. **66**(4): p. 1080-105.
416. Solinski, H.J., T. Gudermann, and A. Breit, *Pharmacology and signaling of MAS-related G protein-coupled receptors*. *Pharmacol Rev*, 2014. **66**(3): p. 570-97.
417. Tang, M., et al., *Voltage-gated potassium channels involved in regulation of physiological function in MrgprA3-specific itch neurons*. *Brain Res*, 2016. **1636**: p. 161-171.
418. Elmariah, S.B. and E.A. Lerner, *The missing link between itch and inflammation in atopic dermatitis*. *Cell*, 2013. **155**(2): p. 267-9.
419. Kittaka, H. and M. Tominaga, *The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin*. *Allergol Int*, 2017. **66**(1): p. 22-30.
420. Talbot, S., S.L. Foster, and C.J. Woolf, *Neuroimmunity: Physiology and Pathology*. *Annu Rev Immunol*, 2016. **34**: p. 421-47.
421. Almeida, T.A., et al., *Tachykinins and Tachykinin Receptors: Structure and Activity Relationships*. *Current Medicinal Chemistry*, 2004. **11**(15): p. 2045-2081.
422. Suvas, S., *Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis*. *J Immunol*, 2017. **199**(5): p. 1543-1552.
423. Garcia-Recio, S. and P. Gascon, *Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 495704.
424. Lai, J.P., et al., *Full-length and truncated neurokinin-1 receptor expression and function during monocyte/macrophage differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(20): p. 7771-6.
425. Roosterman, D., et al., *Endothelin-converting enzyme 1 degrades neuropeptides in endosomes to control receptor recycling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(28): p. 11838-43.
426. Jensen, D.D., et al., *Neurokinin 1 receptor signaling in endosomes mediates sustained nociception and is a viable therapeutic target for prolonged pain relief*. *Sci Transl Med*, 2017. **9**(392).
427. Kohout, T.A., *Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins During Receptor Desensitization*. *Molecular Pharmacology*, 2003. **63**(1): p. 9-18.
428. Janelsins, B.M., et al., *Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity*. *Blood*, 2009. **113**(13): p. 3017-26.
429. Russell, F.A., et al., *Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(4): p. 1099-142.
430. Benarroch, E.E., *CGRP: sensory neuropeptide with multiple neurologic implications*. *Neurology*, 2011. **77**(3): p. 281-7.
431. Karsan, N. and P.J. Goadsby, *CGRP mechanism antagonists and migraine management*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2015. **15**(5): p. 25.

432. Cottrell, G.S., et al., *Post-endocytic sorting of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 1*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 12260-71.
433. Roggenkamp, D., et al., *Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(6): p. 1620-8.
434. Cheret, J., et al., *Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process*. J Dermatol Sci, 2014. **74**(3): p. 193-203.
435. Henderson, J., et al., *The reinnervation pattern of wounds and scars may explain their sensory symptoms*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2006. **59**(9): p. 942-50.
436. Kokkoris, S., P. Andrews, and D.J. Webb, *Role of calcitonin gene-related peptide in cerebral vasospasm, and as a therapeutic approach to subarachnoid hemorrhage*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 135.
437. Scholzen, T., et al., *Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems*. Exp Dermatol, 1998. **7**(2-3): p. 81-96.
438. Blais, M., et al., *Sensory neurons accelerate skin reepithelialization via substance P in an innervated tissue-engineered wound healing model*. Tissue Eng Part A, 2014. **20**(15-16): p. 2180-8.
439. Gohin, S., et al., *Sensory nerves contribute to cutaneous vasodilator response to cathodal stimulation in healthy rats*. Microvasc Res, 2015. **101**: p. 103-10.
440. Sun, R.Q., et al., *Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization*. J Neurophysiol, 2004. **92**(5): p. 2859-66.
441. Sun, R.Q., et al., *Role of calcitonin gene-related peptide in the sensitization of dorsal horn neurons to mechanical stimulation after intradermal injection of capsaicin*. J Neurophysiol, 2004. **92**(1): p. 320-6.
442. Molloy, N.H., D.E. Read, and A.M. Gorman, *Nerve growth factor in cancer cell death and survival*. Cancers (Basel), 2011. **3**(1): p. 510-30.
443. Obata, K. and K. Noguchi, *BDNF in sensory neurons and chronic pain*. Neurosci Res, 2006. **55**(1): p. 1-10.
444. Sariola, H. and M. Saarma, *Novel functions and signalling pathways for GDNF*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 19): p. 3855-62.
445. Reichardt, L.F., *Neurotrophin-regulated signalling pathways*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1473): p. 1545-64.
446. Golden, J.P., et al., *RET signaling is required for survival and normal function of nonpeptidergic nociceptors*. J Neurosci, 2010. **30**(11): p. 3983-94.
447. Russell, W.M.S., et al., *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1992: Universities Federation for Animal Welfare.
448. Tannenbaum, J. and B.T. Bennett, *Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015. **54**(2): p. 120-32.
449. Banks, R.E., *The 4th R of research*. Contemp Top Lab Anim Sci, 1995. **34**(1): p. 50-1.
450. Hartung, T., *Look back in anger - what clinical studies tell us about preclinical work*. ALTEX, 2013. **30**(3): p. 275-91.
451. van der Worp, H.B., et al., *Can animal models of disease reliably inform human studies?* PLoS Med, 2010. **7**(3): p. e1000245.
452. Matthews, R.A., *Medical progress depends on animal models - doesn't it?* J R Soc Med, 2008. **101**(2): p. 95-8.
453. Marx, U., et al., *Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing*. ALTEX, 2016. **33**(3): p. 272-321.
454. Hartung, T., *3D - a new dimension of in vitro research*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **69-70**: p. vi.
455. Baker, M., *Reproducibility: Seek out stronger science*. Nature, 2016. **537**(7622): p. 703-704.
456. <http://alttox.org/mapp/table-of-validated-and-accepted-alternative-methods/>.
457. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788.

458. Natsch, A., et al., *Predicting skin sensitizer potency based on in vitro data from KeratinoSens and kinetic peptide binding: global versus domain-based assessment*. *Toxicol Sci*, 2015. **143**(2): p. 319-32.
459. Miyazawa, M., et al., *Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens*. *Toxicol In Vitro*, 2007. **21**(3): p. 428-37.
460. Reisinger, K., et al., *Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment*. *Toxicol In Vitro*, 2015. **29**(1): p. 259-70.
461. Hennen, J., et al., *Cross talk between keratinocytes and dendritic cells: impact on the prediction of sensitization*. *Toxicol Sci*, 2011. **123**(2): p. 501-10.
462. Hennen, J. and B. Blomeke, *Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells*. *ALTEX*, 2017. **34**(2): p. 279-288.
463. Cao, Y.P., et al., *Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals in THP-1/keratinocyte co-cultures*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012. **34**(2): p. 196-204.
464. Lorsch, J.R., F.S. Collins, and J. Lippincott-Schwartz, *Cell Biology. Fixing problems with cell lines*. *Science*, 2014. **346**(6216): p. 1452-3.
465. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup, A.S.N., *Cell line misidentification: the beginning of the end*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(6): p. 441-8.
466. Pan, C., et al., *Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions*. *Mol Cell Proteomics*, 2009. **8**(3): p. 443-50.
467. Wanner, R., et al., *Classification of sensitizing and irritative potential in a combined in-vitro assay*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. **245**(2): p. 211-8.
468. Sonnenburg, A., M. Schreiner, and R. Stahlmann, *Assessment of the sensitizing potency of preservatives with chance of skin contact by the loose-fit coculture-based sensitization assay (LCSA)*. *Arch Toxicol*, 2015. **89**(12): p. 2339-44.
469. Saito, K., et al., *Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis*. *Toxicol In Vitro*, 2013. **27**(8): p. 2213-24.
470. Cottrez, F., et al., *SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study*. *Toxicol In Vitro*, 2016. **32**: p. 248-60.
471. Russell, S.B., J.D. Russell, and K.M. Trupin, *Collagen synthesis in human fibroblasts: effects of ascorbic acid and regulation by hydrocortisone*. *J Cell Physiol*, 1981. **109**(1): p. 121-31.
472. Phillips, C.L., S.B. Combs, and S.R. Pinnell, *Effects of Ascorbic Acid on Proliferation and Collagen Synthesis in Relation to the Donor Age of Human Dermal Fibroblasts*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1994. **103**(2): p. 228-232.
473. Schmeichel, K.L. and M.J. Bissell, *Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 12): p. 2377-88.
474. Sriram, G., P.L. Bigliardi, and M. Bigliardi-Qi, *Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro*. *Eur J Cell Biol*, 2015. **94**(11): p. 483-512.
475. Oh, J.W., et al., *Organotypic skin culture*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(11): p. 1-4.
476. Akter, F., *What is Tissue Engineering?*, in *Tissue Engineering Made Easy*. 2016. p. 1-2.
477. Howard, D., et al., *Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds*. *J Anat*, 2008. **213**(1): p. 66-72.
478. Lehe, C., et al., *A Two-centre Evaluation of the Human Organotypic Skin Explant Culture Model for Screening Contact Allergens*. Vol. 31. 2004. 553-61.
479. Ahmed, S.S., et al., *An in vitro human skin test for assessing sensitization potential*. *J Appl Toxicol*, 2016. **36**(5): p. 669-84.
480. Frade, M.A., et al., *Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC)*. *An Bras Dermatol*, 2015. **90**(3): p. 347-50.
481. Asano, Y., et al., *Transplantation of three-dimensional artificial human vascular tissues fabricated using an extracellular matrix nanofilm-based cell-accumulation technique*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017. **11**(4): p. 1303-1307.

482. Rochon, M.-H., et al., *Simultaneous isolation of keratinocytes and fibroblasts from a human cutaneous biopsy for the production of autologous reconstructed skin*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2001. **79**(4): p. 663-667.
483. Hata, R. and H. Senoo, *L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts*. J Cell Physiol, 1989. **138**(1): p. 8-16.
484. Auger, F.A., et al., *A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2002(35): p. 73-88.
485. O'Brien, F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materials Today, 2011. **14**(3): p. 88-95.
486. Tsao, C.T., et al., *A simple material model to generate epidermal and dermal layers in vitro for skin regeneration*. J Mater Chem B, 2014. **2**(32): p. 5256-5264.
487. Kuo, S., et al., *Comparison of two decellularized dermal equivalents*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(4): p. 983-990.
488. Moore, M.A., et al., *Decellularization of human dermis using non-denaturing anionic detergent and endonuclease: a review*. Cell Tissue Bank, 2015. **16**(2): p. 249-59.
489. Rieder, E., A. Steinacher-Nigisch, and G. Weigel, *Human immune-cell response towards diverse xenogeneic and allogeneic decellularized biomaterials*. Int J Surg, 2016. **36**(Pt A): p. 347-351.
490. Chaudhari, A.A., et al., *Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(12).
491. Mieremet, A., et al., *Recapitulation of Native Dermal Tissue in a Full-Thickness Human Skin Model Using Human Collagens*. Tissue Eng Part A, 2018. **24**(11-12): p. 873-881.
492. Howling, G.I., et al., *The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro*. Biomaterials, 2001. **22**(22): p. 2959-2966.
493. Romanova, O.A., et al., *Chitosan as a Modifying Component of Artificial Scaffold for Human Skin Tissue Engineering*. Bull Exp Biol Med, 2015. **159**(4): p. 557-66.
494. Mieremet, A., et al., *Improved epidermal barrier formation in human skin models by chitosan modulated dermal matrices*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0174478.
495. Monsuur, H.N., et al., *Methods to study differences in cell mobility during skin wound healing in vitro*. J Biomech, 2016. **49**(8): p. 1381-1387.
496. Raja, et al., *Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 2849-68.
497. Boyce, S.T. and A.L. Lalley, *Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care*. Burns Trauma, 2018. **6**: p. 4.
498. Mathes, S.H., H. Ruffner, and U. Graf-Hausner, *The use of skin models in drug development*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2014. **69-70**(0): p. 81-102.
499. Lovett, M., et al., *Vascularization strategies for tissue engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2009. **15**(3): p. 353-70.
500. Bourget, J.M., et al., *Microstructured human fibroblast-derived extracellular matrix scaffold for vascular media fabrication*. J Tissue Eng Regen Med, 2017. **11**(9): p. 2479-2489.
501. Frueh, F.S., et al., *Current and emerging vascularization strategies in skin tissue engineering*. Crit Rev Biotechnol, 2017. **37**(5): p. 613-625.
502. Bergers, L.I., et al., *Immune-competent human skin disease models*. Drug Discov Today, 2016. **21**(9): p. 1479-88.
503. Chau, D.Y., et al., *The development of a 3D immunocompetent model of human skin*. Biofabrication, 2013. **5**(3): p. 035011.
504. Laubach, V., et al., *Integration of Langerhans-like cells into a human skin equivalent*. Arch Dermatol Res, 2011. **303**(2): p. 135-9.
505. Uchino, T., T. Takezawa, and Y. Ikarashi, *Reconstruction of three-dimensional human skin model composed of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane*. Toxicology in Vitro, 2009. **23**(2): p. 333-337.

506. Lorthois, I., et al., *Contribution of In Vivo and Organotypic 3D Models to Understanding the Role of Macrophages and Neutrophils in the Pathogenesis of Psoriasis*. *Mediators Inflamm*, 2017. **2017**: p. 7215072.
507. Duque-Fernandez, A., et al., *A 3D-psoriatic skin model for dermatological testing: The impact of culture conditions*. *Biochem Biophys Rep*, 2016. **8**: p. 268-276.
508. Sevrain, D., et al., *Two-photon microscopy of dermal innervation in a human re-innervated model of skin*. *Exp Dermatol*, 2013. **22**(4): p. 290-1.
509. Lebonvallet, N., et al., *Activation of primary sensory neurons by the topical application of capsaicin on the epidermis of a re-innervated organotypic human skin model*. *Exp Dermatol*, 2014. **23**(1): p. 73-5.
510. Coskun, A.F., U. Eser, and S. Islam, *Cellular identity at the single-cell level*. *Mol Biosyst*, 2016. **12**(10): p. 2965-79.
511. Waddington, C.H., *An introduction to modern genetics*, by C.H. Waddington. 1939.
512. Ruetz, T. and K. Kaji, *Routes to induced pluripotent stem cells*. *Curr Opin Genet Dev*, 2014. **28**: p. 38-42.
513. Francis, K.R. and L. Wei, *Human embryonic stem cell neural differentiation and enhanced cell survival promoted by hypoxic preconditioning*. *Cell Death Dis*, 2010. **1**: p. e22.
514. Baharvand, H., et al., *Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition*. *The International Journal of Developmental Biology*, 2007. **51**(5): p. 371-378.
515. Dhara, S.K. and S.L. Stice, *Neural differentiation of human embryonic stem cells*. *J Cell Biochem*, 2008. **105**(3): p. 633-40.
516. Fox, J.L., *Human iPSC and ESC translation potential debated*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(5): p. 375-6.
517. Davis, R.L., H. Weintraub, and A.B. Lassar, *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts*. *Cell*, 1987. **51**(6): p. 987-1000.
518. Petersen, G.F. and P.M. Strappe, *Generation of diverse neural cell types through direct conversion*. *World J Stem Cells*, 2016. **8**(2): p. 32-46.
519. Wainger, B.J., et al., *Modeling pain in vitro using nociceptor neurons reprogrammed from fibroblasts*. *Nat Neurosci*, 2015. **18**(1): p. 17-24.
520. Tsunemoto, R.K., et al., *Forward engineering neuronal diversity using direct reprogramming*. *EMBO J*, 2015. **34**(11): p. 1445-55.
521. Karagiannis, P. and S. Yamanaka, *The fate of cell reprogramming*. *Nat Methods*, 2014. **11**(10): p. 1006-8.
522. Graf, T., *Historical origins of transdifferentiation and reprogramming*. *Cell Stem Cell*, 2011. **9**(6): p. 504-16.
523. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(12): p. 3081-9.
524. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
525. Feng, B., et al., *Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor *Esrrb**. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(2): p. 197-203.
526. Yu, J., et al., *Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences*. *Science*, 2009. **324**(5928): p. 797-801.
527. Han, J., et al., *Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2010. **463**(7284): p. 1096-100.
528. Nethercott, H.E., D.J. Brick, and P.H. Schwartz, *Derivation of induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction*. *Methods Mol Biol*, 2011. **767**: p. 67-85.
529. Yamanaka, S., *Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation*. *Nature*, 2009. **460**(7251): p. 49-52.
530. Schlaeger, T.M., et al., *A comparison of non-integrating reprogramming methods*. *Nat Biotechnol*, 2015. **33**(1): p. 58-63.

531. Drozd, A.M., et al., *Generation of human iPSCs from cells of fibroblastic and epithelial origin by means of the oriP/EBNA-1 episomal reprogramming system*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 122.
532. Warren, L., et al., *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(5): p. 618-30.
533. Rohani, L., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells using non-synthetic mRNA*. Stem Cell Res, 2016. **16**(3): p. 662-72.
534. Beers, J., et al., *A cost-effective and efficient reprogramming platform for large-scale production of integration-free human induced pluripotent stem cells in chemically defined culture*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11319.
535. Chen, I.P., et al., *Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia*. Cell Reprogram, 2013. **15**(6): p. 503-13.
536. Nakanishi, M. and M. Otsu, *Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine*. Current Gene Therapy, 2012. **12**(5): p. 410-416.
537. Tancos, Z., et al., *Establishment of induced pluripotent stem cell (iPSC) line from an 84-year old patient with late onset Alzheimer's disease (LOAD)*. Stem Cell Res, 2016. **17**(1): p. 75-77.
538. Morodomi, Y., et al., *BioKnife, a uPA activity-dependent oncolytic Sendai virus, eliminates pleural spread of malignant mesothelioma via simultaneous stimulation of uPA expression*. Mol Ther, 2012. **20**(4): p. 769-77.
539. Fu, S., et al., *Generation of human-induced pluripotent stem cells from burn patient-derived skin fibroblasts using a non-integrative method*. Int J Mol Med, 2018. **41**(1): p. 87-94.
540. Khazaei, M., C.S. Ahuja, and M.G. Fehlings, *Induced Pluripotent Stem Cells for Traumatic Spinal Cord Injury*. Front Cell Dev Biol, 2016. **4**: p. 152.
541. Jungverdorben, J., A. Till, and O. Brustle, *Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy*. J Mol Med (Berl), 2017. **95**(7): p. 705-718.
542. Abdelalim, E.M., et al., *Pluripotent stem cells as a potential tool for disease modelling and cell therapy in diabetes*. Stem Cell Rev, 2014. **10**(3): p. 327-37.
543. Li, M. and J.C. Izpisua Belmonte, *Looking to the future following 10 years of induced pluripotent stem cell technologies*. Nat Protoc, 2016. **11**(9): p. 1579-85.
544. Masten, B.J., et al., *Characterization of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells in Human Lung*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(11): p. 7784-7793.
545. D'Aiuto, L., et al., *Large-scale generation of human iPSC-derived neural stem cells/early neural progenitor cells and their neuronal differentiation*. Organogenesis, 2014. **10**(4): p. 365-77.
546. Yamanaka, S., *Induced pluripotent stem cells: past, present, and future*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 678-84.
547. van Wilgenburg, B., et al., *Efficient, long term production of monocyte-derived macrophages from human pluripotent stem cells under partly-defined and fully-defined conditions*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71098.
548. van den Broek, L.J., et al., *Progress and Future Perspectives in Skin-on-Chip Development with Emphasis on the use of Different Cell Types and Technical Challenges*. Stem Cell Rev, 2017. **13**(3): p. 418-429.
549. Abaci, H.E., et al., *Next generation human skin constructs as advanced tools for drug development*. Exp Biol Med (Maywood), 2017. **242**(17): p. 1657-1668.
550. Hung, S.S.C., et al., *Drug discovery using induced pluripotent stem cell models of neurodegenerative and ocular diseases*. Pharmacol Ther, 2017. **177**: p. 32-43.
551. Qiang, L., R. Fujita, and A. Abeliovich, *Remodeling neurodegeneration: somatic cell reprogramming-based models of adult neurological disorders*. Neuron, 2013. **78**(6): p. 957-69.
552. Perrone, L., et al., *Functional interaction between p75NTR and TrkA: the endocytic trafficking of p75NTR is driven by TrkA and regulates TrkA-mediated signalling*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 1): p. 233-41.

