



HAL
open science

Propriétés immunitaires des kératinocytes humains et de leurs précurseurs

Guillaume Mestrallet

► **To cite this version:**

Guillaume Mestrallet. Propriétés immunitaires des kératinocytes humains et de leurs précurseurs. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL052 . tel-04194152

HAL Id: tel-04194152

<https://theses.hal.science/tel-04194152>

Submitted on 2 Sep 2023

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

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

Propriétés immunitaires des kératinocytes humains et de leurs précurseurs

Immune properties of human keratinocytes and their precursors

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 oncologie : biologie - médecine - santé (CBMS)
Spécialité de doctorat: aspects moléculaires et cellulaires de la biologie Unité de
recherche : Université Paris-Saclay, CEA, Service de Recherche en Hémato
Immunologie, Paris, France et Laboratoire de Génomique et Radiobiologie de la
Kératinopoièse, Evry, France.
Référént : Faculté de Médecine

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 03/09/2021, par

Guillaume MESTRALLET

Composition du Jury

Christelle Monville

Professeur, docteur, Université d'Evry Val
d'Essonne, ISTEM, Evry.

Présidente

Laurence Amiot

Docteur, MCU-PH, HDR, Pôle de Biologie, CHU
Pontchaillou, IRSET - UMR INSERM 1085.

Rapporteur & Examinatrice

Nicolas Gaudenzio

Docteur, HDR, Institut Toulousain des Maladies
Infectieuses et Inflammatoires, Toulouse.

Rapporteur & Examineur

Jérôme Lamartine

Docteur, Professeur, Laboratoire de Biologie
tissulaire et Ingénierie Thérapeutique,
UMR5305 CNRS, Université Claude Bernard, Lyon.

Examineur

Direction de la thèse

Michèle Martin

Docteur, HDR, Université Paris-Saclay, CEA,
Laboratoire de Génomique et Radiobiologie de
la Kératinopoièse, Evry.

Directrice

Nicolas Fortunel

Docteur, HDR, Université Paris-Saclay, CEA,
Laboratoire de Génomique et Radiobiologie
de la Kératinopoièse, Evry.

Co-directeur

Nathalie Rouas-Freiss

Chef d'équipe, HDR, Université de Paris, CEA,
Service de Recherches en Hémato-Immunologie,
Paris.

Co-encadrante

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 8 |
| INTRODUCTION | 10 |
| I. Tissu cutané | 10 |
| 1) Organisation du tissu cutané | 10 |
| A) L'hypoderme | 11 |
| B) Le derme | 12 |
| C) La jonction dermo-épidermique | 12 |
| D) L'épiderme | 13 |
| E) Les annexes épidermiques | 14 |
| 2) Cellules souches cutanées | 16 |
| A) Les cellules souches de l'épiderme interfolliculaire | 16 |
| B) Les cellules souches des follicules pileux | 21 |
| C) Les modèles de différenciation des cellules souches épidermiques | 22 |
| 3) Modèles d'étude du tissu cutané | 24 |
| II. Acteurs cellulaires du système immunitaire cutané | 27 |
| 1) Acteurs non-issus du système hématopoïétique | 27 |
| A) Les kératinocytes | 27 |
| B) Les mélanocytes | 31 |
| C) Les fibroblastes | 32 |
| D) Les cellules endothéliales vasculaires | 32 |
| 2) Acteurs issus du système hématopoïétique | 34 |
| A) Les cellules dendritiques | 34 |
| B) Les lymphocytes T | 35 |
| C) Les mastocytes | 38 |
| D) Les macrophages | 38 |
| E) Les polynucléaires | 39 |
| F) Les cellules lymphoïdes innées | 40 |
| G) Les thrombocytes | 41 |
| III. Mécanismes moléculaires de l'immunité cutanée en conditions normales et pathologiques | 42 |
| 1) Mécanismes d'activation du système immunitaire cutané en conditions normales | 42 |
| A) La reconnaissance des pathogènes par les récepteurs TLR et NLR | 42 |
| B) L'activation immunitaire par le système HLA | 44 |
| a) Gènes et classification du système HLA | 44 |
| b) Présentation antigénique et activation immunitaire par le système HLA | 46 |

| | |
|---|-----------|
| c) Système HLA et tolérance de greffe | 48 |
| C) Régulation de l'immunité cutanée par les cytokines | 50 |
| a) Les cytokines primaires | 50 |
| b) Les cytokines secondaires | 52 |
| c) Les chimiokines | 53 |
| d) Les facteurs de croissance | 54 |
| e) Le système du complément | 54 |
| 2) Dysfonctionnements immunitaires cutanés en conditions pathologiques | 56 |
| A) Les pathologiques auto-immunes | 56 |
| a) La dermatite atopique | 56 |
| b) L'alopécie areata | 57 |
| c) Le psoriasis | 57 |
| d) Le vitiligo | 58 |
| B) La GVHD | 59 |
| IV. Lésions cutanées et thérapie cellulaire | 62 |
| 1) Processus de régénération cutanée | 62 |
| 2) Cas cliniques nécessitant une greffe | 64 |
| A) Epidémiologie et impacts socio-économiques des brûlures | 64 |
| B) Les autres situations pathologiques pouvant nécessiter une greffe cutanée | 66 |
| C) Les différents types de greffe utilisés | 67 |
| 3) Bio-ingénierie de greffons cutanés autologues | 69 |
| 4) Relation entre l'état d'immaturation des kératinocytes et leur immunogénicité | 71 |
| 5) Problématique du rejet de greffe allogénique | 72 |
| V. Acteurs moléculaires de la tolérance immunitaire : Focus sur HLA-G | 74 |
| 1) Modulation immunitaire via CTLA-4 et PD-L1 | 74 |
| 2) Découverte du gène HLA-G | 77 |
| 3) Isoformes de HLA-G | 77 |
| 4) Expression du gène HLA-G | 79 |
| 5) Régulation de l'expression d'HLA-G | 81 |
| 6) Action d'HLA-G sur ses récepteurs | 82 |
| 7) HLA-G et la modulation des cellules immunitaires | 83 |
| A) L'inhibition de la maturation des cellules dendritiques | 83 |
| B) L'inhibition de la fonction cytolytique des NK | 83 |
| C) L'inhibition de la prolifération et de la fonction des LT et des LB | 84 |
| D) HLA-G et la transplantation | 86 |
| PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS | 90 |

| | | |
|------------------------------|---|-----|
| I. | Contexte scientifique | 90 |
| II. | Problématiques | 91 |
| MATÉRIELS ET MÉTHODES | | 93 |
| I. | Modèles cellulaires et tissulaires | 93 |
| II. | Tri des cellules | 94 |
| III. | Amplification des cellules | 94 |
| IV. | Transduction et expression inductible d'HLA-G1 | 95 |
| 1) | Production de vecteurs lentiviraux | 95 |
| 2) | Protocole de transduction des kératinocytes | 96 |
| V. | Analyse de l'expression des marqueurs par cytométrie en flux | 96 |
| VI. | Imagerie et criblage à haut contenu | 97 |
| VII. | Western blot | 98 |
| VIII. | Analyse des propriétés immunogènes et immunosuppressives des cellules | 98 |
| 1) | Test de prolifération en thymidine | 99 |
| 2) | Test de prolifération en cytométrie en flux | 99 |
| 3) | Test avec les surnageants | 100 |
| 4) | Dégranulation des cellules effectrices | 100 |
| 5) | Tests de neutralisation | 101 |
| 6) | Cytotoxicité au chrome | 101 |
| IX. | Statistiques | 102 |
| RÉSULTATS | | 104 |
| I. | Propriétés immunitaires des kératinocytes humains | 104 |
| 1) | Les kératinocytes amplifiés sont hypo-immunogéniques et limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 +. | 104 |
| 2) | Les kératinocytes amplifiés limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 + qu'ils soient dans des conditions inflammatoires ou non. | 107 |
| 3) | L'immunomodulation par les kératinocytes amplifiés fait intervenir des facteurs solubles comme le TGF-β1. | 109 |
| 4) | L'immunomodulation par les kératinocytes amplifiés implique le checkpoint immunitaires PD-L1. | 111 |
| 5) | Les kératinocytes extraits de tissus expriment HLA-G1, ce qui les rend immunomodulateurs. | 114 |
| II. | Bio-ingénierie de kératinocytes plus immunomodulateurs, rôle d'HLA-G | 116 |
| 1) | Transduction de kératinocytes avec un vecteur HLA-G1 inductible. | 116 |
| 2) | L'expression inductible de HLA-G1 augmente l'immunomodulation par les kératinocytes amplifiés. | 119 |
| III. | Propriétés immunitaires des kératinocytes en fonction de leur degré d'immaturation | 146 |

| | |
|---|------------|
| 1) Les précurseurs de kératinocytes du tissu limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 +. | 146 |
| 2) Les précurseurs de kératinocytes limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 + après amplification ex vivo. | 148 |
| 3) Expression de HLA-G1 et PD-L1 selon le niveau d'ITA6 sur des kératinocytes amplifiés. | 150 |
| IV. Données supplémentaires | 168 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 186 |
| CONCLUSION | 194 |
| ANNEXES | 196 |
| I. Revue (Manuscrit en cours de soumission) | 196 |
| II. Cartes des vecteurs | 222 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 229 |
| RÉSUMÉ | 278 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----------|
| Figure 1) La peau fonctionne comme une barrière protectrice entre l'organisme et l'environnement..... | 11 |
| Figure 2) Organisation de l'épiderme humain..... | 14 |
| Figure 3) Organisation d'un follicule pileux..... | 15 |
| Figure 4) Les cellules souches kératinocytaires et les progéniteurs dans l'épiderme interfolliculaire..... | 20 |
| Figure 5) Les cellules souches kératinocytaires des follicules pileux..... | 22 |
| Figure 6) Renouvellement épidermique et différenciation des cellules souches kératinocytaires et des progéniteurs..... | 24 |
| Figure 7) Différents modèles cutanés..... | 26 |
| Figure 8) Relations des kératinocytes avec les cellules immunitaires..... | 31 |
| Figure 9) Organisation du système immunitaire cutané..... | 34 |
| Figure 10) Les TLR permettent la reconnaissance des pathogènes par les cellules..... | 44 |
| Figure 11) Organisation du système HLA..... | 46 |
| Figure 12) La présentation antigénique via le système HLA permet l'activation des lymphocytes T..... | 48 |
| Figure 13) Les mécanismes immunitaires impliqués dans le rejet de greffe allogénique..... | 50 |
| Figure 14) Les kératinocytes participent à la régulation de l'inflammation et favorisent le maintien d'une mémoire immunitaire via la sécrétion de cytokines..... | 55 |
| Figure 15) Dysrégulation de fonctions immunitaires cutanées dans un contexte physiopathologique..... | 59 |
| Figure 16) Mécanismes de la Cutaneous Graft-Versus-Host Disease..... | 61 |
| Figure 17) La cicatrisation de la peau..... | 63 |
| Figure 18) Epidémiologie et coûts dus aux brûlures en Norvège..... | 66 |
| Figure 19) Procédé d'autogreffe épidermique sur un jeune patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle..... | 68 |
| Figure 20) les stratégies immunomodulatrices candidates dans l'épiderme..... | 74 |
| Figure 21) Les propriétés immunomodulatrices de CTLA-4 et PD-L1..... | 76 |
| Figure 22) Les isoformes d'HLA-G..... | 79 |
| Figure 23) Les actions d'HLA-G actions sur différentes cellules immunitaires via ces récepteurs permettent une immunomodulation..... | 86 |
| Figure 24) Stratégie pour étudier les propriétés immunitaires des précurseurs de kératinocytes et moduler leur immunogénicité potentielle..... | 91 |

| | |
|--|-----|
| Figure 25) Les kératinocytes amplifiés sont hypo-immunogéniques et limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 +. | 106 |
| Figure 26) Les kératinocytes amplifiés limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 + qu'ils soient dans des conditions inflammatoires ou non. | 108 |
| Figure 27) L'immunomodulation par des kératinocytes amplifiés implique des facteurs solubles. | 110 |
| Figure 28) L'immunomodulation par des kératinocytes amplifiés implique le point de contrôle immunitaire PD-L1. | 113 |
| Figure 29) Les kératinocytes tissulaires expriment HLA-G1 qui leur permet d'être immunomodulateurs. | 115 |
| Figure 30) Transduction de kératinocytes avec un vecteur HLA-G1 inducible. | 118 |
| Figure 31) L'expression inducible de HLA-G1 augmente l'immunomodulation par les kératinocytes amplifiés. | 120 |
| Figure 32) Les précurseurs de kératinocytes du tissu limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 +. | 147 |
| Figure 33) Les précurseurs de kératinocytes limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 + après amplification ex vivo. | 149 |
| Figure 34) Expression d'HLA-G1 et de PD-L1 selon le niveau d'ITA6 sur des kératinocytes amplifiés. | 151 |
| Figure 35) Propriétés immunitaires des kératinocytes, de leurs précurseurs, et bio-ingénierie de greffons. | 192 |
| | |
| Figure supplémentaire 1) Surnageant de fibroblastes et inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4+. | 168 |
| Figure supplémentaire 2) L'isoforme exprimée sur les kératinocytes est HLA-G1. | 169 |
| Figure supplémentaire 3) Expression d'ILT2 et d'ILT4 par les kératinocytes avec ou sans conditions inflammatoires. | 170 |
| Figure supplémentaire 4) Toxicité de la doxycycline sur les kératinocytes. | 171 |
| Figure supplémentaire 5) Niveaux d'ITA6 et d'EGFR sur les kératinocytes tissulaires. | 172 |
| Figure supplémentaire 6) Influence du milieu sur l'expression d'ITA6 sur les kératinocytes. | 173 |
| Figure supplémentaire 7) Influence du milieu sur l'expression d'ITA6 sur les kératinocytes. | 174 |
| Figure supplémentaire 8) Influence du milieu sur l'expression d'EGFR par les kératinocytes. | 175 |
| Figure supplémentaire 9) Expression d'HLA-G1 et de PD-L1 selon le niveau d'EGFR sur les kératinocytes amplifiés. | 176 |
| Figure supplémentaire 10) Influence de l'EGF sur l'expression de PD-L1 par les kératinocytes. | 177 |

| | |
|---|------------|
| Figure supplémentaire 11) Profils immunitaires des cellules souches des kératinocytes, des cellules différenciées et des progéniteurs juste extraits du tissu. | 178 |
| Figure supplémentaire 12) Kératinocytes et inhibition de la cytotoxicité des NK..... | 179 |
| Figure supplémentaire 13) Influence du milieu sur l'expression de la protéine HLA-G1 sur les kératinocytes au cours du temps. | 180 |
| Figure supplémentaire 14) Expression de protéines immunitaires sur des kératinocytes amplifiés dans 2 milieux au cours du temps..... | 181 |
| Figure supplémentaire 15) Expression des protéines immunitaires en fonction de la stimulation des kératinocytes avec de l'IFN-γ et/ou du TNF-α. | 182 |
| Figure supplémentaire 16) Transcrits du système immunitaire régulés à la hausse / à la baisse dans un modèle de précurseurs des kératinocytes..... | 184 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADH+ : kératinocytes sélectionnés par adhérence sur collagène I
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique codant ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager Bulge : zone renflée du follicule pileux
CD71 : cluster de différenciation 71, récepteur à la transferrine
CEA : Commissariat à l’Energie Atomique
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DED : Derme dé-épidermisé
EGF/EGFR : Facteur de croissance épidermique / son récepteur
FGF : facteur de croissance fibroblastique
G1-S-G2-M : phases du cycle cellulaire
GFP : green fluorescent protein
GO : gene ontology
GVHD : maladie du greffon contre l’hôte
HF : follicule pileux
HLA : Human Leucocyte Antigen
iPSC : cellule souche pluripotente induite
ITA6 : intégrine- $\alpha 6$
IL : interleukine
kDa : kilo dalton
KLF4 : Krüppel Like Factor 4
KRT : kératine
KSFM : keratinocyte serum free medium
LT : lymphocyte T
CMH : complexe d'histocompatibilité majeur
miR : micro ARN
MOI : multiplicité d’infection
PD-L1 : programmed death-ligand 1
RNA-seq : séquençage de l’ARN
SEM : erreur standard à la moyenne
SVF : serum de veau foetal
TGF- β : facteur de croissance transformant β

INTRODUCTION

I. Tissu cutané

1) Organisation du tissu cutané

La peau humaine est une surface d'échange et un tissu protecteur de 2m^2 ¹ chez l'adulte et représente 7% du poids d'un individu en moyenne (3kg chez la femme, 5kg chez l'homme). Ses principales fonctions sont d'assurer un rôle d'échanges avec le milieu extérieur (transpiration, excrétion), de thermorégulation et de protection (contre les rayons, la chaleur et les agents infectieux). Elle permet aussi la synthèse de la vitamine D et a un rôle sensoriel avec en moyenne 50 récepteurs/cm² (thermorécepteurs, mécanorécepteurs, nocicepteurs...) ².

Le tissu cutané présente une structure stratifiée avec plusieurs couches. La plus basale est l'hypoderme, un tissu graisseux. Au-dessus se situe le derme, un tissu conjonctif de soutien, composé principalement de fibroblastes, mais aussi de cellules immunitaires et de cellules nerveuses et endothéliales vasculaires. Il est séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique. Outre ces différentes couches, la peau contient aussi des extensions, formant les ongles et les follicules pileux, ainsi que diverses glandes. Les follicules pileux, présent sur toute la surface exceptée la plante des pieds et la paume, permettent la thermorégulation et la mécano-perception. Les ongles sont composés de cellules mortes et totalement kératinisées. Les glandes sébacées produisent du sébum, permettant l'imperméabilité de l'épiderme et la lubrification des cheveux.

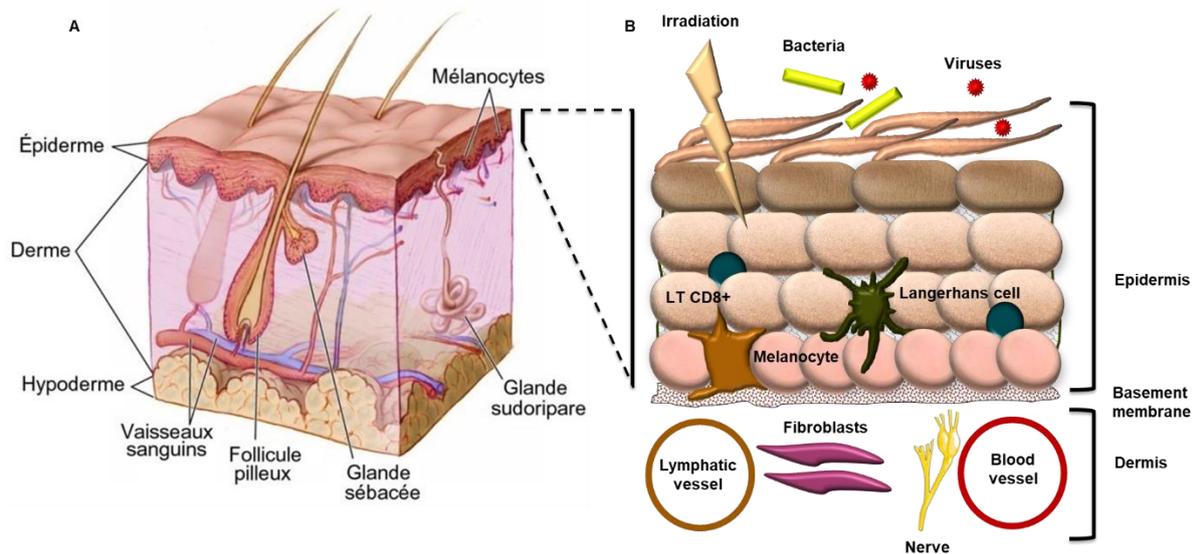


Figure 1) La peau fonctionne comme une barrière protectrice entre l'organisme et l'environnement

A. La peau humaine est un tissu stratifié de trois couches, l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Source : National Cancer Institute, NIH B. L'épiderme assure une fonction barrière contre les pathogènes extérieurs (bactéries, virus) et les rayons ionisants. Il est soutenu par le derme, un tissu conjonctif nutritif.

A) L'hypoderme

L'hypoderme est situé entre les muscles et le derme. C'est un tissu d'origine mésodermique grasseux et conjonctif. Il protège l'organisme contre les déperditions de chaleur et les chocs. C'est aussi un réservoir énergétique riche en lipides et permettant la synthèse d'hormones (leptine, estrone). Il est composé de grappes d'adipocytes, séparées par du tissu conjonctif, contenant les nerfs et des réseaux vasculaires. Ces derniers permettent l'apport en oxygène et en nutriments et confèrent des propriétés sensibles à la peau. La composition de l'hypoderme en adipocytes dépend du site anatomique. Il contient une matrice de collagène de type 1 et de l'élastine³. Il contient des macrophages qui pourraient stimuler la thermorégulation en cas de refroidissement corporel et d'activité physique⁴.

B) Le derme

Le derme est composé de tissu conjonctif et de matrice extracellulaire. Il contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, permettant les échanges nutritifs des cellules cutanées. Il contient aussi les follicules pileux, les glandes sébacées, les glandes sudoripares, des mécanorécepteurs et des cellules immunitaires (cellules dendritiques, lymphocytes)³. Il est divisé en deux couches⁵. La couche réticulaire est la plus profonde, avec beaucoup de tissu conjonctif, des protéoglycanes, du collagène de type 1 et 3 ainsi que des vaisseaux sanguins. Le collagène permet la cohésion du tissu, tandis que l'élastine permet son élasticité et sa flexibilité. Les protéoglycanes permettent au tissu d'être hydraté. Il forme des invaginations dans l'épiderme, les papilles dermiques, augmentant la surface d'échanges. La seconde couche est la couche papillaire, plus fine et superficielle. Elle contient des fibres de collagène 3, des fibres et des capillaires.

Le derme est sans cesse modifié par l'action d'enzymes protéolytiques synthétisées par les cellules. Les principales cellules du derme sont les fibroblastes, qui sécrètent la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance (TGF- β , TNF- α) et des protéases. La matrice extracellulaire ainsi sécrétée permet la prolifération des kératinocytes. Les fibroblastes interviennent aussi dans la cicatrisation.

C) La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique est une matrice extracellulaire qui sépare le derme de l'épiderme. Elle est sécrétée par les kératinocytes basaux et est composée principalement de collagène 4, de laminine 5, de nidogène et de perlecan. Elle permet les échanges moléculaires et cellulaires entre le derme et l'épiderme. La présence d'hémidesmosomes entre les kératinocytes et la jonction dermo-épidermique permet l'ancrage de l'épiderme au derme et la cohésion du tissu. Ces hémidesmosomes permettent la liaison entre la laminine 5 de la lame basale, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, une protéine transmembranaire des kératinocytes basaux, et les filaments de kératine 5 et 14 intracellulaires. La jonction dermo-épidermique permet aussi la migration des kératinocytes vers la plaie en cas de blessure et donc la régénération cutanée⁶.

D) L'épiderme

L'épaisseur de l'épiderme est variable, de 0.05mm pour les paupières à 1,5mm pour la plante des pieds ⁷, en passant par 0,5mm pour les bout des doigts ⁸. Il est d'origine ectodermique et se renouvelle chez l'homme en moins de 28 jours. C'est un tissu pavimenteux pluristratifié ⁹. Il y a plusieurs zones au niveau de l'épiderme, les glandes sébacées, les follicules pileux produisant les poils et cheveux des mammifères, et l'épiderme interfolliculaire au rôle de barrière et de surface d'échange vis-à-vis de l'extérieur.

L'épiderme interfolliculaire est composé de 85 à 95% de kératinocytes (KC) et présente lui-même une structure stratifiée de 4 couches. La plus basale (ou couche germinative), contient notamment 0,1 à 1% de cellules souches, permettant le renouvellement de l'épiderme tous les 28 jours en moyenne ¹⁰ ainsi que sa régénération en cas de blessure. C'est la seule couche de l'épiderme interfolliculaire qui contient des précurseurs kératinocytaires. Au-dessus se situe la couche supra-basale (ou couche épineuse) où débute le processus de différenciation, qui se poursuit dans la couche granuleuse. Ces couches ont une épaisseur de 5 à 10 kératinocytes ayant perdu leur capacité de prolifération et qui s'allongent au fur et à mesure de leur différenciation. Elles peuvent aussi produire des corps lamellaires ⁹. Il y a une importante production de protéines structurales (involucrine, filaggrine et kératines dans la couche granuleuse permettant la mise en place d'une fonction barrière efficace. Enfin le processus de différenciation s'achève au niveau de la couche cornée, la plus externe, composée de cornéocytes, c'est-à-dire des kératinocytes totalement différenciés ¹⁰, anucléés et riches en protéines comme la kératine assurant la fonction barrière vis à vis de l'extérieur. Ils sont orientés parallèlement à la lame basale. Les espaces intercellulaires de la couche cornée sont riches en lipides, ce qui favorise son rôle de barrière avec l'environnement et limite les pertes d'eau ¹¹. Les transglutaminases permettent de lier les kératines, la filaggrine, la loridine, l'involucrine et les lipides de manière covalente, assurant l'imperméabilité du tissu. Les cornéocytes totalement différenciés n'ont plus de desmosomes, ce qui conduit à leur desquamation ¹². Les cellules souches kératinocytaires basales indifférenciées expriment les kératines K5 et K14, tandis que les cellules épineuses et granulaires expriment les kératines K1, K10 et l'involucrine ¹³.

L'épiderme n'est pas vascularisé, les kératinocytes reçoivent donc des nutriments et éliminent les toxines par diffusion à travers le derme et la membrane basale, composé de collagène 4, de nidogène, de laminine et de perlecan ⁵. L'épiderme contient aussi dans la

couche basale des cellules de Merkel, permettant la perception mécanique ¹⁴, et 5 à 10% de mélanocytes, synthétisant la mélanine protectrice contre les UV. La mélanine produite par les mélanocytes est absorbée par les kératinocytes adjacents ce qui protège leur ADN des rayons UV. Des cellules immunitaires, les cellules de Langerhans, sont présentes dans la couche épineuse.

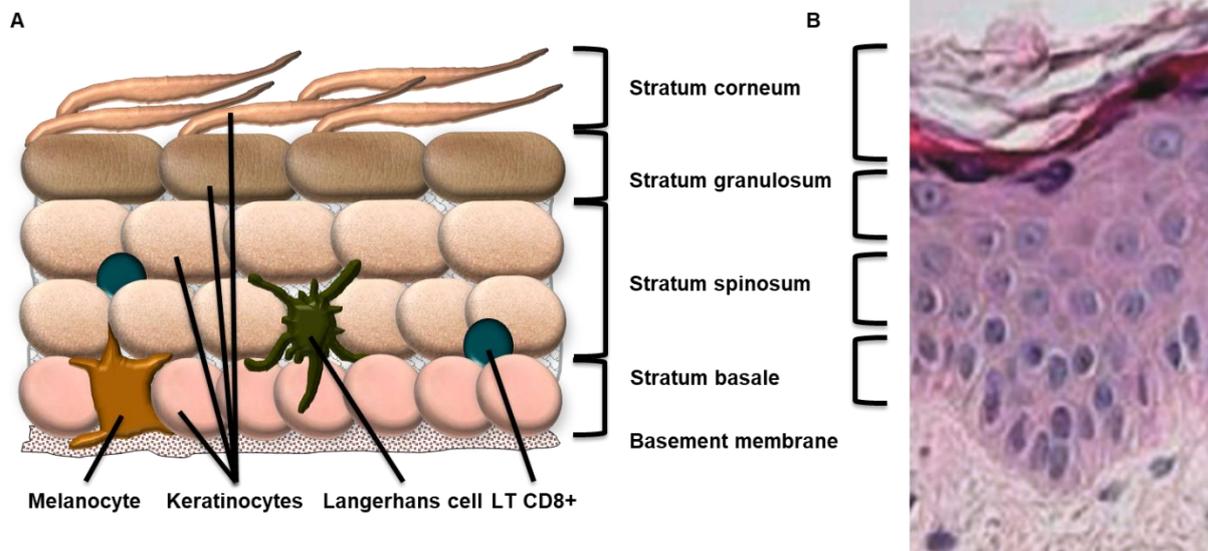


Figure 2) Organisation de l'épiderme humain

L'épiderme interfolliculaire est composé de 85 à 95% de kératinocytes et présente une structure stratifiée de 4 couches. La plus basale est la couche germinative, puis viennent la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Il contient également des mélanocytes et des cellules immunitaires. **A.** Schéma des couches de l'épiderme interfolliculaire humain. **B.** Coupe anatomique d'un épiderme humain coloré à l'hématoxyline-éosine-safran. Source : Fortunel et al., 2011

E) Les annexes épidermiques

Les annexes épidermiques, d'origine ectodermique, comprennent les poils, les ongles, les glandes sudoripares et les glandes sébacées. Elles sont ancrées dans le derme et traversent l'épiderme. Les kératinocytes qui les entourent peuvent également être mobilisés lors du processus de cicatrisation et de renouvellement cutané ^{15,16}. Les glandes sudoripares permettent la thermorégulation et la détoxification du tissu via la production de sueur. Elles

ont une glande sécrétrice dans le derme qui libère la sueur à travers une section tubulaire débouchant à la surface de l'épiderme.

Les follicules pileux, le muscle érecteur et la glande sébacée associés forment une unité fonctionnelle pilo-sébacée. La contraction du muscle érecteur du poil en cas de stimulus thermique entraîne son redressement. Le follicule pileux est composé d'une tige entourée par une gaine cellulaire externe et une gaine interne ^{17,18}. Au niveau de l'isthmus, zone située entre la glande sébacée et la base du muscle érecteur du poil, se trouve un renflement (bulge en anglais), bien observé chez la souris mais moins bien chez l'humain. C'est au niveau de la gaine externe de ce renflement que se trouvent les cellules souches des follicules pileux ¹⁹. Lors de la catagène, la partie inférieure du follicule dégénère par apoptose et est renouvelée lors de la suite du cycle pileux. La télogène est une phase transitoire pendant laquelle le poil tombe avant de repousser à une vitesse de 0,33mm par jour lors d'une phase de prolifération, l'anagène. La glande sébacée est adjacente au follicule pileux et est composée de sébocytes. Ils sécrètent du sébum riche en lipides qui permet la lubrification du poil après libération par le conduit sécrétoire de la glande. Le sébum a également un rôle protecteur ¹⁷.