553. Wehrman, T., et al., *Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors*. Neuron, 2007. **53**(1): p. 25-38.
554. Voisin, T., A. Bouvier, and I.M. Chiu, *Neuro-immune interactions in allergic diseases: novel targets for therapeutics*. Int Immunol, 2017. **29**(6): p. 247-261.
555. Janelsins, B.M., et al., *Neurokinin-1 receptor agonists bias therapeutic dendritic cells to induce type 1 immunity by licensing host dendritic cells to produce IL-12*. Blood, 2013. **121**(15): p. 2923-33.
556. Ding, W., et al., *Calcitonin gene-related peptide biases Langerhans cells toward Th2-type immunity*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6020-6.
557. Eberle, F.C., et al., *Recent advances in understanding psoriasis*. F1000Res, 2016. **5**.
558. Ordovas-Montanes, J., et al., *The Regulation of Immunological Processes by Peripheral Neurons in Homeostasis and Disease*. Trends Immunol, 2015. **36**(10): p. 578-604.
559. Chernova, I., et al., *Substance P (SP) enhances CCL5-induced chemotaxis and intracellular signaling in human monocytes, which express the truncated neurokinin-1 receptor (NK1R)*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(1): p. 154-64.
560. Carucci, J.A., et al., *Calcitonin Gene-Related Peptide Decreases Expression of HLA-DR and CD86 by Human Dendritic Cells and Dampens Dendritic Cell-Driven T Cell-Proliferative Responses Via the Type I Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(7): p. 3494-3499.
561. O'Connell, P.J., S.C. Pingle, and G.P. Ahern, *Dendritic cells do not transduce inflammatory stimuli via the capsaicin receptor TRPV1*. FEBS Lett, 2005. **579**(23): p. 5135-9.
562. Basu, S. and P. Srivastava, *Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5120-5.
563. Pletinckx, K., et al., *Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or Trypanosoma brucei antigens instruct default Th2-cell responses*. Eur J Immunol, 2011. **41**(12): p. 3479-94.
564. Silva-Vilches, C., et al., *Low doses of cholera toxin and its mediator cAMP induce CTLA-2 secretion by dendritic cells to enhance regulatory T cell conversion*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0178114.
565. Lutz, M.B., et al., *GM-CSF Monocyte-Derived Cells and Langerhans Cells As Part of the Dendritic Cell Family*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1388.
566. Briseno, C.G., et al., *Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells*. Cell Rep, 2016. **15**(11): p. 2462-74.
567. Dauer, M., et al., *Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(8): p. 4069-4076.
568. Schaeffer, E., et al., *Dermal CD14(+) Dendritic Cell and Macrophage Infection by Dengue Virus Is Stimulated by Interleukin-4*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(7): p. 1743-1751.
569. Park, I.H., et al., *Generation of human-induced pluripotent stem cells*. Nat Protoc, 2008. **3**(7): p. 1180-6.
570. Faroni, A., et al., *Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell phenotype induces expression of P2X receptors that control cell death*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e743.
571. Braz, J.M. and A.I. Basbaum, *Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli*. Pain, 2010. **150**(2): p. 290-301.
572. Piemonti, L., et al., *Glucocorticoids Affect Human Dendritic Cell Differentiation and Maturation*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(11): p. 6473-6481.
573. Coutinho, A.E. and K.E. Chapman, *The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **335**(1): p. 2-13.
574. Simard-Bisson, C., et al., *A Role for DLK in Microtubule Reorganization to the Cell Periphery and in the Maintenance of Desmosomal and Tight Junction Integrity*. J Invest Dermatol, 2017. **137**(1): p. 132-141.
575. Lavoie, A., et al., *Human epithelial stem cells persist within tissue-engineered skin produced by the self-assembly approach*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(7-8): p. 1023-38.

576. Agner, T., *Susceptibility of atopic dermatitis patients to irritant dermatitis caused by sodium lauryl sulphate*. Acta Derm Venereol, 1991. **71**(4): p. 296-300.
577. Marrakchi, S. and H.I. Maibach, *Sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human face: regional and age-related differences*. Skin Pharmacol Physiol, 2006. **19**(3): p. 177-80.
578. Kaja, S., et al., *Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes*. Curr Protoc Toxicol, 2017. **72**: p. 2 26 1-2 26 10.
579. Terhorst, D., et al., *Dynamics and Transcriptomics of Skin Dendritic Cells and Macrophages in an Imiquimod-Induced, Biphasic Mouse Model of Psoriasis*. J Immunol, 2015. **195**(10): p. 4953-61.
580. Geissmann, F., et al., *Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 961-6.
581. Yaraee, R., et al., *Neuropeptides (SP and CGRP) augment pro-inflammatory cytokine production in HSV-infected macrophages*. International Immunopharmacology, 2003. **3**(13-14): p. 1883-1887.
582. Baliu-Pique, M., G. Jusek, and B. Holzmann, *Neuroimmunological communication via CGRP promotes the development of a regulatory phenotype in TLR4-stimulated macrophages*. Eur J Immunol, 2014. **44**(12): p. 3708-16.
583. Lim, J.E., E. Chung, and Y. Son, *A neuropeptide, Substance-P, directly induces tissue-repairing M2 like macrophages by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway even in the presence of IFNgamma*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9417.
584. Lucey, D.R., et al., *Characterization of substance P binding to human monocytes/macrophages*. Clin Diagn Lab Immunol, 1994. **1**(3): p. 330-5.
585. Ho, W.Z., et al., *Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor*. J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5654-60.
586. Cunin, P., et al., *The tachykinins substance P and hemokinin-1 favor the generation of human memory Th17 cells by inducing IL-1beta, IL-23, and TNF-like 1A expression by monocytes*. J Immunol, 2011. **186**(7): p. 4175-82.
587. Bracci-Laudiero, L., et al., *Endogenous NGF regulates CGRP expression in human monocytes, and affects HLA-DR and CD86 expression and IL-10 production*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3507-14.
588. Frombach, J., et al., *A novel method to generate monocyte-derived dendritic cells during coculture with HaCaT facilitates detection of weak contact allergens in cosmetics*. Arch Toxicol, 2017. **91**(1): p. 339-350.
589. Bellanger, A.P., et al., *Human monocyte-derived dendritic cells exposed to microorganisms involved in hypersensitivity pneumonitis induce a Th1-polarized immune response*. Clin Vaccine Immunol, 2013. **20**(8): p. 1133-42.
590. Riddell, S.R. and P.D. Greenberg, *The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells*. Journal of Immunological Methods, 1990. **128**(2): p. 189-201.
591. Trickett, A. and Y.L. Kwan, *T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads*. Journal of Immunological Methods, 2003. **275**(1-2): p. 251-255.
592. van den Bogaard, E.H., et al., *Crosstalk between keratinocytes and T cells in a 3D microenvironment: a model to study inflammatory skin diseases*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(3): p. 719-727.
593. Lee, J., et al., *Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow*. J Exp Med, 2015. **212**(3): p. 385-99.
594. Hedl, M. and C. Abraham, *IRF5 risk polymorphisms contribute to interindividual variance in pattern recognition receptor-mediated cytokine secretion in human monocyte-derived cells*. J Immunol, 2012. **188**(11): p. 5348-56.
595. Santegoets, S.J., et al., *Human dendritic cell line models for DC differentiation and clinical DC vaccination studies*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(6): p. 1364-73.
596. Berges, C., et al., *A cell line model for the differentiation of human dendritic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(3): p. 896-907.

597. Li, Y., M. Liu, and S.T. Yang, *Dendritic cells derived from pluripotent stem cells: Potential of large scale production*. World J Stem Cells, 2014. **6**(1): p. 1-10.
598. Cai, S., et al., *iPSC-Derived Regulatory Dendritic Cells Inhibit Allograft Rejection by Generating Alloantigen-Specific Regulatory T Cells*. Stem Cell Reports, 2017. **8**(5): p. 1174-1189.
599. Sachamitr, P., et al., *Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Dendritic Cells Displaying Tolerogenic Properties and Resembling the CD141(+) Subset*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1935.
600. Vodyanik, M.A., et al., *Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential*. Blood, 2005. **105**(2): p. 617-26.
601. Kambal, A., et al., *Generation of HIV-1 resistant and functional macrophages from hematopoietic stem cell-derived induced pluripotent stem cells*. Mol Ther, 2011. **19**(3): p. 584-93.
602. Gonzalez-Rey, E., et al., *Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3632-8.
603. Delgado, M., et al., *VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 1122-30.
604. Anand, P., et al., *Neuropeptides in skin disease: increased VIP in eczema and psoriasis but not axillary hyperhidrosis*. British Journal of Dermatology, 1991. **124**(6): p. 547-549.
605. Lumpkin, E.A., K.L. Marshall, and A.M. Nelson, *The cell biology of touch*. J Cell Biol, 2010. **191**(2): p. 237-48.
606. Tsantoulas, C. and S.B. McMahon, *Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain*. Trends Neurosci, 2014. **37**(3): p. 146-58.
607. Laedermann, C.J., H. Abriel, and I. Decosterd, *Post-translational modifications of voltage-gated sodium channels in chronic pain syndromes*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 263.
608. Dryer, S.E., et al., *Expression of K(Ca) channels in identified populations of developing vertebrate neurons: role of neurotrophic factors and activity*. J Physiol Paris, 2003. **97**(1): p. 49-58.
609. Sano, Y., et al., *A novel two-pore domain K+ channel, TRESK, is localized in the spinal cord*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27406-12.
610. Wu, X.F., et al., *Reopening of ATP-sensitive potassium channels reduces neuropathic pain and regulates astroglial gap junctions in the rat spinal cord*. Pain, 2011. **152**(11): p. 2605-15.
611. Young, G.T., et al., *Characterizing human stem cell-derived sensory neurons at the single-cell level reveals their ion channel expression and utility in pain research*. Mol Ther, 2014. **22**(8): p. 1530-1543.
612. Handel, A.E., et al., *Assessing similarity to primary tissue and cortical layer identity in induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons through single-cell transcriptomics*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(5): p. 989-1000.
613. ECVAM. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/>. Available from: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/file-kerati/Attachments%20merged.pdf>.
614. International, H.S. http://www.hsi.org/issues/chemical_product_testing/facts/time_and_cost.html.
615. Torricelli, P., et al., *Protective effects of Polypodium leucotomos extract against UVB-induced damage in a model of reconstructed human epidermis*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2017. **33**(3): p. 156-163.
616. Vinardell, M.P., et al., *In Vitro Comparative Skin Irritation Induced by Nano and Non-Nano Zinc Oxide*. Nanomaterials (Basel), 2017. **7**(3).
617. Kelm, J.M., et al., *Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types*. Biotechnol Bioeng, 2003. **83**(2): p. 173-80.
618. M., K. and K. J. *In vitro 3D Spheroids and Microtissues: ATP-based Cell Viability and Toxicity Assays*. Assay Guidance Manual 2016; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343426/>.
619. Marx, V., *A better brew*. Nature, 2013. **496**: p. 253.
620. Kodzius, R., et al., *Organ-on-Chip Technology: Current State and Future Developments*. Genes (Basel), 2017. **8**(10).

621. Wufuer, M., et al., *Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 37471.
622. Mori, N., Y. Morimoto, and S. Takeuchi, *Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip*. Biomaterials, 2017. **116**: p. 48-56.
623. Wagner, I., et al., *Skin and hair-on-a-chip: Hair and skin assembly versus native skin maintenance in a chip-based perfusion system*. BMC Proceedings, 2013. **7**(Suppl 6).
624. Wilson, R., et al., *Human peptidergic nociceptive sensory neurons generated from human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC)*. PLoS One, 2018. **13**(6): p. e0199996.
625. Ogura, T., et al., *Three-dimensional induction of dorsal, intermediate and ventral spinal cord tissues from human pluripotent stem cells*. Development, 2018. **145**(16).
626. Lim, W.F., et al., *Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(3): p. 71.

Remerciements particuliers

Cette thèse a pu se concrétiser grâce au soutien financier de diverses organismes.

Merci à la Région Alsace (dossier D1402817), la Fondation Centre International pour la Recherche aux Frontières de la Chimie (CIRFC), le LabEx Medalis et le Consortium Québécois sur la découverte du médicament (CQDM) d'avoir permis le financement des 3 premières années de cette thèse et de ce projet de recherche.



La cotutelle a nécessité de répartir le doctorat en temps de travail dans au sein de l'UPR-3572 à Strasbourg et au sein du LOEX à Québec.

Merci à la Fondation René-Touraine d'avoir financé le premier séjour au LOEX, de Novembre 2015 à Mai 2016.



Merci à Mitacs Globalink et Campus France d'avoir financé le second séjour au LOEX, de Janvier 2017 à Octobre 2017.

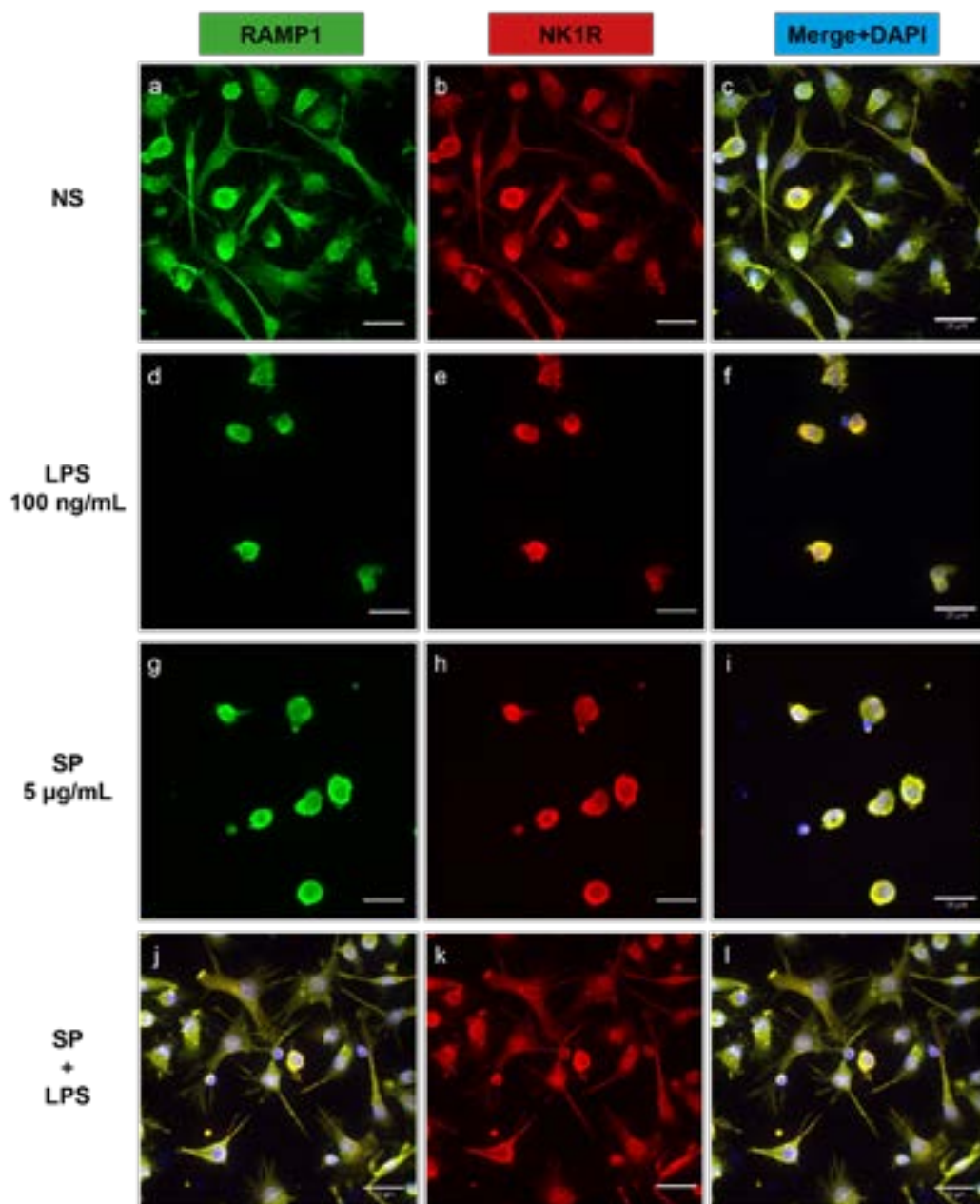


Cette thèse nécessite la prolongation d'une 4^e année, pour permettre la rédaction et la soumission chez *Acta Biomaterialia* de l'article *Muller Q. et al.* et pour permettre de finaliser les obligations de la cotutelle.

Merci à la Fondation pour la recherche médicale (FRM, dossier FDT20170437259) pour avoir permis cette prolongation.

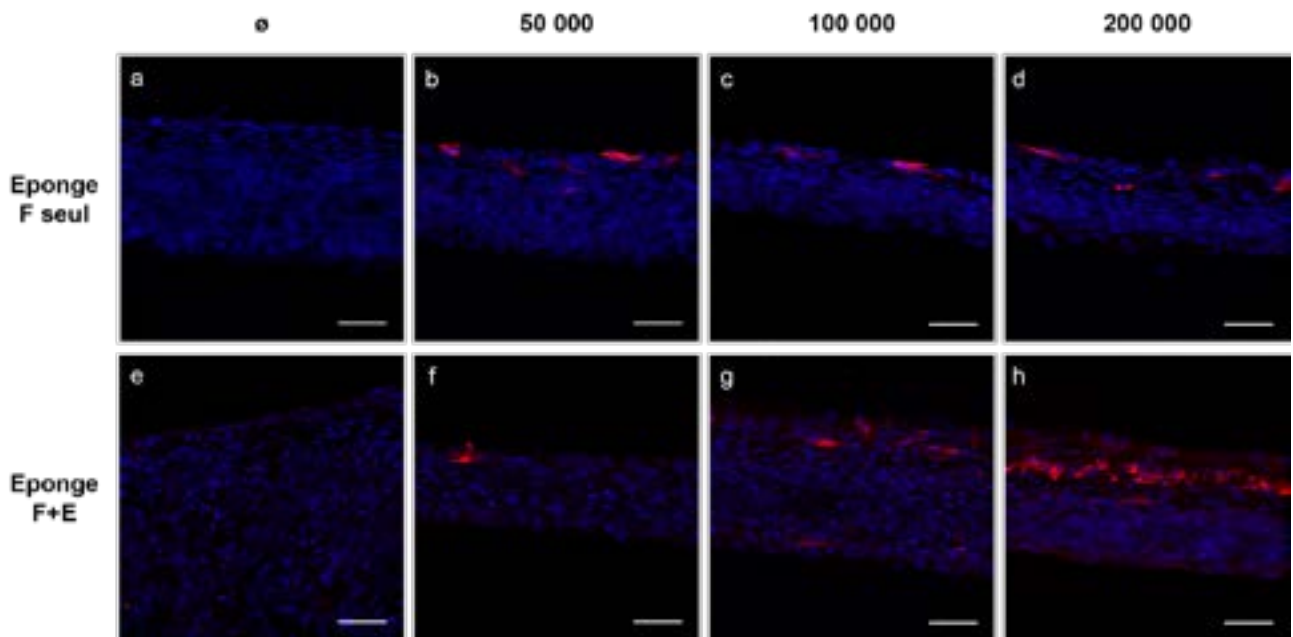


Annexes



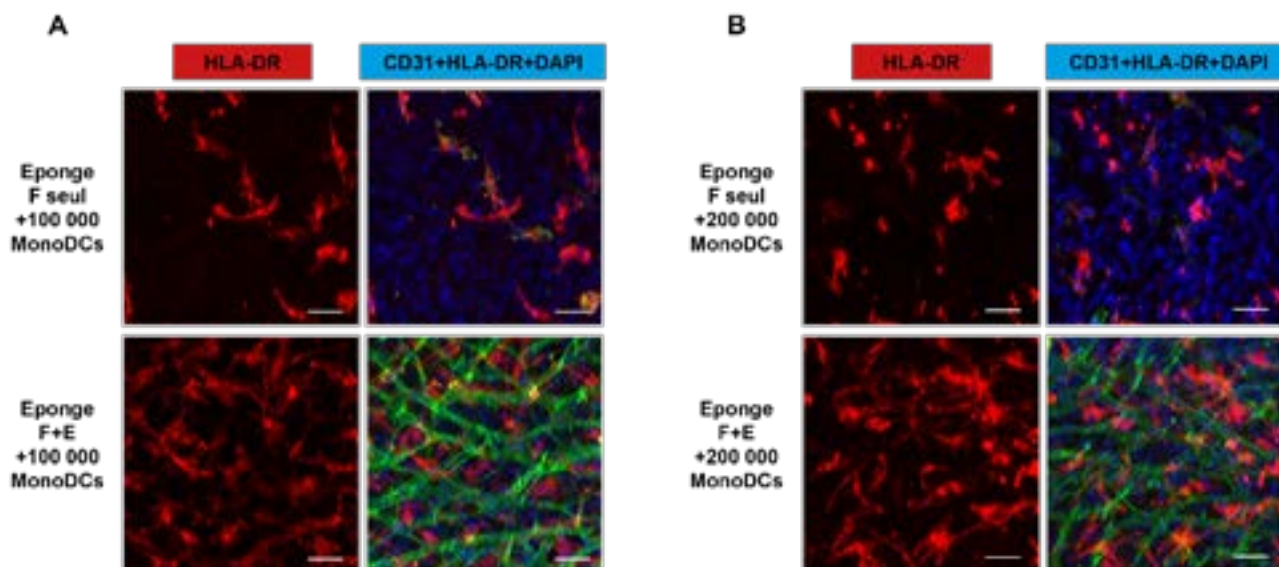
Annexe 1

Observation au microscope confocale d'immunofluorescence de MonoDCs, après 5 jours de différenciation à partir de monocyte et 24h de culture après caractérisation en cytométrie en flux. Les MonoDCs ont été placées dans les conditions non-stimulées (NS, a,b,c), stimulé avec 100ng/mL de lipopolysaccharides (LPS, d,e,f), stimulé avec 5µg/mL de Substance P (SP, g, h, i) ou stimulé avec le LPS et la SP (j, k, l), pendant 24h de culture après différenciation. Quelque-soit leur stade de stimulation, les MonoDCs coexpriment NK1R et RAMP1. Barre d'échelle : 25µm



Annexe 2

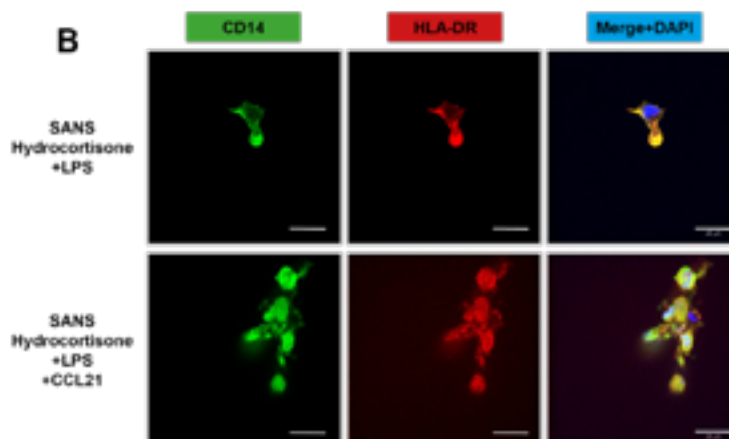
Immunofluorescence de coupes transversales de modèles de dermes, contenant seulement des fibroblastes (F seul, a,b,c,d), comparés au derme contenant des fibroblastes et des cellules endothéliales (F+E, e, f, g, h), en fonction du nombre de MonoDCs (HLA-DR⁺, en rouge) ensemencées. Barre d'échelle = 50 μ m



Annexe 3

Observation en microscopie confocale de surface de modèles de dermes, contenant seulement des fibroblastes (F seul), comparée au derme contenant des fibroblastes et des cellules endothéliales (F+E), pour 100 000 (A) ou 200 000 (B) MonoDCs (HLA-DR⁺) ensemencées. Les cellules endothéliales sont visibles par l'expression du CD31 (en vert). Barre d'échelle = 50µm.