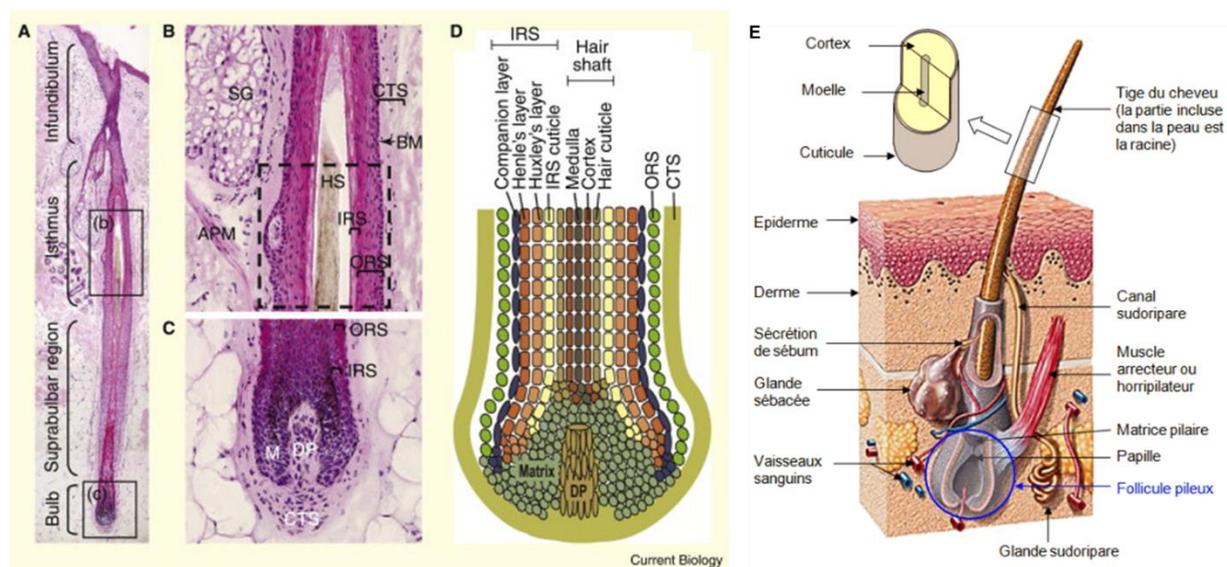


Figure 3) Organisation d'un follicule pileux

Le follicule pileux est composé d'une tige entourée par une gaine cellulaire externe et une gaine interne. Au niveau de l'isthmus, zone située entre la glande sébacée et la base du muscle érecteur du poil, se trouve un renflement (bulge en anglais), bien observé chez la souris mais moins bien chez l'humain. **A/B/C**. Coupe sagittale d'un follicule pileux humain, avec en B un zoom sur l'isthmus et en C un zoom sur le bulbe. **D**. Schéma du bulbe du follicule. APM : muscle érecteur du poil, BM : membrane basale, CTS : gaine de tissu

conjonctif, DP : papille dermique, HS : tige, IRS : gaine racinaire intérieure, M : matrice, ORS : gaine racinaire extérieure, SG : glande sébacée. Source : Schneider et al., 2009. E. Schéma d'un follicule pileux. Source : Vertex overblog, 2016.

2) Cellules souches cutanées

H.Green, le précurseur de l'étude des kératinocytes, et J.Rheinwald, ont isolé une lignée épithéliale dans un tératome de souris, qu'ils ont amplifiée en co-culture avec des fibroblastes murins 3T3 irradiés au rôle nourricier ²⁰. Green a ainsi permis de mieux comprendre les caractéristiques des précurseurs épidermiques ²¹. Il a permis aussi le développement de leur amplification in vitro ²² et le développement associé de soins pour les grands brûlés ²³. Il existe plusieurs types de cellules souches cutanées et elles peuvent se situer dans différents compartiments de la peau ²⁴. Il y a des cellules souches au niveau des renflements des follicules pileux ²⁵. Il a été montré avec des études sur des modèles murins qu'il existe aussi des cellules souches au niveau de l'épiderme interfolliculaire ^{16,26-30}.

A) Les cellules souches de l'épiderme interfolliculaire

La capacité des kératinocytes à avoir un phénotype souche est caractérisée par plusieurs aspects. Ils ont un fort potentiel clonogénique, permettent le renouvellement du tissu à long terme et sont caractérisés par des marqueurs moléculaires. Les cellules souches kératinocytaires sont également caractérisées par une position basale.

Elles ont un fort potentiel clonogénique, qui peut être mesuré avec la « colony-forming efficiency » (CFE), le pourcentage de cellules capables de former un clone ou une colonie ¹⁰. Les cellules souches épidermiques ont donc une CFE élevée tandis que les cellules différenciées ont une CFE basse. Il est ensuite possible de mesurer la capacité des clones issus d'une seule cellule à former de nouveaux clones. Les cellules de type souches sont caractérisées par un potentiel de croissance plus élevé que les cellules différenciées. Cela a permis de différencier différents types de clones, les holoclones, issus de kératinocytes

souches, les paraclones, issus de kératinocytes plus différenciés et les meroclones, issus de progéniteurs précoces ²¹.

Les holoclones (holo = entier) forment de grandes colonies (10-30 mm²) à croissance rapide, moins de 5% des colonies n'arrivent pas à terme et se différencient totalement. Les kératinocytes les composant sont de petite taille et les colonies denses, régulières et circulaires. Un holoclone correspond à la définition fonctionnelle d'une cellule souche. Les paraclones (para = à côté de) ont une croissance limitée forment tous des colonies terminalement différenciées, de taille réduite (5 mm²). Les kératinocytes les composant sont larges et forment des colonies irrégulières et non prolifératives. Un paraclone est donc issu d'une cellule différenciée. Les meroclones (méro = partiel) forment deux types de colonies, des colonies différenciées ou peu différenciées, en fonction du stade de différenciation de la cellule initiale. Leur croissance, leur potentiel prolifératif et leur morphologie sont donc hétérogènes. Les travaux de Barrandon et Green ont donc jeté les bases d'un modèle du renouvellement continu de l'épiderme interfolliculaire ²¹. Les cellules souches kératinocytaires, immatures et correspondant aux holoclones, produiraient des progéniteurs kératinocytaires, plus ou moins immatures et prolifératifs, correspondant aux meroclones, qui eux-mêmes se différencieraient en cellules non prolifératives et clonogéniques, correspondant aux paraclones.

Les cellules souches kératinocytaires permettent de régénérer le tissu en continu. L'étude de leur capacité à régénérer un épiderme in vivo est donc importante, tout comme celle de faire des peaux reconstituées avec des cellules amplifiées in vitro. Les kératinocytes issus d'un meroclone prolifératif avec 17 doublements de population permettent la reconstruction un épiderme normal in vitro ³¹. Les kératinocytes issus d'un holoclone permettent aussi la reconstruction un épiderme normal in vitro, même après 50 doublement de population ³¹, ce qui indique qu'ils contiennent des cellules très immatures.

Les kératinocytes basaux adhèrent à la lame basale et ses différents types de collagène. Or, les kératinocytes différenciés perdent leur capacité d'adhésion ³². De plus, les cellules qui adhèrent le plus vite au composants de la lame basale ont aussi le plus grand potentiel clonogénique et le plus fort niveau d'intégrine $\beta 1$ ³³. Il y a donc une corrélation positive entre adhésion et clonogénicité des kératinocytes. Enfin, ceux qui adhèrent le plus vite à une matrice de collagène de type 1 et qui expriment des niveaux faibles d'EGFR permettent de

reconstruire un épiderme *in vitro* à des passages plus tardifs que ceux exprimant des niveaux d'EGFR élevés ³⁴.

Le maintien des cellules souches et de l'homéostasie de l'épiderme peut faire intervenir des facteurs de croissance comme l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1). En effet, une délétion de l'IGF-1R entraîne une hypoplasie de l'épiderme et une diminution de la prolifération des kératinocytes ³⁵. De nombreux gènes sont impliqués dans le maintien ou non d'un phénotype souche des kératinocytes, comme KLF4 ³⁶, GRHL3 et ZNF750 favorisant leur différenciation, et HNRNPK, MYC, CYR61, FGFBP1, EGFR favorisant leur prolifération ³⁷. Ces gènes (KLF4, cMYC, OCT3/4 et SOX2) sont d'ailleurs utilisés pour générer des iPSCs à partir de kératinocytes ³⁸. L'interferon regulatory factor 2 IRF2 inhibe lui la capacité de prolifération des kératinocytes ³⁹.

Les cellules souches de l'épiderme interfolliculaire sont caractérisées par des marqueurs moléculaires, comme le phénotype $It\alpha 6^{high} CD71^{low}$. L' $It\alpha 6$ est un marqueur de la couche basale et ces cellules sont celles qui ont le plus fort potentiel de croissance et clonogénique. Ce résultat est cohérent avec le fait que les cellules adhérentes ont un potentiel souche plus élevé. Elles sont capables de proliférer sur le long terme, ont un état immature et quiescent ⁴⁰.

CD71 est un récepteur à la transferrine, qui permet l'apport de fer aux cellules lors de la mitose. Les cellules exprimant peu de CD71 sont quiescentes, tandis que celles qui en expriment beaucoup prolifèrent ⁴¹. Il y a donc une population $It\alpha 6^{high} CD71^{low}$ correspondant au phénotype souche, au fort potentiel de régénération de l'épiderme *in vivo* à long terme. A celle-ci s'ajoute une population $It\alpha 6^{high} CD71^{high}$ au phénotype de progéniteur activé, capable de régénérer rapidement l'épiderme mais pas sur le long terme ^{40,42-44}.

L'EGF-R est un autre marqueur de prolifération, c'est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs Rb qui se lie à l'EGF (Epidermal Growth Factor). Il contrôle la prolifération et la motilité des kératinocytes ²¹, ainsi que le maintien de l'immaturité des kératinocytes basaux ⁴⁵. Les kératinocytes souches sont aussi caractérisées par un phénotype $EGF-R^{low}$ ³⁴. Elles se distinguent des cellules progénitrices qui ont une forte capacité proliférative à court terme et exprimant un phénotype $It\alpha 6^{high} CD71^{high} EGF-R^{high}$ ^{34,40}.

Les kératines (KRT) sont des protéines structurelles fibreuses constituant les poils, les ongles et l'épiderme. Leur hydrophobie leur permet d'assurer la fonction barrière protectrice de l'épiderme. Les monomères de kératines s'assemblent en filaments intermédiaires, qui se

lient aux desmosomes ou permettent la différenciation des kératinocytes ⁴⁶. Certaines comme la KRT 5 et la KRT 14 sont exprimées seulement dans la couche basale de l'épiderme. La répression de l'expression de la KRT 14 entraîne une diminution de celle de la KRT 5, une réduction de la prolifération et un retard du cycle cellulaire *in vitro* ⁴⁷. En revanche, l'expression de marqueurs de différenciation, comme l'involucrine et de la kératine 1, est augmentée. Cela est lié à une modification de la phosphorylation de Akt et a permis de proposer la voie PI3K comme potentielle voie régulatrice ⁴⁷. Cela d'autant plus que l'inhibition de cette voie par la kératine 10, exprimée seulement dans les couches supra basales, ralentit la progression dans le cycle cellulaire ^{48,49}.

Les kératinocytes exprimant peu de desmogléine 3 ont un potentiel clonogénique et de croissance plus élevé ⁵⁰. Cette protéine est un composant des desmosomes et elle est moins présente dans la couche basale. Les kératinocytes exprimant peu de desmogléine 3 permettent de mieux reconstituer un épiderme sur un derme désépidermisé (De-Epidermalized Dermis, DED) et présentent une forte similarité avec les kératinocytes $Ita6^{high} CD71^{low}$ ⁵¹.

Il existe aussi d'autres marqueurs potentiels, comme CD29, CD44 et p63 ²⁴, mais il n'y a pas encore de consensus sur une combinaison de marqueurs caractéristique des cellules souches de l'épiderme. Chez l'humain, p63 pourrait assurer la discrimination entre CSK et progéniteurs ⁵². C'est un facteur de transcription impliqué dans le développement embryonnaire et l'homéostasie de l'épiderme. *In vivo*, p63 est fortement exprimé dans les CSK de la couche basale de la cornée, et il est moins exprimé lors de l'initiation de la différenciation des progéniteurs. P63 n'est pas détectable dans les kératinocytes différenciés. L'IL-17 et l'IL-22, en présence de TNF- α , permettent une surexpression des marqueurs CD29, CD44, CD49f (*Ita6*) et p63 sur les kératinocytes et donc un phénotype immature, similaire à celui retrouvé dans le psoriasis, avec des cellules prolifératives et capables de former des colonies ⁵³. Cette signalisation avec l'IL-17 et l'IL-22 passe par la voie RAC1/MEK/ERK/NF- κ B.

La voie Wnt contrôle la prolifération et la migration cellulaire et la polarisation du tissu lors de la morphogénèse embryonnaire de la peau ⁵⁴. Le facteur Wnt soluble se lie avec son récepteur membranaire Frizzled. En absence de liaison Wnt/Frizzled, la β -caténine, responsable de la transduction du signal, est dégradée dans le cytoplasme. Lorsque la voie est activée par la liaison Wnt/Frizzled, la β -caténine n'est plus dégradée et s'accumule dans le cytoplasme. Elle rentre le noyau où elle a un rôle de facteur activateur de la transcription. Or,

dans des coupes de peau humaine, les kératinocytes basaux $It\beta 1^{high}$ présentent un phénotype β -caténine^{low} 55. Le phénotype β -caténine^{low} serait donc un potentiel marqueur des CSK. A l'inverse, PIWIL-2 et les piARN (PIWI-interacting RNAs) sont exprimés de manière constitutive dans la peau et les kératinocytes in vitro. L'expression de PIWIL-2 et la régulation de piARN sont associés à une différenciation des kératinocytes en culture 56.

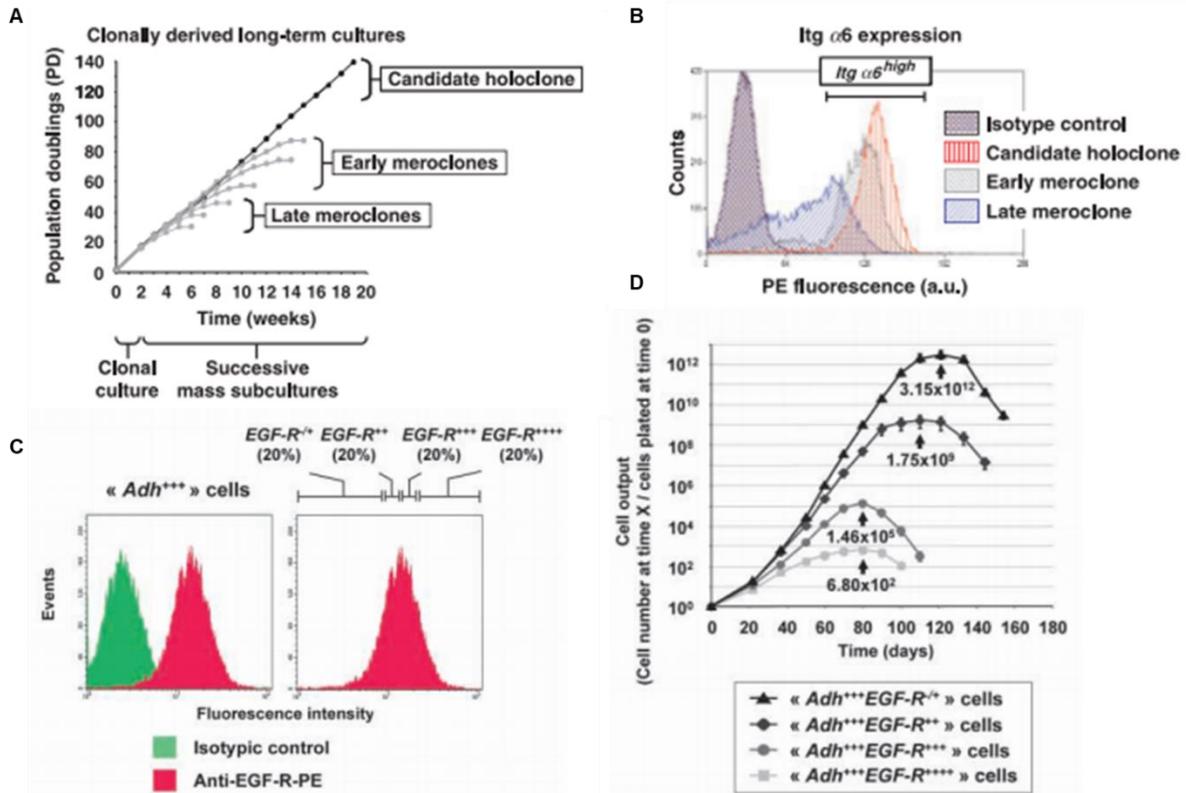


Figure 4) Les cellules souches kératinocytaires et les progéniteurs dans l'épiderme interfolliculaire

A. Différence de doublements de populations des clones de kératinocytes au cours du temps. Les holoclones permettent une culture à long terme et correspondent aux cellules souches adultes fonctionnelles. **B.** Différence de profil d'expression d'intégrine alpha 6 par les clones (ITA6). Les holoclones expriment un fort niveau d'ITA6. Source : Fortunel et al., 2010. **C.** Sélection de kératinocytes, pré-sélectionnés par adhésion au collagène (ADH+), avec différents niveaux de récepteur à l'EGF (EGF-R). **D.** Comparaison des croissances des kératinocytes en fonction du niveau d'expression de l'EGF-R calibrés en C. Les cellules exprimant peu d'EGF-R ont un potentiel de croissance à long terme plus élevé. Source : Fortunel et al., 2003.

B) Les cellules souches des follicules pileux

Le phénotype des cellules souches des follicules pileux est également décrit, en grande majorité sur des modèles murins. Les cellules souches du renflement des follicules pileux peuvent être activées et mobilisés à chaque cycle de régénération du follicule. Elles peuvent également l'être pendant la cicatrisation de la plaie et fournir des cellules permettant la réparation des tissus ²⁵. Le maintien des cellules souches du follicule pileux et la formation des progéniteurs des glandes sébacées est dépendant de la voie de signalisation Notch ⁵⁷. Curieusement, les colonies de deux cellules de kératinocytes présentent un mouvement de rotation. Ce mouvement est lié à la capacité proliférative des kératinocytes humains, plus la vitesse de rotation des deux cellules est élevée plus le potentiel de croissance des colonies est élevé ⁵⁸.

L'identification des cellules souches kératinocytaires représente un enjeu majeur. Des approches de traitement d'image des cultures des kératinocytes ont permis d'identifier ces cellules en se basant sur leur vitesse de locomotion ⁵⁹. Plusieurs marqueurs des cellules souches kératinocytaires des renflements des follicules pileux ont été identifiés. Il y a la kératine 15 (K15), l'intégrine $\beta 1$ et CD200 ¹³. Un grand nombre de facteurs de transcription sont impliqués dans le maintien des cellules souches de l'épiderme folliculaire murin, via le contrôle de gènes de la voie Wnt et BMP ⁶⁰. Des études sur la souris ont montré que le maintien d'hémidesmosomes au niveau basal via l'expression de COL17A1 permet de favoriser le maintien de clones de cellules souches au niveau basal ⁶¹. L'utilisation de séquençage d'ARN unicellulaire couplé aux RNAScope et à l'imagerie par fluorescence indique trois états basocellulaires non prolifératifs et un état prolifératif dans la peau murine homéostatique ⁶². Ils diffèrent par leurs caractéristiques métaboliques et leur localisation se spécifie lors de la réépithélialisation de la plaie. Il y aurait une hiérarchie de différenciation quasi linéaire où les cellules basales passent de l'état COL17A1High / Trp63High à une prolifération précoce. Cela va dans le sens d'un modèle hiérarchique révisé de l'homéostasie épidermique.

Toujours sur des modèles murins, il a été montré que l'âge a un impact important sur la capacité de renouvellement des cellules souches des follicules pileux. Le vieillissement entraîne une diminution du nombre de cellules souches, des modifications au niveau de l'expression des gènes de la matrice extracellulaire. En cas de transplantation, ces cellules souches ne peuvent régénérer l'épiderme que si elles sont associées à un derme jeune ⁶³.

Des observations cliniques chez l'humain indiquent que les cellules souches des follicules pileux ont des propriétés similaires à celles des souris. En effet, des kératinocytes dérivés du follicule pileux peuvent favoriser la cicatrisation¹⁵ ou être utilisés pour traiter des ulcères de jambe⁶⁴.

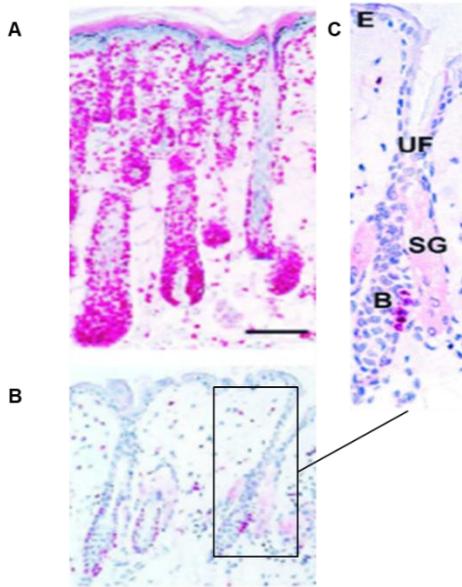


Figure 5) Les cellules souches kératinocytaires des follicules pileux

A. Coupe de peau murine en paraffine avec des cellules en prolifération marqués au BrdU. **B.** Même marquage après un “chase” de huit semaines. Les cellules du bulge sont les seules à conserver le marquage BrdU. **C.** Grossissement d'un follicule du B. E : épiderme, B : bulge, SG : glande sébacée, UF : follicule supérieur. Source : Taylor et al, 2000.

C) Les modèles de différenciation des cellules souches épidermiques

Les cellules souches épidermiques peuvent avoir des divisions symétriques, permettant d'obtenir 2 cellules souches, mais aussi des divisions asymétriques, permettant d'obtenir 1 cellule souche et 1 cellule amplificatrice. Il existe 2 principaux modèles de différenciation des cellules souches épidermiques. Le premier est hiérarchique et le second stochastique. Le premier implique que le potentiel de renouvellement des cellules non souche est limité, ce qui conduit à leur différenciation et à la conservation de quelques cellules souches. Le second modèle suppose que les cellules souches peuvent générer d'autres cellules souches, des

progéniteurs qui vont se différencier, ou les deux. Ce dernier modèle suppose donc que le nombre de clone peut varier et que le potentiel souche d'une cellule peut être déterminé de manière plus aléatoire ⁶⁵. Une étude sur du tissu humain néonatal avec du RNA-seq en cellules uniques a mis en évidence 4 populations de cellules souches basales et suprabasales en haut et en bas des crêtes de l'épiderme inter-folliculaire ⁶⁵.

Des kératinocytes issus de prépuces humains ont été transduits avec un lentivirus codant la GFP, puis greffés sur des souris pendant 28 jours. Des structures en forme de colonne exprimant la GFP ont été détectées, indiquant plutôt que les cellules souches sont dans la couche basale, avec les colonnes les plus étroites au fond des crêtes épidermiques ⁶⁶. Ces résultats sont donc plutôt en faveur d'un modèle hiérarchique chez l'homme, mais il n'existe pas encore de consensus.

Des études sur un modèle murin ont permis d'étudier la croissance de l'épiderme après la naissance, au cours de la croissance d'un individu ⁶⁷. Il semble qu'elle soit bien assurée par des progéniteurs basaux, présentant une homogénéité moléculaire et une capacité d'auto-renouvellement décroissante au cours des générations. L'orientation de la croissance des clones suit l'orientation des fibres de collagène sous-jacentes, ce qui permet la croissance linéaire de l'épiderme.

Une étude sur un modèle murin en résolution single-cell a mis en évidence les mécanismes d'expansion cutanée induite par étirement. Cette étude montre que l'étirement induit une expansion cutanée en favorisant transitoirement l'activité de renouvellement des cellules souches épidermiques, tandis qu'une seconde sous-population de progéniteurs basaux permet toujours la différenciation ⁶⁸.

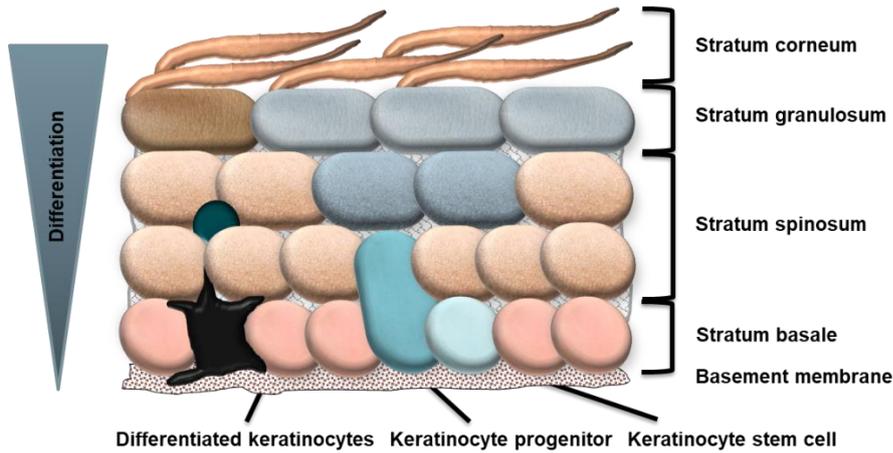


Figure 6) Renouvellement épidermique et différenciation des cellules souches kératinocytaires et des progéniteurs

Schéma de la différenciation des kératinocytes dans l'épiderme interfolliculaire. Les cellules souches kératinocytaires quiescentes sont au niveau basal. Elles peuvent donner une autre cellule souche ou devenir une cellule progénitrice cyclante. Ce progéniteur activé donne plusieurs cellules filles qui se différencient et perdent leur capacité de renouvellement en remontant à la surface de l'épiderme. Il y a un gradient de différenciation entre la membrane basale et la surface.

3) Modèles d'étude du tissu cutané

Plusieurs modèles de peau en 3D ont été développés ^{3,69}. Compte tenu de la mise en place d'une législation en 2013 visant à réduire ou parfois arrêter les tests sur les animaux, le développement de ces modèles présente une forte croissance. Toutefois, la plupart sont incomplets dans la mesure où ils ne contiennent pas toutes les cellules présentes dans le tissu, et notamment les cellules du système immunitaire. Ils peuvent être générés par des systèmes de microfluidique, par des iPSCs par exemple. Des modèles faisant intervenir de la bio-impression 3D sont également à l'étude.

Il peut y avoir une couche de fibroblastes sur une matrice de collagène, une couche de derme décellularisée et une culture de kératinocytes à l'interface air-liquide. Certains modèles contiennent aussi des cellules dendritiques, des cellules de Langerhans. Parfois, les cellules

immunitaires sont placées dans une couche d'agarose avec de la fibronectine. Dans certains modèles, il y a également des macrophages, et des LT dans une matrice de collagène.

Le modèle idéal permettrait un maintien des cultures à long terme, présenterait une structure similaire au tissu, avec un tissu adipeux, un derme, un épiderme, le tout vascularisé, innervé et contenant des cellules immunitaires. Il lui faudrait permettre d'étudier différentes pathologies, des infections, modéliser les réactions inflammatoires et permettre la détection de biomarqueurs. Il existe aussi une lignée de kératinocytes, la HaCaT, capable de proliférer et de se différencier *in vitro*.

Récemment, des organoïdes cutanés complexes ont été développés à partir de cellules souches pluripotentes humaines⁷⁰. Ils ont utilisé une modulation des voies de signalisation du facteur de croissance transformant β (TGF β) et du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) pour co-induire des cellules épithéliales crâniennes et des cellules de la crête neurale au sein d'un agrégat de cellules sphériques. Après 4 à 5 mois, ils ont obtenu un organoïde avec un épiderme stratifié, un derme riche en graisses et des follicules pileux pigmentés qui sont équipés de glandes sébacées. Les organoïdes cutanés ont formé une peau plane portant des poils lorsqu'ils ont été greffés sur des souris.

Il existe aussi des modèles murins qui permettent d'étudier le rôle d'un gène grâce à l'établissement de lignées génétiquement modifiées. Toutefois, ils diffèrent du tissu humain tant au niveau structurel que fonctionnel. Il existe chez la souris un muscle sous cutané permettant de contracter la peau, le panniculus carnosus, vestigial chez l'humain. Il jouerait un rôle thermorégulateur et dans la revascularisation des plaies⁷¹.

La peau murine contient également de très nombreux follicules pileux, ce qui fait que l'épiderme interfolliculaire, majoritaire chez l'homme, est réduit. La plupart des mélanocytes murins se trouve d'ailleurs au niveau des follicules pileux, alors que chez l'humain ils se situent dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire. Cette distribution différente entre les follicules pileux et l'épiderme interfolliculaire a aussi un impact sur le mode de renouvellement cutané chez les deux espèces. En effet, les cellules souches murines sont donc pour l'essentiel localisées au niveau du renflement des nombreux follicules tandis qu'elles sont plutôt au niveau de l'épiderme interfolliculaire chez l'humain. Les cellules souches épidermiques présentent par ailleurs des marqueurs pouvant être différents chez les deux espèces¹⁹. Le cycle des follicules pileux diffère également d'une espèce à l'autre. Il est

synchrone et actif surtout pendant les deux premiers mois chez la souris mais asynchrone et peu actif chez l'humain ⁷².

L'épiderme murin est aussi plus fin que l'humain (respectivement 2 à 3 couches de kératinocytes et moins de 25 µm d'épaisseur, contre 6 à 10 couches de kératinocytes et plus de 100 µm d'épaisseur) ⁷², ce qui fait que la fonction barrière est moins importante. Enfin, chez la souris, et contrairement à l'humain, la plupart des cancers n'est pas d'origine épithéliale (sarcomes ou lymphomes) ⁷². Les agents carcinogènes murins ne sont également pas les mêmes que chez l'humain ⁷³. Toutes ces différences sont à prendre en compte lors d'études sur les cancers cutanés ou les cellules souches épidermiques, et toute découverte chez la souris ne peut donc pas directement être extrapolée chez l'humain.