A	Avec Hydrocortisone	SANS Hydrocortisone
NS	?	Culot cellulaire
LPS 1µg/mL	?	Culot cellulaire
CCL21 250ng/mL	∅	Culot cellulaire
LPS +CCL21	∅	Culot cellulaire



Annexe 4 : Migration des MonoDCs hors du modèle de peau

Migration des MonoDCs hors du modèle de peau (vascularisé avec un épiderme stratifié), stimulé pendant 72h par 1µg/mL de LPS et/ou 250 ng/mL de CCL21, dans un milieu de culture avec ou sans hydrocortisone. (A) Tableau récapitulatif de la présence ou de l'absence de cellules dans le surnageant de culture à la suite de la stimulation. Seules les conditions de stimulation dans un milieu de culture sans hydrocortisone permettent d'obtenir un culot cellulaire après centrifugation des surnageants de culture. (B) Immunofluorescence des cellules présentes dans les surnageant de culture après stimulation. Les culots récoltés ont été placés sur lamelles recouvertes de poly-Lysines pour la réalisation du marquage. Les deux conditions présentées sont les seules qui contenaient encore des cellules observables en microscopie.

Annexe 5 : Protocole de différenciation d'iPSCs humain en DCs**iPS-derived-Dendritic Cells Protocol****Protocole de base : Wai Feng Lim and al. 2011, GeneTherapy [626]**

STEP1 : Différenciation des iPS en lignée hématopoïétique

- Co culture avec des cellules OP9 (stroma murin cell line) à confluence, ajouter les iPS dans du α -MEM +20%SVF, entretient pendant 14-18 jours

DECOLLEMENT : PBS + 0,25% Trypsine + 0,1% collagénase type IV + 0,1% DNase Type I

STEP2 : Différenciation de la lignée hématopoïétique en Monocytes

- Sélection des cellules différenciées hématopoïétiques : Une fois les cellules décollées, les réensemencées ON à 37°C et récupérer les cellules flottantes et faiblement adhérentes. Filtré à 100 μ m et réensemencer
- Différenciation en milieu de culture contenant GM-CSF (100ng/mL) + M-CSF (50ng/mL) pendant 10-14 jours

STEP3 : Différenciation Monocytes en Dendritic Cells

- RPMI 1640 complet + GM-CSF (100ng/mL) + IL-4 (10ng/mL) pendant 3-7 jours

Protocole modifié et adapté grâce à :

- **Vodyanik, M.A. and al. 2005, Blood [600]**
- **Kambal, A. and al. 2011, Molecular Therapy [601]**

STEP1 : Différenciation des iPS en lignée hématopoïétique

- Co culture avec des cellules OP9 (stroma murin cell line) à confluence, ajouter les iPS (1,5.10⁶ dans 20mL ou 0,3.10⁶ cellules dans 4mL pour un puit de plaque 6 puits) dans du α -MEM +20%SVF, entretient pensant 14 jours avec changement de la moitié du milieu tous les 3 jours.
- Vodyanik, M.A. and al. 2005, Blood : Milieu α -MEM + 10%SVF + 100 μ M monothioglycerol (MTG; Sigma, St Louis, MO)
- Kambal, A. and al. 2011, Molecular Therapy : Milieu α -MEM + 10%SVF + 50 ng/ml bone morphogenetic protein-4

DECOLLEMENT : Collagénase IV à 1 mg/mL dans α -MEM pendant 20 minutes 37°C suivit d'un traitement 0.05% trypsin-0.5mMEDTA 15 minutes 37°C

STEP2 : Différenciation de la lignée hématopoïétique en Monocytes

- Vodyanik, M.A. and al. 2005, Blood : **Positive selection of CD34⁺ cells by magnetic sorting**

A single-cell suspension from days 8 and 9 of hES cell/OP9 cocultures was labeled with CD34 paramagnetic monoclonal antibodies (mAbs) using Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) as recommended by the manufacturer and processed through an LS⁺ separation column attached to a Midi-MACS separation unit (Miltenyi Biotech) to obtain the magnet-retained fraction of purified CD34⁺ cells. Purity of isolated CD34⁺ cells, as determined by flow cytometry, was generally more than 95% at a single column run, and cell viability, as evaluated by trypan blue exclusion, was always higher than 95%.

- Kambal, A. and al. 2011, Molecular Therapy :

Single-cell suspensions from the hESC and iPSC OP9 cocultures were labeled with CD133 magnetic antibodies using a Direct CD133 microbead isolation kit (Miltenyi Biotech) and processed through two LS separation column. CD133⁺ cells (2×10^5 – 3×10^5 cells/well) and CB CD34⁺ cells were cultured, separately, in 35 mm dishes with semisolid Methocult media containing a cocktail of cytokines specific for myeloid differentiation (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada).

- Méthode gardée (pour les premiers tests) :

Sélection des cellules différenciées hématopoïétiques : Une fois les cellules décollées, les réensemencées toute la nuit à 37°C et récupérer les cellules flottantes et faiblement adhérentes. Filtré à 100µm et réensemencer.

- o **3 millions dans 6w dans RPMI 1640** (comme PBMC)

Différenciation en milieu de culture contenant GM-CSF (100ng/mL) + M-CSF (50ng/mL) pendant 10-14 jours

Protocol alternatif : Yanagimachi, M.D. and al. 2013, PlosOne [547]

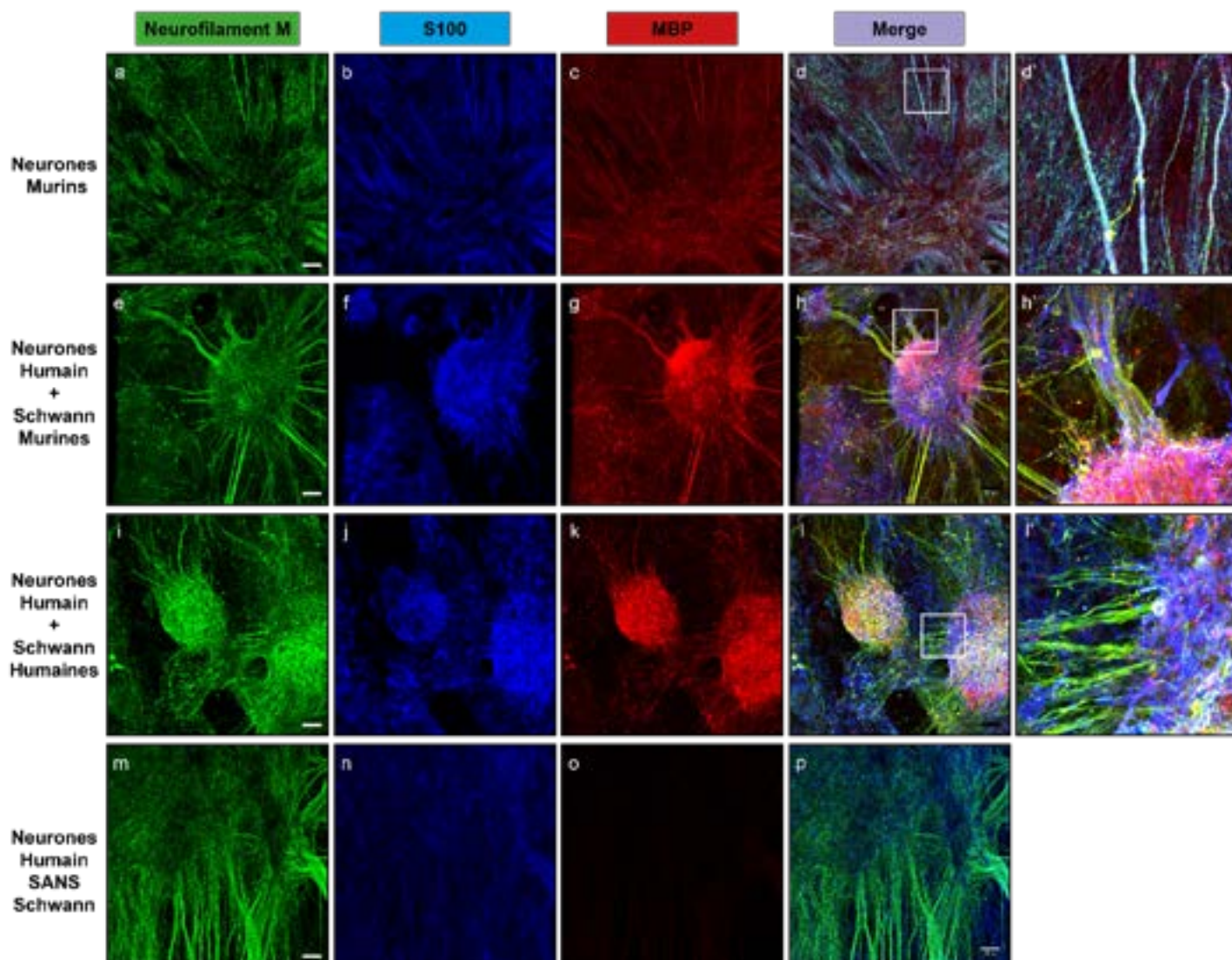
STEP3 : Différenciation Monocytes en Dendritic Cells

- 3.10^6 iPS-derived-Monocytes dans 4mL de RPMI 1640 complet + GM-CSF (100ng/mL) + IL-4 (10ng/mL) par puits de plaque 6puits pendant 5 jours avec ajout de 1mL de milieu à j3

Milieu de culture :

<https://www.stemcell.com/products/alpha-mem-without-nucleosides.html>

Alpha MEM without Nucleosides, StemCells Technologies, Cat : 36453



Annexe 6 : Les cellules de Schwann produisent la protéine de base de la myéline et interagissent avec les neurones sensoriels humains dérivés des iPSC.

Pour se rapprocher de notre contrôle, les neurones sensoriels murins (DRG) qui ont déjà des cellules de Schwann fonctionnelles (b,c,d) capables de produire la protéine de base de la myéline (*Myeline Basic Protein*, MBP), des cellules de Schwann murines ont d'abord été ajoutées aux neurones humains dérivés d'iPSCs, puis des cellules de Schwann différenciées des mêmes iPSCs ont été ajoutées aux neurones humains. La coloration par immunofluorescence sur un modèle de peau innervée montre l'interaction entre les cellules de Schwann murines (S100), qui expriment la MBP (f,g,h), et les neurones sensoriels humains (e,h). Cependant, même les cellules de Schwann humaines restent proches des neurones (l,j,i), elles produisent peu de MBP au niveau des axones (k, i). La MBP n'est pas observée lorsque les neurones dérivés d'iPSCs sont ensemencés seuls sans cellules de Schwann (m,n,n,o,p). Barre d'échelle : 100µm

Nom	Nom commercial	Fournisseur	Référence	Quantité	Prix (€)	Prix du produit	Pour 800 000 neurones (1 éponge)			
Consommables pour la différenciation en neurones						Par mL	Par µg	mL utilisés	µg utilisés	Prix (€)
neurobasal	Neurobasal Medium (1X) (-) L-Glutamine (-) Phenol Red	thermofisher	12348-017	500 mL	62,75	0,1255		33		4,1415
N2	N2-supplement (100X)	thermofisher	17502-048	5 mL	66,50	13,3		0,66		8,778
B27	B27-supplement (50X)	thermofisher	12587-010	10 mL	115,00	11,5		1,32		15,18
Bet-Mercapto	2-Mercaptoethanol 1000X	thermofisher	21985-023	50 mL	6,01	0,1202		0,00605		0,00072721
Rock-inhibitor	Y-27632 dihydrochloride	abcam	ab120129	10 mg	279,00		0,0279		0,0528	0,00147312
alanyl-glutamine	200 mM L-alanyl-L-glutamine	corning	25-015-CI	100 mL	37,45	0,3754		0,33		0,123882
MEM non essential amino-acid	MEM NEAA (100X)	thermofisher	11140-050	100 mL	18,38	0,1838		0,33		0,060654
trace element A	Trace Element A 1000X	corning	25-021-CI	100 mL	47,55	0,4755		0,033		0,0156915
trace element B	Trace Element B 1000X	corning	25-022-CI	100 mL	47,55	0,4755		0,033		0,0156915
trace element C	Trace Element C 1000X	corning	25-023-CI	100 mL	50,95	0,5095		0,033		0,0168135
SB431542	SB431542	sigma	S4317-5mg	5 mg	165,50		0,0331		0,3536	0,01170416
LDN	LDN193189	sigma	SML0559-5mg	5 mg	84,70		0,01694		0,0012	0,00020328
CHIR	CHIR99021	sigma	SML1046-5mg	5 mg	84,50		0,01694		0,0205	0,00034727
DAPT	DAPT (GSI-IX)	Selleckchem	S2215	10 mg	117,00		0,0117		0,3244	0,00379548
BDNF	Recombinant Human BDNF	peprotech	450-02	100 µg	820,00		8,2		0,0384	0,31488
GDNF	Recombinant Human GDNF	peprotech	450-10	100 µg	820,00		8,2		0,096	0,7872
NGF	r. Hum. b-NGF mous	thermofisher	11050HNA C250	250 µg	490,00		1,96		0,09	0,1764
Consommables pour la différenciation en cellules de Schwann							Prix TOTAL Consommables Pour 800 000 neurones (1 éponge)		30	
mTeSR medium	mTeSR™1	STEMCELL Technologies	85850	500 mL	299,00					
minimum essential medium	MEM α, nucleosides	thermofisher	12571063	500 mL	99,00					
STEMdiff Apel medium	STEMdiff™ APEL™2 Medium	STEMCELL Technologies	5270	100 mL	139,00					
PDGF-bb	PDGF-BB Recombinant Human Protein	thermofisher	PHG0041	100 µg	754,00					
βFGF	Recombinant Murine FGF-basic from Coleus forskohlii, ≥98% (HPLC), powder	peprotech	450-33	1 mg	1 100,00					
Forskolin	Recombinant Human NRG1-beta 1/HRG1-beta 1 EGF Domain Protein	Sigma	F6886-25MG	25 mg	491,50					
NRG1		R&D System	396-HB-050	50 µg	351,00					
Consommable pour la culture										
Geltrex	Geltrex	thermofisher	A1413302	5 mL	183,00					
accutase	Stempro accutase	thermofisher	A11105-01	100 mL	46,01					
					TOTAL	6 775,35				

Annexe 7 : Devis

Devis récapitulatif à l'achat des consommables nécessaire à la différenciation des iPSCs en neurones et cellules de Schwann. Un devis approximatif à l'obtention de 800 000 neurones dérivés d'iPSCs a été établi en fonction de la consommation des milieux de cultures et additifs. Le nombre 800 000 neurones correspond à la quantité de neurones nécessaires pour ensemercer une éponge.

Annexe 8 : Publication scientifique Muller, Q. ; Beaudet, MJ. et al. (2018) *Acta Biomaterialia*

Development of an innervated tissue-engineered skin with human sensory neurons and Schwann cells differentiated from iPS cells

Quentin Muller ^{a, b, 1}, Marie-Josée Beaudet ^{a, 1}, Thiéry De Serres-Bérard ^a, Sabrina Bellenfant ^a, Vincent Flacher ^b, François Berthod ^{a, *}

^a Centre LOEX de l'Université Laval, Centre de recherche du CHU de Québec-UL, and Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec (Québec), Canada

^b Laboratory CNRS UPR3572 Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry (I2CT), Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France



Full length article

Development of an innervated tissue-engineered skin with human sensory neurons and Schwann cells differentiated from iPSC cells

Quentin Muller^{a, b, 1}, Marie-Josée Beaudet^{a, 1}, Thiéry De Serres-Bérard^a, Sabrina Bellenfant^a, Vincent Flacher^b, François Berthod^{a, *}

^a Centre LOEX de l'Université Laval, Centre de recherche du CHU de Québec-UL, and Département de Chirurgie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec (Québec), Canada

^b Laboratory CNRS UPR3572 Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry (I²CT), Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2018

Received in revised form 25 September 2018

Accepted 9 October 2018

Available online xxx

Keywords:

Skin

Axonal migration

Substance P

CGRP

Induced pluripotent stem cells

TRPV1

ABSTRACT

Cutaneous innervation is increasingly recognized as a major element of skin physiopathology through the neurogenic inflammation driven by neuropeptides that are sensed by endothelial cells and the immune system. To investigate this process in vitro, models of innervated tissue-engineered skin (TES) were developed, yet exclusively with murine sensory neurons extracted from dorsal root ganglions. In order to build a fully human model of innervated TES, we used induced pluripotent stem cells (iPSC) generated from human skin fibroblasts. Nearly 100% of the iPSC differentiated into sensory neurons were shown to express the neuronal markers BRN3A and β 3-tubulin after 19 days of maturation. In addition, these cells were also positive to TRPV1 and neurofilament M, and some of them expressed Substance P, TrkA and TRPA1. When stimulated with molecules inducing neuropeptide release, iPSC-derived neurons released Substance P and CGRP, both in conventional monolayer culture and after seeding in a 3D fibroblast-populated collagen sponge model. Schwann cells, the essential partners of neurons for function and axonal migration, were also successfully differentiated from human iPSC as shown by their expression of the markers S100, GFAP, p75 and SOX10. When cultured for one additional month in the TES model, iPSC-derived neurons seeded at the bottom of the sponge formed a network of neurites spanning the whole TES up to the epidermis, but only when combined with mouse or iPSC-derived Schwann cells. This unique model of human innervated TES should be highly useful for the study of cutaneous neuroinflammation.

Statement of Significance

The purpose of this work was to develop in vitro an innovative fully human tissue-engineered skin enabling the investigation of the influence of cutaneous innervation on skin pathophysiology. To reach that aim, neurons were differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) generated from normal human skin fibroblasts. This innervated tissue-engineered skin model will be the first one to show iPSC-derived neurons can be successfully used to build a 3D nerve network in vitro. Since innervation has been recently recognized to play a central role in many human skin diseases, such as psoriasis and atopic dermatitis, this construct promises to be at the forefront to model these diseases while using patient-derived cells.

© 2018.

1. Introduction

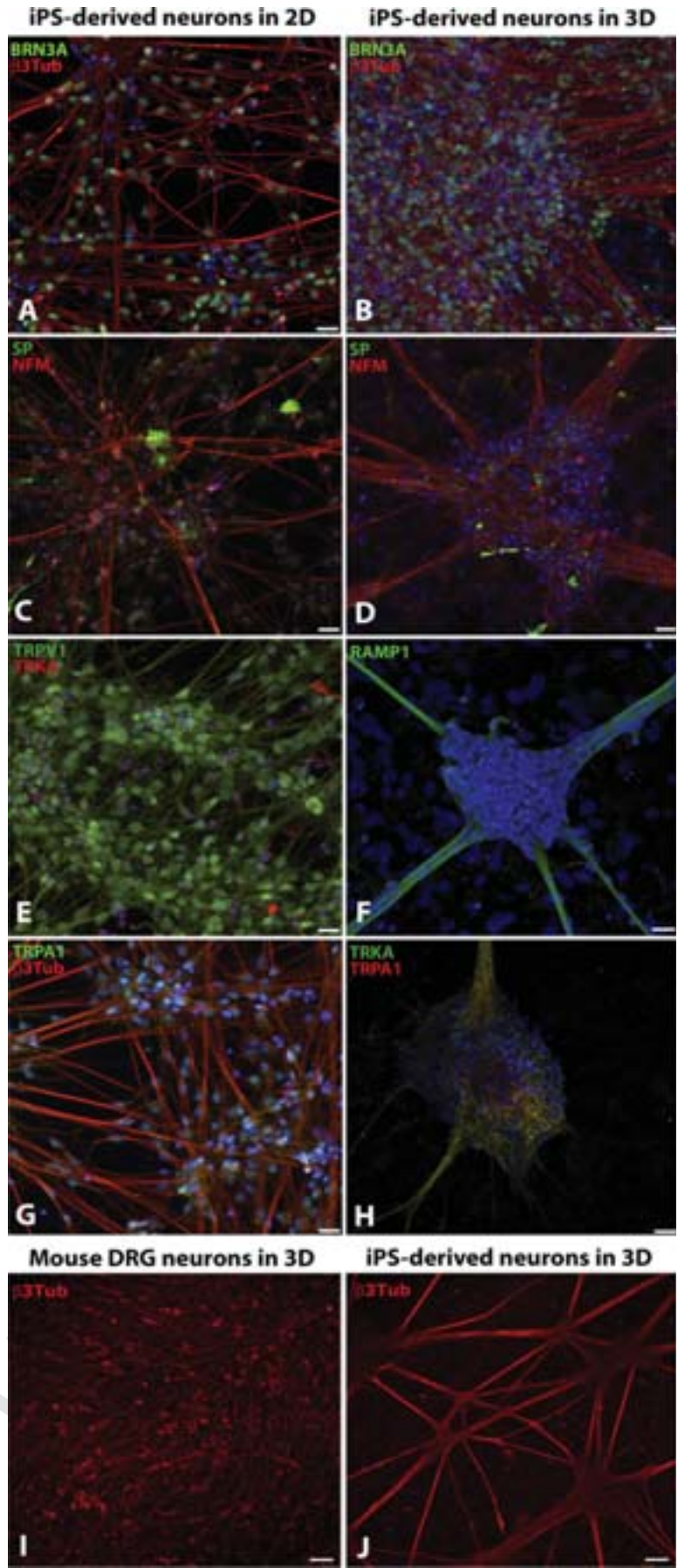
Although the primary purpose of cutaneous sensory innervation is the perception of sense of touch, pain and temperature, it also plays a major role in skin physiology and pathology. Indeed, sensory neurons are able to trigger a neurogenic inflammation upon stimulation

through the release of neuropeptides. This process induces microvascular vasodilation and an increase in vascular permeability, along with immune cells chemotaxis and activation [1]. Consequently, neuronal triggering is intimately combined with the local innate immune response early after an injury to promote tissue inflammation. Moreover, it has more recently been shown that sensory neurons are also involved in the direct recognition of pathogens through the same molecular pathways as immune cells, such as Toll Like Receptors (TLRs) [2]. The density of cutaneous innervation as well as the high speed of neural action potentials constitute major advantages for the detection of danger signals. Thus, the in vitro development of a human skin integrating a nerve network represents an essential first step towards

* Corresponding author at: Centre LOEX de l'Université Laval, Centre de recherche du CHU de Québec-UL, Hôpital de l'Enfant-Jésus, Aile R, 1401, 18e rue, Québec (QC) G1J 1Z4, Canada.

Email address: francois.berthod@fmed.ulaval.ca (F. Berthod)

¹ Both authors contributed equally to the work.



detailed studies on the interaction of nociceptor neurons with endothelial and immune cells and the regulation of neurogenic inflammation. We previously created an innervated TES including sensory neurons obtained from mouse embryos. These neurons were cultured underneath the tissue and were shown to build a dense nerve network that reached the epidermis through the whole thickness of the dermal compartment [3,4]. Neurons released neuropeptides such as SP that was shown to enhance reepithelialization in an in vitro model of wound healing [5]. Whereas murine neuropeptides successfully activated human cells, their animal origin in a human tissue-engineered skin model could be a limitation for further studies, all the more that dorsal root ganglion neurons are extracted at an early embryonic developmental stage (E12 to E14). To develop a more reliable innervated skin model, the use of human sensory neurons is highly desirable, especially for cosmetic research and development in Europe where the use of animal cells is banned.

Fortunately, the technology allowing the differentiation of neuronal cells from human skin fibroblasts induced to become pluripotent stem cells (iPSC) is now widely available [6].

Some research groups succeeded in differentiating iPSC into sensory neurons, albeit with low degrees of purity and cell yields, and these studies did not attempt to create tridimensional networks [7–14]. To study neurogenic inflammation, it is crucial that the sensory neurons differentiated from human iPSC cells express the transient receptor potential cation channel subfamily (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPA1) that regulate neuropeptides release [15]. Indeed, a challenge with hot temperature or irritant compounds like capsaicin or eugenol should drive activation of TRPVs and subsequent release of neuropeptides, mainly Substance P (SP) and Calcitonin gene-related peptide (CGRP), from peptidergic sensory neurons. Moreover, sensory neurons should express the tropomyosin receptor kinase A (TRKA) responsible for the binding to nerve growth factor (NGF), necessary for their survival [12].

Here, we propose a complete method to differentiate pure, functional sensory neurons and Schwann cells from human iPSCs and their combination in a 3D culture system to generate a fully human tissue-engineered skin model. It will be a highly valuable tool to study in vitro the relationship between human sensory nerves and skin pathophysiology.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

All human cells used in this work were obtained with informed consent from the donors; The study was approved by the CHU de Quebec-Université Laval research ethics review board.

Fibroblasts and keratinocytes were isolated from human skin biopsies after breast reductive surgeries as previously described [16].

Human keratinocytes were cultured in flasks on a feeder layer of irradiated 3T3 mouse fibroblasts in DHC medium consisting of a 3:1 ratio of DMEM/Ham's F12 (Gibco, Gaithersburg, MD) with 36.54 mM NaHCO₃ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ), 0.18 mM L-adenine (Millipore Sigma, Oakville, Canada), 312.5 µl/l 2N HCL (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) and supplemented with 5% HyClone Fe-

talClone II (Hyclone, Logan, UT), 2.5 µg/mL insulin (Millipore Sigma), 0.2 µg/mL hydrocortisone (Millipore Sigma), 10⁻¹⁰ M cholera toxin (ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA), 10 ng/mL human epidermal growth factor (Austral Biologicals, San Ramon, CA), and antibiotics.

Human microvascular endothelial cells were extracted from foreskin as previously described [17] and grown in endothelial growth medium EBM-2 (Lonza, Mississauga, Canada).

Mouse DRG were extracted from E12.5 mice as previously described [3] and cultured in DME medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent, St-Bruno, Canada) and with 10 ng/mL NGF (Sino Biological, Atlanta, GA), and were cultured in same conditions as iPSC-derived neurons to serve as controls. All animal experiments were approved by the CHU de Quebec-Université Laval animal care committee following the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

2.2. Differentiation of iPSC cells into sensory neurons:

The iPSC cells were obtained from the iPSC-Quebec platform of the CHU de Québec-Université Laval research center. They were derived from 2 different human skin fibroblast cell lines and from one human peripheral blood mononuclear cell line. The iPSC cells were reprogrammed with the CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen, Carlsbad, California).

Differentiation into sensory neurons was performed following a protocol modified from reference [14]: iPSC cells were passaged with Stempro accutase (Gibco) added with 5 µM Y-27632 (Abcam, Toronto, Canada), diluted in DMEM-F12 medium containing 25 µg/ml of penicillin-gentamycin (Sigma Chemicals) without serum. Cells were plated on Geltrex (Gibco) coating (1:200 dilution) in a 6 wells plate at a density of 90,000 cells/cm² and passaged at confluency with Stempro accutase and 5 µM Y-27632. From day 0 to day 11 of differentiation, cells were cultured in a DMEM F12 : neurobasal A medium (Gibco) (vol:vol) supplemented with 2% B-27 (Gibco), 1% N2 supplement (Gibco), 0.01 mM β-mercaptoethanol (Gibco), 50 µg/mL ascorbic acid (Sigma Millipore), 5 µM Y-27632, 1% L-alanyl-L-glutamine (Corning, New-York, NY), 1% MEM non-essential amino acids (Gibco), 0.1% trace elements A, 0.1% trace elements B, 0.1% trace elements C (Corning). From day 0 to day 5 of differentiation, medium was supplemented with 40 µM SB431542, 0.2 µM LDN193189 and 3 µM CHIR99021 (Sigma Millipore). From day 5 to day 7 of differentiation, medium was supplemented with 3 µM CHIR99021. From day 9 to day 11 of differentiation, medium was supplemented with 10 µM DAPT (Selleck Chemicals LLC, Houston, TX). At day 11, cells were passaged with Stempro accutase and 5 µM Y-27632 and plated on 1 µg/ml Poly-D-lysine (Sigma Millipore) coated wells for 2D tests. Cells were seeded at 300,000 cells/cm² for purity tests, at 600,000 cells/cm² per well for ELISA tests and at 10⁶ cells/3.6 cm² when seeded over the 3D sponge model. For the quantification of the sensory neuron purity, cells were seeded on poly-D-lysine surface in a 24-wells plate and the ratio of β3Tub/BRN3A positive cells versus the number of unstained but Dapi-positive cells at day 18 was quantified using an axio imager M2 micro-

Fig. 1. Characterization by immunofluorescence of iPSC-derived neurons cultured in 2D and in 3D. Cells were stained by immunofluorescence for POU class 4 homeobox 1 (BRN3A), Neuronal Class III β-Tubulin (β3Tub), substance P (SP), tropomyosin receptor kinase A (TRKA), transient receptor potential cation channel member A1 (TRPA1), neurofilament medium (NFM), transient receptor potential cation channel subfamily V1 (TRPV1) and receptor activity modifying protein 1 (RAMP1). For 2D staining (A,C,E,G), cells were seeded at a density of 300,000 cells/cm² on poly-D-lysine coated wells and matured until day 18. For 3D staining (B,D,F,H-J), neurons were cultured in the fibroblast-populated sponge for 19 days and pictures were taken from an above view of the sponge. Scale bar A-H=20 µm, I-J=100 µm.

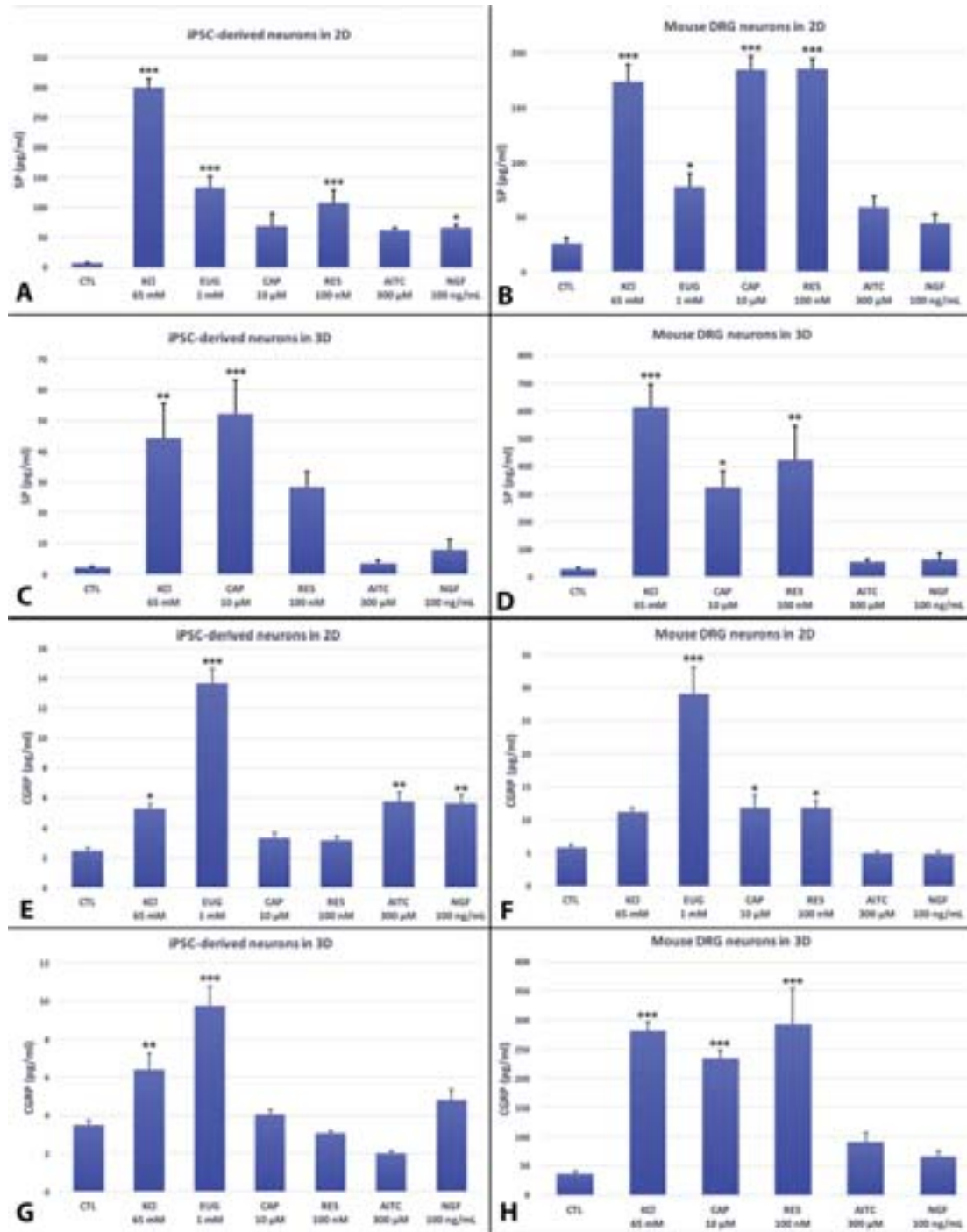


Fig. 2. Quantification of SP and CGRP release from iPSC-derived and mouse DRG neurons upon TRP stimulation. Substance P (SP; A-D) and calcitonin gene-related peptide (CGRP; E-H) released from iPSC-derived neurons (used after 19 days of maturation) (A,C,E,G) or mouse DRG neurons (B,D,F,H) were quantified by ELISA after stimulation with 65 nM potassium chloride (KCl, induces neuronal depolarization), 10 μM capsaicin (CAP, ligand for TRPV1), 100 nM resiniferatoxin (RES, ligand for TRPV1), 1 mM eugenol (EUG, ligand for TRPV1,2,3) (except in D,H), 100 μM allyl isothiocyanate (AITC, ligand for TRPA1), 100 ng/ml NGF (ligand for TrkA) cultured in monolayer (2D) or after seeding in a fibroblast-populated sponge (3D). Data are displayed as mean ± standard error of the mean (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$, $n = 5$ to 21).

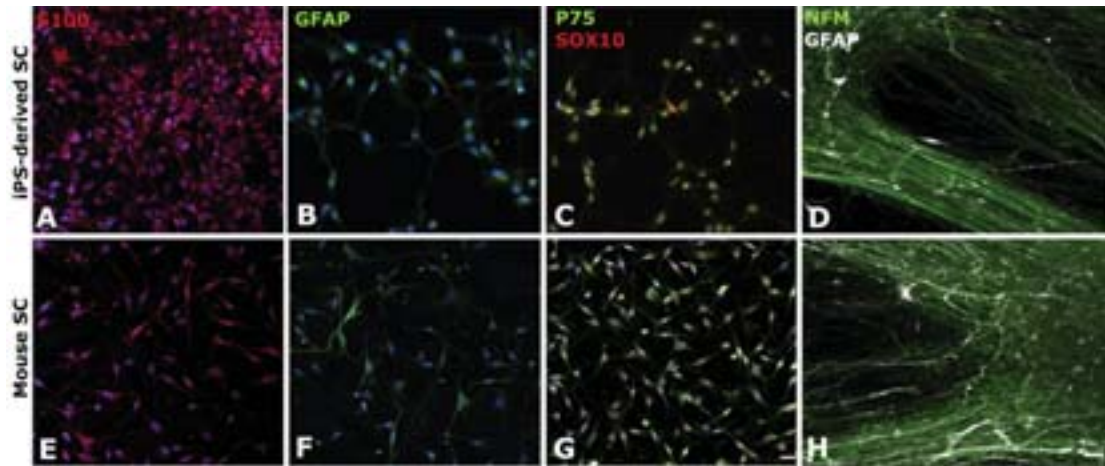


Fig. 3. Characterization by immunofluorescence of iPSC-derived Schwann cells cultured in 2D. Human iPSC-derived Schwann cells (A-D) or mouse Schwann cells (E-H) were stained in 2D with the specific markers S100 (in red; A,E), GFAP (in green; B,F), P75 (in green; C,G) and SOX10 (in red; C,G). Schwann cells derived from iPSC (stained in white with GFAP) were cocultured with iPSC-derived neurons (stained in green with NFM) for 18 days (D,H). Scale bar=20 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

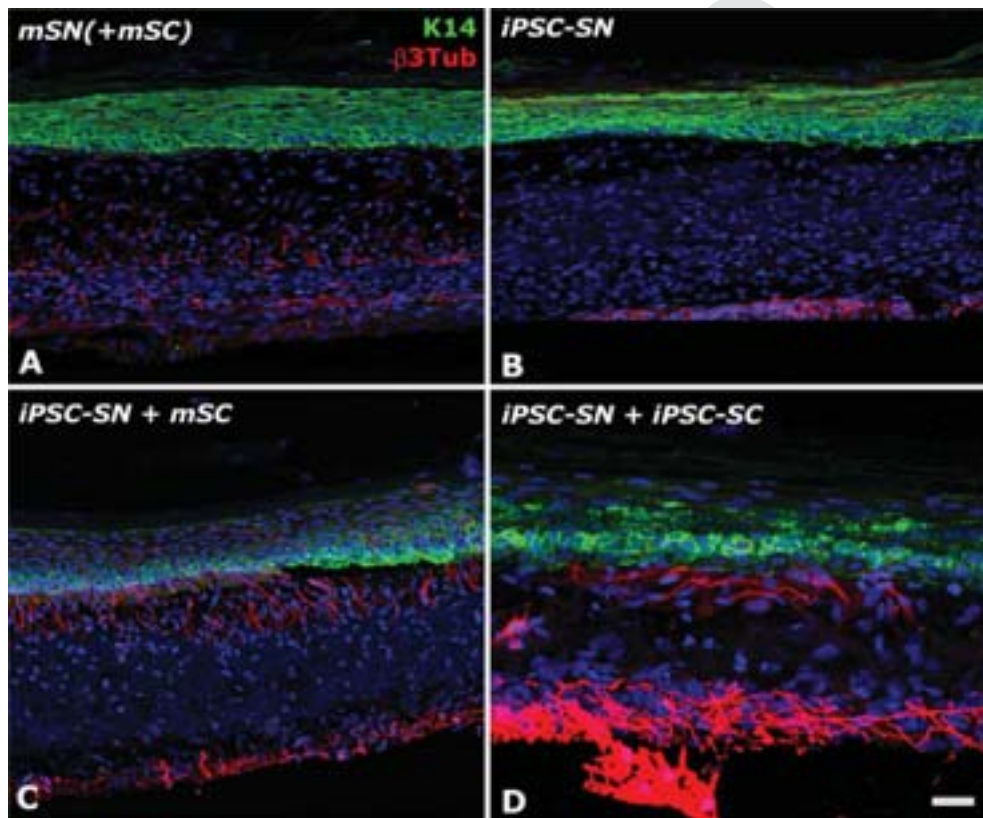


Fig. 4. Characterization by immunofluorescence of the capacity of the iPSC-derived neurons to form a 3D nerve network in the tissue-engineered skin. The human reconstructed skin model made of keratinocytes (stained in green with Keratin 14), fibroblasts and mouse (A) or iPSC-derived (B-D) neurons (stained in red with β 3Tub) was cocultured or not (B) with mouse (C) or iPSC-derived Schwann cells (D). Scale bar=50 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

scope (Zeiss, Toronto, Canada). Experiment was done in sextuplicates and 6 fields per well were evaluated using a 40x lens.