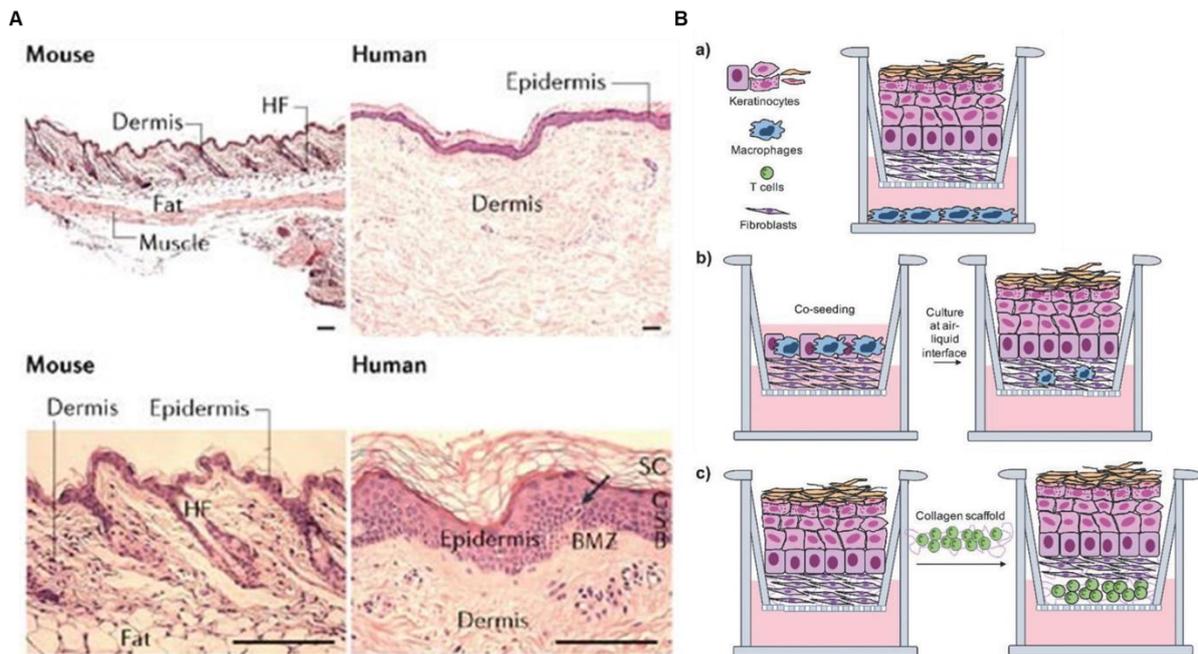


Figure 7) Différents modèles cutanés

A. Coupes anatomiques de peaux humaines et murines à différents grossissements (5X en haut, 20X en bas). L'épiderme murin est plus fin que l'épiderme humain et contient beaucoup plus de follicules pileux. Il est toutefois un modèle très utilisé pour l'étude de la peau et des pathologies associées. BMZ : membrane basale, B: couche basale, S : couche épineuse, G : couche granuleuse, SC : couche cornée, HF : follicule pileux. Source : Khavari, 2006. **Ba/b/c.** Différents protocoles de co-cultures de cellules immunitaires, de fibroblastes et de kératinocytes pour obtenir des modèles d'épidermes immunocompétents. Source : Pupovac et al., 2018.

II. Acteurs cellulaires du système immunitaire cutané

Lors d'une infection, du contact avec un agent chimique ou d'une irradiation, la peau se retrouve altérée et une réaction immunitaire se met en place. Cela se traduit souvent par une inflammation locale puis par un recrutement des cellules immunitaires sanguines. Ces dernières peuvent être des neutrophiles, des monocytes, des basophiles, des cellules dendritiques et des lymphocytes T (CD4, CD8, NK, $\gamma\delta$...) ⁷⁴. Les relations entre les cellules immunitaires et les cellules épithéliales sont très étudiées ⁷⁵.

1) Acteurs non-issus du système hématopoïétique

A) Les kératinocytes

Dans l'épiderme, plusieurs types de cellules impliquées dans l'immunité sont présents. Parmi eux, les kératinocytes ont un rôle de senseurs et de sécrétion des cytokines ^{74,76}. Les pathogènes sont reconnus grâce à l'expression de PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns) qui sont reconnus par les PRR (Pattern Recognition Receptors) des cellules ⁷⁷. Les PRR les plus connus sont les TLR (Toll Like Receptor). Les kératinocytes expriment plusieurs TLR (TLR1,2,3,4,5,6,7 et 9) ^{78,79}, ce qui permet une production d'interférons ⁸⁰ et donc le recrutement de cellules immunitaires. Ils expriment à leur surface plusieurs autres molécules impliqués dans les réponses immunitaires, comme ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), permettant le recrutement et le trafic des lymphocytes ⁸¹⁻⁸³, BB1 et B7-H1, permettant l'induction de la tolérance via une sécrétion d'IL-10 ⁸⁴. Les kératinocytes sont aussi capables de communiquer avec d'autres cellules de la peau via la sécrétion de vésicules extracellulaires contenant des cargos de lipides et de protéines variées ⁸⁵.

Ils ont la propriété d'exprimer non seulement les molécules du CMHI mais aussi celles du CMHII, ce qui permet la reconnaissance des antigènes par les cellules immunitaires. L'expression d'HLA-DR dans la peau se fait au niveau des CL, mais parfois aussi au niveau

des kératinocytes en cas de pathologie. En effet, dans le cas d'un eczéma, l'expression d'HLA-DR est située au milieu de l'épiderme, alors qu'elle est basale pour un lupus érythémateux discoïde ou un lichen ⁸⁶. Il est également à noter que la fixation de ligands sur des TLR induit l'expression de certains HLA. Par exemple, poly-I:C, un ligand du TLR3, induit l'expression du CMHI (HLA-ABC) et du CMHII (HLA-DR), tandis que la flagelline, un ligand du TLR5, induit l'expression du CMHI (HLA-ABC) et que le LPS, un ligand du TLR4, induit l'expression du CMHII (HLA-DR) ⁷⁹. Il existe toutefois une population de kératinocytes de petite taille n'exprimant pas de CMHI et 2 ⁸⁷.

Les kératinocytes pourraient donc avoir aussi des caractéristiques de cellules présentatrices d'antigène aux LT CD4+ suite à une stimulation par l'IFN- γ , parfois dans le cas d'une greffe ^{86,88,89}. Il semblerait que les kératinocytes soient capables de présenter des antigènes aux LT CD4+ et aux LT CD8+ mémoires, entraînant la production de cytokines et la lyse cellulaire ⁹⁰. Des travaux sur une lignée de kératinocytes ont mis en évidence la présentation antigénique via le CMHII ^{91,92}. Dans les 2 cas, l'expression d'ICAM1 est requise et l'expression de B7 (CD80 ou CD86) peut également avoir un impact ⁹³. Des travaux sur un modèle murin ont permis de montrer que l'expression de CMHII par les kératinocytes interfolliculaires permet l'accumulation de L Th1 en clusters via des interactions avec le microbiote cutané. La production d'IL-22 par les ILC3s ou les LT favorise l'expression du CMHII par les kératinocytes. Les monocytes favorisent aussi cette expression. Cela permet aux kératinocytes de faire de la présentation antigénique aux L Th1 qui s'accumulent en clusters et produisent de l'IFN- γ ⁹⁴.

CD40 est une protéine costimulatrice des LT présente sur les cellules présentatrices d'antigène. La liaison du CD40L des LTH au CD40 active les cellules présentatrices d'antigène et favorise l'expression de récepteurs au TNF, augmentant ainsi l'inflammation. CD40 est aussi exprimé par les kératinocytes ⁹⁵ et la liaison CD40/CD40L inhibe la prolifération des kératinocytes ⁹⁶.

Les kératinocytes sécrètent plusieurs types de médiateurs de l'immunité, comme les peptides antimicrobiens (AMPs), des alarmines, la plupart étant des défensines, des protéines S100 et des cathélicidines antimicrobiennes (LL37) ^{74,92,97,98}. Cette sécrétion d'AMPs peut être augmentée lors d'une infection suite à la production d'IL-17A et d'IL-22 par les lymphocytes TH17 ^{99,100} et d'IFN- γ ¹⁰¹. Cela amplifie la réponse inflammatoire. Les kératinocytes sécrètent beaucoup de cytokines aux fonctions diverses ⁷⁶. Parmi elles il y a des

cytokines primaires (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α), des chimiokines du type CXC (CXCL8, CXCL2, CXCL3, CXCL10), des chimiokines de type CC (CCL2, CCL13, CCL5, CCL20), des cytokines régulant l'immunité humorale (IL-12, IL-18), des cytokines activant les lymphocytes (IL-6, IL-7, IL15), des facteurs de croissance (TGF- α , PDGF, VEGF, M-CSF, GM-CSF, G-CSF), des cytokines immunosuppressives (IL-1ra, TGF- β , IL-10) et des interférons (IFN- γ)^{76,102}.

La production des facteurs de croissance permet la migration de cellules endothéliales et l'angiogenèse lors de la cicatrisation, ainsi que la prolifération des fibroblastes et leur production de matrice extracellulaire¹⁰³. L'IL-1 permet d'activer les lymphocytes TH, les cellules dendritiques (DCs) et promouvoir la maturation des lymphocytes B et leur expansion clonale¹⁰⁴. Les kératinocytes synthétisent de manière constitutive la pro IL-1 α et la pro IL-1 β mais ils sont sous forme inactive dans un épiderme sain. Lors d'une exposition aux UV, l'IL-1 β est libérée suite à l'activation de l'inflammasome, ce qui entraîne la production de cytokines inflammatoires¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Les kératinocytes activés exprimant CCL20, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 peuvent attirer les lymphocytes T, notamment lors de pathologies (psoriasis, lymphome cutané)¹⁰². Ils peuvent aussi recruter des neutrophiles en cas de psoriasis en exprimant CXCL1 et CXCL8¹⁰².

Les kératinocytes peuvent réguler la circulation des cellules de Langerhans via l'expression de CCL20¹⁰⁸. L'expression de CCL20 par les kératinocytes des follicules pileux permet la colocalisation et la rencontre des LC et des LTregs ce qui favorise l'induction de la tolérance. Le microbiote commensal cutané peut stimuler la sécrétion de CCL20 par les cellules épidermiques, ce qui active son récepteur CCR6 sur les cellules T régulatrices (Tregs) de la peau. Ensuite, les Tregs favorisent la tolérance des bactéries commensales, facilitant ainsi une bonne homéostasie immunitaire¹⁰⁹. Le CCL20 sécrété par les kératinocytes permet le recrutement des ILC ROR γ t⁺ au niveau des follicules pileux, où ils restreignent la prolifération des sébocytes. Cela limite la production de sébum, qui contient des lipides antimicrobiens, et favorise donc la colonisation par les bactéries Gram⁺¹¹⁰. La production de CCL20 et de CCL27 par les kératinocytes favorise également le recrutement des LT du sang exprimant CCR6 et CCR10⁹². Les kératinocytes sécrètent également en conditions inflammatoires du thymic stromal lymphopoietin (TSLP). Le TSLP permet l'expression de plusieurs facteurs pro-inflammatoires (TGF- β , BMP7, L17D, IL1F9, IL-24, SCF, CCL22, CXCL1, CXCL9, CCXL). Le TSLP se fixe aussi sur son récepteur présent sur

les LTreg de la peau ce qui permet le maintien d'une inflammation au niveau local et inhibe le développement d'une inflammation systémique pouvant être létale ⁹².

Plusieurs études suggèrent donc que les kératinocytes peuvent être des acteurs initiateurs de l'inflammation à travers la libération de ces cytokines. En effet, il semblerait qu'ils soient activés avant les autres cellules immunitaires lors d'une inflammation ^{81,111-113}. Les kératinocytes peuvent aussi sécréter des cytokines et des facteurs de croissance favorisant la cicatrisation ¹¹⁴. Les kératinocytes participent à la régulation de l'activation et de la prolifération des LT de la peau ^{115,116}. Les kératinocytes expriment peu de HLA-DR, de CD80 et CD86, ce qui fait qu'ils font peu de présentation antigénique. En présence d'IFN- γ , ils peuvent induire la tolérance des LT ¹¹⁷. La sécrétion de TSLP et de TGF- β par les kératinocytes leur permet de maintenir l'inflammation au niveau local et non pas systémique, assurant ainsi l'homéostasie du tissu via une interaction avec les LTreg ⁹².

Les kératinocytes participent donc à l'initiation de la réponse immunitaire et à sa régulation. Ils permettent de détecter les PAMPs et les alarmines avec les TLR et les NLR, ce qui active la voie NF- κ B et induit la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-18, TNF- α , IFN). Cela entraîne la migration des LC dans les ganglions lymphatiques ce qui favorise le recrutement de LT exprimant le marqueur cutané CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen). Les LT du sang sont aussi recrutés tout comme les LT CD4⁺ résidant dans la peau et ayant déjà été exposé à un antigène. L'expression des molécules liées au CMHI (MICA, MICB et ULBP) par les kératinocytes permet des interactions avec les LT CD8⁺ et les LT $\gamma\delta$ via le récepteur NKG2D. NKG2D favorise les réactions immunitaires et est exprimé par diverses cellules immunitaires résidentes ou infiltrant la peau ⁹².

La sécrétion de TGF- β et de TSLP par les kératinocytes participe à cette réponse pro-inflammatoire mais permet de la maintenir à un niveau local grâce à leur action sur les LTreg. Enfin, le TGF- β sécrété par les kératinocytes favorise le maintien d'une mémoire immunitaire cutanée en favorisant l'établissement de LT mémoires permettant une réponse rapide en cas de nouveau dommage ⁹². La sécrétion de TGF- β 1 joue un rôle important dans ce processus. En effet, ce facteur augmente l'expression de l'intégrine α E (ITGAE) dans les LT, favorisant ainsi sa liaison avec la E-cadhérine (gène CDH1) des kératinocytes. Cette interaction cellulaire favorise la rétention des LT mémoire résidents à la suite de lésions cutanées ⁹², et permet une réponse rapide en cas de nouveaux dommages. Des études sur un modèle murin ont montré que les cellules souches épidermiques ont une mémoire inflammatoire. Elle ne fait

pas appel aux LT ni aux macrophages cutanés. Des gènes comme Aim2 restent accessibles après un premier stimulus ce qui permet leur transcription rapide en cas de second épisode inflammatoire ¹¹⁸.

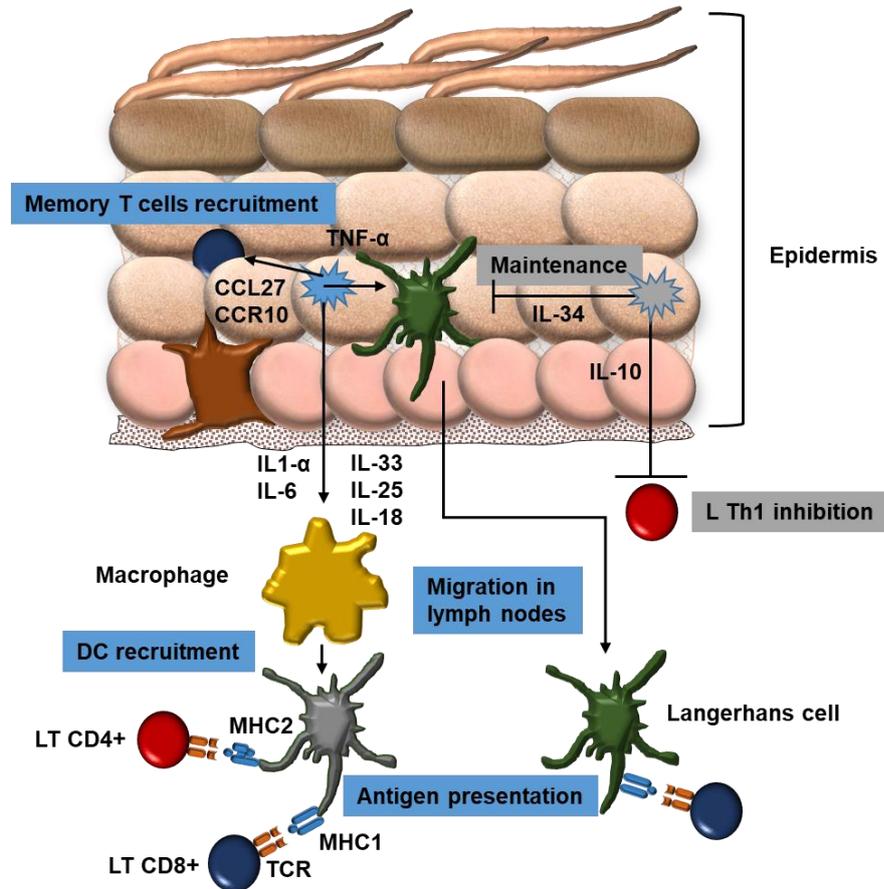


Figure 8) Relations des kératinocytes avec les cellules immunitaires

Activation ou inhibition du système immunitaire cutané par les kératinocytes.

B) Les mélanocytes

Ils interviennent dans la protection contre les rayons UV et sont localisés vers la couche dermo-épidermique. Cette protection contre les UV se fait via la sécrétion d'un pigment, la mélanine. Ils sont aussi capables de sécréter des cytokines (IL-1, TNF, des chimiokines de type CXC, de l'IL-12, des facteurs de croissance...) ¹¹⁹. En cas de Vitiligo, ils peuvent être plus sensibles au stress oxydatif et peuvent être détruits par l'immunité innée puis par les cellules de l'immunité adaptative (LT CD8+) ¹²⁰. En cas de Vitiligo, il y a une surexpression

du marqueur NKG2D par les LT CD8+ péri-lésionnels du patient. L'IL-15 augmente l'expression de NKG2D sur les LT CD8+. Les cellules dendritiques péri-lésionnelles du patient expriment les ligands de NKG2D. Le blocage spécifique de l'axe NKG2D/NKG2DL lors de l'activation lymphocytaire diminue la production de cytokines pro-inflammatoires ¹²¹.

C) Les fibroblastes

Dans le derme, il y a aussi des fibroblastes, qui sont des cellules mésenchymateuses, capables de libérer de l'IL-6 en grande quantité lorsqu'elles sont exposées à l'IL-1 α ^{122,123}. Ces cellules sont aussi la principale source de TNF- α suite à une irradiation aux UV, ce qui suggère un rôle d'amplification de l'inflammation suite à leur exposition aux cytokines produites par les kératinocytes ¹²⁴. Ils ont aussi un rôle de maintien de l'homéostasie cutanée. En effet, les fibroblastes dermiques expriment l'enzyme dégradant l'acide rétinoïque (RA) Cyp26b1, et réduisent ainsi le niveau de cette molécule qui induit l'expression dans les mastocytes de P2X7, un récepteur de l'ATP extracellulaire qui favorise l'inflammation ¹²⁵. Par ce mécanisme, les fibroblastes dermiques inhibent l'activation pro-inflammatoire des mastocytes ¹²⁵. Les fibroblastes expriment plusieurs TLR, sécrètent des peptides antimicrobiens (AMPs), comme LL-37 et des défensines comme hBD1 et 2. Ils expriment aussi des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-12, IL-10), des chimiokines (CCL1, CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL8, CXCL10 et CX3CL1), ainsi que des facteurs de croissance (GM-CSF, G-CSF). Cela leur permet de limiter la formation de biofilms bactériens et d'éliminer des pathogènes comme *S.aureus* ¹⁰³. Des systèmes de co-culture de fibroblastes et de kératinocytes ont montré que cela permettait d'augmenter la production de cytokines (IL-6) et de facteurs de croissance (VEGF) favorisant la bio-ingénierie de tissus cutanés ¹²⁶.

D) Les cellules endothéliales vasculaires

Ces cellules jouent un rôle dans le passage des cellules immunitaires du sang au tissu et réciproquement, via le processus de diapédèse et l'expression de molécules d'adhésion comme les immunoglobulines (ICAM, VCAM) et les sélectines (P et E). Ces molécules

d'adhésion peuvent se lier aux intégrines exprimées par les LT suite à l'expression de cytokines lors du processus de diapédèse. Des interactions se font aussi avec les molécules CLA permettant de sélectionner les LT qui deviendront résidents au sein du tissu cutané ¹²⁷. Le CLA exprimé par les LT interagit avec la sélectine E des cellules endothéliales, permettant la diapédèse des LT ¹²⁸. Les molécules d'adhésion sont stockées au sein de l'appareil de Golgi et peuvent être rapidement mobilisées lors de la diapédèse ¹²⁹.

Les cellules endothéliales expriment également tous les TLR ce qui leur permet de reconnaître les PAMPS et donc de moduler l'inflammation ^{130,131}. Ces cellules peuvent aussi sécréter des cytokines (IL-1 α , IL-1 β , CXCL8, CXCL2, CXCL3, CCL2, CCL20, M-CSF, GM-CSF, G-CSF, PDGF) ⁷⁶, ce qui permet le recrutement de cellules immunitaires lors de l'inflammation. Ce processus est également facilité par la sécrétion de facteurs vasodilatateurs (NO) ou vasoconstricteurs (endothéline) au niveau local. Ces cellules peuvent aussi faire de la présentation antigénique via une expression du CMH-2 et des molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86) ¹⁰³.

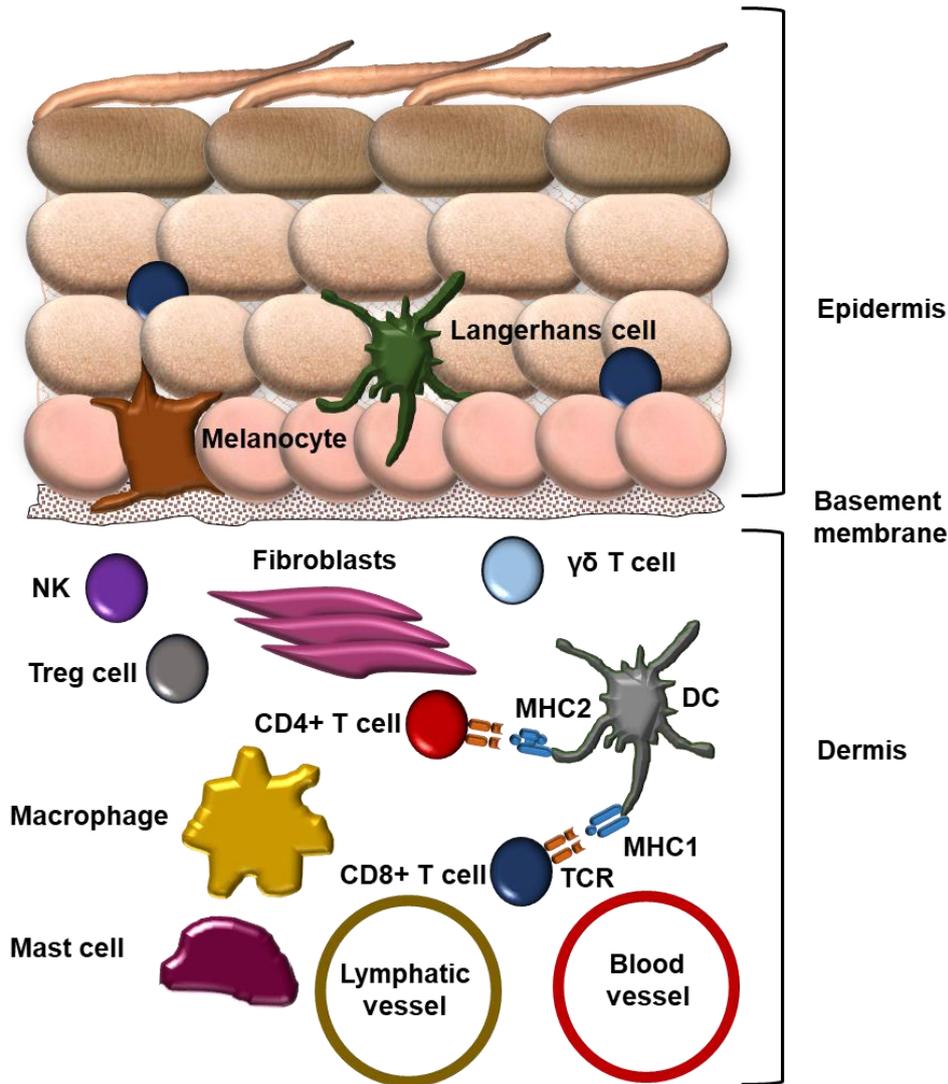


Figure 9) Organisation du système immunitaire cutané

Schéma illustrant les différents types de cellules immunitaires présentes dans la peau.

2) Acteurs issus du système hématopoïétique

A) Les cellules dendritiques

Les principales cellules dendritiques trouvées dans l'épiderme sont les cellules de Langerhans, elles sont en contact entre elles et avec les kératinocytes des couches supra-basales via leurs dendrites. Dans le derme on trouve des cellules dendritiques sous la jonction dermo-épidermique. Ces cellules produisent des interférons, des molécules inflammatoires et

permettent la présentation croisée et la présentation des antigènes aux autres cellules immunitaires ¹³².

Les cellules de Langerhans présentent quelques caractéristiques, comme le granule de Birbeck et l'expression de CD1a ¹³³, CD207 et le CMHII. Elles représentent 2% des cellules de l'épiderme ¹³⁴. Les cellules de Langerhans sont d'origine prénatale et peuvent perdurer tout au long de la vie, indépendamment des précurseurs dérivés de la moelle osseuse ¹³⁵. Lors d'une réaction immunitaire il semblerait qu'ils puissent passer dans le derme suite à l'expression de protéases MMPs et migrer jusqu'aux ganglions ¹⁰³. Cela permet ensuite le recrutement des autres acteurs immunitaires comme les LT ¹³⁶. Elles peuvent activer les LTCD8+ et induire la différenciation des LTH2 ¹³⁷. Elles pourraient aussi être impliqués dans la tolérance, toutefois, leur rôle est encore sujet à plusieurs controverses ⁷⁴, et le consensus actuel est plutôt axé sur un rôle de régulation. En cas de destruction, ces cellules peuvent être renouvelées à partir de monocytes recrutés au niveau de la lésion ¹³⁸. Les cellules de Langerhans présentent un mélange de propriétés des macrophages (auto-entretien) et des DC (migration vers les ganglions lymphatiques et stimulation des lymphocytes T) ¹³⁹.

Les DCs du derme ont un rôle de présentation des antigènes et de sécrétion de cytokines. Elles expriment CD1c, CD206, CD209 et le CMHII ¹⁴⁰⁻¹⁴². Les DCs peuvent aussi exprimer les TLR2 et 4 ¹⁴³. Une fois activés, ils participent à la réaction inflammatoire à travers la production de cytokines (IL12, IL18) ^{76,144}.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes produisent beaucoup d'IFN- α et β . Elles expriment les TLR7 et 9 qui sont intracellulaires et reconnaissent les acides nucléiques viraux. En cas d'infection virale, ces cellules produisent 10000 fois plus d'IFN-1 que les autres cellules et s'infiltrant dans la peau suite à la signalisation par les TLR. Enfin, elles produisent de l'IL-6 favorisant la ré-épithélialisation des plaies ¹⁰³.

B) Les lymphocytes T

Ils dérivent de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, et sont présents, outre la peau, dans les ganglions lymphatiques et la rate. Ils expriment un récepteur de reconnaissance des antigènes, le TCR (T cell receptor). Ils se divisent en plusieurs catégories, selon l'expression de marqueurs, et ont plusieurs fonctions. Les CD4+ peuvent reconnaître la

présentation de peptides par le CMHI et les CD8+ par le CMHII. Cette présentation de l'antigène se fait par des cellules présentatrices d'antigène comme les DCs. Une fois qu'ils ont reconnu un antigène, et selon l'action de plusieurs co-stimulateurs, les LT peuvent proliférer, générer des cytokines ou des cellules effectrices selon leur fonction. Les LT CD8+ sont des cellules cytolytiques, c'est-à-dire qu'elles sont capables de libérer des perforines et des granzymes, ou d'induire l'apoptose via la voie Fas-FasLigand. Tous ces processus aboutissent à la lyse de la cellule ciblée. Les LT CD4+ sont des cellules auxiliaires, ils peuvent se différencier en TH1, TH2 et TH17. A l'issue de la réponse immunitaire, seule une partie des LT est conservée et constitue une population de lymphocytes mémoires, permettant une immunité adaptative, lors de nouvelles infections par le même pathogène. Cela permet une réponse immunitaire plus spécifique et rapide en cas de nouvelle infection par ce pathogène. Ces procédés sont d'ailleurs essentiels dans le processus de vaccination en médecine.

Il est important de noter que la peau contient 2 fois plus de LT que le sang et qu'elle constitue ainsi un réservoir majeur de LT ¹⁴⁵. La plupart d'entre eux sont des LT mémoires CD8+ $\alpha\beta$ ^{146,147}. Une partie d'entre eux exprime le marqueur de localisation tissulaire CLA ^{145,148}, CCR4, CCR8 et CCR10 ⁹². Ils expriment également CD25 (récepteur de l'IL2) et HLA-DR ¹⁴⁹. Les LT de l'épiderme sont surtout localisés dans les couches basales et suprabasales, à proximité des cellules de Langerhans ¹⁴⁷. Les LT du derme sont quant à eux plus proches des veinules post capillaires ou proches de la jonction dermo-épidermique. Ces cellules sont le plus souvent des LT mémoires, et acquièrent un phénotype de cellules résidentes au contact de DCs cutanés et de cellules mésenchymateuses ^{150,151}. Ils expriment CD103, suite à une sécrétion de TGF- β par les kératinocytes, ce qui permet leur maintien dans la peau ⁹². Les LT mémoires pourraient être recrutés dans la peau via la transformation de la vitamine D par les DCs en 1,25(OH)(2)D3 entraînant une surexpression de CCR10 ¹⁵².

Au niveau des LT CD4+, on retrouve les TH1, les TH2 et les TH17 dans la peau. Les TH1 produisent l'IFN- γ lors de l'infection par des pathogènes intracellulaires. Les TH2 sont impliqués dans les réactions allergiques, la dermatite atopique ¹²⁰ et les TH17 permettent une réponse face aux champignons et aux bactéries ¹⁰⁰. Des populations de Th17 et aussi de TH22 produisant l'IL-17 et l'IL-22 ont été identifiées et pourraient favoriser la production d'AMP par les kératinocytes lors de l'infection ^{99,153,154}.

Le fait que la peau soit riche en LT mémoires permet une réponse rapide en cas d'infection par un pathogène auquel l'individu a déjà été exposé ¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Les LT peuvent entrer au niveau de l'épiderme en exprimant l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ qui se lie au collagène 4 de la membrane basale. Un modèle de réaction immunitaire cutanée est proposé en trois étapes ⁷⁴. Dans un premier temps, suite à l'entrée du pathogène dans le tissu, les LT mémoires résidents réagissent s'il y a déjà eu une exposition à ce pathogène. Dans un second temps, les LT mémoires circulants sont recrutés de manière non spécifique. Enfin, les LT effecteurs, dirigés contre l'antigène de manière spécifique, produits dans les ganglions lymphatiques, sont recrutés dans la peau après expansion clonale suite à la migration des DCs présentant l'antigène de manière spécifique au bout de 24 à 72h ¹⁵⁹. Le maintien des LT dans la peau sur le long terme est favorisé par la sécrétion d'IL-7, d'IL-15 et de TGF- β par les kératinocytes en conditions d'homéostasie ⁹².