2.3. Differentiation of iPS cells into Schwann cells.

Differentiation of iPSC into Schwann cells was performed following a protocol modified from reference [18]. Up to day 6, iPS cells were cultured in the same conditions than for sensory neuron differentiation in order to reach a neuronal precursor commitment. Then, cells were dissociated with accutase supplemented with 5 μM Y-27632 and plated on a 9.6 cm^2 Geltrex coated well (1:200 dilution in cold DH medium) at a density of 130,000 cells/ cm^2 in the day 7 medium from sensory neuron differentiation. At day 7, cells were cultured in minimum essential medium (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) with 1% N2 supplement, 1 mM β -mercaptoethanol, 5 μM Y-27632, 1% L-alanyl-L-glutamine, 1% MEM non-essential amino acids (Gibco), 0.1% trace elements A, 0.1% trace elements B, 0.1% trace elements C. From day 8 to day 11, β -mercaptoethanol was removed and 35 ng/ml retinoic acid (Sigma Millipore) was added to the medium with 1% B27 supplement without vitamin A. At day 12, cells were passaged with accutase and plate on 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-D-lysine coated well at a density of 50,000 cells/ cm^2 . From day 12 to day 26, cells were cultured in STEMdiff Apel medium (STEMCELL Technologies) supplemented with 1% N2 supplement, 1% B27 supplement without vitamin A, 5 μM Y-27632, 5 μM Y-27632, 1% L-alanyl-L-glutamine, 1% MEM non-essential amino acids, 0.1% trace elements A, 0.1% trace elements B, 0.1% trace elements C, 5 ng/ml PDGF-bb, (Gibco), 10 ng/ml β FGF (Feldan, Quebec City, Canada), 14 μM forskolin (Sigma Millipore), 192 ng/ml NRG1 (R&D System, Oakville, Canada). From day 26 until the end of the 2D culture, Schwann cells were maintained in DH medium supplemented with 10% FBS, 5 μM forskolin, 50 ng/ml NRG1, 1% N2 supplement, 1% L-alanyl-L-glutamine. Schwann cells were cultured with 0.25 nM goat anti-rabbit IgG (Electron microscopy sciences, Hatfield, PA) for 3 days before seeding cells on sponges [19]. For 2D coculture (Fig. 3D,H), 300,000 iPS Schwann cells were seeded with 600,00 iPS sensory neurons in 24-well plates. Cells were maintained in DMEM F12 : neurobasal A medium (vol:vol) supplemented with 1% B-27, 1% N2 supplement, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid, 1% L-alanyl-L-glutamine, 20 ng/mL BDNF (Sino Biological), 10 ng/mL GDNF (Sino Biological) and 10 ng/mL NGF, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ hydrocortisone, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ insulin. Cells were cultivated 18 days before fixation.

2.4. Cell purity quantification

To quantify the proportion of iPS cells effectively differentiated into sensory neurons, neurons at day 11 were seeded at a density of 300,000 cells/ cm^2 in 24-wells plates on poly-D-lysine surface (n=6) and cultured as previously described for 7 days. Cells were fixed with PFA 4% and cell purity was assessed using a Zeiss axio imager M2 microscope. Purity was determined by quantification of the ratio of β 3Tub/BRN3A positive cells compared to the number of Dapi-positive cells (Supplemental Fig. S2). For each well, 6 fields were evaluated using a 40x lens. The same method was performed for assessing Schwann cell purity by calculating the ratio of S100-positive cells over the number of Dapi-positive cells.

2.5. Preparation of the tissue-engineered 3D skin model

Collagen sponges were prepared as previously described [20] and seeded with 800,000 human fibroblasts alone (for ELISA tests) or in

combination with 800,000 endothelial cells (for all other conditions) and cultured in DME (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) mixed 1:1 (vol:vol) with EBM2 (Lonza, Mississauga, Canada) and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid for 7 days. Then, 400,000 fibroblasts (for ELISA tests) or in combination with 400,000 endothelial cells (for all other conditions) were seeded on the opposite side of the sponge. After 3 days, Schwann cells from mouse sciatic nerves [20] or derived from human iPSC were seeded (only when specified) at a density of 1 million per sponge on top of the sponge. All samples (with or without Schwann cells) were cultured for 7 days in DMEM-F12 medium supplemented with 10% FBS, 5 μM forskolin, 50 ng/ml NRG1, 1% N2 supplement, 1% L-alanyl-L-glutamine.

One million of iPS-derived sensory neurons matured for 11 days were then seeded on the opposite side (versus Schwann cells) of the sponge and cultured for two days in DMEM F12:neurobasal A medium (vol:vol), supplemented with 1% B-27, 1% N2 supplement, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid, 5 μM Y-27632, 10 μM DAPT, 20 ng/mL BDNF (Feldan) and 10 ng/mL GDNF. The sponge was matured 6 additional days in DMEM F12, neurobasal A medium vol:vol, supplemented with 1% B-27, 1% N2 supplement, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid, 5 μM Y-27632, 20 ng/mL BDNF (Sino Biological), 10 ng/mL GDNF (Sino Biological) and 10 ng/mL NGF.

Sponges were flipped upside down and 1 million of human keratinocytes were seeded on top of sponge (opposite side to neurons) under immersion in the culture medium. Samples were cultured 7 days in DMEM-F12 with 5% Hyclone serum supplemented with 20 ng/mL BDNF (Feldan), 10 ng/mL GDNF, 10 ng/mL NGF, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ hydrocortisone, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ insulin, 10 ng/mL human epidermal growth factor and 10^{-10} M cholera toxin. Then, sponges were lifted up at air-liquid interface to promote keratinocyte differentiation for 17 days in the same medium but without EGF.

2.6. ELISA analyses

To quantify SP and CGRP secretion with Elisa kit (Phoenix Pharmaceuticals), sensory neurons differentiated from iPSC or extracted from mouse DRG were seeded at a density of 600,000 and 300,000 cells/ cm^2 respectively in 24-well plates coated with poly-D-lysine. For ELISA quantification of the 3D tissue supernatants, sponges were seeded with 1 million sensory neurons derived from iPS or from DRG and were washed twice with DMEM-F12 without serum before treatment. For 2D or 3D tests, medium was replaced with 150 μl or 400 μl of DMEM-F12:Neurobasal A medium (vol:vol) pH 6.2, respectively. Capsaicin (Sigma Millipore) was dissolved in ethanol 99% for a final concentration of 10 μM . Cells were exposed with capsaicin or KCl (Fisher Chemical, Ottawa, Canada) for 5 min or with AITC (Sigma-Millipore), eugenol (Sigma Millipore) or NGF for 10 min before removing the supernatant for Elisa tests or fixation with PFA 4% for immunostaining.

2.7. Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% cold PFA for 20 min at 4°C, washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) (composed of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4) (Fisher Chemical), then incubated in immunofluorescence staining buffer, containing PBS, 0.3% triton X-100 (Biorad, Mississauga, Canada) and 5% serum, for 20 min at room temperature. Cells were stained overnight at 4°C with primary antibodies diluted in immunofluorescence staining buffer and were washed with PBS for 5 min

then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies (1:500 dilution) in immunofluorescence staining buffer and finally were washed with PBS before mounting with fluoromount G with Dapi (Electron microscopy Sciences, Hatfield, PA).

The antibodies used were: mouse anti- β 3Tub (1:1000; Biolegend, San Diego, CA), rabbit anti-BRN3A (1:500; Millipore Sigma), mouse anti-substance P (1:1000; Abcam), goat anti-TRKA (1:200; R&D System), rabbit anti-TRPA1 (1:200; Abcam), sheep anti-TRPM8 (1:100; Novus Biologicals, Oakville, Canada), mouse or chicken anti-NFM and anti-NFH (1:500; Millipore Sigma), rabbit anti-TRPV1 (1:200; Novus Biologicals), goat anti-RAMP1 (1:50; Santa Cruz, Mississauga, Canada), rabbit anti-P75 (1:200; Abcam), rabbit or mouse anti-S100 (DAKO cytomation, Santa Clara, CA), mouse anti-MBP (1:500; R&D System), mouse anti-SOX10 (1:500; R&D System), mouse anti-GFAP (1:500; Millipore Sigma), rabbit anti-GFAP (1:1000; Abcam), Alexa fluor 488 goat anti-rabbit (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 594 goat anti-mouse (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 594 goat anti-rabbit (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 488 goat anti-mouse (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 647 donkey anti-sheep (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 647 or 488 donkey anti-chicken (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 555 donkey anti-mouse (1:500; Invitrogen), Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit (1:500; Invitrogen).

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA. Post-Hoc test were conducted using Bonferroni correction ($\alpha=0.05$). The differences were considered significant at $p<0.05$. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. Sensory neurons were differentiated from human iPSC cells with high purity, high yield and expressed specific markers

Human fibroblasts-derived iPSCs cultured on Geltrex-coated 6-well plates (2D culture) were allowed to differentiate for 22 days and were stained with specific markers for sensory neurons to confirm their identity. Based on the expression of BRN3A (a transcription factor expressed in the developing sensory neurons [21,22], neurofilament M (NFM, 150 kDa [23]) and TRPV1, the optimal maturation time was observed at day 19, and was followed by a decrease in the number of cells at day 22 (Supplemental Fig. S1A-O). Mouse dorsal root ganglion (DRG)-derived sensory neurons expressed the same markers in a similar pattern (Supplemental Fig. S1P-R).

To determine the proportion of iPSC-derived cells that were efficiently differentiated into sensory neurons, cells were double-stained for BRN3A, and β 3Tub (staining for β III-tubulin, a generic marker of neurons [24]). Immunofluorescence images showed that nearly 100% ($98.9\% \pm 1.35$, $n=6$) of cells were positive for both markers (Supplemental Fig. S2). Over the whole maturation period, iPSC growth resulted in a 65 ± 15 -fold increase ($n=10$) in the number of cells differentiated into sensory neurons, as compared to the initial number of iPSC seeded. This high yield, as compared to the original protocol by Maury et al. [14] might be explained at least in part by a more potent growth of cells as monolayer culture instead of neurospheres. Moreover, the culture medium was supplemented by additional nutrients. And accutase, a mild digestive enzyme, was used instead of trypsin, allowing a more efficient cell recovery for cell harvesting/replating.

At day 19, in addition to BRN3A and β 3Tub, some of the differentiated cells expressed the neurofilament M and SP. In addition, most cells were positive to TRPV1 and TRPA1, with some of them expressing TrkA (the receptor for NGF) (Fig. 1A,C,E,G).

To incorporate the iPSC-derived neurons into the 3D model, it was not possible to first fully differentiate the neurons in 2D for 19 days, and then seed them over the sponge. Indeed, since mature neurons already displayed long neurites at day 19, their enzymatic digestion induced massive cell death precluding their use for 3D seeding. To overcome this limitation, iPSC-derived neurons were passaged with accutase at day 11 of differentiation (before neurite outgrowth) and seeded on the sponge 3D model. To confirm that the differentiation of the sensory neurons between day 11 and day 19 was as efficient in 3D as in 2D, the expression of neuronal markers was assessed by immunofluorescent staining of whole sponges, followed by en-face imaging. A similar pattern of expression of the markers BRN3A, β 3Tub, SP, NFM, TrkA and TRPA1 was observed, along with Ramp1 (a CGRP receptor) (Fig. 1B,D,F,H).

In addition, since these neurons can be maintained in 3D culture for a much longer time, numerous nerve fibers were observed after 49 days of culture to express the neurofilament H (200 kDa), which is a marker of larger caliber and more mature axons [25]. In addition, most of these NFH-positive fibers also expressed SP (Supplemental Fig. S3).

Interestingly, iPSC-derived neurons showed a tendency to aggregate together into ganglion-like clusters from which large bundles of neurites elongated, in contrast with mouse DRG neurons that were homogeneously distributed beneath the sponge (Fig. 1I,J). Of note, a similar cluster formation was reported with iPSC-derived sensory neurons cultured in 2D after 2 weeks in culture [26]. The non-peptidergic marker P2X3 was not detected in 2D and 3D cultures (Data not shown).

3.2. TRP agonists trigger SP and CGRP release from iPSC-derived sensory neurons

In order to test the capacity of the iPSC-derived sensory neurons to induce neurogenic inflammation, their potential to release neuropeptides upon TRPV activation was investigated and compared to mouse DRG neurons in conventional 2D culture as well as in 3D culture into the sponge (only populated with fibroblasts).

The TRPV1 agonists resiniferatoxin (at 100 nM) induced a significant increase in the release of SP from iPSC-derived neurons cultured in 2D compared to control ($p<0.0001$; $n=13$), while the effect of capsaicin (at 10 μ M) was not significant (Fig. 2A). Moreover, eugenol (at 1 mM), an agonist of TRPV1, 2 and 3 induced a significant increase of SP release ($p<0.0001$; $n=14$), as well as NGF (at 100 ng/ml), the agonist of TrkA ($p<0.01$; $n=16$). KCl (at 65 mM), which induces neuronal depolarization independently of receptors, promoted the most potent rise of SP release ($p<0.0001$; $n=16$) (Fig. 2A). Of note, although TRPA1 was detected by immunofluorescence staining, exposure to its agonist AITC (300 μ M) did not result in a significant difference of SP secretion. As a control, 2D culture of mouse DRG neurons showed significant increases of SP release upon stimulation with capsaicin ($p<0.0001$; $n=5$), resiniferatoxin ($p<0.0001$; $n=6$), eugenol ($p<0.01$; $n=6$) and treatment with KCl ($p<0.0001$; $n=6$) (Fig. 2B).

When cultured in 3D in a fibroblast-populated sponge, iPSC-derived neurons released significantly higher amount of SP after stimulation with capsaicin ($p<0.0001$; $n=17$) and KCl ($p<0.001$; $n=16$), while resiniferatoxin, AITC and NGF did not have an effect (Fig. 2C). Stimulation of mouse DRG neurons in the same 3D culture scaffold

fold produced significantly higher levels of SP upon treatment with capsaicin ($p < 0.01$; $n = 6$), resiniferatoxin ($p < 0.001$; $n = 5$) and KCl ($p < 0.0001$; $n = 7$) (Fig. 2D).

The secretion of CGRP by iPSC-derived neurons was significantly enhanced by eugenol ($p < 0.0001$; $n = 18$), AITC ($p < 0.001$; $n = 18$), NGF ($p < 0.001$; $n = 18$) and KCl ($p < 0.01$; $n = 18$) in 2D culture (Fig. 2E), and by eugenol ($p < 0.0001$; $n = 11$) and KCl ($p < 0.001$; $n = 17$) in 3D sponges (Fig. 2G). Mouse DRG neurons released significantly more CGRP upon stimulation with eugenol ($p < 0.0001$; $n = 7$), capsaicin ($p < 0.01$; $n = 11$) and resiniferatoxin ($p < 0.01$; $n = 11$) in 2D (Fig. 2F) and capsaicin ($p < 0.0001$; $n = 21$), resiniferatoxin ($p < 0.0001$; $n = 6$) and KCl ($p < 0.0001$; $n = 7$) in 3D (Fig. 2H).

The capacity of capsaicin to induce an action potential in iPSC-derived neurons was confirmed by the quantification of calcium entry into cells upon stimulation. Five seconds after addition of $10 \mu\text{M}$ of capsaicin in the culture medium, an increase by 30% of the relative fluorescence intensity was observed in iPSC-derived neurons compared to the non-stimulated condition, which went back to initial values after 5 s (Supplemental Fig. S4). The fibroblasts used to generate iPSC did not show any increase in calcium upon capsaicin stimulation (Data not shown).

3.3. Efficient neurite outgrowth from iPSC-derived neurons throughout the tissue-engineered skin is dependent on the presence of mouse or iPSC-derived Schwann cells

When iPSC-derived neurons were cultured in the tissue-engineered skin model, they failed to promote axonal outgrowth from the neuronal cell layer at the bottom of the tissue to the epidermis on top as observed with mouse DRG neurons (Fig. 4B vs A). One major difference with DRG neurons that could explain this limitation is the presence of Schwann cells that are extracted from DRG along with neurons. Thus, we hypothesized that Schwann cells might be an essential partner to promote axonal outgrowth. Indeed, when mouse Schwann cells were added in the tissue-engineered skin model prior to iPSC-derived neuron seeding, a much higher neurite outgrowth was observed in the tissue with numerous axons reaching the epidermis (Fig. 4C).

In order to develop a fully human model, the same iPSC used to generate neurons were differentiated into human Schwann cells. The resulting human iPSC-derived Schwann cells expressed the specific markers S100, GFAP, p75 and SOX10 (Fig. 3). When these cells were added in a 2D culture of iPSC-derived neurons, they aligned along the neurites as observed with mouse Schwann cells (Fig. 3D vs H). When the iPSC-derived Schwann cells were added in the dermal compartment of the tissue-engineered skin model before seeding and at the opposite side versus neurons, they were shown to induce a strong increase in axonal outgrowth toward the epidermis (Fig. 4D).

4. Discussion

The aim of this work was to generate human iPSC-derived sensory neurons to be used in place of rodent neurons to prepare innervated tissue-engineered skin models. The animal origin of neurons in these models does not seem to critically compromise their ability to interact with most human skin cells, notably because neuropeptides are highly conserved among species. However, interspecies differences cannot be ruled out. Finally, the use of animal cells has been banned in the European Union for cosmetic research and development. Therefore, the replacement of animal neurons by human neurons remains highly desirable.

Since the advent of the iPSC technology, several protocols have been proposed to differentiate human sensory neurons from iPSC, but with some limitations, such as low neuron differentiation efficiency and low cell yields [7–14]. Moreover, none of these studies have unequivocally demonstrated the ability of these neurons to secrete neuropeptides following specific stimulations. Our purpose was to generate sensory neurons from human skin fibroblast-derived iPSC with high purity, high yield, and to demonstrate their capacity to release SP and CGRP upon stimulation of their TRP receptors.

In addition, we showed that these iPSC-derived neurons could be efficiently integrated into a 3D tissue-engineered skin model. Interestingly, this culture system created a favorable environment for prolonged neuronal culture (49 days vs. 21 days in 2D), thereby allowing the neurons to reach a higher maturation stage in 3D while maintaining their capacity to release neuropeptides upon stimulation. Moreover, a key feature of a functional innervated tissue-engineered skin model is the ability of neurites extending from neurons seeded at the bottom of the tissue to migrate through the dermal compartment and form a nerve network reaching the epidermis. Indeed, a direct contact of neurites with keratinocytes is essential to efficiently recapitulate skin physiopathology. A key finding of our work is the demonstration that a coculture of iPSC-derived neurons with Schwann cells was necessary to induce a strong neurite outgrowth in 3D. Of note, human Schwann cells differentiated from the same iPSC used to generate neurons were able to support such neurite outgrowth to maintain a fully human model. It represents a promising method for generate a fully human innervated tissue-engineered skin model from the biopsy of a single individual.

We intend to develop disease-specific skin models and analyze the potential effect of sensory nerves in these models after induction of neuropeptide release upon stimulation with TRPV1 agonists. Such model would be particularly well-suited for the modelling of psoriasis, since this disease is highly suspected to be modulated by skin innervation [27,28]. It represents an optimal base to build an immunocompetent skin model, with a strong potential for personalized medicine approaches.

5. Declaration of interest

None.

Author contribution

QM and M-JB contributed to the conception, design and achievement of experiments.

TDSB and SB participated to the acquisition of data.

VF participated in interpretation of data and critically revised the article.

FB contributed to the study conception and design, analysis of data, drafting of the article and gave final approval of the submitted version.

Acknowledgments

The authors acknowledge Dr. Jack Puymirat and the iPSC-Quebec platform of the CHU de Québec-Université Laval research center for the production of the human iPSC cell lines used in this work.

Funding: This work was supported by the CQDM (Centre Québécois pour la Découverte du Médicament), Pierre Fabre Dermo-cosmétique (Toulouse, France) and the Quebec Network for Cell and Tissue Therapies – ThéCell (a thematic network supported by the Fonds de recherche du Québec–Santé). QM and VF were supported

by Région Alsace, LabEx Medalis, and Fondation pour la Recherche Médicale. QM was the recipient of travel grants of Fondation René Touraine and Mitacs Globalink-Campus France. These funding sources had no involvement in study design, interpretation of data and article writing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.011>.

References

- [1] E.M. Peters, M.E. Ericson, J. Hosoi, K. Seiffert, M.K. Hordinsky, J.C. Ansel, R. Paus, T.E. Scholzen, Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance, *J. Invest. Dermatol.* 126 (9) (2006) 1937–1947.
- [2] I.M. Chiu, C.A. von Hehn, C.J. Woolf, Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology, *Nat. Neurosci.* 15 (8) (2012) 1063–1067.
- [3] M. Gingras, J. Bergeron, J. Dery, H.D. Durham, F. Berthod, In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth, *FASEB J.* 17 (14) (2003) 2124–2126.
- [4] V. Gagnon, D. Larouche, R. Parenteau-Bareil, M. Gingras, L. Germain, F. Berthod, Hair follicles guide nerve migration in vitro and in vivo in tissue-engineered skin, *J. Invest. Dermatol.* 131 (6) (2011) 1375–1378.
- [5] M. Blais, L. Mottier, M.A. Germain, S. Bellenfant, S. Cadau, F. Berthod, Sensory neurons accelerate skin reepithelialization via substance P in an innervated tissue-engineered wound healing model, *Tissue Eng. Part A* 20 (15–16) (2014) 2180–2188.
- [6] Y. Shi, H. Inoue, J.C. Wu, S. Yamanaka, Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2) (2017) 115–130.
- [7] K. Schrenk-Siemens, H. Wende, V. Prato, K. Song, C. Rostock, A. Loewer, J. Utikal, G.R. Lewin, S.G. Lechner, J. Siemens, PIEZO2 is required for mechanotransduction in human stem cell-derived touch receptors, *Nat. Neurosci.* 18 (1) (2015) 10–16.
- [8] A. Eigentler, S. Boesch, R. Schneider, G. Dechant, R. Nat, Induced pluripotent stem cells from Friedreich ataxia patients fail to upregulate frataxin during in vitro differentiation to peripheral sensory neurons, *Stem Cells Dev.* 22 (24) (2013) 3271–3282.
- [9] B.J. Wainger, E.D. Buttermore, J.T. Oliveira, C. Mellin, S. Lee, W.A. Saber, A.J. Wang, J.K. Ichida, I.M. Chiu, L. Barrett, E.A. Huebner, C. Bilgin, N. Tsujimoto, C. Brenneis, K. Kapur, L.L. Rubin, K. Eggan, C.J. Woolf, Modeling pain in vitro using nociceptor neurons reprogrammed from fibroblasts, *Nat. Neurosci.* 18 (1) (2015) 17–24.
- [10] S.M. Chambers, Y. Qi, Y. Mica, G. Lee, X.J. Zhang, L. Niu, J. Bilsland, L. Cao, E. Stevens, P. Whiting, S.H. Shi, L. Studer, Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors, *Nat. Biotechnol.* 30 (7) (2012) 715–720.
- [11] D. Pre, M.W. Nestor, A.A. Sproul, S. Jacob, P. Koppensteiner, V. Chinchalomporn, M. Zimmer, A. Yamamoto, S.A. Noggle, O. Arancio, A time course analysis of the electrophysiological properties of neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs), *PLOS One* 9 (7) (2014), e103418.
- [12] J.W. Blanchard, K.T. Eade, A. Szucs, V. Lo Sardo, R.K. Tsunemoto, D. Williams, P.P. Sanna, K.K. Baldwin, Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory neurons, *Nat. Neurosci.* 18 (1) (2015) 25–35.
- [13] L. Menendez, M.J. Kulik, A.T. Page, S.S. Park, J.D. Lauderdale, M.L. Cunningham, S. Dalton, Directed differentiation of human pluripotent cells to neural crest stem cells, *Nat. Protoc.* 8 (1) (2013) 203–212.
- [14] Y. Maury, J. Come, R.A. Piskrowski, N. Salah-Mohellibi, V. Chevalerey, M. Peschanski, C. Martinat, S. Nedelec, Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes, *Nat. Biotechnol.* 33 (1) (2015) 89–96.
- [15] M.J. Caterina, Z. Pang, TRP channels in skin biology and pathophysiology, *Pharmaceuticals (Basel)* 9 (4) (2016) 77.
- [16] L. Germain, M. Rouabhia, R. Guignard, L. Carrier, V. Bouvard, F.A. Auger, Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin, *Burns* 19 (2) (1993) 99–104.
- [17] P.L. Tremblay, F. Berthod, L. Germain, F.A. Auger, In vitro evaluation of the angiostatic potential of drugs using an endothelialized tissue-engineered connective tissue, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315 (2) (2005) 510–516.
- [18] A. Faroni, S.W. Rothwell, A.A. Grolla, G. Terenghi, V. Magnaghi, A. Verkhatsky, Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell phenotype induces expression of P2X receptors that control cell death, *Cell Death Dis.* 4 (2013), e743.
- [19] N. Tzekova, A. Heinen, S. Bunk, C. Hermann, H.P. Hartung, B. Reipert, P. Kury, Immunoglobulins stimulate cultured Schwann cell maturation and promote their potential to induce axonal outgrowth, *J. Neuroinflammation* 12 (2015) 107.
- [20] M. Blais, M. Grenier, F. Berthod, Improvement of nerve regeneration in tissue-engineered skin enriched with Schwann cells, *J. Invest. Dermatol.* 129 (12) (2009) 2895–2900.
- [21] M. Zou, S. Li, W.H. Klein, M. Xiang, Brn3a/Pou4f1 regulates dorsal root ganglion sensory neuron specification and axonal projection into the spinal cord, *Dev. Biol.* 364 (2) (2012) 114–127.
- [22] R. Wilson, A.A. Ahmed, A. Poll, M. Sakae, A. Laude, M. Sieber-Blum, Human peptidergic nociceptive sensory neurons generated from human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC), *PLOS One* 13 (6) (2018), e0199996.
- [23] F.J. Naves, J.J. Huerta, O. Garcia-Suarez, N. Urdangaray, I. Esteban, M.E. Del Valle, J.A. Vega, Distribution of immunoreactivity for cytoskeletal (microtubule, microtubule-associated, and neurofilament) proteins in adult human dorsal root ganglia, *Anat. Rec.* 244 (2) (1996) 246–256.
- [24] P.F. Moskowitz, M.M. Oblinger, Sensory neurons selectively upregulate synthesis and transport of the beta III-tubulin protein during axonal regeneration, *J. Neurosci.* 15 (2) (1995) 1545–1555.
- [25] M.V. Rao, M.K. Houseweart, T.L. Williamson, T.O. Crawford, J. Folmer, D.W. Cleveland, Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation, *J. Cell Biol.* 143 (1) (1998) 171–181.
- [26] A.J. Clark, M.S. Kaller, J. Galino, H.J. Willison, S. Rinaldi, D.L.H. Bennett, Co-cultures with stem cell-derived human sensory neurons reveal regulators of peripheral myelination, *Brain* 140 (4) (2017) 898–913.
- [27] L. Riol-Blanco, J. Ordovas-Montanes, M. Perro, E. Naval, A. Thiriou, D. Alvarez, S. Paust, J.N. Wood, U.H. von Andrian, Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasisiform skin inflammation, *Nature* 510 (7503) (2014) 157–161.
- [28] S.M. Ostrowski, A. Belkadi, C.M. Loyd, D. Diaconu, N.L. Ward, Cutaneous denervation of psoriasisiform mouse skin improves acanthosis and inflammation in a sensory neuropeptide-dependent manner, *J. Invest. Dermatol.* 131 (7) (2011) 1530–1538.

Annexe 9 : Publication scientifique Flacher, V. et al. (2015), *ACS Chemical Biology*.

Mannoside Glycolipid Conjugates Display Anti-inflammatory Activity by Inhibition of Toll-like Receptor-4 Mediated Cell Activation

Vincent Flacher,^{+,‡} Patrick Neuberg,^{+,§,‡} Floriane Point,⁺ François Daubeuf,[∥] Quentin Muller,⁺ David Sigwalt,[‡] Jean-Daniel Fauny,⁺ Jean-Serge Remy,[§] Nelly Frossard,[∥] Alain Wagner,[‡] Christopher G. Mueller,⁺ and Evelyne Schaeffer^{*,‡}

⁺Laboratory of Immunopathology and Therapeutic Chemistry, CNRS UPR 3572/Laboratory of Excellence MEDALIS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France

[‡]Laboratory of Functional Chemo Systems and [§]Laboratory V-SAT, Vectors – Synthesis and Therapeutic Applications, CNRS-University of Strasbourg UMR 7199/Laboratory of Excellence MEDALIS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch, France

[∥]Laboratory of Therapeutic Innovation, CNRS-University of Strasbourg UMR 7200/Laboratory of Excellence MEDALIS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch, France

Mannoside Glycolipid Conjugates Display Anti-inflammatory Activity by Inhibition of Toll-like Receptor-4 Mediated Cell Activation

Vincent Flacher,^{†,‡} Patrick Neuberger,^{‡,§,‡} Floriane Point,[†] François Daubeuf,^{||} Quentin Muller,[†] David Sigwalt,[‡] Jean-Daniel Fauny,[†] Jean-Serge Remy,[§] Nelly Frossard,^{||} Alain Wagner,[‡] Christopher G. Mueller,[†] and Evelyne Schaeffer^{*,†}

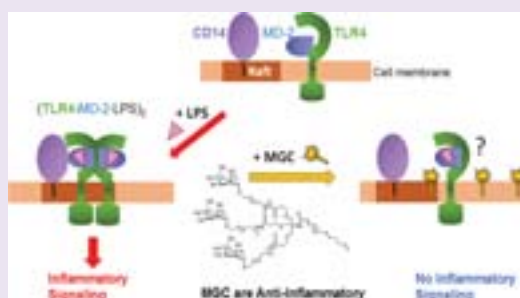
[†]Laboratory of Immunopathology and Therapeutic Chemistry, CNRS UPR 3572/Laboratory of Excellence MEDALIS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France

[‡]Laboratory of Functional Chemo Systems and [§]Laboratory V-SAT, Vectors – Synthesis and Therapeutic Applications, CNRS-University of Strasbourg UMR 7199/Laboratory of Excellence MEDALIS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch, France

^{||}Laboratory of Therapeutic Innovation, CNRS-University of Strasbourg UMR 7200/Laboratory of Excellence MEDALIS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch, France

Supporting Information

ABSTRACT: Inhibition of excessive Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling is a therapeutic approach pursued for many inflammatory diseases. We report that Mannoside Glycolipid Conjugates (MGCs) selectively blocked TLR4-mediated activation of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells (DCs) by lipopolysaccharide (LPS). They potently suppressed pro-inflammatory cytokine secretion and maturation of DCs exposed to LPS, leading to impaired T cell stimulation. MGCs did not interfere with LPS and could act in a delayed manner, hours after LPS stimulation. Their inhibitory action required both the sugar heads and the lipid chain, although the nature of the sugar and the structure of the lipid tail could be modified. They blocked early signaling events at the cell membrane, enhanced internalization of CD14 receptors, and prevented colocalization of CD14 and TLR4, thereby abolishing NF- κ B nuclear translocation. When the best lead conjugate was tested in a mouse model of LPS-induced acute lung inflammation, it displayed an anti-inflammatory action by suppressing the recruitment of neutrophils. Thus, MGCs could serve as promising leads for the development of selective TLR4 antagonistic agents for inflammatory diseases.



Toll-like receptors (TLRs) serve as the first line of defense against invading pathogens such as bacteria and viruses. They are notably expressed by monocytes, macrophages, and dendritic cells (DCs). They activate the host defense system by rapidly triggering inflammation.¹ But TLR signaling is a double-edged sword: although it leads to eliminating the invading organisms, a deregulated response results in tissue damage and ultimately contributes to the pathogenesis of chronic inflammatory diseases.

TLR4 plays a key role in the innate host response to bacterial infection. TLR4 recognizes the lipopolysaccharide (LPS) present in the outer membrane of Gram-negative bacteria. Activation of the signaling cascade is achieved by the successive interaction of LPS with the lipopolysaccharide binding protein (LBP), the cluster differentiation antigen CD14, and the myeloid differentiation protein (MD-2) that binds LPS and presents it in a monomeric form to TLR4.² Upon LPS recognition, TLR4 undergoes dimerization and recruits downstream adaptor proteins through interactions with its intracellular domain.³ This initiates the intracellular signaling

cascade that culminates in translocation of transcription factors to the nucleus and the biosynthesis of pro-inflammatory cytokines and interferons leading to cellular activation.^{4,5} An overly potent or prolonged TLR4 response is involved in acute (septic shock)⁶ and chronic diseases (atherosclerosis,⁷ autoimmune colitis,⁸ systemic lupus erythematosus,⁹ diabetes,¹⁰ Alzheimer disease¹¹). Thus, blockade of excessive TLR4 signaling is a therapeutic approach that is actively pursued. Recent links also emerged between TLR4 and breast cancer oncogenesis, highlighting the development of novel therapeutics for the targeting of TLR4 in breast cancer therapy.¹² Small molecules and nanoparticles active in modulating the TLR4 signal by targeting directly the MD-2-TLR4 complex or by interfering with the TLR4 signaling have been described.^{13–15} However, the development of TLR antagonists as therapeutic

Received: July 16, 2015

Accepted: September 21, 2015

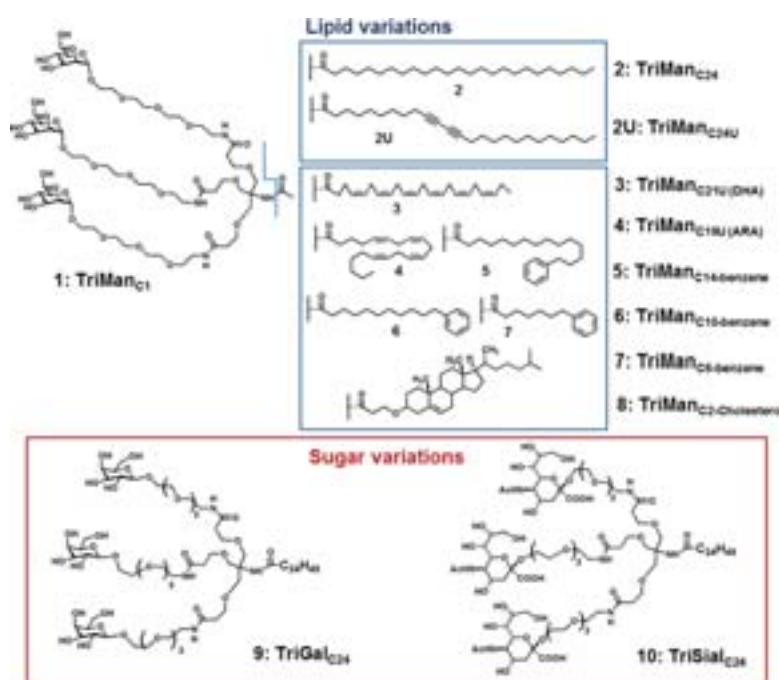


Figure 1. Structure of conjugates. Trimannosides **2** and **2U** are compared with conjugates containing lipid variations (**1** contains no lipid chain; **3** and **4** have an omega-3 and omega-6 lipid chain; conjugates **5**, **6**, and **7** have a benzene-ending lipid chain; conjugate **8** contains a cholesterol motif) or sugar variations (**9** and **10**, with galactose or sialic acid).

agents has been slow, and so far none are approved for clinical use.

We have previously described the properties of mannoside glycolipid conjugates (MGCs) as antiviral agents.^{16,17} These water-soluble compounds are formed by three building blocks: a trimannose head, a hydrophilic linker, and a 24-carbon lipid chain. MGCs efficiently target the mannose-binding lectins Macrophage Mannose Receptor/CD206 and DC-SIGN/CD209, thanks to the cooperation between the mannose head and the lipid chain. They display biological activities as single molecules and as self-assembled micelles, and inhibit *trans*-infection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mediated by human DCs. Because intracellular signaling from C-type lectins exerts inhibitory effects on the TLR4 pathway,^{18–20} we hypothesized that MGCs could interfere with TLR4-mediated cell activation.

In this report, we have investigated whether mannoside glycolipid conjugates display anti-inflammatory responses on TLR4-mediated signaling. We examined their effects on LPS-induced inflammatory reactions in human monocytes and DCs. To decipher their mechanism of action, we studied the importance of the sugar and the lipid moieties and tested their effect on the expression and location of cell membrane proteins involved in TLR4 responses. Finally, we verified their anti-inflammatory effect *in vivo* in an acute model of LPS-mediated pulmonary inflammation. Our data highlight the potent anti-inflammatory action of MGCs both in cells and *in vivo*.

RESULTS AND DISCUSSION

Conjugates **2 and **2U** Are Not Pro-inflammatory.** We have reported previously the synthesis and physicochemical properties of conjugates **2** and **2U** (Figure 1). They exhibited no cytotoxicity up to respectively 500 μM and 250 μM in MTT

viability assays on a human cell line.^{16,17} For human monocyte-derived DCs, no cytotoxicity was measured up to concentrations of 150 μM in 7-AAD staining assays. In the presence of LPS, some cytotoxicity was detected for compound **2** at 150 μM , but not for **2U** (Supporting Information Figure 1Sa). When conjugates alone were added to DCs, they did not affect the pro-inflammatory cytokine TNF- α level in the media (Supporting Information Figure 2S), showing that conjugates **2** and **2U** are not pro-inflammatory.

Conjugates **2 and **2U** Act as TLR4 Inhibitors.** We examined the capacity of conjugates **2** and **2U** to inhibit the production of inflammatory cytokines as well as the maturation of DCs stimulated with the TLR4 ligand, LPS. The media were collected for measurement of cytokine concentrations by ELISA, and cell surface maturation markers were labeled and analyzed by flow cytometry.

Stimulation of TLR4 activates the MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88)-dependent pathway, which involves the early phase of nuclear factor- κB (NF- κB) activation and leads to the production of pro-inflammatory cytokines.¹ When DCs were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), simultaneous treatment with conjugates inhibited the release of pro-inflammatory cytokines in a dose-dependent manner. The highest concentration of conjugates (150 μM) completely abrogated LPS-induced TNF- α and IL-6 release. Levels of IL-12p70 were also potently reduced (Figure 2a). Depending on the cytokine considered, the IC₅₀ values of conjugates **2** and **2U** ranged between 12 and 28 μM (Supporting Information Table 1S).

Stimulation of TLR4 can also activate the MyD88-independent pathway that relies on the adapter TRIF and leads to the expression of interferon (IFN)-inducible genes and the maturation of DCs.¹ Conjugates at 50 μM were able to totally inhibit IFN- β release triggered by LPS (Figure 2a).

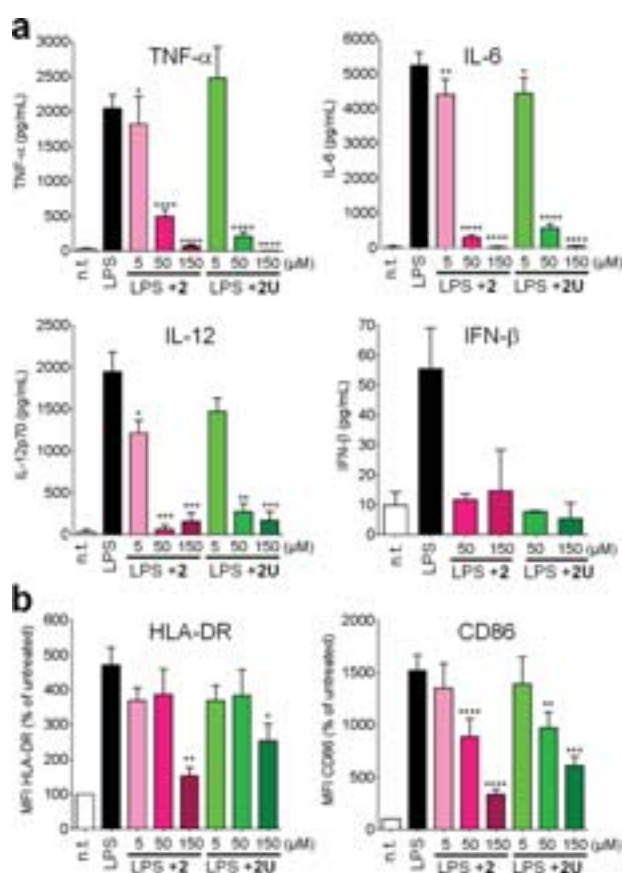


Figure 2. Conjugates 2 and 2U displaying anti-inflammatory behavior for LPS-treated DCs. Dose-dependent inhibition of (a) pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-12p70 and of interferon- β , released in the media after 24 h, (b) cell surface markers HLA-DR and CD86 expression after 24 h. Nontreated cells (n.t.) are indicated. MFI, mean fluorescence intensity. Data correspond to $n > 20$ cell donors/independent assays.

In line with this, conjugates displayed a potent effect on DC maturation. The expression of cell surface markers CD86 and HLA-DR was upregulated in the presence of LPS, as expected. Co-treatment with conjugates potently inhibited this increased expression in a dose-dependent fashion (Figures 2b and Supporting Information 3Sa). The upregulation of other maturation markers (CD80, CD83) was also impaired (Supporting Information Figure 3Sa). Together, these results demonstrate the potent anti-inflammatory activity of conjugates 2 and 2U on LPS-activated DCs. Thus, our results show that conjugates can inhibit the two branches of downstream TLR4 signaling, MyD88- and TRIF-dependent pathways.

It was important to address the question whether the action of conjugates on DCs leads to relevant physiological consequences on cells of the immune system. DCs initiate primary immune responses through their ability to conjugate with naive T cells.²¹ Mixed leukocyte reactions were performed by coculture of conjugate-primed DCs with naive T lymphocytes. After 5 days, proliferation of T cells was analyzed by CFSE dilution in flow cytometry. Results showed that conjugates 2 and 2U could inhibit T cell proliferation induced by LPS-activated DCs (Supporting Information Figure 3Sb), confirming that the suppressive action of conjugates 2 and 2U on activated DCs translates to T cell proliferation.

To investigate whether conjugates 2 and 2U were specifically active on TLR4, we tested their effect on other TLRs. When DCs were stimulated with TLR agonists Pam₃CSK₄ (TLR1/2), poly(I:C) (TLR3), and R-848 (TLR7/8), conjugates were unable to significantly affect cell maturation markers and cytokine release in a dose-dependent manner (Supporting Information Figure 4S). Since IL-1 β receptor signaling is also linked to MyD88,²² conjugates were tested on the IL-1 β response. No significant effect was detected on IL-1 β -induced TNF- α production (Supporting Information Figure 4S). These data indicate that the potent suppressive effect of conjugates 2 and 2U is restricted to LPS stimulation of TLR4.