Le rôle des LT régulateurs (Treg) n'est pas encore totalement défini. Toutefois, des études sur l'épiderme des follicules pileux de souris montrent que les Treg favorisent la réparation cutanée. En particulier, les Treg favorisent la différenciation des kératinocytes souches issus des follicules pileux murins via les cytokines CXCL5 et IL-17 ¹⁶⁰. Cela pourrait se faire via une diminution de la production d'IFN- γ . Ils pourraient aussi favoriser le maintien de l'homéostasie tissulaire en prévenant une inflammation systémique ⁹². Ils sont surtout localisés près des follicules pileux et 95% d'entre eux ont déjà été exposés à des antigènes, ce qui conduit à les considérer comme des « antigen experienced memory Treg » (mTreg).

Outre les LT classiques, il y a également des Natural Killer T cells (NKT) ¹⁶¹ et des LT $\gamma\delta$ ¹⁶². Chez l'homme, ces derniers représentent 2 à 9% des LT du derme et 1 à 10% des LT de l'épiderme. Ces cellules peuvent être impliquées dans la régulation des cellules cancéreuses. En effet, les LT $\gamma\delta$ qui expriment NKG2D peuvent reconnaître les séquences MICA et MICB du CMHI, ce qui entraîne une réaction de co-stimulation et aboutit à la lyse de la cellule cible ¹⁶³. Ces séquences sont surexprimées en cas de stress cellulaire, par exemple par les cellules d'un mélanome ¹⁶⁴. Les kératinocytes endommagés peuvent aussi surexprimer MICA et MICB, et donc être lysés par les NKT et les LT $\gamma\delta$ ⁹². Les LT $\gamma\delta$ produisent également des facteurs de croissance lors de la cicatrisation (CTGF, FGF9, KGF et IGF1) ¹⁶⁵. Ils produisent également des cathélicidines lors des infections microbiennes ¹⁶⁶. Les NKT pourraient également avoir un rôle de protection vis-à-vis des infections microbiennes en reconnaissant des glycolipides bactériens ^{161,167}. Ils sont recrutés dans la peau en cas d'inflammation suite à la sécrétion de chimiokines et des interactions avec les kératinocytes ¹⁰³. Les NK expriment le

marqueur CD56, mais pas le récepteur des T (TCR, CD3), ce qui leur permet d'avoir une réponse non spécifique. Ils libèrent des granules cytotoxiques comme les LT CD8+ ¹⁶⁸. La production de cytokines inflammatoires comme le TNF- α et l'IFN- γ augmentent la cytotoxicité des NK. Une stimulation des NK et des LT CD8+ avec de l'IL-2 augmente leur cytotoxicité ¹⁶⁸.

C) Les mastocytes

Ces cellules se trouvent dans la peau au niveau du derme à proximité des vaisseaux sanguins et de la lymphe. Ils expriment le CD117 et des récepteurs aux Fc des IgE. Ils sont impliqués dans les réactions allergiques de contact IgE dépendantes. Ces cellules recrutent et activent les NK en cas de réaction immunitaire ⁸². Ils peuvent être activés par certains composés du complément, des chimiokines, des TLR (TLR2,3 et 4) et des neuropeptides. Ils libèrent alors des granules présents dans leur cytoplasme des granules contenant des protéases et du TNF- α ¹⁶⁹ et des protéoglycane. Ils peuvent aussi sécréter des cytokines (IL-1 α , IL-1 β , CCL3, CCL4, IL-6, GM-CSF, IL-10, IFN- γ) ⁷⁶, des prostaglandines, des leucotriènes, le PAF (platelet activating factor), favorisant l'inflammation. Ils expriment des marqueurs caractéristiques des cellules présentatrice d'antigène comme CD40, CD80 et CD86 ainsi que le CMHII, ce qui leur permettrait d'activer les lymphocytes T ¹⁷⁰. Enfin, ils sécrètent du TGF- β 1 et des protéases qui impactent les fibroblastes et permettent la formation de fibrilles de collagène ¹⁰³.

D) Les macrophages

Ces cellules sont issues des monocytes sanguins qui sortent des vaisseaux et infiltrent le derme où elles deviennent des cellules résidentes capables de phagocytose et de présentation antigénique. Ils expriment des TLR, sécrètent des enzymes (hydrolase, peroxydase) et des cytokines inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , CXCL8, CXCL2, CXCL3, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, IL-12, IL-6, M-CSF, GM-CSF, G-CSF, TGF- α , PDGF, VEGF, IL-1ra, TGF- β , IL-10, IFN- γ) ⁷⁶. Ils expriment CD11b, CD14 et CD68, ainsi que HLA-DR et le facteur XIIIa. Les

macrophages sont donc capables de présenter des antigènes. Ils sont impliqués dans les processus de cicatrisation mais aussi d'inflammation en formant des syncytia⁸⁸.

Lors d'une blessure cutanée, le tissu passe par une étape inflammatoire avant de se régénérer. Au cours des deux premiers jours suivant la blessure, les neutrophiles s'infiltrent dans le tissu et éliminent les tissus nécrosés ainsi que les bactéries présentes. Les monocytes circulants s'infiltrent ensuite dans le tissu et se différencient en macrophages, les M1 pro-inflammatoires et les M2 anti-inflammatoires. Ces derniers stimulent la cicatrisation en sécrétant des cytokines comme l'IL-10, le TGF- β et le VEGF¹⁷¹ et induisent une réponse des LT Th2¹⁰³. Toutefois, en cas de blessure chronique, comme un ulcère, il y a surtout des M1, sécrétant des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α ³. Les M1 sont recrutés au site de l'inflammation et ont une forte activité de phagocytose et bactéricide. Ils sécrètent beaucoup de cytokines pro-inflammatoires permettant la présentation antigénique, la phagocytose et la production de facteurs de croissance permettant la cicatrisation des plaies¹⁰³.

La sécrétion d'IL-1 par les kératinocytes permet, via une fixation sur le récepteur IL-1R des macrophages, une sécrétion de CXCL2 favorisant le recrutement de DC et donc la formation de clusters DC-LT dans la peau et la présentation antigénique⁹².

Des études sur un modèle murin mimant la réparation d'une blessure cutanée montrent que les macrophages de la plaie phagocytent et dégradent SFRP4, un inhibiteur de la voie Wnt, conduisant à une activation chronique de cette voie et à une fibrose cutanée. La suppression de cette phagocytose suffit à elle seule à inverser les mécanismes entre fibrose et régénération cutanée. Les macrophages peuvent donc influencer sur la guérison des plaies cutanées¹⁷².

E) Les polynucléaires

Ces cellules ne sont pas présentes dans la peau saine mais sont recrutées lors de l'inflammation, dans le cadre de l'immunité innée et adaptative. Les polynucléaires regroupent les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles, tous capables de sécréter des cytokines.

Les éosinophiles sécrètent de l'IL-1 α , TNF- α , CXCL8, CCL3, CCL4, CCL5, IL-12, IL-6, GM-CSF, TGF- α , TGF- β et l'IL-10⁷⁶. Ils représentent 3% des leucocytes sanguins et libèrent les protéines cytotoxiques contenues dans leurs granules lors des infections. Parmi les protéines contenues dans leurs granules, la protéine cationique éosinophile et la neurotoxine dérivée d'éosinophiles ont un effet antiviral activant les mastocytes et les basophiles. Dans la peau, ces cellules sont localisées dans le derme et expriment les TLR1, 4, 7 et 10¹⁰³.

Les basophiles sécrètent de l'IL-1 α , CXCL8, CCL3, CCL4, CCL5⁷⁶. Ils représentent à peine 1% des leucocytes sanguins et peuvent libérer des protéines (histamine, héparine) présents dans leurs granules. Ils expriment les TLR2, 3 et 4 et régulent l'inflammation cutanée. Ils sont en effet présents en plus grande quantité en cas de diverses pathologies cutanées¹⁰³.

Les neutrophiles sécrètent de l'IL-1 β , TNF- α , CXCL8, CXCL10, CCL3, CCL4, IL-12, VEGF, TGF- β et l'IL-10⁷⁶. Ce sont les cellules phagocytaires majoritaires du sang (60 à 70% des leucocytes sanguins). Ils sécrètent des bactéricides stockés dans leurs granules et interagissent avec le système du complément et les anticorps. Ils reconnaissent les pathogènes via les TLR1, 2 et 10, et sont recrutés dans la peau via la sécrétion de chimiokines variées¹⁰³.

F) Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont des cellules à morphologie lymphoïde, sans marqueur myéloïde ou dendritique et n'exprimant pas de récepteurs antigéniques. Elles interviennent dans l'immunité innée avec un rôle analogue aux LT CD4⁺. Elles régulent la migration des DC dans les ganglions et les LT à travers la présentation antigénique par le CMHII. Il en existe trois catégories. Les ILC1, ILC2 et ILC3 seraient les homologues de l'immunité innée des LT CD4 + helper 1 (TH1), des TH2 et des TH17¹⁷³.

Les ILC1s expriment CD161 et sont activés par l'IL-12 et l'IL-15. Ils produisent du TNF- α et de l'IFN- γ . Ils pourraient être impliqués dans la dermatite allergique de contact. Les ILC2s expriment CLA, CCR4, l'IL-25R, l'IL-33R, KLRG1, CRTH2 et TSLPR. Ils produisent de l'IL-13 et de l'IL-5 en réponse à une stimulation par de l'IL-25, de l'IL-33, du TSLP ou du PGD2. Ils sont impliqués dans la dermatite atopique et leur action est inhibée par la E-cadhérine. En cas de dermatite atopique, les jonctions intercellulaires des kératinocytes

via la E-cadhérine sont altérées tout comme la protection par la filaggrine, ce qui favorise la production de cytokines pro-inflammatoires. Enfin les ILC3s expriment CLA et NKp44. Ils produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 en réponse à une stimulation par de l'IL-1 β et de l'IL-23. Ils sont impliqués dans le psoriasis ¹⁷⁴.

Le maintien des ILCs murins de la peau dépend de la sécrétion de facteurs des follicules pileux, ce qui permet un contrôle de la fonction des glandes sébacées et la régulation du microbiote cutané ¹¹⁰.

G) Les thrombocytes

Les thrombocytes, ou plaquettes sanguines, sont issus de la fragmentation des mégacaryocytes, de grandes cellules contenues dans la moelle osseuse. Elles survivent 8 à 12 jours dans le sang et sont dégradées dans la rate. Elles sont de forme lenticulaire et mesurent entre 1,5 et 3,5 μm de diamètre. Leur concentration sanguine est de 150,000 à 400,000/ μL de sang. Elles contiennent 827 protéines. Les thrombocidines 1 et 2 ont une action antibactérienne tandis que les facteurs de croissance (PDGF, TGF- β , EGF et VEGF) ont une action angiogénique et réparatrice dans le cadre de la réponse antimicrobienne. Les plaquettes activent les neutrophiles et les monocytes via la P sélectine de leurs membranes et son ligand PSG-L-1. Les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales sont régulées par différentes chimiokines (CXCL4, CXCL7, β -thromboglobuline, le peptide activant les neutrophiles (NAP), CCL3 (protéine inhibitrice des macrophages-1 α , MIP 1a), CCL5, CXCL1 et CXCL5). Le recrutement des plaquettes permet donc une cicatrisation efficace ¹⁰³ et l'arrêt du saignement via la formation d'un thrombus.

Toutes ces cellules sont impliquées dans la mise en place et la régulation de l'immunité cutanée, notamment via la production de cytokines et la reconnaissance antigénique.

III. Mécanismes moléculaires de l'immunité cutanée en conditions normales et pathologiques

1) Mécanismes d'activation du système immunitaire cutané en conditions normales

A) La reconnaissance des pathogènes par les récepteurs TLR et NLR

La famille des Toll-like receptors (TLR), contient 10 membres chez l'homme. Ils appartiennent à la super-famille des Pattern recognition receptors (PRR) qui reconnaissent des Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPS), exprimés par des pathogènes. Les nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLR) reconnaissent aussi les PAMPS et sont exprimés par les kératinocytes ⁹². Les TLR sont des glycoprotéines membranaires qui reconnaissent différents ligands. Les TLR1, 2, 6 et 10 reconnaissent des lipoprotéines, TLR3 de l'ARN, TLR4 reconnaît le LPS bactérien, TLR5 la flagelline, TLR7, 8 et 9 de l'ARN ou de l'ADN ^{175,176}. Les TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont localisés à la membrane, tandis que les TLR3, 7, 8 et 9 sont localisés dans des endosomes avec un domaine TIR cytosolique permettant la transduction du signal.

La fixation des PAMPS sur les TLR entraîne la production de cytokines permettant le recrutement des cellules immunitaires. La plupart des TLR ont une fonction pro-inflammatoire excepté le TLR10 ¹⁷⁷. Les données de transcriptomique indiquent que les TLR1, 2, 3 et 5 sont exprimés dans les kératinocytes de manière constitutive alors que le TLR4 est beaucoup plus exprimé en présence de LPS ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Lors d'une inflammation comme dans le cas du psoriasis, TLR5 est sous exprimé dans les kératinocytes tandis que TLR1 et 2 sont surexprimés ¹⁷⁸. Les CL expriment les TLR1, 2, 4 et 8 et sont moins sensibles à leurs ligands ¹⁸¹, tandis que les autres CD expriment les TLR1, 2, 3, 5, 6, 8 et 10 ¹⁸². Les mastocytes expriment tous les TLR sauf TLR8 et 10 et répondent aux ligands des TLR1, 2, 3, 4 et 6 ¹⁸². Les neutrophiles expriment tous les TLR sauf TLR3 mais ne sont pas sensibles aux ligands de TLR9. Les éosinophiles expriment les TLR1, 4, 7, 9 et 10 mais ne sont sensibles qu'aux ligands de TLR7 ¹⁸². Les cellules endothéliales expriment tous les TLR ¹³⁰.

La voie de signalisation principale des TLR, excepté pour TLR3, est la voie impliquant MyD88/ NF- κ B, permettant la production de cytokines inflammatoires. Pour le TLR3, mais aussi pour le TLR4, il existe également une autre voie, impliquant TRIF, permet d'activer NF- κ B et IRF3. Cela induit la production d'interféron (IFN- β) et de l'expression des gènes associés. Il y a aussi une production d'interférons pour les TLR7, 8 et 9 ^{175,176}. La production de cytokines associée à la signalisation des TLR permet à la fois l'activation de l'immunité innée et adaptative. Par ailleurs, l'expression des TLR peut aussi être régulée par les cytokines. Par exemple, l'expression de TLR3 sur les kératinocytes est induite par l'IFN- γ et cela permet, en présence du ligand poly (I:C), d'augmenter la production d'IL-6, d'IL-8 et de défensine ¹⁸³. La fixation du ligand poly (I:C) sur le TLR3 permet aussi d'induire la production d'IL-1 β et d'IL-18, ce qui active les DCs et favorise la différenciation des LT en Th1 *in vitro* ⁹². La signalisation par TLR3 des kératinocytes permet la production de CXCL9 et CXCL10 favorisant le recrutement des Th1. De même, elle induit la sécrétion de CCL20 et CCL27 ce qui permet le recrutement des LT mémoires ⁹². L'expression de TLR3 et la réponse antivirale peut aussi être augmentée par une élévation du niveau de calcium extracellulaire ¹⁸⁴, favorisant par ailleurs la différenciation des kératinocytes.

La voie de signalisation des NLR conduit à l'activation de l'inflammasome via NLRP3 et la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-18. Les kératinocytes expriment les NLR NOD1 et NOD2, ce qui permet la reconnaissance de produits bactériens et favorise l'inflammation via la voie NF- κ B et la signalisation MAPK ⁹².

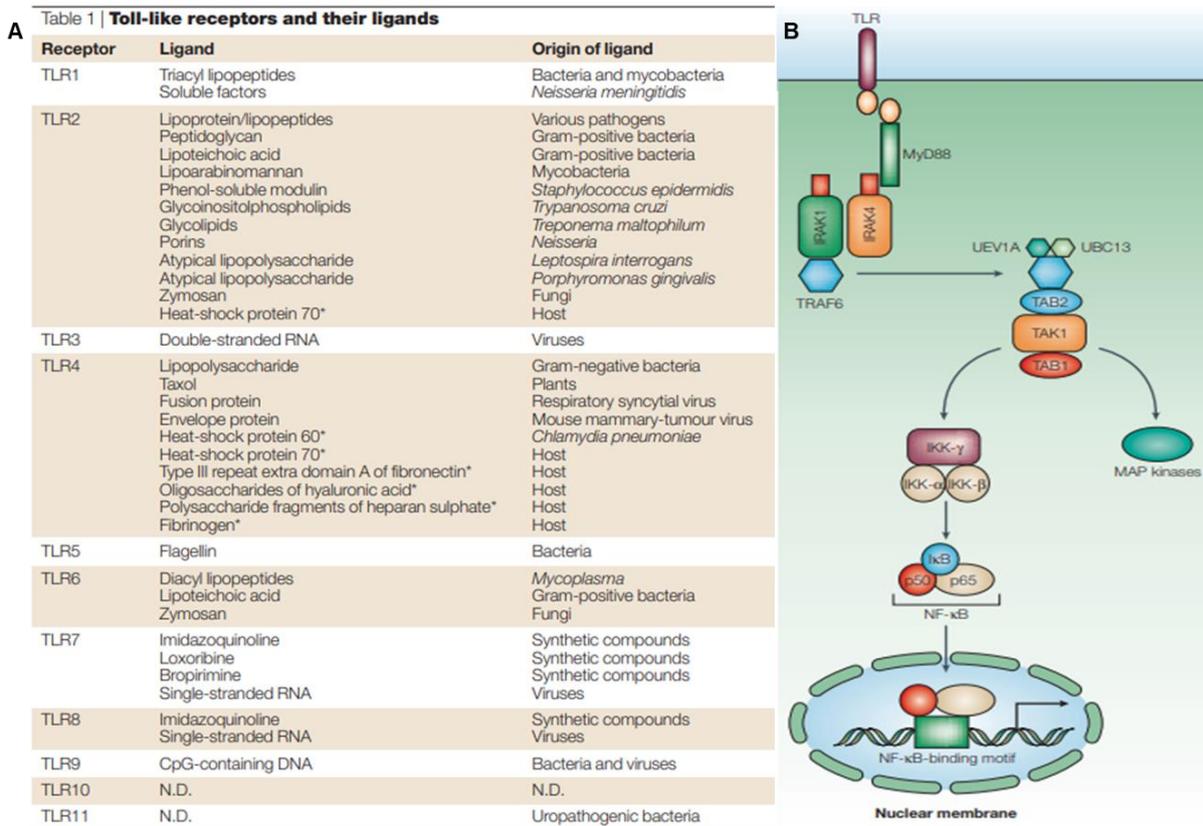


Figure 10) Les TLR permettent la reconnaissance des pathogènes par les cellules

A. Tableau récapitulatif des différents TLR et des ligands respectifs qu'ils peuvent reconnaître. **B.** Schéma illustrant la voie de signalisation intracellulaire des TLR via la voie NF- κ B. Source : Akira et Takeda, 2004.

B) L'activation immunitaire par le système HLA

a) Gènes et classification du système HLA

Le système HLA (Human Leucocyte Antigen), a été découvert en 1958 par Jean Dausset en étudiant la capacité de sérums de gens polytransfusés à agglutiner des lymphocytes de sujets sains¹⁸⁵. C'est un système de gènes qui permet d'encoder les protéines du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Les protéines du CMH sont exprimées par les cellules, ce qui leur permet de présenter des antigènes aux cellules du système immunitaire, entraînant ou non son activation.

Il existe 3 classes de gènes HLA chez l'homme. La classe 1 (HLA-A, B, C, E, F et G) permet à la cellule de présenter des antigènes issus de l'intérieur de la cellule (par exemple des protéines virales). Cela peut entraîner l'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et la lyse des cellules. Les molécules de la classe 1 sont présentes sur toutes les cellules nucléées (les globules rouges n'en ont pas par exemple) de l'organisme et ont un niveau d'expression variable. La classe 2 (DP, DQ, DM, DR) permet à la cellule de présenter des peptides issus de l'extérieur. Cela peut entraîner l'activation des Lymphocytes T CD4+ helpers qui vont ensuite stimuler la production d'anticorps par les lymphocytes B, dirigés contre l'antigène présenté. Les molécules de la classe 2 sont exprimées par les cellules présentatrices de l'antigène (lymphocyte B, CD) et par d'autres cellules lors d'une réponse immunitaire (ex: cellules endothéliales). Enfin, la classe 3 permet d'encoder des gènes du système du complément.

L'expression de ces gènes est stimulée par l'IFN- γ et diminuée lors de l'activation des systèmes d'échappement immunitaire impliqués dans le développement d'une tumeur. Le système HLA est polygénique, et ces gènes sont localisés sur le chromosome 6 humain. Ces gènes sont transmis lors de la reproduction, avec parfois un crossing over de 1% entre les gènes A et B, B et DR, DR et DQ. La structure des molécules de la classe 1 et de la classe 2 diffère. Les molécules de la classe 1 sont composées de 3 chaînes α et d'une microglobuline β . Les molécules de la classe 2 sont composées de 2 chaînes α et de 2 chaînes β . La partie extra-membranaire du CMH mesure 7nm tandis que la partie membranaire mesure 5nm. Le peptide est présenté au niveau d'une poche située à la surface et composé de feuilletts β entourés d'hélices α . Le polymorphisme des gènes HLA est important et touche principalement cette poche. Fin 2015, plus de 10000 allèles de classe 1 et 3000 de classe 2 étaient recensés, pour plus de 7000 protéines de classe 1 et 2500 de classe 2. Par exemple, pour HLA-G, il y avait en 2015 51 allèles et 17 protéines connus.

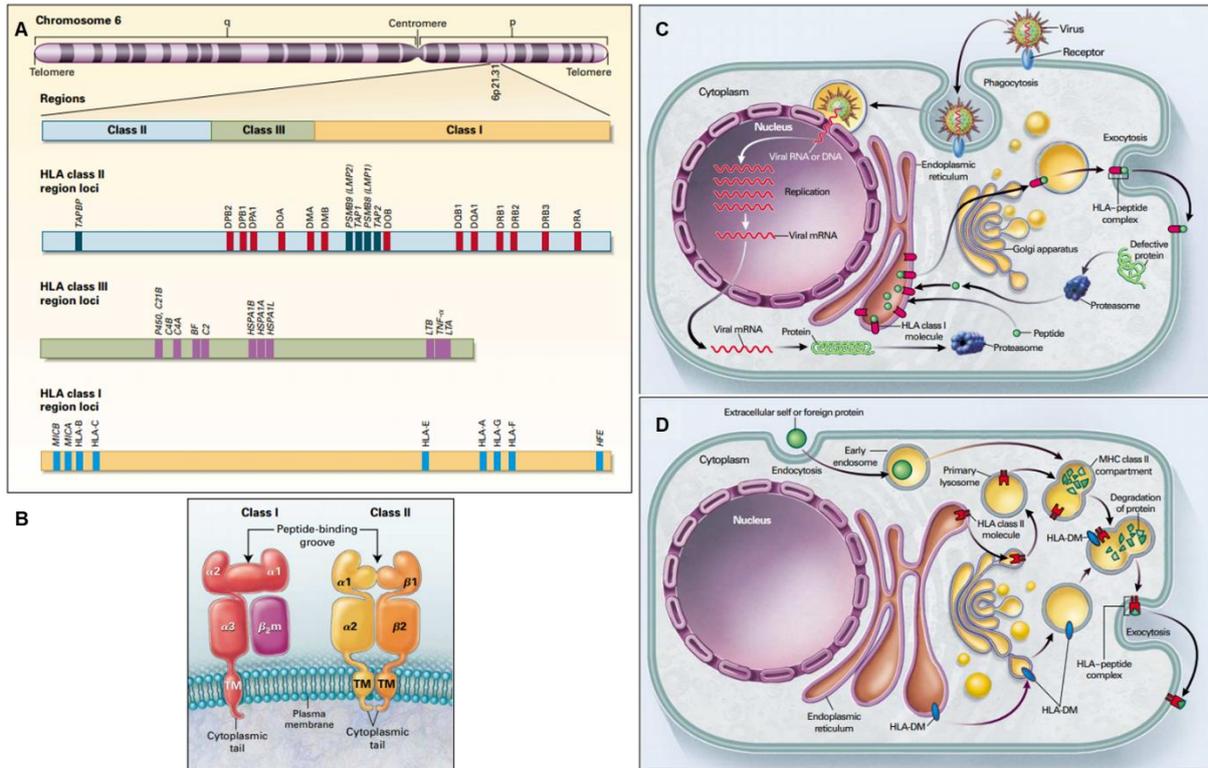


Figure 11) Organisation du système HLA

A. Il existe 3 classes de gènes HLA chez l'homme, codés sur le chromosome 6. **B.** Les molécules de la classe 1 sont composées de 3 chaînes α et d'une microglobuline β . Les molécules de la classe 2 sont composées de 2 chaînes α et de 2 chaînes β . **C.** La classe 1 (HLA-A, B, C, E, F et G) permet à la cellule de présenter des antigènes issus de l'intérieur de la cellule (par exemple des protéines virales), entraînant l'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et la lyse des cellules. **D.** La classe 2 (DP, DQ, DM, DR) permet à la cellule de présenter des peptides issus de l'extérieur, ce qui entraîne l'activation des Lymphocytes T CD4+ helpers qui vont ensuite stimuler la production d'anticorps par les lymphocytes B, dirigés contre l'antigène présenté. Source : Klein et Sato, 2000.

b) Présentation antigénique et activation immunitaire par le système HLA

Le système HLA permet de présenter les antigènes aux cellules immunitaires. La présentation de l'antigène par le CMHI se fait par contact avec le TCR des LT CD8+. Le peptide ne mesure que quelques AA de long et a une faible affinité ($K_d \sim 10^{-6} M$) avec la poche, ce qui lui permet de présenter plusieurs peptides différents. Les mécanismes de

présentation sont distincts. En ce qui concerne le CMHI, les protéines présentes dans le cytosol sont dégradées par le protéasome et les débris peptidiques sont importés dans le REG via TAP. Ils sont ensuite chargés sur le CMH via la Tapasine. Le complexe CMHI/peptide est alors transporté jusqu'à la membrane de la cellule en passant via des vésicules dans l'appareil de Golgi. Le complexe CMHII/peptide invariant est lui aussi transporté du REG à l'appareil de Golgi, puis le peptide invariant est digéré et le peptide CLIP est remplacé dans la vésicule par un peptide exogène préalablement endocyté et digéré. Le complexe CMHII/peptide est alors transporté à la membrane de la cellule. Toutefois, les deux mécanismes peuvent se compléter lors de la présentation croisée. En effet, un peptide exogène digéré dans un endosome peut être libéré dans le cytoplasme et ainsi rejoindre le mécanisme de présentation du CMHI.

Le système HLA permet d'activer les lymphocytes. La reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR des lymphocytes entraîne une cascade de transduction aboutissant à leur activation. La structure de ce complexe a été déterminée en 1996 ¹⁸⁶. Ces mécanismes impliquent également une interaction avec le CD4/CMHII pour les LT CD4+ et une interaction CD8/CMHII pour les LT CD8+. Les contacts sont facilités par des molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules comme les ICAM. Il existe également un signal de costimulation impliquant la molécule B7 (CD80 ou CD86) à la surface des cellules infectées et le CD28 des lymphocytes T.

Le système HLA permet également de réguler les NK. L'interaction entre le CMHI et les récepteurs KIR (Killer Ig-like Receptors) permet d'inhiber l'activité cytotoxique du NK. Ce mécanisme est par exemple mis en place lors de la grossesse où les cellules embryonnaires expriment HLA-G, ce qui permet de les protéger de la lyse par les NK de la mère. Une cellule déficiente en CMHI a plus de chances d'être lysée par les NK. Cela permet la reconnaissance du soi et permet aux cellules de l'organisme de ne pas être lysées par son propre système immunitaire.

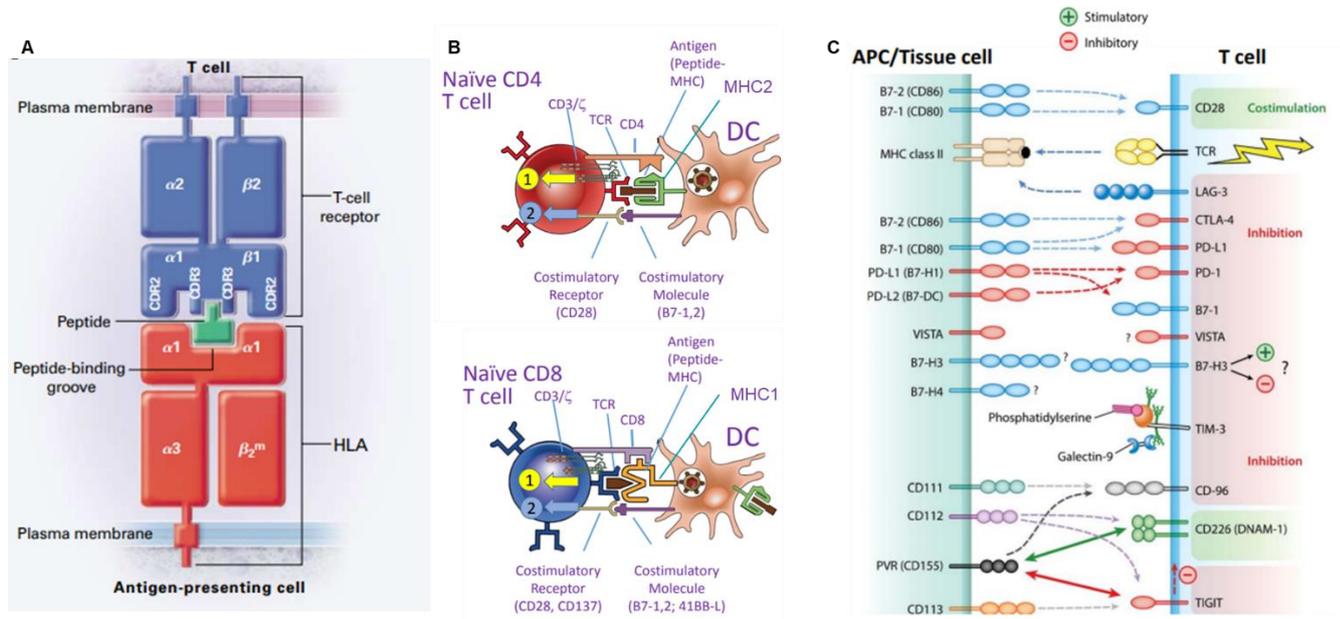


Figure 12) La présentation antigénique via le système HLA permet l'activation des lymphocytes T

A. La liaison entre le T-cell receptor (TCR) et le complexe HLA/peptide permet à la cellule présentatrice d'antigène d'activer le lymphocyte. **B.** Les molécules de costimulation CD4 et CD8 permettent l'activation des lymphocytes correspondant, via une interaction avec le CMHII et le CMHI respectivement. **C.** Il existe de nombreuses molécules de costimulation (CD40, CD86) ou d'inhibition (PD-L1, CTLA-4). Source : Klein et Sato, 2000 ; Lichtman et al., 2017 ; Baumeister et al., 2016.

c) Système HLA et tolérance de greffe

Le système HLA est également très impliqué lors de la greffe et la transplantation. En effet, le HLA du donneur peut être considéré comme un antigène étranger par le patient. Cela est dû au fait qu'il y a un grand polymorphisme (environ 10^{10} combinaisons possibles) et au fait que ce système est exprimé dans tout l'organisme, ce qui fait qu'il est facilement détecté par le système immunitaire. Le rejet de greffe peut être provoqué par la réponse cellulaire (lymphocytes T CD8) et la réponse humorale (anticorps anti-HLA) dirigées contre le système HLA.