Conjugates Do Not Compete with LPS for Binding on TLR4. To identify the mechanism involved in the anti-inflammatory action of conjugates, we first explored whether they act by competing with LPS (Figure 3). DCs were

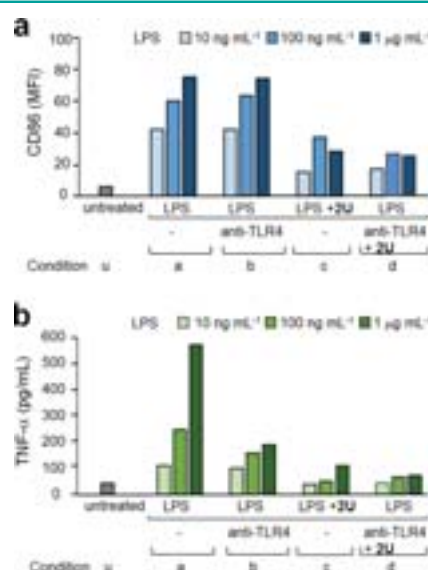


Figure 3. Competition between conjugate 2U and LPS binding. Conjugate 2U does not compete with LPS binding. DCs were treated with LPS or LPS+2U for 2 h, then washed before the indicated treatments. (a) CD86 cell surface expression (MFI, mean fluorescence intensity) and (b) TNF- α production were analyzed after 24 h. Representative data out of 2.

subjected to a 2-h stimulation with LPS alone, or with LPS and conjugate 2U, followed by extensive washes (condition a, c). To ensure complete elimination of LPS signaling, cells were exposed to a TLR4 neutralizing antibody, in the absence of 2U (condition b) or with the addition of 2U after 30 min (condition d). After 24 h, as expected, LPS induced a dose-dependent increase of CD86 expression and TNF- α production (condition a), while the addition of LPS and 2U led to a decreased CD86 expression and TNF- α production (condition c). The TLR4 antibody led to decreased TNF- α production, without affecting CD86 expression (condition b). Conjugate 2U (condition d) induced a drastic reduction of CD86 expression and decrease of TNF- α production. These results demonstrate that even after LPS removal and receptor inactivation, conjugate 2U is still able to display its anti-inflammatory effect. This shows that compound 2U does not act by competing with LPS on TLR4/MD2/CD14. Thus, conjugates use a mode of action distinct from that of other anti-inflammatory compounds such a PIM analogues that block LPS

binding to CD14²³ or amphiphilic glycolipids that inhibit TLR4 activation by LPS by competitively occupying CD14.²⁴

We investigated whether conjugates could affect TLR4 signaling in a delayed manner following LPS stimulation. DCs were treated with LPS, and compounds were added after a delay of 2, 4, and 6 h (Figures 4 and Supporting Information

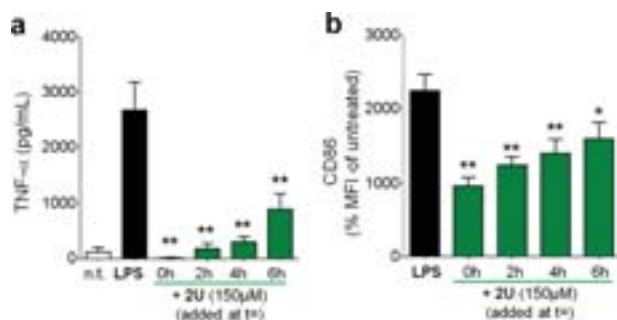


Figure 4. Delayed addition of conjugate 2U. The delayed addition conserves inhibitory activity. DCs were treated with LPS, alone or with 2U added at the indicated times, or left untreated (n.t.). (a) TNF- α production and (b) CD86 cell surface expression were analyzed after 24 h. Data correspond to $n > 3$ independent assays.

5S). Production of TNF- α was clearly reduced even with a 4 and 6 h delay, with respectively 2 and 2U. Similarly, CD86 expression was down-regulated after a 2 and 6 h delay, with respectively 2 and 2U. These findings demonstrate the ability of conjugates to inhibit the inflammatory response in a delayed fashion, several hours after LPS stimulation. They further support the notion that the conjugates do not act by competing with LPS.

Conjugates Inhibit LPS-Induced NF- κ B Activation.

Since the TLR4 signaling pathway culminates in the activation of the NF- κ B transcription factor, which regulates the induction of cytokine genes, we examined the effect of conjugates on NF- κ B activity. In resting cells, NF- κ B/I κ B complexes are present in the cytoplasm. Activation leads to degradation of I κ B, release of free NF- κ B that translocates into the nucleus to activate genes with κ B binding sites. We visualized the cellular location of the NF- κ B p65 subunit in the presence or absence of LPS and conjugate 2 (Figure 5). As expected, p65 was found in the cytoplasm of untreated DCs and in the nucleus of LPS-treated cells. In the presence of 2, p65 was detected in the cytoplasm, suggesting a block of its nuclear translocation. Similar results were found with conjugate 2U, as shown on a field of cells visualized by confocal microscopy (Supporting Information Figure 6S).

These data confirm that the anti-inflammatory activity of conjugates translates to an inability of NF- κ B p65 to translocate into the cell nucleus. They also suggest that conjugates act on TLR4 signaling independently of the cross-talk with DC-SIGN described with pathogens, which leads to increased accumulation of nuclear p65.²⁰

Conjugates Inhibit TLR4 Signaling Independently of C-type Lectins. We tested whether the anti-inflammatory behavior was specific for DCs or could occur in different immune cells. In human monocytes, conjugates also inhibited LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL1- β , and IL-8 in a dose-dependent fashion (Supporting Information Figure 7S). These results demonstrate that conjugates can act on TLR4 signaling in distinct cells. These

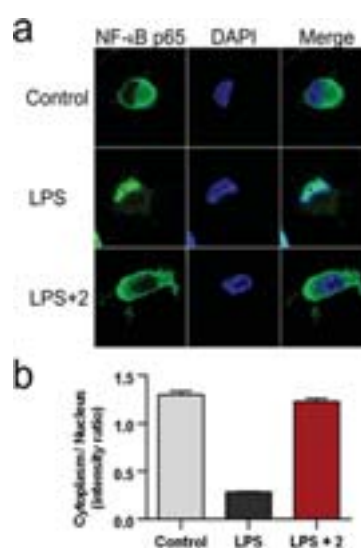


Figure 5. Cellular location of the NF- κ B p65 subunit in the presence or absence of LPS and conjugate 2. Conjugate 2 prevents NF- κ B p65 nuclear translocation in LPS-treated DCs. (a) A representative confocal microscopy image shows p65 in the cytoplasm of untreated cells, in the nucleus of LPS-treated cells, and in the cytoplasm of cells treated with both LPS and 2 (100 μ M). (b) Histograms show the ratio of cytoplasmic versus nuclear p65 analyzed in 170 cells. Bars correspond to SEM.

findings questioned our cross-talk hypothesis, since monocytes do not express C-type lectins DC-SIGN¹⁶ and MR.²⁵ To examine whether DC-SIGN is involved in the inhibitory effect of conjugates on TLR4, the effect of the compounds was compared in human monocytic THP-1-DC-SIGN cells and in THP-1 cells (that do not express DC-SIGN and MR). In both LPS-stimulated cell types, conjugates could inhibit IL-8 production (Supporting Information Figure 8Sa) and down-regulate expression of the CD54 marker (Supporting Information Figure 8Sb). These results indicate that the anti-inflammatory action of conjugates can occur independently of DC-SIGN expression.

To confirm that DC-SIGN was not required in the anti-inflammatory action of conjugates, we used the anti-DC-SIGN antagonist antibody AZND1 that targets the carbohydrate recognition domain.²⁶ This antibody did abolish the activity of mannodendrimers that inhibit LPS-treated DCs in a DC-SIGN-dependent fashion.²⁷ We found that preincubation of DCs with this antibody had no effect on TNF- α inhibition (Supporting Information Figure 9S). These results confirm that conjugates 2 and 2U have the capacity to inhibit TLR4 activation independently of DC-SIGN. They also question the importance of the role of the mannose heads of MGCs, previously shown to interact *in vitro* with DC-SIGN.

Structure–Activity Relationship Studies: Importance of the Mannose Heads and Lipid Chain. To elucidate the role of the mannose heads of 2 and 2U during their suppressive action, we used conjugates in which the mannose residues were either lacking or replaced with sugars, such as galactose and sialic acid, that do not interact with DC-SIGN or MR.

The NHPD conjugate constituted by a linker and a C24-lipid chain, but lacking a sugar head,¹⁶ was totally inactive. Similarly, the lipid docosahexaenoic acid (DHA) showed no effect (Figure 6a). These findings showed that a sugar head was required for an efficient immediate suppressive activity.

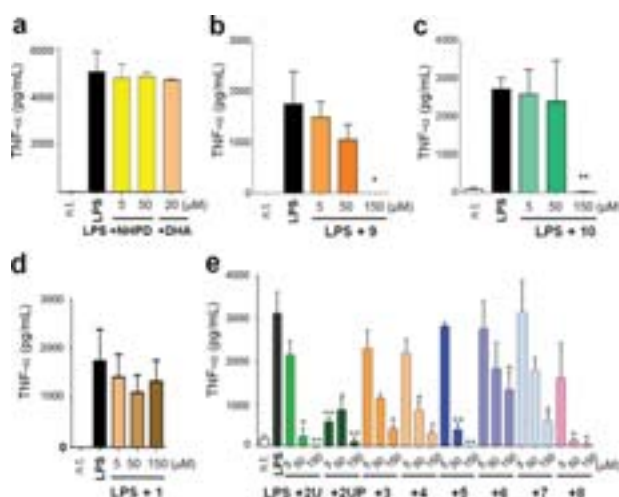


Figure 6. Structure–activity studies examining the inhibitory activity of modified conjugates. TNF- α production of LPS-activated DCs was analyzed after 24 h of treatment with compounds containing modifications of the sugar head, (a) no sugar and (b) TriGal_{C24}; (c) TriSial_{C24}; modifications of the lipid chain, (d) no lipid chain; and (e) distinct lipid tails. Data correspond to $n = 4$ independent assays.

Conjugate TriGal_{C24} **9** was previously described,¹⁷ and TriSial_{C24} **10** was newly synthesized (Figure 1). They could inhibit TNF- α production in LPS-treated DCs (Figure 6b, c) and down-regulate maturation markers (Supporting Information Figure 10Sa), although less efficiently than conjugates **2** and **2U** (Figure 2c). Only TriGal_{C24} **9** displayed some low cytotoxicity at 150 μ M in DCs (Supporting Information Figure 1Sb). Compound **2U** bearing a diacetylenic motif was photopolymerized under strong UV irradiation (8 h at 254 nm with 5 8W UV light tubes). This allowed us to compare the activity of dynamic micelles **2U** with rigid photopolymerized cross-linked polymers **2UP**.¹⁷ At low concentration, polymers displayed a better inhibitory activity of TNF- α production (Figure 6e), which highlights the role of the multivalent mannose presentation in polymers.

Together, these results clarified the role of the sugar moiety in the suppressive activity, showing that the sugar head is essential, with the optimal sugar being mannose compared with galactose or sialic acid residues.

To better understand the structural requirements of the lipid moiety and the importance of micelle formation, we synthesized conjugates containing a variety of lipid chains (Figure 1). To get a deeper insight into the physicochemical properties, we measured the critical micelle concentration (CMC) of all compounds (Supporting Information Table SP1). The most active compounds **2** and **2U** displayed low CMC values by the pyrene inclusion method (around 10 μ M). Compounds **3** (TriMan-DHA) and **4** (TriMan-ARA) contain a polyunsaturated fatty acids tail, respectively a docosahexaenoic acid (DHA) omega-3, C21-lipid chain and an arachidonic acid (ARA) omega-6, C19-lipid chain; they could not assemble into micelles. In conjugates **5**, **6**, and **7**, a benzene moiety was covalently linked at the end of a C14-, C10-, and C6-saturated lipid chain. Only compound **5** could form micelles, at a CMC of 78 μ M. We also synthesized conjugate **8** containing a cholesterol motif, known to interact differently with cell membranes, and able to form micelles at a CMC of 9.9 μ M. In primary cells, compounds **4** and **5** displayed no cytotoxicity up to 150 μ M. Compound **3** was slightly cytotoxic, and compound **8** was cytotoxic even at 50 μ M (Supporting Information Figure 1Sc).

First, we found that conjugate **1**, TriMan_{C1}, which lacks a lipid chain, was unable to affect LPS-induced cytokine release (Figure 6d) and DC maturation (Supporting Information Figure 10Sb), which demonstrated the importance of the lipid chain. Compounds **3**, **4**, and **5**, but not compounds **6** and **7** containing the shorter lipid chain, could efficiently inhibit TNF- α production, with an activity similar to that of conjugate **2U** (Figure 6e). The apparent inhibitory activity of **8** was explained by its cytotoxic effect.

These results showed that conjugates can accommodate a variety of lipid modifications (multiple double bonds, benzene) and that a long lipid chain (at least C14) is crucial for activity. They revealed that the formation of micelles is not required for inhibition of cytokine production.

Down-regulation of activated maturation markers (Supporting Information Figure 10Sc) was achieved only by conjugate **5**. It inhibited both cytokine production and cell maturation, with an activity similar to that of conjugates **2** and **2U**. Photopolymerized micelles **2UP**, having a caged lipidic core, were unable to significantly affect marker expression, showing again the importance of hydrophobic membrane interactions. This is in full agreement with our hypothesis of a dual interaction mode, since insertion into the cell membrane is blocked by

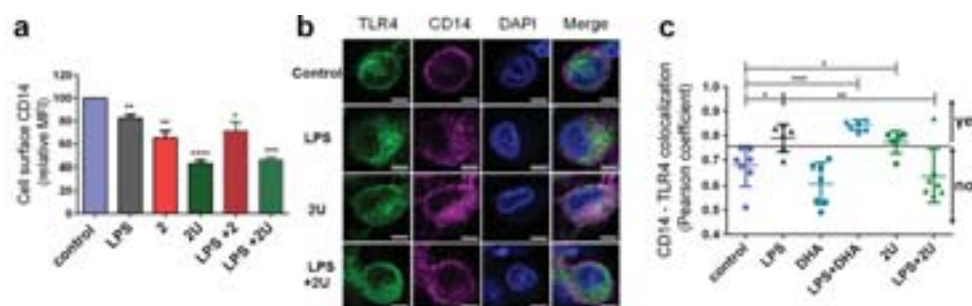


Figure 7. Effects of conjugates on DC membranes. (a) Cell surface expression of CD14 analyzed by flow cytometry, after 30 min of treatment with indicated compounds. (b) A representative confocal microscopy image shows the cellular location of CD14 and TLR4 in permeabilized cells, after 30 min of treatment with indicated compounds. Size bars: 5 μ m. (c) Pearson coefficient of colocalization of CD14 and TLR4 in permeabilized DCs. Each dot corresponds to a field of 10–15 cells. Data correspond to $n = 3$ independent assays. Dots above the gray line (area noted as yes) have an increased tendency for colocalization.

cross-linking of the lipid chain resulting from the photopolymerization process.

The apparent effect of **8** likely resulted from its cytotoxicity. These findings revealed a correlation between micelle formation and down-regulation of activated maturation markers. They also showed that conjugates modulate cytokine production and cell maturation by distinct TLR4-downstream pathways.

Our data demonstrated that the formation of micelles is not required for anti-inflammatory activity, such as inhibition of TNF- α . However, micelle formation appears important for modulation of the cell maturation markers. They stressed the importance of a long-enough lipid tail in conjugates and revealed that distinct lipid chains are functional, although they can affect differently TLR4-downstream signaling.

MGCs Act on Cell Membranes: They Internalize GPI-Linked Proteins. Since the lipid tail of conjugates is essential for their activity, it appeared crucial to investigate their interaction with cell membranes. It is likely that the lipid chain would insert into membranes and alter their composition. The fatty acid composition of cell membranes influences their fluidity, which modulates membrane bound receptors. Membranes contain microdomains, referred to as lipid rafts, which incorporate specific proteins such as glycosphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins^{28,29}

We examined the effect of conjugates **2** and **2U** on the cell surface expression of two GPI-linked proteins, CD1a highly expressed on DCs and CD14 involved in LPS cellular activation. CD14 acts as an associated molecule of TLR4 and plays a fundamental role in TLR4 signaling. DCs were treated for 30 min with LPS or conjugates or both, followed by flow cytometry analyses. LPS alone did not modify the cell surface expression levels of CD1a (Supporting Information Figure 11S) and weakly (20%) downregulated CD14 (Figure 7a). In contrast, levels of CD1a and CD14 were potently downregulated by conjugates **2** and **2U** (respectively 35% and 60%). These levels remained at their low values in the presence of conjugates and LPS. Visualization of CD14 cell location showed that the CD14 decrease at the cell surface correlated with increased internalization (Figure 7b).

These results indicated that conjugates have a disruptive action on lipid raft-located GPI-anchored proteins, CD1a and CD14, and induce their rapid cell internalization. Thus, the plasma membrane may be a principal target through which the modulatory effects of conjugates are mediated.

Our data agree with reports describing the effects of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on key cell surface markers, particularly CD14. Following DHA treatment, decreased levels of membrane CD14 and enhanced cytosolic levels are detected in microglial cells.³⁰ Conjugated linoleic acid also suppresses surface expression of CD14 during stimulation of macrophages. In contrast, EPA- and DHA-treated macrophages show enhancement of CD14 at the membrane along with decreased levels in the cytosol.³¹ Of note, other raft-disrupting non-lipid drugs, such as nystatin or methyl- β -cyclodextrin, inhibit LPS-induced TNF- α secretion without alteration of the cell surface expression of receptors involved in LPS activation but redistribute proteins out of lipid rafts.²⁸

MGCs Act on Cell Membranes: They Reorganize CD14 and TLR4 Location. In response to LPS, TLR4 is recruited to lipid rafts and associates with the GPI-anchored CD14 protein. This enhances the formation of a TLR4 dimer and association of TLR4 with MD-2 and adaptor molecules TRIF and MyD88,

leading to the activation of downstream signaling pathways. Thus, lipid raft integrity is essential for LPS-cellular activation, proper TLR dimerization, and initiation of the signaling cascade.^{32,33}

Conjugates have a disruptive action on membrane integrity, as shown above. We therefore examined whether **2U** could modify the respective localization of CD14 and TLR4, in the absence or presence of LPS. As a control, we used the lipid DHA that also disorganizes cell membranes. After 30 min of treatment, DCs were labeled and images visualized by confocal microscopy, followed by colocalization analysis (Figure 7b,c). As expected, in control cells and upon DHA treatment, CD14 and TLR4 did not colocalize: CD14 was present at the cell membrane, while most of TLR4 was cytoplasmic. LPS, as well as conjugate **2U** alone, induced CD14 internalization and some colocalization with TLR4. Interestingly, the addition of both LPS and **2U** prevented colocalization and resulted in a situation similar to that of control cells. Conjugate **2U** behaved differently from DHA, unable to prevent colocalization.

These findings showed that **2U** alone disrupts the respective localization of TLR4 and CD14 and promotes some colocalization, but without inducing pro-inflammatory signaling. Interestingly, in the presence of LPS, **2U** could prevent CD14 and TLR4 colocalization. These results suggest that the inhibitory action of conjugates is mediated by their effect on cell membranes: they likely alter lipid raft composition and interfere with the clustering of CD14 and TLR4 in rafts, which leads to impaired receptor-complex formation and blocking of signal transduction. This result may explain the extended effect of conjugates: they may block downstream signaling by disrupting the clustering of CD14 and TLR4 in plasma and endosomal membranes.

Similar effects are described for PUFA that alter lipid raft composition and interfere with their clustering, thus inhibiting inflammation.^{34,35} Peptide 4F alters membrane fluidity by cholesterol depletion, which destroys clustering of CD14 and TLR4 in rafts and leads to impaired receptor-complex formation.³⁶ DHA disrupts the organization of rafts but also nonrafts and upon 24 h exposure inhibits the pro-inflammatory effects of LPS on DCs.³⁷

Conjugate 2U Prevents Acute Lung Inflammation in Mice. Since conjugates displayed a potent anti-inflammatory activity *in vitro*, we tested whether the most active conjugate **2U** was active in a model of acute lung inflammation in response to LPS in BALB/c mice. Conjugate **2U** was administered intraperitoneally at different doses 1 h before LPS challenge. Infiltration of immune cells, especially neutrophils, into the lungs is an important component of the inflammatory response in acute pulmonary injury.^{38,39} It was monitored after 24 h by quantifying inflammatory cells, namely neutrophils, lymphocytes, and macrophages in the bronchoalveolar lavage fluid (Figure 8). Compared with the saline-treated mice, LPS treatment induced a potent recruitment of neutrophils and lymphocytes and did not alter the level of macrophages. Interestingly, pretreatment with conjugate **2U** before LPS challenge reduced the recruitment of neutrophils and lymphocytes in a dose-dependent manner, with a maximal activity of about 40% at the dose of 100 mg/kg. These data show that conjugate **2U** has an anti-inflammatory action in this mouse model, and actively prevents acute lung inflammation by reducing neutrophil and lymphocyte recruitment.

Conclusions. These studies have established that MGCs can display potent anti-inflammatory activities in human

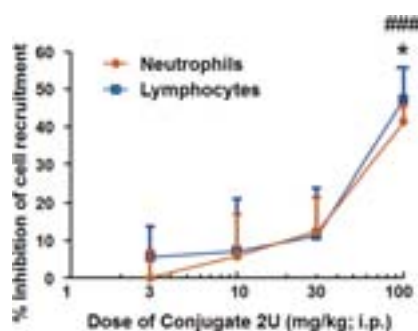


Figure 8. Conjugate 2U is active in a mouse model of acute lung inflammation. (a) Balb/c mice were treated with solvent or 2U administered i.p., 1 h before LPS challenge. Results show the dose-dependent inhibition of cell recruitment in BAL fluid after 24 h. Bars are SEM values ($n = 6$ per group). #### $p \leq 0.001$ versus control group and * $p \leq 0.05$ versus LPS group.

immune cells. They antagonize LPS-activated NF- κ B signaling and strongly suppress the release of pro-inflammatory cytokines including TNF- α . Importantly, our lead conjugate 2U is active in an acute mouse model of lung inflammation.

MGCs inhibit signaling through TLR4, without competing with LPS for binding to TLR4. Our structure–activity analysis indicates that the inhibitory activity of the conjugates relies on their sugar head and mostly on their lipid chain. Important roles of fatty acids in membrane order, lipid raft structure, and membrane trafficking are beginning to be unraveled.⁴⁰ In line with this, our data showed that the effect of MGCs on inflammatory signaling occurs at the membrane level. Conjugates induce a rapid cell internalization of lipid raft-located GPI-anchored proteins such as CD14 and disrupt the respective localization of TLR4 and CD14. Thus, the mechanism accounting for the anti-inflammatory effect of our conjugates is most likely interference with early membrane events involving CD14 and TLR4. Future investigations will be necessary to decipher their precise molecular mechanism and verify the hypothesis of disruption of TLR4 dimerization.

Finally, our data reveal the dual-functional roles of MGC, able to exert both anti-inflammatory and antiviral¹⁷ activities. This highlights the interest in MGCs that may provide new therapeutic applications in distinct inflammation-driven diseases.

METHODS

Cell Culture. All human primary cells and cell lines were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in RPMI 1640 supplemented with gentamycin and 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (complete medium). Human monocytes were purified from buffy coats by successive Ficoll and Percoll gradients. DCs were differentiated from monocytes by 5 days of culture with GM-CSF (50 ng mL⁻¹; Schering-Plough) and IL-4 (10 ng mL⁻¹; ImmunoTools). Proper differentiation was characterized by low CD14 and high CD1a and DC-SIGN expression levels. THP-1 cells were acquired from ATCC. THP-1-DC-SIGN cells are a kind gift from Dr. A. Sakuntabhai (Institut Pasteur, Paris, France).

Flow Cytometry. The cells' phenotype was analyzed using the following antibodies from BD Bioscience: HLA-DR-FITC (Tü39 or L243), MR/CD206-FITC (19.2), DC-SIGN/CD209-PerCP-Cy5.5 (DCN46), CD1a-APC (HI149), CD86-FITC (FUN-1), CD80-PE (L307.4), CD83-APC (HB15e), CD54-PE (HA58), and CD14-PE (MEM-15, ImmunoTools). Data were acquired on a FACSCalibur (Becton-Dickinson) or Gallios (Beckman-Coulter) after exclusion of dead cells by Sytox Red (Molecular Probes, Invitrogen) or 7-AAD

(BD-Pharmingen) DNA intercalating dyes. Data were analyzed using the Cell Quest Pro software (BD Bioscience) or FlowJo (Trestar).

Cell Activation. Cells cultured in complete medium were incubated in the presence of TLR ligands (InvivoGen): TLR2-TLR1 ligand Pam₃CSK₄ (1 μ g mL⁻¹), TLR3 ligand double-stranded RNA poly(I:C) (10 μ g mL⁻¹), TLR4 ligand Ultra pure *E. coli* K12 lipopolysaccharide (LPS: 10, 100, or 1000 ng mL⁻¹), TLR7/8 ligand R-848 (1 μ g mL⁻¹), or human IL-1 β (300 ng mL⁻¹; Affymetrix, eBioscience) at the indicated final concentrations. MGCs were usually added at the same time as the stimuli, or, where indicated, 2, 4, or 6 h after LPS.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). After 24 h of stimulation with TLR ligands, cell supernatants were collected and stored at -20 °C. Levels of cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, and TNF- α released in the media were measured by ELISA with the corresponding BD OptEIA Set (BD-Pharmingen). Levels of IFN- β were measured with the VeriKine human IFN- β ELISA kit (PBL Interferon Source).

Effect on Cell Surface Proteins. DCs (10⁵ cells) in complete medium (200 μ L) were plated in a 96-well plate. They were left untreated or treated with conjugates (100 μ M), LPS (1 μ g mL⁻¹) or their combination for 30 min at 37 °C. They were washed, kept on ice, labeled with anti-CD14-PE and anti-CD1a-APC, and analyzed by flow cytometry.

LPS Competition Assays. DCs were subjected to a 2-h stimulation with LPS (10, 100, and 1000 ng mL⁻¹) alone, or with LPS and conjugate 2U (50 μ M), followed by extensive washes. To ensure complete elimination of LPS signaling, cells were exposed to a neutralizing IgG monoclonal antibody to human TLR4 (InvivoGen, mabg-htrlr4; 5 μ g mL⁻¹) in the absence of 2U or with the addition of 2U after 30 min. After 24 h, cells were labeled with CD86, and expression was measured by flow cytometry. TNF- α secretion into the media was quantified by ELISA.

Confocal Microscopy. Cells (10⁵ per chamber) were cultured on poly-L-lysine-coated, eight-chamber slides (Lab-Tek, Nunc) in complete medium (300 μ L). After treatments and labeling, DAPI was used as nuclear counterstaining. Slides were mounted using Fluoromount (Dako). Images were acquired on a Zeiss LSM 780 confocal microscope with GaAsP detector and Zen acquisition software. Images were processed using the ImageJ software.

For NF- κ B localization, DCs were treated or not with LPS, in the presence or absence of conjugate 2 (100 μ M). Cells were washed, fixed with PFA 4% for 5 min, permeabilized with PBS/Triton X-100 (0.1%) for 5 min, labeled with antihuman NF- κ Bp65-AF647 (Santa Cruz Biotechnology), and amplified with antimouse IgG-AF488 antibody (Molecular Probes). The ratio of p65 fluorescence intensity in the cytoplasm versus in the nucleus was analyzed on 170 cells for each condition. For colocalization analysis of CD14 and TLR4, DCs were left untreated or treated with conjugates (100 μ M) or DHA (20 μ M) for 30 min. LPS (100 ng mL⁻¹) was added for 30 min. Cells were washed, fixed, permeabilized, and labeled with anti-TLR4 polyclonal goat antibody (R&D Systems AF1478, 5 μ g mL⁻¹) followed by AF₄₈₈-donkey antigoat (Molecular Probes, Invitrogen) and anti-CD14-APC (ImmunoTools).

In Vivo Assays in BALB/c Mice. All animals received humane care in compliance with the guidelines formulated by the French Ministry of Agriculture and of Higher Education and Research, and all procedures were reviewed by the Regional Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Strasbourg. Conjugate 2U was solubilized in sterile saline (Braun) at 0.38, 1.25, 3.8, and 12.5 mg mL⁻¹. Nine week-old male Balb/c mice received an intraperitoneal (i.p.) administration of compound 2U (3, 10, 30, and 100 mg kg⁻¹) 1 h before LPS intranasal administration (Sigma-Aldrich, L2880; 1 μ g/mouse). Six mice were used per condition. Control animals received equivalent volumes of saline (8 mL/kg) by i.p. route.

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed 24 h after LPS challenge as described.⁴¹ Mice were anaesthetized IP (Ketamine 300 mg/kg-Xylazine 20 mg/kg). After semiexcision of the trachea, a plastic cannula was inserted, and airspace washed with PBS-EDTA (0.5 mL; 3 mM) with a 1 mL syringe. This procedure was performed 10 times.

The remaining BAL fluid was centrifuged (300g for 5 min, 4 °C). Cell pellets were pooled, resuspended in PBS-EDTA (500 μ L; 3 mM), and used for total cell counts measured with a Celligo. Differential cell counts were assessed by flow cytometry (LSRII cytometer, BD Bioscience). BAL cells were mixed with FcR-block (0.5 μ L, 553142, BD Bioscience) in a black microplate, incubated for 20 min at 20 °C. Then, marker antibodies were added: CD11c-FITC (557400, BD Biosciences), Gr-1-PE (12-5931-85, eBioscience), CD11b-APC-Cy7 (557657, BD Biosciences), and CD45-AlexaFluor700 (103128, BioLegend), incubated for 30 min at 20 °C before 7-AAD (5 μ L, BD Biosciences) addition; flow cytometry was performed immediately. Live leukocytes were identified as CD45⁺/7-AAD⁻ cells. They were subdivided into lymphocytes (SSC-A^{low}CD11b^{low}), neutrophils (CD11b⁺CD11c⁻Gr1⁺), and macrophages (CD11b⁺Gr1⁻CD11c⁺).

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using paired Student's *t* test (for *in vitro* assays) or one-way ANOVA followed by Tukey's posthoc test (for *in vivo* assays). Data were considered significantly different when *p* was less than 0.05.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acscchembio.5b00552.

Synthesis and characterization of conjugates (NMR spectra, WST-1 assays), physicochemical characterization of conjugates (CMC, DLS), and additional *in vitro* assays on DCs, monocytes, and THP-1 cells (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: e.schaeffer@ibmc-cnrs.unistra.fr.

Author Contributions

[†]Contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS) and the Agence Nationale pour la Recherche (Program "Investissements d'Avenir," ANR-10-LABX-0034 MEDALIS; ANR-11-EQPX-022). We thank the Strasbourg/Esplanade imaging platform. V.F., F.P., P.N., and D.S. were supported by the Laboratory of Excellence Medalis, Initiative of Excellence (IdEx), University of Strasbourg, France.

■ REFERENCES

- (1) Akira, S., and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.
- (2) Kobayashi, M., Saitoh, S., Tanimura, N., Takahashi, K., Kawasaki, K., Nishijima, M., Fujimoto, Y., Fukase, K., Akashi-Takamura, S., and Miyake, K. (2006) Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J. Immunol.* 176, 6211–6218.
- (3) Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J. I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J., and Lee, J. O. (2007) Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130, 906–917.
- (4) Lu, Y. C., Yeh, W. C., and Ohashi, P. S. (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- (5) Peri, F., and Calabrese, V. (2014) Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update. *J. Med. Chem.* 57, 3612–3622.
- (6) Leon, C. G., Tory, R., Jia, J., Sivak, O., and Wasan, K. M. (2008) Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists:

a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharm. Res.* 25, 1751–1761.

- (7) Triantafilou, M., Gamper, F. G., Lepper, P. M., Mouratis, M. A., Schumann, C., Harokopakis, E., Schifferle, R. E., Hajishengallis, G., and Triantafilou, K. (2007) Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 9, 2030–2039.

- (8) Arranz, A., Juarranz, Y., Leceta, J., Gomariz, R. P., and Martinez, C. (2008) VIP balances innate and adaptive immune responses induced by specific stimulation of TLR2 and TLR4. *Peptides* 29, 948–956.

- (9) Liu, B., Yang, Y., Dai, J., Medzhitov, R., Freudenberg, M. A., Zhang, P. L., and Li, Z. (2006) TLR4 up-regulation at protein or gene level is pathogenic for lupus-like autoimmune disease. *J. Immunol.* 177, 6880–6888.

- (10) Devaraj, S., Dasu, M. R., Rockwood, J., Winter, W., Griffen, S. C., and Jialal, I. (2008) Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 578–583.

- (11) Zhou, X., Yuan, L., Zhao, X., Hou, C., Ma, W., Yu, H., and Xiao, R. (2014) Genistein antagonizes inflammatory damage induced by beta-amyloid peptide in microglia through TLR4 and NF-kappaB. *Nutrition* 30, 90–95.

- (12) Ahmed, A., Redmond, H. P., and Wang, J. H. (2013) Links between Toll-like receptor 4 and breast cancer. *Oncimmunology* 2, e22945.

- (13) Bevan, D. E., Martinko, A. J., Loram, L. C., Stahl, J. A., Taylor, F. R., Joshee, S., Watkins, L. R., and Yin, H. (2010) Selection, preparation, and evaluation of small-molecule inhibitors of Toll-like receptor 4. *ACS Med. Chem. Lett.* 1, 194–198.

- (14) Peri, F., and Piazza, M. (2012) Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists. *Biotechnol. Adv.* 30, 251–260.

- (15) Rodriguez Lavado, J., Sestito, S. E., Cighetti, R., Aguilar Moncayo, E. M., Oblak, A., Lainscek, D., Jimenez Blanco, J. L., Garcia Fernandez, J. M., Ortiz Mellet, C., Jerala, R., Calabrese, V., and Peri, F. (2014) Trehalose- and glucose-derived glycoamphiphiles: small-molecule and nanoparticle Toll-like receptor 4 (TLR4) modulators. *J. Med. Chem.* 57, 9105–9123.

- (16) Dehuyser, L., Schaeffer, E., Chaloin, O., Mueller, C. G., Baati, R., and Wagner, A. (2012) Synthesis of novel mannoside glycolipid conjugates for inhibition of HIV-1 trans-infection. *Bioconjugate Chem.* 23, 1731–1739.

- (17) Schaeffer, E., Dehuyser, L., Sigwalt, D., Flacher, V., Bernacchi, S., Chaloin, O., Remy, J. S., Mueller, C. G., Baati, R., and Wagner, A. (2013) Dynamic micelles of mannoside glycolipids are more efficient than polymers for inhibiting HIV-1 trans-infection. *Bioconjugate Chem.* 24, 1813–1823.

- (18) Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., Introna, M., and Allavena, P. (2003) Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J. Immunol.* 171, 4552–4560.

- (19) van Stijn, C. M., Meyer, S., van den Broek, M., Bruijns, S. C., van Kooyk, Y., Geyer, R., and van Die, I. (2010) Schistosoma mansoni worm glycolipids induce an inflammatory phenotype in human dendritic cells by cooperation of TLR4 and DC-SIGN. *Mol. Immunol.* 47, 1544–1552.

- (20) Geijtenbeek, T. B., and Gringhuis, S. I. (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 465–479.

- (21) Meyer zum Bueschenfelde, C. O., Unternaehrer, J., Mellman, I., and Bottomly, K. (2004) Regulated recruitment of MHC class II and costimulatory molecules to lipid rafts in dendritic cells. *J. Immunol.* 173, 6119–6124.

- (22) Martin, M. U., and Wesche, H. (2002) Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1592, 265–280.
- (23) Court, N., Rose, S., Bourigault, M. L., Front, S., Martin, O. R., Dowling, J. K., Kenny, E. F., O'Neill, L., Erard, F., and Quesniaux, V. F. (2011) Mycobacterial PIMs inhibit host inflammatory responses through CD14-dependent and CD14-independent mechanisms. *PLoS One* 6, e24631.
- (24) Piazza, M., Yu, L., Teghanemt, A., Gioannini, T., Weiss, J., and Peri, F. (2009) Evidence of a specific interaction between new synthetic antisepsis agents and CD14. *Biochemistry* 48, 12337–12344.
- (25) Wollenberg, A., Mommaas, M., Oppel, T., Schottdorf, E. M., Gunther, S., and Moderer, M. (2002) Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* 118, 327–334.
- (26) Engering, A., Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguët, V., and van Kooyk, Y. (2002) The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* 168, 2118–2126.
- (27) Blattes, E., Vercellone, A., Eutamene, H., Turrin, C. O., Theodorou, V., Majoral, J. P., Caminade, A. M., Prandi, J., Nigou, J., and Puzo, G. (2013) Mannodendrimers prevent acute lung inflammation by inhibiting neutrophil recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8795–8800.
- (28) Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D. T., and Triantafilou, K. (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.* 115, 2603–2611.
- (29) Nohe, A., Keating, E., Fivaz, M., van der Goot, F. G., and Petersen, N. O. (2006) Dynamics of GPI-anchored proteins on the surface of living cells. *Nanomedicine* 2, 1–7.
- (30) De Smedt-Peyrusse, V., Sargueil, F., Moranis, A., Harizi, H., Mongrand, S., and Laye, S. (2008) Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. *J. Neurochem.* 105, 296–307.
- (31) Dowling, J. K., McCoy, C. E., Doyle, S. L., BenLarbi, N., Canavan, M., O'Neill, L. A., and Loscher, C. E. (2013) Conjugated linoleic acid suppresses IRF3 activation via modulation of CD14. *J. Nutr. Biochem.* 24, 920–928.
- (32) Reuven, E. M., Fink, A., and Shai, Y. (2014) Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1838, 1586–1593.
- (33) Plociennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzecka, K., and Kwiatkowska, K. (2015) Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 557–581.
- (34) Kariko, K., Weissman, D., and Welsh, F. A. (2004) Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling—a unifying theme in ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 1288–1304.
- (35) Calder, P. C. (2010) Lipid-laden dendritic cells fail to function. *Cell Res.* 20, 1089–1091.
- (36) White, C. R., Smythies, L. E., Crossman, D. K., Palgunachari, M. N., Anantharamaiah, G. M., and Datta, G. (2012) Regulation of pattern recognition receptors by the apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 32, 2631–2639.
- (37) Williams, J. A., Batten, S. E., Harris, M., Rockett, B. D., Shaikh, S. R., Stillwell, W., and Wassall, S. R. (2012) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids segregate differently between raft and nonraft domains. *Biophys. J.* 103, 228–237.
- (38) Barnes, P. J. (2004) Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.* 56, 515–548.
- (39) Beeh, K. M., and Beier, J. (2006) Handle with care: targeting neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease and severe asthma? *Clin. Exp. Allergy* 36, 142–157.
- (40) Calder, P. C. (2013) n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proc. Nutr. Soc.* 72, 326–336.
- (41) Daubeuf, F., and Frossard, N. (2012) Performing bronchoalveolar lavage in the mouse. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2, 167–175.

« Science is not about building a body of known “facts”.
It is a method for asking awkward questions and subjecting them to a reality-check,
thus avoiding the human tendency to believe whatever makes us feel good. »

Sir Terry Pratchett

Résumé

Les réactions immunitaires de la peau sont initiées par les cellules dendritiques cutanées (dendritic cells, DCs). L'effet potentiellement sensibilisateur d'un composé peut être prédit *in vitro* en utilisant des monocytes humains différenciés en DCs (MonoDCs). Cependant, ces modèles simplistes restent imprécis car l'activation des DCs cutanés par les sensibilisateurs peut être déclenchée ou modulée par des interactions microenvironnementales avec de multiples types de cellules non immunitaires.

Notre objectif est de développer une peau immunocompétente qui combinera des MonoDCs avec tous les éléments structurels et fonctionnels de la peau, c'est-à-dire une barrière épidermique posée sur un derme contenant une pseudo-vascularisation et des neurones nociceptifs. Une matrice de collagène a étéensemencée avec des fibroblastes et des cellules endothéliales, puis avec des précurseurs de fibres nerveuses dérivées soit de l'iPSC humaine, soit de la DRG embryonnaire murins. Enfin, nous avons introduit les MonoDC et les kératinocytes.

Nous avons observé que les neurones différenciés *in situ* innervent l'épiderme comme observé habituellement dans la peau humaine normale. De plus, les neurones dérivées d'iPSCs, expriment neuropeptides et canaux calcique spécifiques des fibres nociceptives. Enfin, les Mono-DC intégrés au modèle restent stable pendant toute la durée nécessaire à la formation de l'épiderme et peuvent être stimulé.

Le modèle sera utilisé pour prédire le potentiel irritant des composés chimiques et l'impact de l'innervation nociceptive sur l'activation des DCs.

Abstract (Résumé en anglais)

Immune reactions in the skin are initiated by the cutaneous dendritic cells (DCs). The potential sensitizing effect of a compound can be predicted *in vitro* using human monocytes differentiated into DCs (Mono-DCs). However, these simplistic models remain inaccurate because the activation of cutaneous DCs by sensitizers may be triggered or modulated by microenvironmental interactions with multiple types of non-immune cells.

Our goal is to develop an immunocompetent human tissue-engineered skin that will combine DCs with all structural and functional element of the skin, i.e. an epidermal barrier laid upon a dermis containing a pseudo-vascularization and nociceptive neurons. Collagen matrix was seeded with fibroblasts and endothelial cells, then with precursors of nerve fibers derived from either human iPSC or murine embryonic DRG. Finally, we introduced Mono-DCs and keratinocytes.

We observed that *in situ* differentiated neurons grow axons towards the epidermis as usually observed in normal human skin. What's more, the neurons derive from iPSC, express neuropeptides and calcium channel as normal nociceptive fibers. Moreover, Mono-DCs settled as expected beneath the epidermis and remained sessile to stimulation for several weeks.

The model will be used to predict the irritant potential of chemical compounds, and the impact of nerves on DC activation.