1 à 10% des LT circulants sont alloréactifs, pour un individu qui n'a jamais été en contact avec un allo-antigène mais 10^5 fois plus de LT sont capables de reconnaître un peptide

étranger sans contact préalable. Cela s'explique car les CMH de deux individus présentent des surfaces proches permettant au TCR d'un individu de reconnaître le CMH d'un autre individu. Dans le même temps, les peptides présentés par le CMH allogénique sont différents de ceux de l'individu et sont donc reconnus comme étranger, pouvant donc déclencher une réaction immunitaire dirigée contre le greffon. La réactivité croisée du TCR explique donc l'alloréactivité des LT. 1 TCR reconnaît 10^6 à 10^7 peptides ¹⁸⁷, ce qui lui permet de reconnaître spécifiquement un peptide du non-soi parmi un excès de plus de mille peptides du soi (il y est exposé au moins une fois dans le thymus).

Du fait de la proximité de la surface et de la forme des molécules HLA (par exemple, cas des spécificités larges Bw4 et Bw6, des groupes de réactions croisées), il est aussi possible que des anticorps anti-HLA en reconnaissent plusieurs. Ces anticorps anti-HLA ne sont normalement pas présents sans qu'il y ait eu un événement immunisant allogénique Il peut y avoir plusieurs origines de ces anticorps (transfusions de culots globulaires, transfusions plaquettaires, grossesse, transplantation antérieure). Ils peuvent entraîner un rejet de la greffe via différents mécanismes (activation du complément, recrutement des cellules phagocytaires) ^{188,189}.

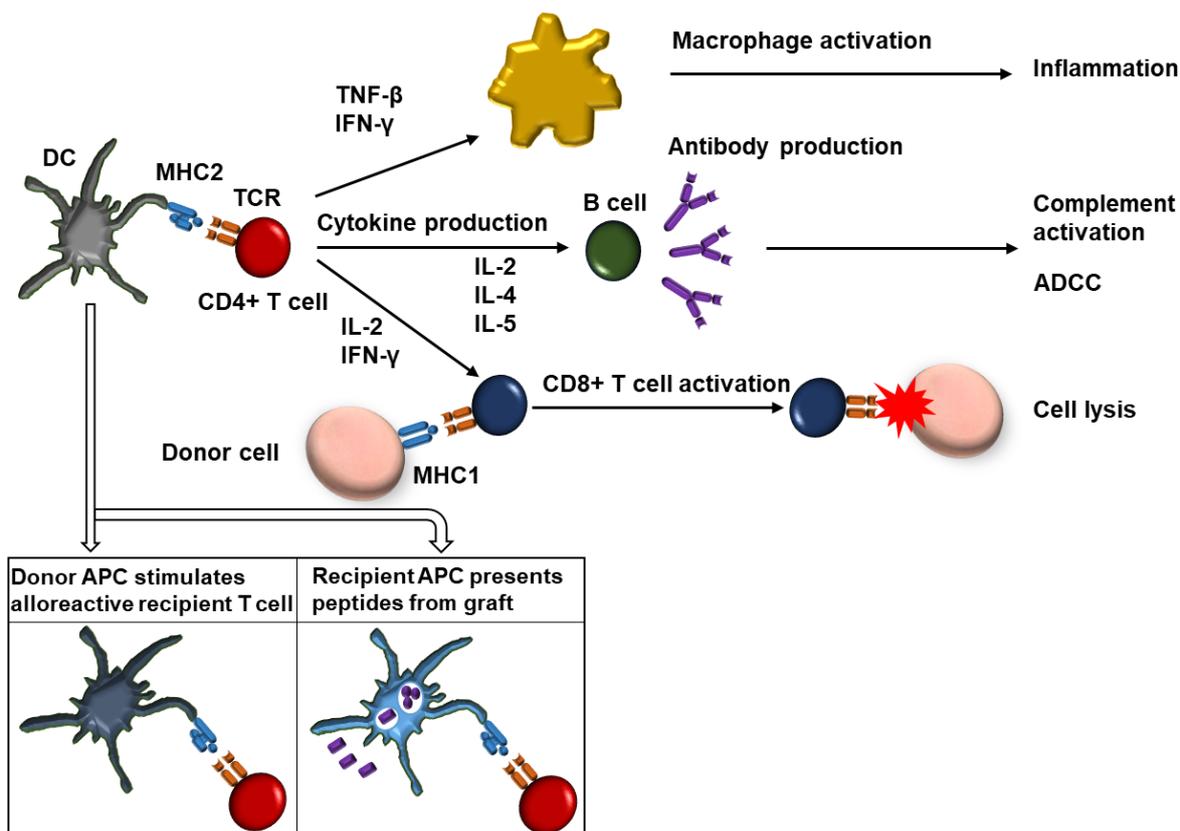


Figure 13) Les mécanismes immunitaires impliqués dans le rejet de greffe allogénique

Schéma illustrant les différents mécanismes du rejet de greffe. Les cellules présentatrices d'antigène (APC) du donneur peuvent stimuler les LT du receveur, ou les APC du receveur peuvent présenter des peptides du greffon aux LT. Cela peut aboutir à l'activation des macrophages, la lyse médiée par les NK et les LT CD8+ (ADCC) ou le système du complément.

C) Régulation de l'immunité cutanée par les cytokines

a) Les cytokines primaires

Ces cytokines sont les premières à être sécrétées lors d'une réaction inflammatoire et leur sécrétion entraîne celle d'autres cytokines. Elles peuvent être pro ou anti inflammatoires.

L'interleukine-1 existe sous plusieurs formes, IL-1 α , IL-1 β et l'IL-1ra (receptor antagonist) qui se lie au même récepteurs. Ces récepteurs sont IL-1R1 et IL-1R2. IL-1R1

permet l'activation de la voie NF- κ B cytoplasmique ¹⁹⁰. IL-1ra se lie au récepteur mais n'induit aucun signal de transduction. Dans la peau, IL-1 α est majoritairement sécrétée par les kératinocytes (KC) alors que l'IL-1 β est plutôt sécrétée par les cellules de Langerhans (CL). Les kératinocytes stockent de l'IL-1 α active ¹⁹¹ alors qu'ils produisent la pro-IL-1 β sous forme inactive. Cette forme inactive est ensuite activée suite à l'action de la convertase ICE, synthétisée par les CL, les mastocytes, monocytes, macrophages et neutrophiles. Les CL peuvent donc, à la différence des kératinocytes, produire la pro-IL-1 β et l'enzyme permettant son activation ^{112,192}. L'IL-1 α est pro-inflammatoire, permet d'induire sa propre expression, celle d'autres cytokines (IL-6, IL-8, TNF- α), de molécules d'adhésion permettant l'infiltration cellulaire, la prolifération des kératinocytes et l'activité des macrophages. L'IL-1 β quant à elle permet d'augmenter la circulation des CL entre l'épiderme et la jonction dermo-épithéliale. Des mutations du gène NLRP1 chez l'humain peuvent favoriser, via une sécrétion paracrine d'IL-1, une hyperplasie, une inflammation cutanée et des cancers. Ce mécanisme met en jeu l'inflammasome ¹⁹³.

Le tumor necrosis factor- α (TNF- α) existe sous une forme membranaire et une forme soluble. La forme membranaire se fixe surtout sur le récepteur TNF-R2, permettant des réactions inflammatoires locales. La forme soluble est produite par clivage de la forme membranaire par la protéase TACE. Elle se fixe plutôt sur le récepteur TNF-R1 ce qui entraîne une réaction inflammatoire systémique. Ces deux formes activent la voie NF- κ B. Il est stocké dans les mastocytes ¹⁶⁹ mais aussi, lorsqu'ils sont activés, par les kératinocytes et les CL ^{194,195}. Il est possible d'augmenter sa synthèse dans les kératinocytes via la PKC ou en stabilisant l'ARNm ¹⁹⁶. Il est également pro-inflammatoire et permet l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires. La production de TNF- α et d'IFN- γ augmente la cytotoxicité des NK ¹⁶⁸. La sécrétion de TNF- α par les kératinocytes permet l'activation et la migration des LCs dans les ganglions lymphatiques où elles présentent les antigènes aux LT et leur permettent d'exprimer le cutaneous leukocyte antigen (CLA) ⁹².

Toutes ces cytokines peuvent agir de concert et sont imbriquées dans des processus communs. Par exemple, l'IL-1 α , avec l'IL-17 et le TNF α , active l'immunité innée via la production de peptides antibactériens ¹⁹⁷. Selon le contexte, les effets vont aussi varier. Par exemple, l'IL-1 β , induite par la voie TLR4/p38 et la signalisation JNK MAPK va permettre la cicatrisation en présence d'IL-6 ¹⁹⁸, tandis que dans le contexte du psoriasis, l'IL-1 β induit une résistance à l'insuline via la voie p38 MAPK et une prolifération des kératinocytes indépendante de l'insuline ¹⁹⁹. Dans les cicatrices hypertrophiées suite à des brûlures, il y a

une surexpression de l'IL-1 β et du récepteur au TNF- α (TNF-R1) ²⁰⁰. Dans le cadre d'une surexposition aux UV, la peau humaine va aussi vieillir précocement via une surexpression d'IL-1 β ²⁰¹. L'exposition aux UV induit une production de cytokines des kératinocytes (IL-1, IL-18), mais aussi des LTH1 et LTH2 (en 3 pics distincts après exposition aux UVB) ; ces derniers produisant alors de l'IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, du TNF- α et GM-CSF ²⁰². La sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β par les kératinocytes en cas de blessure induit l'expression de CCL27 par les kératinocytes adjacents, ce qui favorise le recrutement des LT mémoire via le CCR10 et la réponse immunitaire ⁹².

b) Les cytokines secondaires

L'IL-6, pro-inflammatoire, peut être produite par beaucoup de cellules comme les kératinocytes et permet d'activer la production protéique de la phase aiguë de l'inflammation. Ses récepteurs se situent surtout sur les lymphocytes et les hépatocytes. Elle favorise la prolifération et la différenciation des LT cytotoxiques et des LB ²⁰³. Elle active la voie JAK/STAT. L'IL-6 peut augmenter la fibrose lors de la cicatrisation dans des conditions auto-inflammatoires comme la sclérose ²⁰⁴.

L'IL-10, anti-inflammatoire, est produite par les LT Th2, les kératinocytes, les DC, les mastocytes et les monocytes. Elle inhibe la sécrétion des cytokines des LT Th1 ²⁰⁵ et d'autres cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. La voie de signalisation impliquée lors de sa fixation à son récepteur IL-10R est la voie JAK/STAT. Plusieurs pistes pour réduire la formation de grosses cicatrices via une surexpression d'IL-10 ont été étudiées ^{206,207}.

En conditions non-inflammatoires, les kératinocytes sécrètent de l'IL-7, de l'IL-15 et du TGF- β permettant le maintien des LT résidant dans la peau ⁹². Cela se fait par une surexpression de CD69, CD103 et une sous-expression de S1PR1 sur les LT mémoire résidant dans la peau.

Le transforming growth factor (TGF- β), anti-inflammatoire ou non, est sécrété par les plaquettes et les kératinocytes activés. Il inhibe la différenciation des macrophages, l'activité des monocytes et des LT CD8+, et la présentation des antigènes par les CL ^{208,209}. Il favorise aussi la formation de LT mémoires résidant dans la peau et la génération de LTreg protecteurs contre les allogreffes en combinaison avec l'IL-2 et l'acide rétinoïque ⁹². Il

permet cependant l'adhésion et le chimiotactisme des leucocytes lors de l'inflammation et peut activer la migration des DCs dans les ganglions lymphatiques, favorisant le recrutement des LT dans la peau ⁹². Cette fonction pro ou anti inflammatoire dépend du stade de différenciation de la cellule ayant son récepteur et de l'activation de la voie Smad ²¹⁰.

Tout comme pour l'IL-1, les kératinocytes peuvent aussi produire de l'Il-18 pro-inflammatoire sous forme inactive ^{192,211}. Ces cytokines peuvent alors être clivées par la caspase-1 via l'inflammasome et NLRP3 lors d'une exposition aux UV ²¹².

L'IL-34, une cytokine anti-inflammatoire, produite par les kératinocytes et se fixant sur le récepteur de M-CSF, permet une fois l'inflammation terminer de maintenir en vie les LC ²¹³.

L'IFN- γ a un rôle pro-inflammatoire dans la peau. En effet, une simple dose suffit pour induire une cascade de production de cytokines (TNF, IL-23) par les LT et les DC de la peau ²¹⁴. Il existe de plus une boucle de régulation positive entre la production d'IFN- γ et celle d'IL-33. En effet, les kératinocytes exposés à l'IFN- γ produisent alors plus d'IL-33, ce qui induit en retour une plus grande production d'IFN- γ ²¹⁵.

L'Il-33 est aussi produite par les kératinocytes sous une forme inactive, la pro-IL-33, localisée dans le noyau où elle réprime la transcription des cytokines pro-inflammatoires ²¹⁶. La forme active après clivage permet la signalisation des cytokines des TH2 via ST2 ²¹⁷. La signalisation d'Il-33 est induite par l'IFN- γ , l'IL-17 et le TNF α ²¹⁸.

L'IL-25, tout comme l'IL-33 et l'IL-1 α , est stockée dans les kératinocytes et est sécrétée sous l'action de protéases lors de l'altération de l'épiderme, ce qui participe à l'activation de la réponse immunitaire ⁹².

c) Les chimiokines

Ce sont des molécules sécrétées qui permettent, par chimiotactisme, d'influer sur le recrutement et la mobilité de différentes cellules immunitaires au sein du tissu, en réponse à l'infection par un agent pathogène ²¹⁹. Elles peuvent aussi jouer sur l'activation et la différenciation des cellules immunitaires ²²⁰.

Les 2 familles les plus connues sont les familles CC et CXC, différenciées selon la position de résidus cystéines. Les CXC comme CXCL8 (IL-8) attirent surtout les

neutrophiles lors de la cicatrisation ²²¹, tandis que les CC attirent des leucocytes plus variés (des basophiles et des LT pour CCL2, des LT pour CCL3, des éosinophiles, des LT et des CD pour CCL4 et CCL5). Les CXC (hormis CXC12) ainsi que l'IL-1 β sont plus exprimées dans les kératinocytes proches de larges brûlures, tandis que les CC sont moins exprimés ^{222,223}. Le processus de chimiotactisme fait intervenir un gradient des chimiokines, qui est mis en place par la fixation de ces dernières aux protéoglycanes cellulaires et à la matrice extracellulaire. Les récepteurs aux chimiokines sont couplés aux protéines G, il en existe 4 types et les interactions chimiokine/récepteur sont peu spécifiques ²²⁴.

d) Les facteurs de croissance

Ce sont des molécules permettant d'induire la différenciation et la prolifération des cellules souches. GM-CSF est très impliqué lors d'une inflammation et peut être produit par les kératinocytes en présence d'IL-1. Il permet la croissance des neutrophiles, des macrophages et des éosinophiles, mais aussi la maturation et la migration des CL murins ²²⁵. Les CL, CD et macrophages ont des récepteurs au GM-CSF. M-CSF contrôle lui le développement des macrophages ²¹³.

e) Le système du complément

Il existe des mécanismes de lyse des cellules infectées par un pathogène, qui peuvent être médiés par les anticorps, comme l'activation du complément par la voie classique ²²⁶. Lors de l'activation de cette voie, la protéine C1q interagit avec un complexe antigène-anticorps. Il a été montré que C1q ne reconnaît le complexe anticorps-antigène que si les anticorps forment des hexamères d'IgG ^{227,228}. Il s'ensuit une cascade protéolytique : C1q active C1r et C1s, qui vont cliver C2 et C4; C2b et C4b forment un complexe, la C4b2a C3 convertase, qui clive C3 en C3a et C3b; C4b et C3b forment ensuite la C5 convertase qui va cliver C5 en C5a et C5b. Enfin, C5b recrute les protéines C6 à C9 à la surface des cellules, permettant la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) ²²⁹. La fixation du CAM entraîne une augmentation des flux calciques membranaires, ce qui entraîne une altération des mitochondries et la mort des cellules ²³⁰. De plus les fragments solubles C5a et C3a permettent la diapédèse des

neutrophiles et des monocytes, l'activation des cellules endothéliales et monocytes, la dégranulation des mastocytes et l'activation de l'hématopoïèse.

Il existe des protéines régulatrices du système du complément. CD46 est un cofacteur permettant l'inactivation par clivage des composants du complément C3b et C4b par le facteur sérique I, ce qui protège la cellule ²³¹. CD55 interfère avec la conversion de C2 en C2a, empêchant ainsi la formation de la C4b2a C3 convertase ²³². CD59 peut lui empêcher C9 de polymériser et former le CAM ²³³. Toutes ces protéines sont exprimées à la surface des cellules humaines ce qui leur permet d'être protégées de la lyse par le complément.

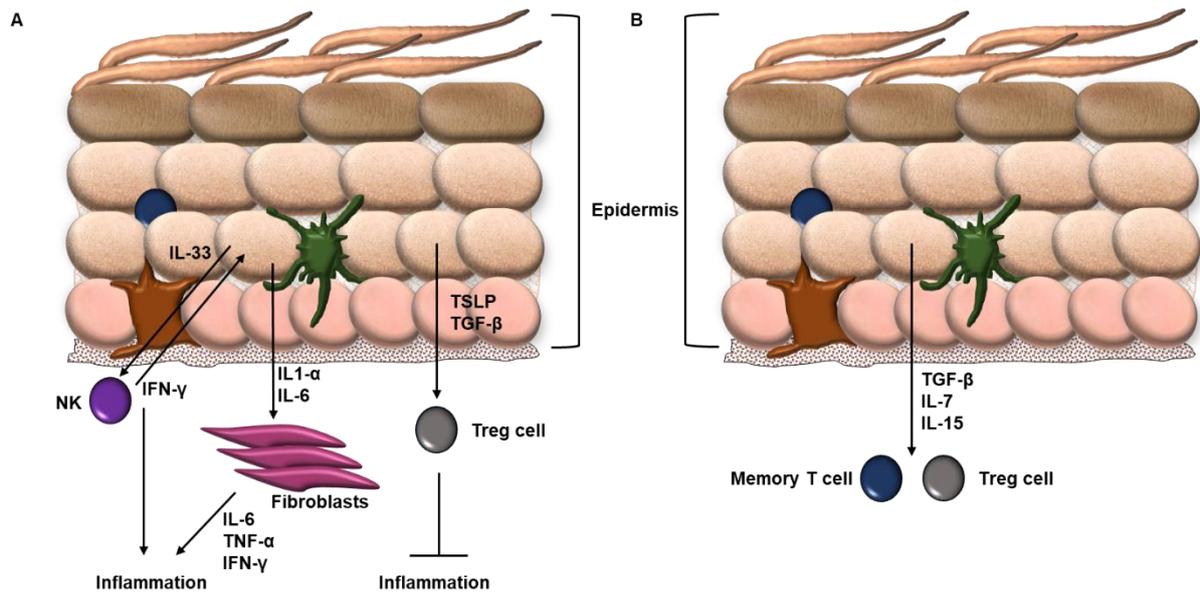


Figure 14) Les kératinocytes participent à la régulation de l'inflammation et favorisent le maintien d'une mémoire immunitaire via la sécrétion de cytokines

A. Les kératinocytes peuvent réguler l'inflammation via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6) ou anti-inflammatoires (TSLP, TGF- β). **B.** Les kératinocytes favorisent aussi le maintien d'une mémoire immunitaire via la sécrétion de cytokines (IL-7, IL-15, TGF- β).

2) Dysfonctionnements immunitaires cutanés en conditions pathologiques

A) Les pathologiques auto-immunes

En cas de pathologie, les populations immunitaires épidermiques sont modifiées. Une étude de single cell a récemment mis en évidence une signature des cellules dendritiques dans la peau saine humaine et murine. Ils ont par contraste identifié des lymphocytes T cytotoxiques exprimant l'IL-13 et l'IL-22 en cas de dermatite atopique et des lymphocytes T helper 17 en cas de psoriasis ²³⁴.

a) La dermatite atopique

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) constituent un groupe de cellules immunitaires provenant d'un progéniteur lymphoïde commun. Les ILC n'expriment pas de gènes activant la recombinaison (RAG) et sont par conséquent caractérisées par l'absence de récepteurs antigéniques ²³⁵. Ces cellules n'expriment pas non plus de marqueurs de cellules myéloïdes ou dendritiques ²³⁵. Les ILC exercent des fonctions immunitaires analogues à celles des LT CD4+ (également appelées TH), régulent la migration des DC dans les ganglions lymphatiques et sont capables de présenter des antigènes aux cellules TH via le CMHII ¹⁷³. Le groupe des ILC comprends trois groupes, les ILC1, les ILC2 et les ILC3, qui seraient les homologues de l'immunité innée des LT CD4 + helper 1 (TH1), des TH2 et des TH17 ¹⁷³.

Les ILC jouent donc un rôle dans l'immunité protectrice et la régulation de l'inflammation, via des facteurs solubles et des contacts avec les kératinocytes. Un signal pro-inflammatoire peut résulter de la sécrétion d'IL-25, Il-33, TSLP et PGD2 par les kératinocytes, qui induit alors la production d'Il-13 et d'Il-5 par les ILC2 ²³⁶. Au contraire, l'interaction directe entre les ILC2 et les kératinocytes via la E-cadhérine inhibe la production d'IL-5 et d'IL-13. Dans la dermatite atopique, une carence en expression de la E-cadhérine réduit les jonctions intercellulaires, ce qui favorise la production de cytokines pro-inflammatoires par les ILC2 ²³⁶. Récemment, un anticorps monoclonal humain, dirigé contre la sous-unité α du récepteur de l'IL-4, bloquant la signalisation de l'IL-4 et de l'IL-13 a été

évalué dans des essais cliniques chez des patients atteints de dermatite atopique, avec une amélioration significative de la gravité de la maladie ²³⁷.

La forte présence de *Staphylococcus aureus* au niveau des lésions cutanées des patients atteints de dermatite atopique limite la présence d'espèces anaérobies. Cela entraîne une modification transcriptionnelle des gènes de la fonction barrière, du métabolisme, de la défense antimicrobienne et de la signalisation des LTH2 ²³⁸.

b) L'alopécie areata

Un autre exemple de pathologie cutanée impliquant une dérégulation immunitaire est l'alopécie areata, qui se caractérise par une diminution de la pilosité, notamment mais pas exclusivement sur le cuir chevelu ²³⁹. Les follicules pileux sont normalement préservés du système immunitaire, un phénomène appelé privilège immunitaire. L'altération de ce privilège immunitaire est l'une des causes de l'alopécie areata ²⁴⁰. Le contexte physiopathologique décrit est celui d'une maladie auto-immune, avec une infiltration anormale de LT. Cela provoque une inflammation locale et la destruction des follicules pileux ²³⁹. L'expression du CMH par les kératinocytes favorise le maintien de LT autoréactifs dirigés contre les follicules pileux ²⁴¹.

c) Le psoriasis

En cas de psoriasis, les propriétés immunitaires des kératinocytes sont altérées. Le psoriasis en plaques (psoriasis vulgaris) représente environ 90% des cas ²⁴². L'expression de TLR5 est réduite dans les kératinocytes, tandis que le TLR1 et le TLR2 sont surexprimées ¹⁷⁸. L'expression de CCL20, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 est augmentée, entraînant une attraction accrue des LT ¹⁰². De plus, dans la peau psoriasique, la sécrétion de CXCL1 et CXCL8 par les kératinocytes favorise le recrutement de neutrophiles ¹⁰². Enfin, la sécrétion d'IL-1 β par les kératinocytes induit une croissance indépendante de l'insuline via l'activation de la voie de signalisation p38 MAPK, qui altère la différenciation et participe à l'état hyperprolifératif de l'épiderme observé dans le psoriasis ¹⁹⁹.

Les cellules épidermiques sont renouvelées tous les 3 à 5 jours en cas de psoriasis plutôt qu'en 28 à 30 jours. Cela serait dû à la maturation prématurée des kératinocytes induite par une cascade inflammatoire dans le derme impliquant les cellules dendritiques, les macrophages et les LT. Ces cellules immunitaires migrent dans l'épiderme et sécrètent des cytokines (IL-36 γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-22), favorisant la prolifération des kératinocytes²⁴³. Une activation anormale du système du complément est également impliquée dans le développement de la pathologie²⁴⁴. Le récepteur à l'arylhydrocarbure (AHR) est un facteur de transcription, qui est activé par des contaminants environnementaux comme la dioxine, les substances xénobiotiques, le tryptophane, le glucosinolate et les métabolites polyphénoliques²⁴⁵. Son activation limite la perte d'eau transépidermique et l'inflammation chronique en cas de psoriasis²⁴⁶.

d) Le vitiligo

Les mélanocytes sont également concernés par des dérégulations immunitaires affectant la peau. Le vitiligo en est un exemple majeur. Cette pathologie se caractérise par la dépigmentation progressive de l'épiderme, du fait de la disparition complète des mélanocytes. Dans le vitiligo, une sensibilité accrue des mélanocytes au stress oxydatif a été mise en évidence¹²⁰. La destruction des mélanocytes se produit par l'action des cellules de l'immunité innée (NK), puis par les cellules de l'immunité adaptative (LT CD8+)¹²⁰. Des études menées sur des modèles murins ont montré que le programmed death ligand 1 (PD-L1, également nommé CD274) peut favoriser le recrutement des LTreg. Cela pourrait constituer la base d'une stratégie thérapeutique de réduction de la dépigmentation en cas de vitiligo²⁴⁷.

Le GPNMB est exprimé dans les kératinocytes épidermiques humains mais disparaît dans la peau lésionnelle du vitiligo²⁴⁸. Il est impliqué dans l'adhésion cellulaire, la protection contre le stress et le maintien des cellules souches. Dans la peau, le GPNMB des mélanocytes favoriserait la pigmentation par la formation de mélanosomes, mais le rôle du GPNMB dans les kératinocytes n'est pas encore bien compris²⁴⁹. L'IFN- γ et l'IL-17A, deux cytokines impliquées dans le développement du vitiligo, inhibent l'expression de GPNMB par les kératinocytes *in vitro*²⁴⁸. Une diminution de l'expression du GPNMB dans les kératinocytes pourrait affecter le maintien ou la survie des mélanocytes en cas de stress oxydatif.

Il existe donc de nombreux dysfonctionnements immunitaires dans les pathologies cutanées, qui impliquent des cellules non hématopoïétiques telles que les mélanocytes et les kératinocytes.

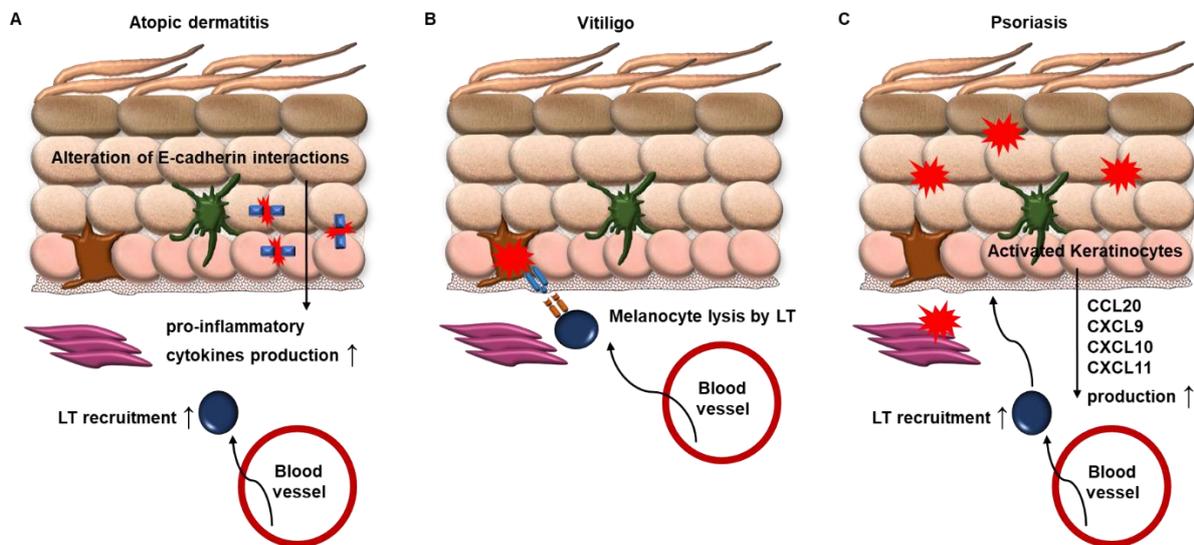


Figure 15) Dysrégulation de fonctions immunitaires cutanées dans un contexte physiopathologique

Les kératinocytes sont impliqués dans les pathologies comme **A** la dermatite atopique, **B** le vitiligo, **C** le psoriasis. Cela peut impliquer des défauts de cohésion entre kératinocytes ou la sécrétion de cytokines.

B) La GVHD

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) est une pathologie classique qui peut intervenir suite à une allogreffe de cellules hématopoïétiques. L'agence de biomédecine française référence 1958 allogreffes de cellules souches hématopoïétiques en 2016, dont 205 en pédiatrie. La GVHD peut se manifester par une attaque du greffon contre l'hôte, notamment au niveau de sa peau. Elle peut survenir dans 40 à 60% des cas d'allogreffe hématopoïétique avec 15% de mortalité. Cela est dû principalement à des incompatibilités des systèmes HLA du greffon et du patient. Les LT du donneur reconnaissent avec leur TCR le CMH du receveur comme étant un antigène. Cela entraîne une activation et une expansion clonale des LT dirigés contre le système HLA du receveur. Cette pathologie peut être aiguë

ou chronique ²⁵⁰. Suite à la production de cytokines pro-inflammatoires, les cellules effectrices reconnaissent les antigènes allogéniques ce qui induit l'altération du tissu cutané.

Cette pathologie est traitée par des corticoïdes mais de nombreux effets secondaires persistent (vergetures, ecchymoses, infections, acné, augmentation de la pilosité, dépigmentation) ²⁵¹. Une diminution du taux de HLA-E soluble chez les patients après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques est associée à une GVHD chronique aiguë et prolongée ainsi qu'à une diminution de la survie ²⁵². Une augmentation du taux de HLA-G soluble est aussi associée avec une forme moins sévère de GVHD ^{253,254}. La GVHD peut prendre une forme proche du psoriasis, avec un recrutement de L Th17 CD8+ et la production accrue de TNF- α et d'IL-17, favorisant le recrutement des cellules immunitaires par les kératinocytes ²⁵⁵. Il y a une association directe entre le niveau plasmatique d'élafine, une protéine soluble produite par les kératinocytes et la gravité de la GVHD cutanée ²⁵⁶.

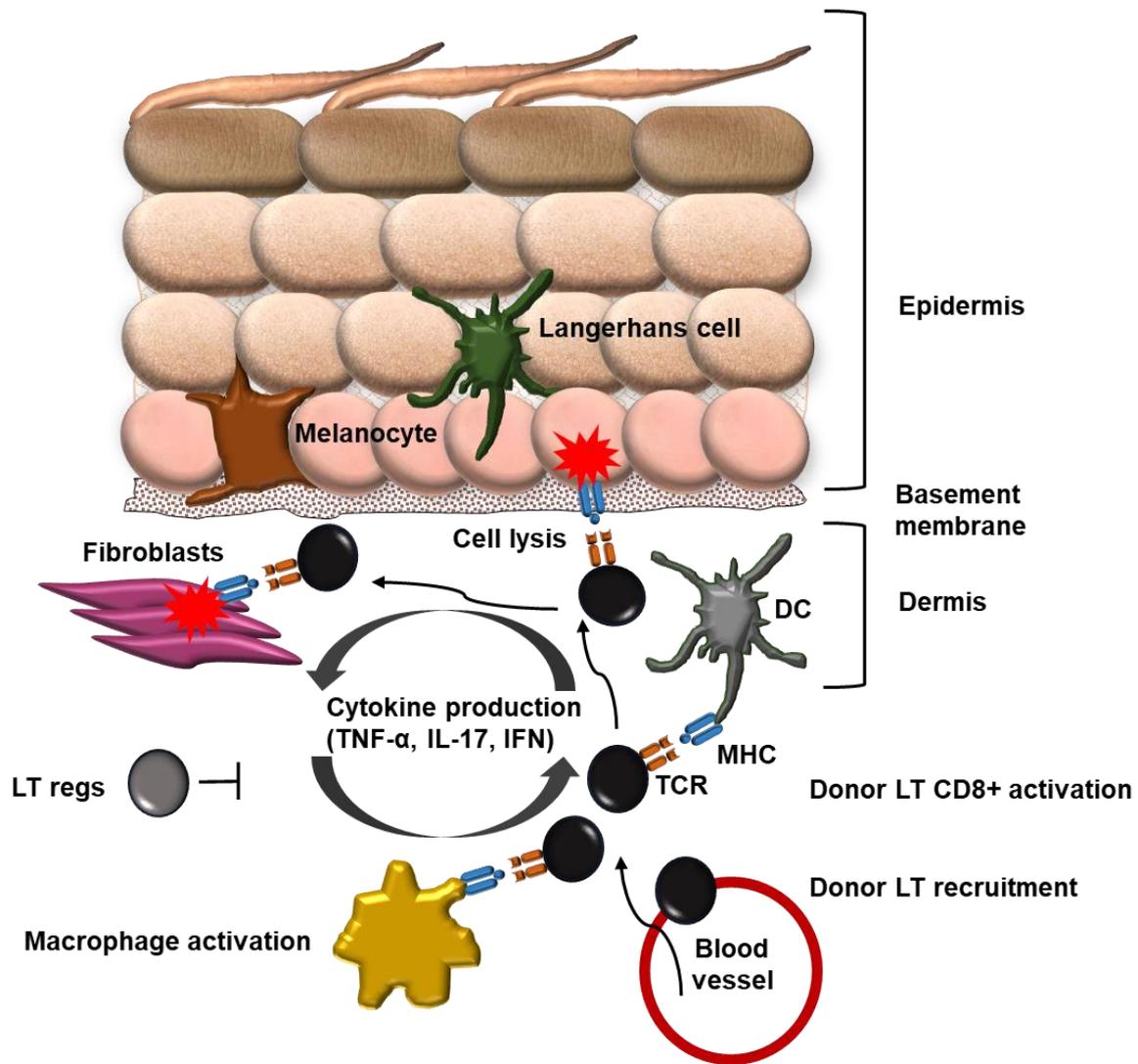


Figure 16) Mécanismes de la Cutaneous Graft-Versus-Host Disease

Les kératinocytes sont impliqués dans la maladie du greffon contre l'hôte suite à des incompatibilités des systèmes HLA du greffon de moelle et du patient. Cela peut impliquer des défauts de cohésion entre kératinocytes ou la sécrétion de cytokines. Il y a une association entre le niveau plasmatique d'élafine, une protéine soluble produite par les kératinocytes et la gravité de la GVHD cutanée. Source : Paczesny et al., 2010.

IV. Lésions cutanées et thérapie cellulaire

1) Processus de régénération cutanée

La cicatrisation de la peau se fait en 4 étapes. La première est une phase de coagulation et d'hémostase. Vient ensuite une phase d'inflammation caractérisée par l'infiltration des cellules immunitaires mononuclées. Ensuite, les fibroblastes et les cellules épithéliales prolifèrent, il peut y avoir de l'angiogenèse. Le tissu reformé subit enfin une étape de maturation avec un dépôt de collagène et une différenciation des cellules, pouvant conduire à la formation de cicatrices. Dans le cas de brûlures superficielles, la peau est renouvelée en moins de deux semaines et il y a peu de cicatrices. L'épiderme est régénéré en quelques heures à partir de la migration de kératinocytes proches du derme. Dans le cas de brûlures plus importantes, la cicatrisation se fait d'abord au niveau des angles, ce qui permet de fermer la plaie plus rapidement. Il a aussi été montré que lors de la régénération cutanée, des fibroblastes localisés dans le derme et issus de la moelle osseuse prolifèrent et participent à la cicatrisation ⁵.

Plusieurs cytokines générées par les cellules dendritiques permettent la cicatrisation suite à une brûlure. CXCL12, VEGF et des facteurs induits par l'hypoxie permettent ainsi l'angiogenèse, tandis que la voie du TGF- β permet de jouer sur la contraction, le remodellement et la cicatrisation ⁵. Contrairement à d'autres cas d'altération de la peau, la brûlure induit une réponse systémique. En effet, des cytokines inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α sont libérés au site de la brûlure. Il est important de noter que la brûlure favorise une infection en modifiant l'équilibre immunitaire, favorisant ainsi une prolongation de l'état inflammatoire et ralentissant le processus de cicatrisation. Une combinaison de facteurs de croissance permet de favoriser la cicatrisation ⁵. Il y a le FGF (fibroblast growth factor), favorisant la croissance des cellules stromales, le PDGF (platelet-derived growth factor), dérivé des plaquettes. Il y a aussi des facteurs favorisant la régénération épidermique comme l'EGF (epidermal growth factor) et l'HGF (hepatocyte growth factor). Ils favorisent la prolifération, la croissance et la migration des cellules épidermiques ^{257,258}. Enfin, il y a des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (vascular endothelial growth factor) et limitant la formation de cicatrices comme le TGF- β 3 (transforming growth factor).

En cas de blessure cutanée sur un modèle murin, l'altération des jonctions intercellulaires entre les cellules différenciées touchées en surface et les cellules sous-jacentes permet à ces dernières de réagir²⁵⁹. Ces cellules détectent la blessure et produisent des cytokines recrutant les cellules dendritiques et les LTregs. Ces LTregs stimulent ensuite la prolifération des cellules souches. En cas de lésion cutanée, les cellules épithéliales sécrètent des cytokines (IL-1, IL-18, IL-25 e IL-33) qui induisent l'activation de programmes de réparation tissulaire médiés par les LTH17²⁶⁰.

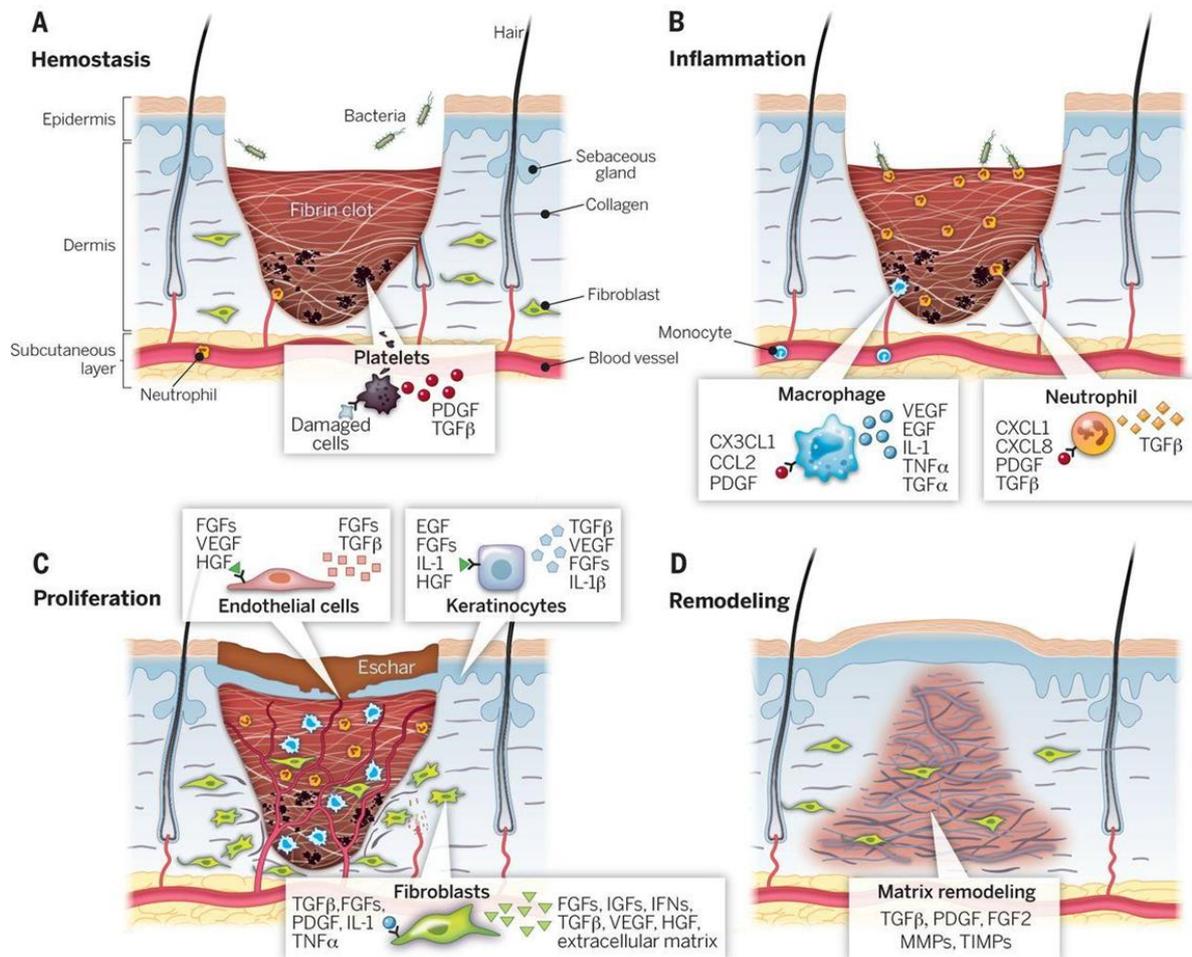


Figure 17) La cicatrisation de la peau

La cicatrisation de la peau se fait en 4 étapes. **A.** La première est une phase de coagulation et d'hémostase. **B.** Vient ensuite une phase d'inflammation caractérisée par l'infiltration des cellules immunitaires mononuclées. **C.** Ensuite, les fibroblastes et les cellules épithéliales prolifèrent, il peut y avoir de l'angiogenèse. **D.** Le tissu reformé subit enfin une étape de maturation avec un dépôt de collagène et une différenciation des cellules, pouvant conduire à la formation de cicatrices.²⁶¹

2) Cas cliniques nécessitant une greffe

Il peut être nécessaire de procéder à une greffe de peau dans plusieurs cas. Cela peut être dû à des brûlures, des blessures traumatiques, des ulcères (de Buruli, de diabète, de pression, veineux...), suite à une chirurgie, d'autres maladies infectieuses (fasciite nécrosante, purpura fulminans...) ou des maladies génétiques comme l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle ²⁶².

A) Epidémiologie et impacts socio-économiques des brûlures

D'après l'OMS, 180 000 décès par an sont provoqués par des brûlures et plus de 30 000 000 de cas nécessitent des soins à l'hôpital ²⁶³⁻²⁶⁵. Elles peuvent être causées par la chaleur ou les rayonnements, la radioactivité, l'électricité, la friction ou le contact avec des produits chimiques. En 2004, près de 11 millions de personnes dans le monde ont eu besoin de soins médicaux suite à une brûlure. Rien qu'aux Etats Unis, il y a eu en 2008 410 000 brûlures dont 40 000 ont nécessité une hospitalisation. 26 millions de dollars sont dépensés chaque année en Afrique du Sud pour des brûlures liées au la cuisine sur des réchauds alimentés en paraffine. Il faut ajouter à ces coûts directs des coûts indirects (pertes de salaire, soins prolongés, traumatismes psychologiques...) ^{263,264}. Cela représente un coût économique pour la société considérable.

En 2000, aux USA, les coûts liés aux brûlures d'enfants étaient de plus de 211 millions de dollars. Le coût des hospitalisations aux USA pour les brûlures variait en 1998 entre 1187\$ pour un ébouillantage à 4102\$ pour une brûlure par le feu ²⁶⁶. Les frais d'hospitalisation étaient beaucoup moins élevés (4 815 \$ par jour) pour les cas qui ont survécu (frais totaux moyens 69 053 \$) que pour ceux qui sont décédés (frais totaux moyens 212 593 \$). Le coût annuel total des brûlures est estimé à 7,5 milliards de dollars, ce qui comprend à la fois les frais médicaux et le coût de la perte de productivité. Ces coûts comprennent 3 milliards de dollars liés aux blessures mortelles par le feu / brûlures, 1 milliard de dollars pour les blessures par le feu / brûlures traitées dans les hôpitaux et 3 milliards de dollars pour les blessures ne faisant pas appel aux soins hospitaliers ²⁶⁵.

En Europe occidentale, le coût des brûlures mineures, comprenant la perte de production au travail de l'individu, le coût pour la sécurité sociale et le coût du traitement, est d'environ 7 000 euros par patient. Pour les brûlures graves, les coûts sont estimés à plus de 40 000 euros par patient ²⁶⁷. Ces chiffres sont sous-estimés car les véritables coûts des incapacités sur le long terme résultant de brûlures ne sont pas encore bien déterminés. Des informations provenant du registre norvégien des patients révèlent qu'en 2007, 726 patients au total ont été admis dans des hôpitaux pour des brûlures aiguës, ce qui représente un taux d'incidence de 15,5 / 100 000 habitants ²⁶⁸. En Norvège, les coûts de la prise en charge hospitalière des brûlures en 2007 ont dépassé 10,5 millions d'euros. Le taux de brûlures nécessitant une hospitalisation chez les enfants de moins de 5 ans était 5,3 fois supérieur, soit 82,5 / 100 000 habitants par an. L'âge moyen de tous les patients brûlés était de 26,9 ans, les deux tiers d'entre eux étant des hommes avec une durée moyenne de séjour à l'hôpital de 11,3 jours. Quinze des patients (2,1%) sont décédés de brûlures dans les hôpitaux norvégiens cette année-là.

En cas de brûlure profonde au niveau de la main (80% des cas), il existe des alternatives thérapeutiques à l'excision-greffe ²⁶⁹. Il s'agit des dermes artificiels (Alloderm, Matriderm, Integra) et des lambeaux. En présence de zones donneuses immédiatement utilisables, la combinaison Matriderm /greffe de peau mince pleine est recommandée. En leur absence, il est recommandé d'utiliser l'Integra. En cas d'exposition des structures nobles et d'un sous-sol douteux, il est envisageable de discuter des lambeaux (cross-arm, Colson modifié). En revanche, ces techniques sont coûteuses. L'Integra (derme artificiel) coûte entre 5 et 5,5€ au cm², le Matriderm, entre 4 et 5€ au cm², tandis que l'Alloderm est encore plus coûteux (32€50 au cm²).

| | Données de l'année 2007, en Norvège |
|---|-------------------------------------|
| Incidence des brûlures graves | 15,5 / 100 000 habitants |
| Incidence des brûlures graves infantiles (<5 ans) | 82,5 / 100 000 habitants |
| Age moyen des patients brûlés à l'hôpital | 26,9 ans |
| Durée moyenne de séjour à l'hôpital | 11,3 jours |
| Taux de décès à l'hôpital | 2,1% |
| Coût de la prise en charge hospitalière des brûlures | 10,5 millions d'euros |

Figure 18) Epidémiologie et coûts dus aux brûlures en Norvège

Données épidémiologiques et économiques sur la prise en charge hospitalières des brûlures en 2017 en Norvège. Source : Onarheim et al., 2009.

B) Les autres situations pathologiques pouvant nécessiter une greffe cutanée

L'ulcère de Buruli est une infection chronique causée par la bactérie *Mycobacterium ulcerans*. Cette bactérie produit une toxine, la mycolactone, qui provoque des lésions tissulaires et inhibe la réponse immunitaire. Elle affecte la peau et parfois les os. Elle peut entraîner des déformations et des incapacités permanentes. Selon les données partielles provenant de 13 pays, il y a eu 2206 cas en 2017. L'Australie et le Nigéria sont les pays notifiant le plus de cas. 35% des lésions touchent les membres supérieurs, 55% les membres inférieurs et 10% d'autres parties du corps. En cas d'ulcère de Buruli trop étendu, il peut être nécessaire de procéder à une greffe cutanée 8 semaines après le traitement antibiotique ayant éliminé l'agent pathogène pour prévenir une rechute^{270,271}. Cela peut concerner les ulcères de catégorie 3 (lésion unique de diamètre > 15 cm, lésions multiples, lésion située sur l'œil, un sein, les organes génitaux, et ostéomyélite).

L'épidermolyse bulleuse jonctionnelle est définie par la formation de lésions bulleuses entre l'épiderme et le derme au niveau de la membrane basale cutanée. Cela entraîne la cicatrisation atrophique des lésions et/ou un excès de formation de tissu granuleux. Elle est causée par des mutations au niveau des gènes codant les protéines impliquées dans la formation de la lame basale, ce qui empêche l'épiderme d'adhérer au derme. Une déficience au niveau du gène LAMB3, codant la sous-unité $\beta 3$ de la laminine, est une des causes de la

maladie. La greffe de feuillet de kératinocytes génétiquement modifiés exprimant le gène LAMB3 a permis de régénérer l'épiderme d'un jeune patient de manière stable pendant plus de 4 ans²⁷².

C) Les différents types de greffe utilisés

Plusieurs approches d'ensemencement des cellules lors du traitement des blessures cutanées sont envisagées. A l'heure actuelle, les pansements de peau sont l'approche la plus courante mais cette approche limite le traitement de plaies larges et complexes. Il existe donc des approches en développement comme des sprays cellulaires, permettant de traiter de larges plaies, mais il existe un risque de stress cellulaire avec ce mode de dépôt, et cette technique reste chère et nécessite des équipements ainsi qu'un personnel qualifié. De même, des approches de dépôt avec de l'impression 3D sont en développement⁵. En fonction de la profondeur de la brûlure, la greffe sera différente. En cas d'altération cutanée peu profonde, on utilise la greffe de peau mince et demi-épaisse avec l'épiderme et une partie de derme. Il est possible de faire une greffe de peau totale avec l'épiderme, et aussi le derme. La zone donneuse doit être suturée car ne peut pas se régénérer. Il existe aussi la greffe avec des pastilles de petits cylindres de peau. Dans tous les cas, il faut que la zone soit bien vascularisée, sans infection et hémorragie.

Il faut différencier les types de greffe. La greffe autologue consiste à prélever les cellules saines du patient pour les lui regreffer. Cela présente un intérêt majeur qui est qu'il y a moins de rejet immunitaire car le système immunitaire tolère mieux les cellules. Toutefois, il est difficile, plus long et coûteux de produire un greffon dans ces conditions. Le contexte inflammatoire du patient, comme dans le cas d'une brûlure, peut aussi entraîner un rejet de greffe même si on lui greffe ses propres cellules. Il y a aussi l'allogreffe, qui consiste à greffer des cellules issues d'un autre individu de la même espèce. Il lui faut avoir un système immunitaire compatible, ce qui est plus rare. Enfin, la xéno greffe consiste à greffer des cellules d'un individu sur un individu d'espèce différente.

Dans le cas de brûlures sévères, la peau peut être brûlée sur 40 à 90% de la surface de la peau. Les cellules souches de la couche basale peuvent être détruites, empêchant ainsi la reformation d'un épiderme. Le traitement consiste alors en une greffe cutanée épidermique

^{273,274}. Ce traitement peut aussi être repris, en combinaison avec une thérapie génique, dans le cas de génodermatoses comme une épidermolyse bulleuse jonctionnelle ^{272,275}.

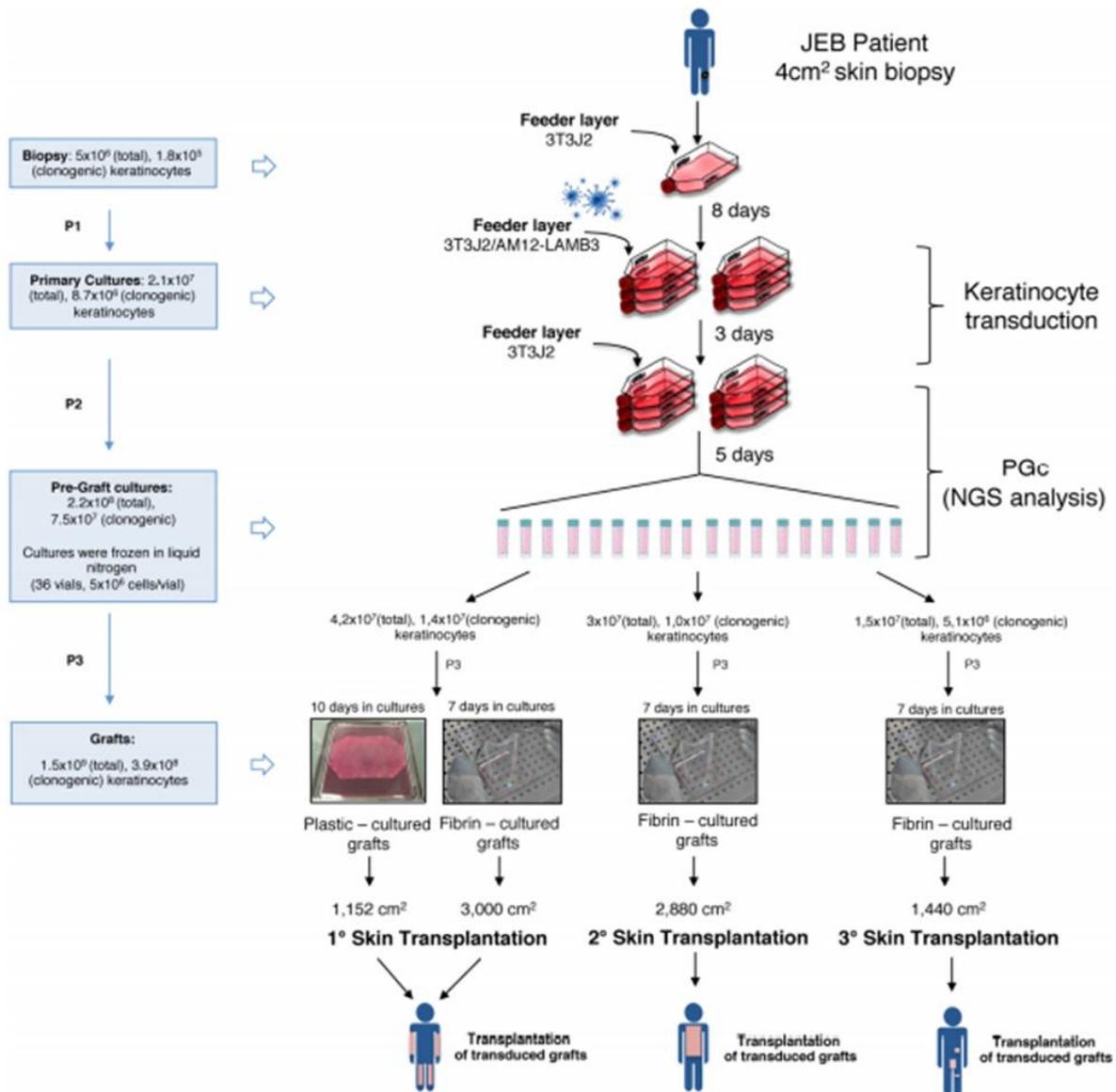


Figure 19) Procédé d'autogreffe épidermique sur un jeune patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle

Schéma du protocole de greffe totale de peau autologue d'un jeune patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle. Une biopsie de 4cm² est prélevée. Les kératinocytes sont amplifiés en culture avant d'être ré-amplifiés sur un gel de fibrine et greffés sur le patient. Source : Hirsch et al., 2017.

3) Bio-ingénierie de greffons cutanés autologues

La préparation des greffons cutanés se fait actuellement à partir de cellules autologues prélevées sur le patient sur des zones saines sur quelques cm². Les kératinocytes peuvent être isolés et cultivés *ex-vivo* ²⁷⁶ en vue d'obtenir une grande quantité de cellules pour avoir un greffon d'une taille suffisante. Ce processus d'amplification *ex vivo* est toutefois long car prend environ 1 à 2 semaines, ce qui est limitant en cas d'urgence.

Ce procédé a été mis en place suite aux travaux de Green en 1979 ²², avec une co-culture de kératinocytes et de fibroblastes murins (3T3). La prolifération des fibroblastes est arrêtée par irradiation ²⁷⁷, ce qui permet de n'amplifier que les kératinocytes. Cette co-culture permet de fournir des facteurs de croissance et des interactions mécaniques entre cellules, ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire ²⁰. Cela permet également l'élimination des métabolites toxiques et retarde la différenciation des kératinocytes ²⁷⁸. Le milieu de culture, dit milieu Green, contient du sérum de veau fœtal (SVF) et de l'EGF permettant d'accroître la croissance des kératinocytes (+40 à 150 doublements de population) ²⁰. D'autres composants furent également ajoutés pour augmenter son efficacité, comme l'insuline, l'hydrocortisone ²⁷⁹ et des molécules stimulant la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) comme l'isoprotérénol ²⁸⁰. Il est aussi possible de favoriser l'expansion *in vitro* des kératinocytes en co-culture avec des fibroblastes en supplémentant le milieu non défini issu des travaux de Green par un inhibiteur de la signalisation du TGF- β ^{20,281}. Cette co-culture en présence de sérum est notamment utilisée pour traiter des patients brûlés sur plus de 30% de leur surface corporelle ²⁸². Il faut toutefois vérifier que le patient n'est pas allergique aux antibiotiques utilisés (vancomycine, amikacine) ni au sérum de veau présent dans les milieux de culture.

Le principal défaut de ce système est qu'il fait intervenir des composants xénogéniques. Or, l'utilisation de fibroblastes d'origine humaine n'impacte pas la croissance à long-terme des kératinocytes comparés celle de 3T3 ²⁸³. L'utilisation d'un substitut de sérum (Ultrosor G) et du KGF (Keratinocyte Growth Factor) permet aussi une amplification des kératinocytes en absence de sérum et de fibroblastes. Ils permettent de reconstruire un épiderme *in vitro* ²⁸⁴. Les milieux dits définis et semi-définis ne contiennent pas de sérum et ont donc une composition mieux contrôlée, car ne dépendant pas de la qualité des lots de sérum. Il n'y a également pas besoin de fibroblastes. Ces caractéristiques moins

xénogéniques vont dans le sens de meilleures applications cliniques. Toutefois, ils ne permettent pas une amplification à long terme d'aussi bonne qualité que les milieux contenant du sérum. Les kératinocytes prolifèrent peu, se différencient vite et sont moins susceptibles de reconstruire un épiderme ²⁸⁵. Le développement de milieux moins xénogéniques mais permettant de maintenir un potentiel régénératif important est donc un enjeu majeur en clinique.

La co-culture de kératinocytes avec les fibroblastes fœtaux est peu immunogène et permet une accélération de la croissance des cellules par rapport à des monocultures. Les cellules fœtales de la peau sont peu immunogènes suite à l'expression d'IDO, dHGF, de GM-CSF et d'IL-8 ²⁸⁶. Il est aussi possible de faire un système de co-culture des kératinocytes avec des cellules stromales mésenchymateuses dérivées d'adipocytes humains (hADSCs) sur une couche de collagène. Ce système semble aussi efficace que la co-culture avec des fibroblastes en augmentant la prolifération tout en diminuant la différenciation des kératinocytes ²⁸⁷. D'autres approches sont aussi à l'étude pour limiter l'ajout de composants animaux dans les cultures de cellules. Il existe un système utilisant la matrice extracellulaire (ECM) générée par des fibroblastes dermiques humains, pour ensuite avoir une expansion des kératinocytes en culture sans sérum ²⁸⁸.

Les kératinocytes sont issus de prélèvements de tissus sains, qui sont souvent des biopsies de 2cm² sur des zones qui cicatrisent bien et sont peu exposées, comme l'aîne et les aisselles. Les kératinocytes sont amplifiés 1 à 3 semaines en feuillets qui sont fixés sur une gaze qui sera ensuite déposée sur la zone à traiter pendant 7 à 10 jours ²⁸². Toutefois, cette approche est coûteuse et prend du temps, car il faut amplifier les kératinocytes plusieurs semaines. Il y a eu plusieurs études cliniques sur l'utilisation d'autogreffes cutanées précédées d'une amplification *ex-vivo*. La première sur 63 patients rapporte un taux de prise de greffe de 65%, avec un taux de survie des patients de 84%, au bout de 7 jours. Le taux d'infection était de 4,3% et 11% des patients ont dû être à nouveau greffés ²⁸⁹. La seconde sur 88 patients rapporte un taux de prise de greffe de 72,7%, avec un taux de survie des patients de 91% ²⁹⁰. Le taux de prise de greffe reste assez variable.

L'utilisation d'un gel de fibrine solide sur lequel amplifier les greffons a représenté une avancée majeure, car cela a permis de plus facilement les manipuler sans les altérer lorsqu'on les retire de leur support de culture ²⁷⁴. L'utilisation d'une matrice de gel de fibrine issu de plasma sanguin humain a permis de développer un modèle de reconstruction

épidermique efficace ²⁹¹. Cette technique permet d'avoir des fibroblastes enchâssés dans la matrice de fibrine, avec une bonne régénération cutanée et des contrôles qualités fonctionnels tout au long de la croissance épidermique.

Actuellement, les cellules utilisées sont issues d'une préparation totale de kératinocytes et non pas de kératinocytes souches, ce qui limite la production du greffon en terme de quantité de cellules et de vitesse d'expansion. Cette technique empêche aussi la reformation des glandes sébacées, des glandes sudoripares et ne contient pas de mélanocytes. L'épiderme ne possède alors pas les propriétés lubrifiantes, thermorégulatrices, sensibles ou encore de pigmentation ²⁹². Le tissu obtenu est peu élastique et cicatrise moins bien qu'un tissu sain. Il est donc pertinent de travailler à la production de greffons cutanés issus de cellules souches pour palier à ces inconvénients ²⁹³.

4) Relation entre l'état d'immaturation des kératinocytes et leur immunogénicité

On sait peu de choses sur la relation entre le caractère des souches des kératinocytes et leur immunogénicité. Il est important d'étudier ce lien afin de comprendre les propriétés immunitaires des cellules souches et générer des greffons avec une bonne capacité de renouvellement cellulaire couplée à une faible immunogénicité pour favoriser la prise de greffe.

L'IL-17 et l'IL-22, en présence de TNF- α , permettent une surexpression des marqueurs CD29, CD44, CD49f (Ita6) et p63 sur les kératinocytes et donc un phénotype immature, similaire à celui retrouvé dans le psoriasis, avec des cellules prolifératives et capables de former des colonies ⁵³. Cette signalisation avec l'IL-17 et l'IL-22 passe par la voie RAC1/MEK/ERK/NF- κ B. De plus, l'IL-1 α , l'IL-6 et le GM-CSF sont des médiateurs en aval de l'IL17A qui favorisent les divisions asymétriques dans les kératinocytes humains ²⁹⁴.

De nombreux gènes sont impliqués dans le maintien ou non d'un phénotype souche des kératinocytes, comme KLF4 ³⁶, GRHL3 et ZNF750 favorisant leur différenciation, et HNRNPK, MYC, CYR61, FGFBP1, EGFR favorisant leur prolifération ³⁷. Ces gènes (KLF4, cMYC, OCT3/4 et SOX2) sont d'ailleurs utilisés pour générer des iPSCs à partir de kératinocytes ³⁸. L'interferon regulatory factor 2 IRF2 inhibe lui la capacité de prolifération

des kératinocytes ³⁹. KLF4 régule des gènes anti-inflammatoires dans les kératinocytes murins via une interaction avec le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) ²⁹⁵. Cette régulation se fait via Tsc22d3 and Zfp36, des médiateurs de l'inflammation. L'interaction entre KLF4 et GR joue donc sur la balance différenciation/prolifération des kératinocytes.

Toutefois, si la brûlure touche une superficie trop large, il est difficile d'obtenir suffisamment de cellules du patient pour les amplifier et réaliser une greffe autologue. De même, chez certains patients âgés ou ayant un contexte inflammatoire important, il existe un manque de cicatrisation de la zone où le prélèvement autologue a été réalisé, ce qui limite l'approche thérapeutique actuelle. Pour ces raisons, il existe toujours une réflexion autour de la greffe allogénique même si la problématique du rejet de greffe est très importante. Plusieurs produits contenant des kératinocytes pour une greffe allogénique sont commercialisés (Epicel, Cryoskin, BioSeed-S, Apligraf, Dermagraft, Theraskin, OrCell...) mais le problème du rejet de greffe persiste.

5) Problématique du rejet de greffe allogénique

Le rejet de greffe est expliqué par les différences alléliques entre donneurs et receveurs au niveau des locus polymorphes de 3 classes d'antigènes d'histocompatibilité: le groupe sanguin ABO, le complexe d'histocompatibilité majeur (CMH) et mineur (mHA) ²⁹⁶. Dans le cas de la greffe cutanée allogénique, les cliniciens observent un fort rejet au bout de 7 à 10 jours, ce qui limite grandement l'utilisation de cette approche. C'est un problème qui est d'ailleurs aussi présent lors de l'utilisation de cellules souches embryonnaires pour régénérer un épiderme in vitro, car les cellules utilisées seraient issues d'une allo-banque ²⁹⁷. La problématique du rejet de greffe met en exergue un fort besoin clinique en cellules immunocompatibles ^{298,299}.

Les problèmes du rejet de greffe ont conduit à l'expérimentation de plusieurs techniques. Des approches sur la souris combinant un immunosuppresseur comme la Rapamycine, un inhibiteur de la division des LT, et l'IL-2 ont permis d'empêcher le rejet de greffe de peau. L'IL-2 contrôle l'activité des LT reg ce qui favorise la tolérance immunitaire

³⁰⁰.

Chez l'homme, la surexpression de CD47 ainsi que la diminution de l'expression du CMHI et du CMHII dans des iPSCs et leurs dérivés permet d'avoir des greffons moins immunogéniques et de diminuer le rejet ³⁰¹. CD47 inhibe la phagocytose et l'activité des NK, tandis que la diminution du CMHI est faite dans l'étude par un CRISPR dirigé contre la B2M. Pour le CMHII, c'est un CRISPR dirigé contre le régulateur CIITA qui est utilisé. D'autres approches ont été envisagées, comme la délétion de la B2M et la production de cellules homozygotes pour les gènes du CMHI. Toutefois, ces approches sont imparfaites. Dans le premier cas, les cellules ne peuvent plus faire du tout de présentation antigénique et sont lysées par les NK, tandis que dans le second cas, il est très difficile de trouver tous les donneurs sains homozygotes pour couvrir toute la population ³⁰².

Des approches de surexpression de récepteurs immunosuppresseurs comme CTLA4-ig et PD-L1 ont également été faites sur des hESCs ³⁰³. PD-L1 se lie à PD-1, exprimé à la surface des LT, ce qui inhibe leur activité ³⁰⁴. PD-L1 permet le maintien de l'anergie des LT et limite les réactions auto-immunes ³⁰⁵.

Des approche d'édition du génome d'iPSCs au niveau des gènes HLA ont également été initiées ³⁰². Une première stratégie a consisté à produire des cellules pseudo-homozygotes pour les gènes HLA de classe I, à partir de donneurs hétérozygotes, par édition de l'allèle ciblé. Cela permet de réduire le nombre de donneurs nécessaires pour avoir une couverture de toute la population japonaise dans l'étude. La seconde approche, tenant compte du rôle pivot de HLA-C dans la suppression des cellules NK, a consisté à supprimer HLA-A et HLA-B en ne conservant qu'un seul haplotype de HLA-C pour générer des iPSCs (les gènes E, F et G sont conservés). Cela augmente la compatibilité des donneurs. Dans les deux cas, les cellules sont capables de supprimer l'activité des LT et des NK tout en préservant partiellement l'expression de HLA et la présentation antigénique. Cette stratégie peut être combinée à une déplétion du CMHII via une déplétion de CIITA.

Il existe aussi des approches utilisant des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) qui sont très plastiques et peuvent être différenciées en différents types cellulaires. De plus, les MSC libèrent des cytokines anti-inflammatoires et inhibent la prolifération des LT CD4+ et CD8+, ainsi que des LB. En effet, les MSC expriment peu de CMHI et de CMHII, ainsi que les co-activateurs des LT (CD40, CD80 et CD86), ce qui limite le risque de rejet ³⁰⁶⁻³⁰⁹. Les cellules stromales dérivées du tissu adipeux peuvent aussi être utilisées en cas de brûlure.

Il est donc important de développer également des greffons immunocompatibles pour limiter ce rejet de greffe.

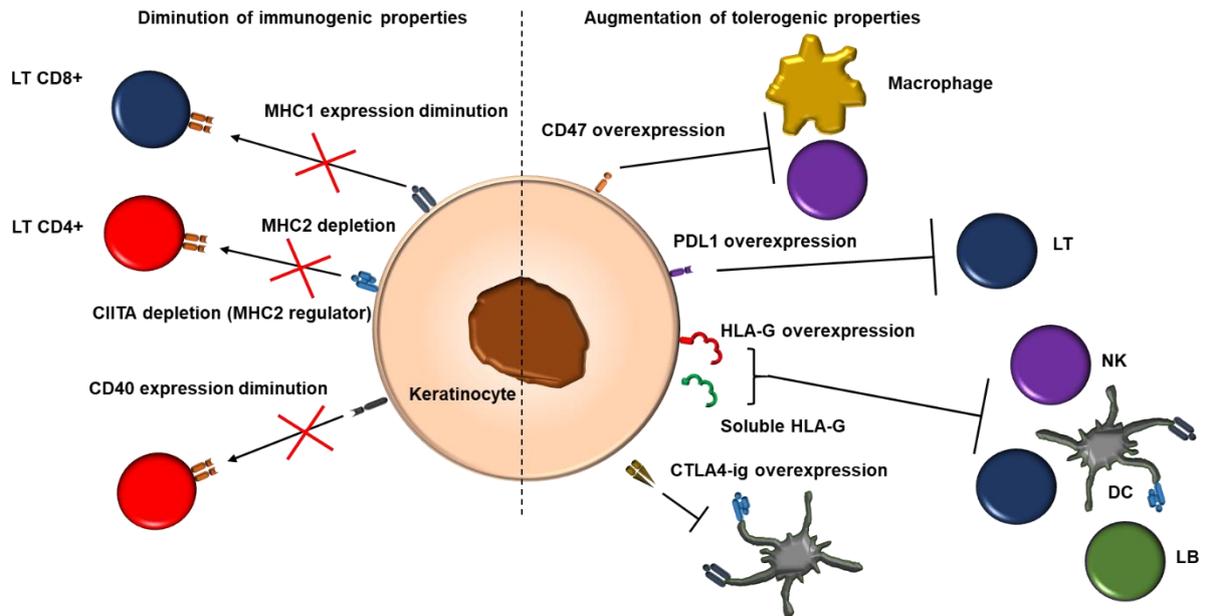


Figure 20) les stratégies immunomodulatrices candidates dans l'épiderme

Différentes approches existent pour générer des cellules immunocompatibles et limiter le rejet de greffe. Les premières visent à diminuer l'expression de marqueurs immunogènes (CMHI, CMHII et CD40). Les secondes visent à surexprimer des molécules immunomodulatrices (CD47, PD-L1, CTLA-4ig, HLA-G).

V. Acteurs moléculaires de la tolérance immunitaire : Focus sur HLA-G

1) Modulation immunitaire via CTLA-4 et PD-L1

Plusieurs anticorps ciblant les molécules de costimulation ont déjà été mis sur le marché. Certaines molécules ciblent CD28, CD80 et CD86, comme l'Abatacept et le Belatacept possédant des domaines du CTLA-4. Il y a aussi des molécules ciblant le CTLA-4 comme l'Ipilimumab et PD-1 comme le Nivolumab ³¹⁰. En effet, CTLA-4 et PD-1, bien que permettant tous-deux de favoriser la tolérance des LT, ont des modes d'action distincts.

CTLA-4 se lie au CD80 et CD86 exprimés seulement sur les APCs tandis que PD-L1 est exprimé sur beaucoup plus de types cellulaires différents³¹¹. La fixation de CD28 sur CD80 ou CD86 entraîne une co-stimulation des LT, tandis que la fixation de CTLA-4 sur ces récepteurs entraîne une co-inhibition des LT. Ainsi, les ligands de CTLA-4 peuvent se lier avec CD28 et avoir une action opposée, tandis que PD1 se fixe sur PD-L1 ce qui entraîne toujours une inhibition des LT et des NK. De plus, CTLA-4 est exprimé sur des LT primo-activés et des Tregs constitutifs, dans les nœuds lymphatiques, tandis que PD-1 est présent sur des LT effecteurs, et des Tregs induits, dans les tissus inflammatoires. L'expression de CTLA-4 est transitoire et faible tandis que celle de PD-1 est stable et élevée, mais CTLA-4 induit une tolérance plus forte que PD-1³¹⁰.

PD-L1 et PD-L2 sont les ligands de la protéine PD1 (programmed cell death protein 1)^{310,312}. PD1 est exprimé sur les LT, tandis que PD-L1 est exprimé sur les LB, les LT, les macrophages, les DCs, les mastocytes, les îlots pancréatiques, les astrocytes, les cellules placentaires, les cellules endothéliales et épithéliales et aussi les kératinocytes. PD-L2 est lui exprimé sur les macrophages, les mastocytes et les DCs. L'interaction de ces molécules permet une atténuation de la réponse immune engendrée par la liaison du TCR. PD-L1 est le principal ligand de PD1. PD1 possède un domaine Ig-V extracellulaire, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique avec 2 motifs de signalisation avec des tyrosines. PD-L1 possède aussi un domaine Ig-V, un domaine Ig-C, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. PD-L1 est une protéine de 65kDa et contenant 220 acides aminés²⁴⁷.

La liaison de PD-L1 sur PD1 entraîne la phosphorylation du motif ITIM (tyrosine-based inhibitory motif) et du motif ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) par des kinases de la famille Src. Cela entraîne le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 et l'atténuation des signaux activateurs des LT. PD-L1 est aussi capable de se lier au co-activateur CD80, ce qui renforce l'inhibition des LT. Cela entraîne l'inhibition de la prolifération des LT et de la production de cytokines. PD-L1 intervient dans le cas de nombreuses pathologies comme le cancer et est donc une cible thérapeutique très étudiée. Ainsi, de nombreux anticorps ont été développés comme le Durvalumab, l'Atezolizumab et l'Avelumab.

Il existe de nombreux systèmes de régulation de l'expression de PD-L1, via des voies de signalisation (JAK-STAT, MYC, mTOR, RAS, MYC, HIF), des miARN régulant la

traduction, et des facteurs (CSN5, CUL3, B3GNT3) entraînant des modifications post traductionnelles. Un des principaux inducteurs de l'expression de PD-L1 est l'IFN- γ ³¹⁰. Des études sur un modèle murin ont montré que les kératinocytes exprimant PD-L1 permettent de réduire la prolifération et la fonction effectrice des LT au niveau de sites inflammatoires locaux ainsi que la production d'IFN- γ , ce qui permet un maintien de l'homéostasie³¹¹.

Dans le cas de nombreuses pathologies (maladies auto-immunes, cancers), des stratégies thérapeutiques visant à moduler l'immunité cellulaire ont été développées. L'expression de PD-L1 est par exemple diminuée dans l'épiderme en cas de psoriasis³¹³. PD-L1 a été détecté dans des kératinocytes proches de la membrane basale de la muqueuse buccale de patients atteints du Lichen plan buccal, une pathologie caractérisée par une forte infiltration de LT sous épithéliale³¹⁰. Des études sur des modèles murins ont montré que PD-L1 augmente la présence de LTregs dans la peau ce qui pourrait permettre d'atténuer la dépigmentation dans des cas de Vitiligo²⁴⁷.

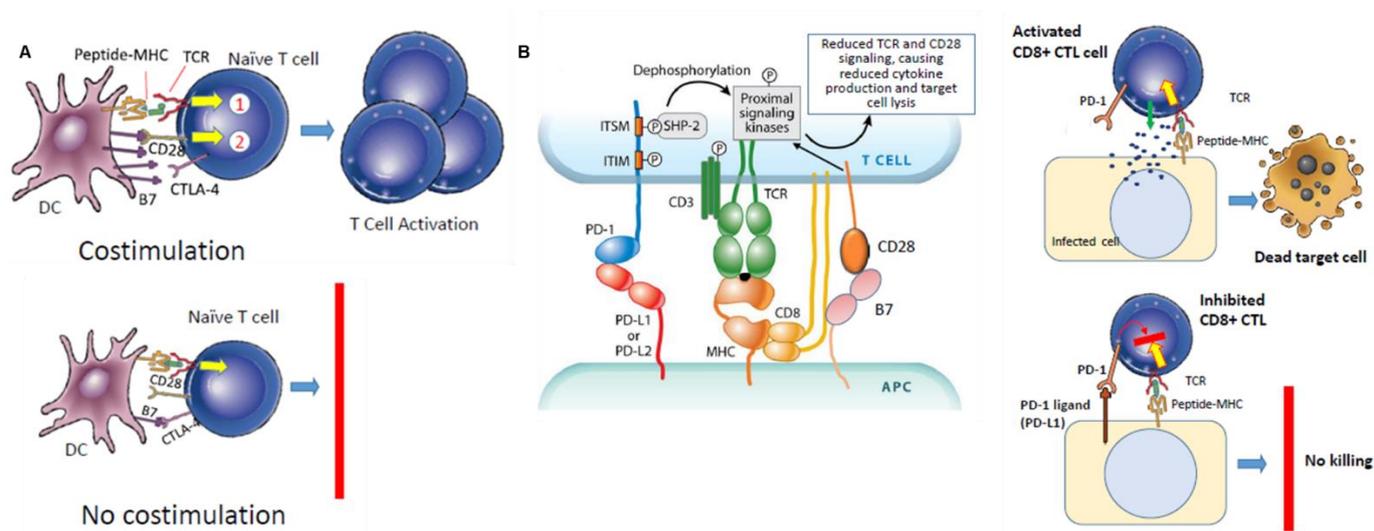


Figure 21) Les propriétés immunomodulatrices de CTLA-4 et PD-L1

A. CTLA-4 se lie à B7 avec plus d'affinité que CD28. Il agit donc comme un inhibiteur compétitif de l'activation des LT par CD28. Il pourrait aussi inhiber directement les LT sur lesquels il est exprimé. **B.** PD-L1 se lie au PD1 exprimé par les LT CD8+. Cela entraîne une réduction de l'expression du TCR et de CD28, de la production de cytokines et de la dégranulation³¹⁴. Source : Baumeister et al., 2016, Lichtman et al., 2017.

2) Découverte du gène HLA-G

HLA-G a été particulièrement étudié dans le contexte de la recherche sur l'inhibition du rejet de greffe. En effet, lors de la grossesse, sa présence permet de protéger les cellules embryonnaires contre l'activité des NK de la mère^{315,316}. Il est d'ailleurs actuellement utilisé comme marqueur de la qualité de l'embryon lors de la procréation médicalement assistée³¹⁷. Il pourrait être ainsi intéressant de développer des applications permettant d'inhiber le rejet du greffon en produisant des greffons exprimant HLA-G. Le gène codant HLA-G est localisé sur le chromosome 6 et est composé de 7 introns et de 8 exons, codant une protéine transmembranaire de 39kDa. Il est aussi possible d'observer des complexes de 53kDa et de 70-76kDa dans des exsudats de patients atteints d'un cancer, en cas de liaison avec la β 2-microglobuline (B2M) et de formation de ponts disulfures entre plusieurs molécules HLA-G³¹⁸.

L'exon 1 code le peptide signal. Les exons 2, 3 et 4 codent pour les domaines globulaires α 1, α 2 et α 3, tandis que l'exon 5 code pour la région transmembranaire et que l'exon 6 code la queue cytoplasmique. Cette queue cytoplasmique ne contient pas de motif d'endocytose ce qui augmente la demi-vie de HLA-G à la surface cellulaire comparativement aux autres molécules HLA de classe I³¹⁹. L'exon 7 n'est pas transcrit et l'exon 8 codent pour le 3'UTR non transcrit³¹⁷. Il y avait en 2015 51 allèles et 17 protéines connus.

3) Isoformes de HLA-G

Il existe plusieurs isoformes issus d'un seul transcrite primaire. Les isoformes HLA-G1 à G4 sont membranaires alors que les HLA-G5 à G7 sont leurs pendants solubles³²⁰. HLA-G1 contient les trois domaines globulaires, HLA-G2 contient les domaines α 1 et α 3, HLA-G4 contient les domaines α 1 et α 2 et HLA-G3 ne contient que le domaine α 1. HLA-G5 est l'homologue soluble de HLA-G1 et a les trois domaines globulaires, alors que HLA-G6 est l'homologue soluble de HLA-G2 et ne contient que les domaines α 1 et α 3. HLA-G1 contient 338 acides aminés et a une masse de 38kDa, HLA-G2 contient 246 acides aminés et a une masse de 28kDa, HLA-G3 contient 154 acides aminés et a une masse de 17kDa³²¹. HLA-G4 contient 246 acides aminés et a une masse de 28kDa^{322,323}, HLA-G5 contient 319

acides aminés et a une masse de 36kDa^{324,325}, HLA-G6 contient 227 acides aminés et a une masse de 26kDa^{324,326}, HLA-G7 contient 116 acides aminés et a une masse de 13kDa³²⁶.

Seuls HLA-G1 et G5 présentent une longue chaîne lourde associée à la β 2-microglobuline (B2M) et se liant à de petits peptides, bien qu'il ne soit pas clair si HLA-G peut ou non les présenter aux LT CD8+³²⁷. Récemment, de nouveaux isoformes ont été détectés dans des tumeurs de carcinomes rénaux. Ces isoformes sont issus d'un épissage alternatif avec une extension de la région 5' (forme HLA-G1L) et peuvent aussi ne pas avoir de domaine transmembranaire et de domaine α 1³²⁸. Ce domaine α 1 permet la liaison à la B2M.

HLA-G peut être exprimé sous forme d'un homodimère, avec un pont disulfure³²⁹⁻³³¹, qui est plus actif que la forme monomérique³³²⁻³³⁴. HLA-G1 peut être exprimé sous la forme d'un homodimère covalent ou d'un monomère alors que HLA-G2 peut être exprimé sous la forme d'un homodimère non covalent (sans pont disulfure) ayant une plus grande avidité que HLA-G1. HLA-G1 peut également être libéré dans le milieu par les métalloprotéases et cette forme soluble sHLA-G1 est tout aussi stable et fonctionnelle que la forme membranaire de HLA-G1³³⁵. D'autres isoformes de HLA-G, comme HLA-G4 et HLA-G5, sont aussi exprimés sous forme d'homodimères³³⁶. L'oxyde nitrique (NO) peut modifier une tyrosine de HLA-G et induire son excrétion protéolytique par des métalloprotéases³³⁷. Ce sHLA-G nitré est retrouvé dans les fluides corporels³³⁸, et pourrait caractériser des sites inflammatoires.

Il existe différents anticorps qui reconnaissent ces isoformes. 4H84 reconnaît l'épitope de la chaîne α 1 de toutes les isoformes tandis que 5A6G7 reconnaît l'extrémité C-terminale codée par l'intron 4 des isoformes solubles G5 et G6^{339,340}. 87G reconnaît les isoformes HLA-G1 et G5 via l'épitope de la chaîne α 1³⁴¹.

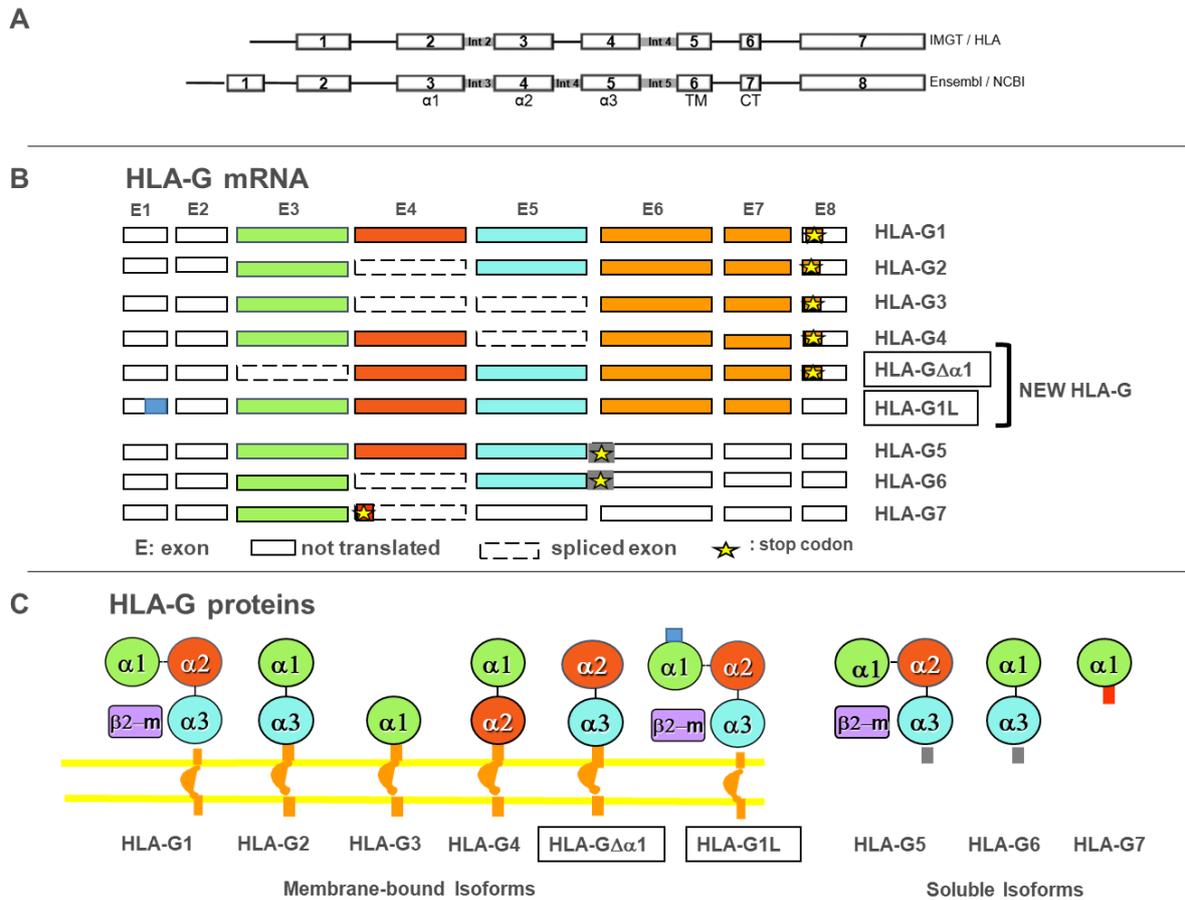


Figure 22) Les isoformes d’HLA-G

Le gène codant HLA-G est localisé sur le chromosome 6 et est composé de 7 introns et de 8 exons. Les isoformes HLA-G1 à G4 sont membranaires alors que les HLA-G5 à G7 sont leurs pendants solubles. Source : Rouas-Freiss et al., 2021.

4) Expression du gène HLA-G

HLA-G est exprimé dans les cellules du placenta³⁴² et leurs vésicules extracellulaires³⁴³, dans l’épithélium du thymus³⁴⁴, dans les îlots pancréatiques³⁴⁵, dans la cornée³⁴⁶ et, sous la forme HLA-G5, par les MSCs (Adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells)³⁴⁷. Il est aussi présent dans le sang où il peut être produit par les monocytes activés CD14+³⁴⁸. Plusieurs études ont montré que l’IL-10 induit la production d’HLA-G par les MSCs, les monocytes et les trophoblastes^{347,349,350}. Il est aussi légèrement exprimé, combiné à une faible expression de HLA-DR, dans les FMSC (fetal-maternal microchimeric stem cells), qui

semblent donc peu immunogènes³⁵¹. HLA-G est aussi exprimé sur des exosomes produits par le placenta, par des cellules de mélanome ou sur des exosomes présents dans le sang des femmes enceintes³⁴⁸.

En cas de pathologie, il peut aussi être exprimé par des cellules présentatrices d'antigène (APC) activées par de l'IL-10 ou de l'IFN- γ ^{350,352}, par les macrophages CD68+ CD11+ en cas de psoriasis³⁵³, d'infection virale³⁵⁴, dans des tumeurs^{355,356} mais aussi dans des transplantations cardiaques³⁵⁷. Le rôle de HLA-G dans ces différents contextes est bien décrit. L'expression d'HLA-G dans des tumeurs et sa liaison avec LILRB1/ILT2 est associée au développement tumoral, avec des métastases invasives et un mauvais pronostic vital pour le patient. Cela est dû au fait que HLA-G permet l'échappement des tumeurs, en particulier pour certains allèles du polymorphisme HLA-G³⁵⁶. Le niveau d'HLA-G est aussi utilisé comme marqueur prédictif dans le cas de plusieurs maladies auto-immunes³⁵⁶. Une infection par un pathogène comme *Pseudomonas Aeruginosa* ou *Toxoplasma gondii* peut aussi augmenter l'expression et la sécrétion d'HLA-G et favoriser l'échappement au système immunitaire³⁵⁶. Les niveaux de HLA-G solubles (sHLA-G) dans le plasma sont plus élevés chez les patients VHC / VIH par rapport au VHC, au VIH et aux individus sains³⁵⁸. HLA-G pourrait ainsi permettre de mieux distinguer les groupes de patients atteints de maladies infectieuses. HLA-G est aussi exprimé dans le plasma de patients atteint de la lèpre³⁵⁹.

HLA-G peut être exprimé par une cellule et ensuite transmis à une autre cellule par divers mécanismes. Ainsi, une cellule exprimant peu HLA-G peut finalement l'exprimer fortement. Cela peut poser problème par exemple lors de la transmission d'HLA-G par des cellules cancéreuses à d'autres cellules cancéreuses, car cela favorise l'échappement immunitaire d'un plus grand nombre de cellules. De même, la transmission d'HLA-G de cellules cancéreuses à des cellules immunitaires va favoriser l'anergie du système immunitaire et l'échappement immunitaire de la tumeur³⁶⁰. Les mécanismes de transfert d'HLA-G intercellulaire sont la trogocytose, la formation d'exosomes et celle de nanotubes à effet tunnel (TnTs) entre les cellules. La trogocytose est un mécanisme qui se met en place en moins d'une heure et permet le transfert de molécules par des contacts entre les membranes de cellules en formant ainsi des synapses immunologiques. Les exosomes sont quant à eux des vésicules extracellulaires de 75 à 150 nm sécrétées par des cellules et qui peuvent fusionner avec d'autres cellules. Les exosomes contenant des protéines à leurs membranes peuvent donc les transmettre lors de la fusion avec les membranes des cellules cibles. Enfin, les TnTs sont des protrusions non adhérentes faisant intervenir la polymérisation d'actine

permettant de connecter des cellules distantes. Leur génération peut se faire soit par élongation des protrusions soit lors de la séparation de cellules qui étaient collées initialement

360

5) Régulation de l'expression d'HLA-G

L'action de cytokines ³⁶¹, comme l'IL-10 ^{350,362}, l'EGF ³⁶³ et surtout les IFN ^{364,365} peut entraîner une surexpression du gène HLA-G, mais pas l'induire ³⁵². Il est possible d'induire l'expression d'HLA-G en simulant des conditions inflammatoires (IFN- γ 100ng/mL de milieu et/ou TNF- α 20ng/mL de milieu) pendant 24h ³⁶⁶. Il a été montré que l'hypoxie favorise aussi l'expression de HLA-G, ce qui pourrait avoir un impact dans le cas de la remodelation utérine lors de la grossesse ou dans le cas de cancers ³⁶¹.

Il existe aussi des mécanismes épigénétiques de déméthylation qui activent la transcription du gène HLA-G. L'agent de déméthylation 5-aza2'-désoxycytidine, la décitabine, et l'inhibiteur de l'histone désacétylase, la trichostatine A, peuvent induire la transcription du gène HLA-G, mais pas sa traduction, dans des cas de cancer ^{367,368}. L'expression de l'ARNm HLA-G n'entraîne pas systématiquement la présence de la protéine ^{369,370}. Cela implique une régulation post-transcriptionnelle stricte de l'expression de HLA-G. Parmi ces potentiels mécanismes post-transcription, se trouvent les microARN miR-152, -148A, -148B et -133A ³⁷¹, étudiés dans le cadre d'une étude sur le carcinome rénal. L'expression stable de ces microARN de 21 à 24 nucléotides permet la sous expression de HLA-G via une diminution du taux d'ARNm et une fixation sur leur zone 3'UTR, ce qui augmente la cytotoxicité médiée par les NK ³¹⁷.

Il existe aussi trois éléments de réponse ras (RRE), situés le long de la région promotrice du gène HLA-G de 1,4 kb, qui entraînent une sous-expression de HLA-G lors de la liaison du facteur RREB-1 ³⁷². L'expression du gène peut également être régulée par la fixation de protéines de choc thermique (HSF-1) sur le promoteur ³⁴⁸. Il existe une zone située entre -100 bp et le codon ATG qui, sous l'action de la progestérone, entraîne une régulation positive du gène HLA-G ³⁷³. La progestérone régule l'expression de HLA-G de manière dose dépendante ³⁷⁴. Il existe plus de 29 single nucleotide polymorphisms (SNPs) potentiellement impliqués dans la régulation du promoteur du gène codant HLA-G ^{375,376}. L'expression de HLA-G1,2 et 4 sur les cellules thymiques peut aussi être favorisée par l'expression du facteur de régulation

auto-immun Aire ³⁷⁷. L'expression d'HLA-G peut aussi être induite par l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) lors de la différenciation des monocytes en DC, même si les mécanismes d'action de ces deux molécules permettant la tolérance sont distincts ³⁴⁸. La fixation de GLI3 via la voie Hedgehog sur l'élément de liaison GLI du promoteur du gène HLA-G entraîne sa sous expression ³⁷⁸. Enfin, HLA-G permet aussi de sur-exprimer ses propres récepteurs (ILT2, ILT4 et KIR2DL4) sur les APC, les NK et les LT, ce qui permet la mise en place d'une boucle de régulation positive de son activité inhibitrice ³⁷⁹.

6) Action d'HLA-G sur ses récepteurs

Il a été montré que HLA-G est un potentiel inhibiteur du rejet de greffe en inhibant l'action des NK, des LT et des APC ^{355,380}. Cette inhibition se fait via plusieurs récepteurs au HLA-G, ce sont ILT2/CD85j/LILRB1 ^{381,382}, ILT4/CD85d/LILRB2 ³⁸³ et KIR2DL4/CD158d ^{316,384}. NKG2A/CD94 est un autre récepteur de HLA-G sur les NK. La liaison ligand-récepteur entre HLA-G et NKG2A/CD94 dépend de la composition en acides aminés de la chaîne lourde de HLA-G ³⁸⁵. Les récepteurs de HLA-G sont exprimés sur différentes cellules immunitaires ³¹⁷. ILT2 est exprimé sur les LB, les monocytes, les LT, les NK et les DC ³⁸¹. ILT4 est lui exprimé sur les cellules myéloïdes (monocytes, macrophages, DC) ³⁸³. KIR2DL4 est exprimé surtout sur les NK ³⁸⁶ et un peu sur les LT. Il est exprimé de manière transitoire à la membrane et surtout dans les endosomes, et cette expression peut être augmentée en présence d'IL-2 ³⁴⁸. A la différence des autres récepteurs, il ne permet pas la liaison à un dimère de HLA-G. Il présente une spécificité de liaison avec HLA-G ³⁸⁴ via les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ ³⁴⁸ et peut avoir une fonction inhibitrice ou activatrice, cette dernière étant médiée par une internalisation du complexe sHLA-G/ KIR2DL4 ^{317,387}.

ILT2 et ILT4 présentent une spécificité pour toutes les molécules HLA de classe I, mais ont la plus haute affinité pour HLA-G ³⁸⁸ et ont une fonction inhibitrice ³¹⁷. Ils possèdent 4 domaines extracellulaires et des immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) sur leur queue cytoplasmique leur permettant d'avoir une activité inhibitrice. La fixation d'HLA-G sur ILT2 et ILT4 entraîne la phosphorylation des motifs ITIMs et le recrutement de phosphatases initiant la cascade réactionnelle inhibitrice ³⁴⁸. Des études sur des modèles murins suggèrent que la signalisation met en jeu les voies IL-6-STAT3 et NF- κ B dans les DC ³⁸⁹. ILT2 et ILT4 reconnaissent différentes conformations de HLA-G ³⁹⁰. ILT2 est un

récepteur du HLA-G associé à B2M, alors que ILT4 reconnaît également les chaînes lourdes libres du HLA-G^{330,391}. Le dimère HLA-G1 sans β 2m semble manquer d'affinité pour LILRB1, mais se lie fortement à LILRB2, mais les deux récepteurs permettent la fixation de dimères comme cela a été montré par cristallographie³⁹². Il existe d'autres potentiels récepteurs du HLA-G comme CD8 et CD160, présent sur les LT et les NK³¹⁷.

7) HLA-G et la modulation des cellules immunitaires

A) L'inhibition de la maturation des cellules dendritiques

Le potentiel de HLA-G comme inhibiteur du rejet de greffe a été montré par plusieurs résultats sur chaque type cellulaire impliqué dans ce rejet^{380,393}. En ce qui concerne les APC, des études de greffe de peau allogénique sur un modèle murin ont montré que HLA-G1 inhibe la maturation des APC, donc la réponse immunitaire et le rejet de greffe³⁹⁴. Il est à noter que les principaux récepteurs de HLA-G1 sur les APC sont ILT4 et ILT2. Récemment, il a été montré qu'un type de DC exprimant de l'IL-10, les DC-10³⁹⁵, a des propriétés tolérogènes via une expression d'HLA-G1. Ces cellules sont présentes dans le sang in vivo et les organes lymphoïdes secondaires et expriment en plus d'HLA-G1 ILT2, 3 et 4, ce qui leur permet d'induire les cellules Tr1, aux propriétés régulatrices bien étudiées³⁹⁵⁻³⁹⁸.

B) L'inhibition de la fonction cytolytique des NK

Les HLA-G1,2,3,4 et 5 semblent aussi capables d'inhiber la fonction cytolytique des NK sur les cellules exprimant peu de CMHI via une interaction avec ILT2 et KIR2DL4. Cela a été montré in vitro et ex vivo^{315,399-402} et aussi in vivo avec des études de greffes xénogéniques⁴⁰³⁻⁴⁰⁷. Le HLA-G soluble semble aussi capable d'induire l'apoptose des NK et des LT cytotoxiques⁴⁰⁸. Les formes solubles et membranaires de HLA-G peuvent aussi jouer sur l'expression et la libération d'IFN- γ par les NK^{387,409,410}. Il existe aussi une possibilité que HLA-G favorise la surexpression d'HLA-E, ce qui modifierait l'activité des NK³¹⁷. Il est possible de mesurer l'inhibition de la cytotoxicité par HLA-G en cytométrie en utilisant un

anticorps bloquant anti-HLA-G et en ne considérant que les cellules exprimant le récepteur ILT2⁴¹¹.

C) L'inhibition de la prolifération et de la fonction des LT et des LB

HLA-G est capable d'inhiber la prolifération, la différenciation des LB et leur production de cytokines⁴¹². Le HLA-G des cellules du foie inhibe les LT et cela est d'autant plus fort pour les cellules du foie différenciées⁴¹³. En ce qui concerne les LT CD4+, HLA-G1 et G5 semblent capables d'inhiber leur allo-prolifération via ILT2⁴¹⁴⁻⁴¹⁶. Les lymphocytes T CD4+ allogéniques sécrètent HLA-G5⁴¹⁵, et ce dernier peut, ainsi que HLA-G1, inhiber l'alloréactivité des cellules T CD4+^{415,416}. Les HLA-G1,2,3,4 et 5 semblent aussi capables d'inhiber la fonction cytolytique des LT CD8+⁴¹⁷⁻⁴¹⁹ via une interaction avec ILT2 et KIR2DL4. La fixation de HLA-G sur ILT2 des LT CD8+ IL2+ empêche la dégranulation et la production d'IFN γ ⁴²⁰. Il est important de noter que les LT CD8+ ILT2+ constituent un réservoir de cellules différent du réservoir des LT CD8+ PD1+ dans les tumeurs et que leurs mécanismes d'inhibition par PD-L1 et HLA-G sont donc distincts⁴²⁰. HLA-G5 peut aussi se lier à CD8 et induire l'apoptose des LT CD8+ activées par la phytohématagglutinine (PHA) via un mécanisme dépendant de CD95-CD95L⁴⁰⁸. HLA-G5 limite la prolifération des LT alloréactifs en jouant sur le cycle cellulaire, plus précisément en diminuant l'expression des cyclines et en régulant positivement l'expression de l'inhibiteur de la kinase p27kip⁴²¹. Il a été montré que HLA-G1 et G5 ont un effet immunosuppresseur sur les LT. Ils induisent le passage des LT vers des LT suppresseurs, via une diminution de l'expression des récepteurs CD4 et CD8 qui permettent l'activation des LT en interagissant avec leur complexe TCR/CD3. Cela entraîne l'inhibition de l'activité des autres LT^{422,423}.

Par ailleurs, quelques indices laissent penser que HLA-G pourrait favoriser l'induction des LT régulateurs CD4+ CD25high FoxP3+ via des contacts cellule/cellule en présence de MSCs³⁴⁷. Des greffes sur des souris humanisées ont aussi montré que les LT CD4+ HLA-G+ améliorent aussi la tolérance de la greffe⁴²⁴. Une partie des LT CD4+ ou CD8+ peut ainsi induire une tolérance des autres LT, en étant généré ou en fonctionnant via l'action d'HLA-G. Les LT et NK activés, ainsi que quelques monocytes, peuvent se comporter comme des cellules régulatrices, de manière transitoire, suite à l'incorporation de membranes contenant HLA-G issues de cellules de leur environnement par trogocytose³¹⁷.

HLA-G inhibe aussi le chimiotactisme des LT, LB et NK via une sous expression des récepteurs aux cytokines sur ces cellules ⁴²⁵. En effet sHLA-G inhibe de manière différentielle l'expression de CCR2, CXCR3 et CXCR5 dans les LT CD4 +, CXCR3 dans les LT CD8 +, les clones et les LT TCR Vdelta2 / gamma9. L'expression de CXCR4 est également augmentée pour ces dernières ⁴²⁶. sHLA-G module aussi la chimiotaxie et la sécrétion des cytokines et chimiokines dans les NK CD56^{bright} et CD56^{dim} ⁴²⁷. HLA-G joue donc sur le recrutement des cellules immunitaires. Enfin, HLA-G inhibe la phagocytose et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) des neutrophiles ⁴²⁸, ainsi que l'angiogenèse, via une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales ⁴²⁹. HLA-G inhibe également l'entrée de ces neutrophiles lors d'allogreffe cardiaque ⁴³⁰.

HLA-G étant retrouvé dans les biopsies de patients atteints d'un cancer, comme le mélanome ⁴³¹⁻⁴³³, il est vraisemblablement impliqué dans l'échappement tumoral. Il est possible de discriminer un tissu sain d'un tissu tumoral (par exemple un cancer du rein ccRCC, clear-cell renal cell carcinoma) en mesurant une expression différentielle de points de contrôle immunitaires comme HLA-G et PD-L1 entre les deux tissus adjacents ⁴³⁴. Il faudra donc prendre garde que des greffons exprimant HLA-G ne favorisent pas le développement d'un cancer.

| | | ILT2 | ILT4 | KIR2DL4 | CD8 | CD160 | Functions | Ref. |
|---------------------|-----------------------------|--|------|---------|------|-------|--|--|
| Receptor expression | NK | some | - | + | some | + | Cytolytic function inhibition Chemotactism inhibition | Forte et al., 2000 Matsunami et al., 2001 Sasaki et al., 1999 Morandi et al., 2014 Gonzalez et al., 2012 |
| | LT CD4+ | some | - | - | - | some | Proliferation inhibition Chemotactism inhibition | Bainbridge et al., 2000 Lila et al., 2001 Riteau et al., 1999 Morandi et al., 2014 Gonzalez et al., 2012 |
| | LT CD8+ | some | - | some | + | + | Cytolytic function inhibition Chemotactism inhibition | Kapasi et al., 2000 Le Gal et al., 1999 Riteau et al., 2001 Morandi et al., 2014 Gonzalez et al., 2012 |
| | LT reg | some | - | - | - | - | Regulatory cells induction | Le Rond et al., 2006 Le Maoult et al., 2004 Gonzalez et al., 2012 |
| | LB | + | - | - | - | - | Proliferation inhibition Chemotactism inhibition | Naji et al., 2014 Morandi et al., 2014 Gonzalez et al., 2012 |
| | DC | + | + | - | - | - | APC maturation inhibition | Horuzsko et al., 2001 Gonzalez et al., 2012 |
| | Macrophages / Monocytes | + | + | - | - | - | APC maturation inhibition | Horuzsko et al., 2001 Gonzalez et al., 2012 |
| Other ligands | MHC1 | MHC1 | | MHC1 | MHC1 | | | |
| Ligand structure | B2M associated HLA-G dimers | B2M associated HLA-G dimers B2M free HLA-G dimers | | | | | | |

Figure 23) Les actions d'HLA-G actions sur différentes cellules immunitaires via ces récepteurs permettent une immunomodulation

Tableau récapitulatif de l'action immunomodulatrice d'HLA-G sur toutes les cellules immunitaires via ses récepteurs.

D) HLA-G et la transplantation

Il a été montré que HLA-G était détecté dans 20% des échantillons issues de biopsies du myocarde et de sérums de patients avec une transplantation cardiaque. Les patients exprimant HLA-G sont significativement moins sujettes à un rejet aigu de la greffe ³⁶¹. 86% des patients ne faisant pas de rejet aigu expriment HLA-G. L'expression d'HLA-G dans le cas de greffe cardiaque est associée à un plus faible dépôt de la molécule du complément C4d, ce qui suggère une diminution de la réponse humorale ⁴³⁵. Des études similaires sur la transplantation rénale, hépatique et pulmonaire ont montré aussi une diminution du rejet de greffe associée à la présence d'HLA-G ³⁶¹. Il y a moins d'anticorps anti-HLA et de rejet chronique de la greffe en présence d'HLA-G. Toutefois, il est important de limiter le développement de cancer post-greffe, HLA-G pouvant permettre l'échappement immunitaire

des cellules tumorales. Un appariement de 14bp au niveau du polymorphisme de HLA-G entre le donneur et le receveur d'une greffe cardiaque corrèle avec une limitation du risque de développement tumoral post-greffe cardiaque ⁴³⁶. A l'inverse, le polymorphisme HLA-G +3196 est identifié comme un facteur de risque du rejet après une transplantation cardiaque ⁴³⁷. En ce qui concerne la greffe de rein, une étude sur des patients transplantés a permis de mettre en évidence une relation potentielle entre la prise de poids post-transplantation et le polymorphisme de 14bp d'HLA-G, mais la relation avec la tolérance de greffe allogène est sujette à controverses ^{438,439}.

Plusieurs modèles de souris transgéniques pour HLA-G et ses récepteurs ont été mis en place. Il est observé une meilleure tolérance de la greffe allogénique sur ces différents modèles ^{389,440}. La mise au point d'exosomes dérivés de MSC ciblant les DC et permettant de leur faire incorporer des ARNm du gène HLA-G permettraient de favoriser la tolérance de la greffe cutanée chez des souris (avec des peaux de souris greffées sur une autre souris) ⁴⁴¹. Les colonies endothéliales dérivées de cellules progénitrices endothéliales de sang de cordon (CB-ECFC) expriment HLA-G, l'IL-10 et le TGF- β 1. Elles sécrètent l'IL-10 et le TGF- β 1 et ont des propriétés immunosuppressives *in vitro*. Elles sont également tolérées jusqu'à 14 jours chez des souris immunocompétentes ⁴⁴².

HLA-G peut être surexprimé chez les patients suite à l'ajout de molécules immunosuppressives comme le Belatacept, la progestérone et l'évérolimus, un agent anti-prolifératif ³⁶¹. Plusieurs approches ont été étudiées pour utiliser HLA-G en tant qu'agent immunorégulateur.

La première est de faire exprimer HLA-G par des cellules dérivées de cellules amniotiques. Cela a été fait avec des cardiomyocytes cultivés *in vitro* puis greffés à des rats dans le cadre d'un infarctus du myocarde ⁴⁴³. L'expression de HLA-G et HLA-E, couplée à une sous expression de HLA-DR et des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86, sur des cellules épithéliales dérivées du cordon ombilical limite leur capacité de présentation des antigènes par rapport aux kératinocytes adultes. Ces cellules sont capables d'inhiber l'alloprolifération des PBMC. Cela est amplifié par une surexpression de HGF et d'IL-4 et une sous-expression d'IL-1 β et de TGF- β 1, qui est une signature plutôt anti-inflammatoire ⁴⁴⁴. La surexpression de HLA-G, par un vecteur contenant le gène dans des cellules souches embryonnaires et leurs dérivés épidermiques réduit également leur lyse par des NK et la prolifération des LT lors d'une réaction lymphocytaire mixte ⁴⁴⁵.

La seconde est d'utiliser la forme soluble d'HLA-G pour inhiber le rejet de greffe par HLA-G. Ainsi, une molécule dérivée d'HLA-G a été testée dans le cadre de greffe de peau chez la souris et permet d'augmenter la tolérance³⁴⁹. L'injection de microbilles liées à HLA-G par un autre groupe de recherche dans des souris a permis une diminution du rejet aigu de la greffe de peau³⁹⁴.

Des approches de bio-ingénierie de cellules pour leur faire exprimer HLA-G sont en développement. Des fibroblastes dermiques ont été modifiés pour exprimer un HLA-G1 modifié. Ils sont moins sensibles à la lyse par les NK stimulés par l'IL-2 et réduisent la prolifération des PBMC suite à une activation avec la PHA. HLA-G1 a été modifié au niveau de la région 3' UTR, ce qui permet de limiter la régulation par les miARN. Il a aussi été modifié pour ne pas exprimer le motif de rétention RKKSSD (remplacé par RAASSD) dans le réticulum endoplasmique (ER), ce qui permet d'augmenter son expression membranaire. Une région de 14bp a également été enlevée entre l'exon 6 et l'exon 8, car le polymorphisme associé corrèle avec un différentiel d'expression d'HLA-G⁴⁴⁶.

PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS

I. Contexte scientifique

Il peut être nécessaire de procéder à une greffe de peau dans plusieurs cas. Cela peut être dû à des brûlures, des blessures traumatiques, des ulcères (de Buruli, de diabète, de pression, veineux...), suite à une chirurgie, d'autres maladies infectieuses (fasciite nécrosante, purpura fulminans...) ou des maladies génétiques comme l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle. D'après l'OMS, 180 000 décès par an sont provoqués par des brûlures et plus de 30 000 000 de cas nécessitent des soins à l'hôpital. Aujourd'hui, la réponse en clinique consiste à développer des autogreffes à partir de biopsies de quelques cm² amplifiées *ex vivo*. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes de renouvellement de l'épiderme à partir de cellules souches permettant la bio-ingénierie de greffons. C'est dans ce cadre qu'un travail récent du laboratoire a mis en évidence le rôle du facteur de transcription KLF4 dans le maintien des cellules souches kératinocytaires ³⁶. Récemment, la greffe de feuillets de kératinocytes génétiquement modifiés exprimant le gène LAMB3 a permis de régénérer intégralement l'épiderme d'un jeune patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle ²⁷².

Toutefois, en cas de brûlure trop importante, de pathologies nécessitant une greffe rapide ou en présence de sites de prélèvement chez le patient trop inflammés et ne pouvant pas cicatriser, il serait utile de disposer de greffons allogéniques fonctionnels transitoires. Ils seraient ensuite remplacés par un greffon autologue, le temps qu'il soit fonctionnel. Le problème du rejet de la greffe allogénique de peau est malheureusement très limitant de ce point de vue. En effet, les cliniciens observent alors en une dizaine de jours une infiltration des cellules mononuclées dans l'épiderme, qui aboutit à une nécrose et une élimination du greffon. Le rejet de greffe est expliqué par les différences alléliques entre donneurs et receveurs au niveau des locus polymorphes de 3 classes d'antigènes d'histocompatibilité: le groupe sanguin ABO, le complexe d'histocompatibilité majeur (CMH) et mineur (mHA) ²⁹⁶. La problématique du rejet de greffe allogénique met en exergue un fort besoin clinique en cellules immunocompatibles ^{298,299}.

II. Problématiques

Il y a donc un double enjeu. D'une part le maintien de cellules souches épidermiques au potentiel régénérateur élevé, et d'autre part l'obtention d'un greffon immunocompatible. Ce travail s'inscrit donc dans un contexte d'étude des propriétés immunitaires des kératinocytes en lien avec leur degré d'immaturité. En collaboration avec les équipes de Nathalie Rouas-Freiss et Joël LeMaout, j'ai développé plusieurs tests permettant de mesurer les propriétés immunogènes et immunosuppressives des cellules.

Le but de ce travail est de caractériser le profil immunitaire des progéniteurs des kératinocytes épidermiques humains dans le tissu, mais aussi dans les conditions de bio-ingénierie des greffons. Il s'agira de différencier les propriétés immunogènes, c'est à dire qui favorisent l'initiation d'une réaction immunitaire, des propriétés immunomodulatrices, qui inhibent à l'inverse les réactions immunitaires.

Dans un second temps, il s'agit d'atténuer l'immunogénicité potentielle des kératinocytes et de leurs précurseurs à l'aide de molécules immunomodulatrices. Suite à un travail de bibliographie ayant abouti à la rédaction d'une revue sur le sujet (Mestrallet, G. et al, Skin immunity and tolerance : Focus on epidermal keratinocytes, en cours de soumission, voir annexes), le choix s'est porté sur HLA-G. Ce checkpoint immunitaire permet de protéger le fœtus contre le système immunitaire maternel, en agissant sur la plupart des acteurs immunitaires cellulaires ³¹⁵.

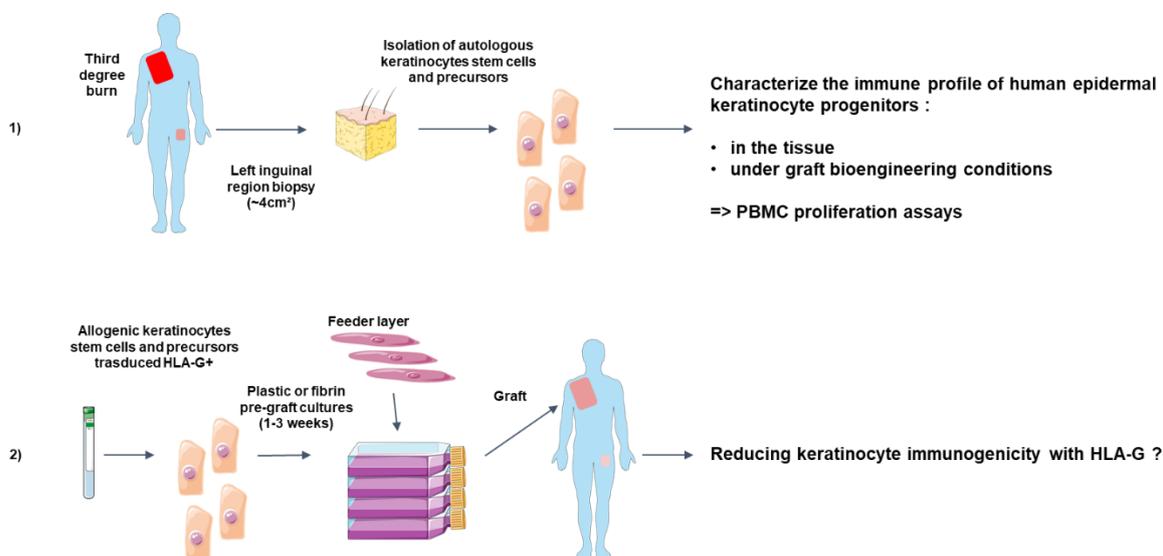


Figure 24) Stratégie pour étudier les propriétés immunitaires des précurseurs de kératinocytes et moduler leur immunogénicité potentielle

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Modèles cellulaires et tissulaires

Nous avons utilisé différents modèles. Le premier modèle tissulaire a consisté à obtenir des déchets opératoires de plastie mammaire sur des donneuses saines de moins de 50 ans. Chaque donneuse a donné son consentement éclairé. S'ensuit une étape d'extraction des kératinocytes épidermiques totaux. Pour cela, il y a d'abord une étape de séparation de l'épiderme et du derme par digestion enzymatique (trypsine+dispase) et dissociation mécanique. Les kératinocytes totaux en suspension sont ensuite filtrés. C'est le modèle qui permet le mieux de rendre compte de la composition du tissu global et de travailler sur les différentes populations de cellules présentes in vivo.

A partir de ces cellules, il est possible de sélectionner différentes populations et notamment d'obtenir des modèles des précurseurs des kératinocytes basaux.

La sélection de kératinocytes basaux fait intervenir une étape d'adhésion des kératinocytes sur collagène de type 1. Les kératinocytes totaux sontensemencés à 200 000 cellules/cm² dans des flasques présentant une surface recouverte de collagène 1 et incubés 10 minutes à 37°C avec 5% de CO₂. Seuls les kératinocytes les plus basaux ont le temps d'adhérer, ce qui permet d'éliminer les cellules les plus différenciées. Il faut ensuite compter les kératinocytes basaux ayant adhéré (ADH+). On peut ensuite les amplifier en culture ou les congeler à -160°C. C'est le modèle qui correspond au matériel cellulaire utilisé en thérapie cellulaire cutanée et dans des précédents travaux du laboratoire⁴⁴⁷.

Il est aussi possible de marquer les kératinocytes totaux issus du tissu et non amplifiés en culture avec un anticorps anti ITA6, marqueur de la couche basale de l'épiderme, et un anticorps anti EGFR, marqueur de la prolifération cellulaire. Les cellules ITA6fort EGFRfaible ont un potentiel de cellules souches adulte élevé, tandis que les cellules ITA6fort EGFRfort correspondent à des précurseurs de kératinocytes en prolifération. C'est le modèle qui permet à partir des kératinocytes totaux d'étudier les différentes populations cellulaires et en particulier les cellules souches kératinocytaires et les progéniteurs kératinocytaires.

Les cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) ont été collectés chez des donneurs sains volontaires à l'établissement français du sang (EFS) de l'hôpital Saint Louis à Paris après avoir recueilli leur consentement.

II. Tri des cellules

Les kératinocytes épidermiques adultes ont été triés en fonction de leur expression d'HLA-G ou de PD-L1 en utilisant l'anticorps monoclonal de souris anti-PD-L1 humain conjugué au PE-cy7 (clone MIH1, Thermofisher) et l'anticorps monoclonal anti-HLA-G humain conjugué à l'Alexa 700 (clone 87G, Novus Biologicals). Les kératinocytes épidermiques adultes ont aussi été triés en fonction de leur expression d'ITA6 et d'EGF-R en utilisant un anticorps monoclonal de rat anti-CD49f humain (ITA6) conjugué à la phycoérythrine (PE) (clone GoH3, BD Pharmingen) et un anticorps monoclonal de rat anti-EGF-R humain couplé à l'Alexa Fluor 405 (clone ICR10, Novus Biologicals). Des contrôles isotypiques appropriés ont été systématiquement utilisés. Les cellules ont été triées à l'aide d'un FACS Aria 3 (BD Biosciences).

III. Amplification des cellules

Les kératinocytes peuvent être amplifiés en culture afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules à étudier, pour étudier la capacité de renouvellement du tissu ou en clinique pour générer des greffons. Cette amplification peut se faire dans différentes conditions. Le modèle standard, développé par Green puis amélioré par la suite, consiste à mettre en co-culture des fibroblastes dermiques humains et des kératinocytes. Les fibroblastes sont irradiés par irradiation γ (60 Gy) au préalable pour empêcher leur prolifération. Les cellules sont amplifiées dans un milieu non-défini (Green) avec du sérum animal, utilisé aujourd'hui pour le développement des greffons. Un modèle alternatif également utilisé dans cette étude consiste à amplifier les kératinocytes dans un milieu semi-défini (KSFM : Keratinocyte Serum Free Medium), sans sérum ni cellules nourricières, plus proche des futures contraintes réglementaires.

Toutes les cultures ont été réalisées dans des flasques en plastique revêtues de collagène de type I (Biocoat, Becton-Dickinson). La composition du milieu contenant du sérum comprenait du DMEM et du milieu F12 de Ham (Gibco) (v / v, mélange 3/1), 10% de sérum de veau foetal (Hyclone), 10 ng / ml de facteur de croissance épidermique (EGF) (Chemicon), 5 µg / ml de transferrine (Sigma), 5 µg / ml d'insuline (Sigma), 0,4 µg / ml d'hydrocortisone (Sigma), 180 µM d'adénine (Sigma), 2 mM de tri-iodothyronine (Sigma), 10⁻⁶M d'isoproterenol (Sigma), 2 mM L de glutamine (Gibco), et 100 U / ml de pénicilline / streptomycine (Gibco). Le kératinocyte-SFM (Gibco) supplémenté en EGF et PBE a été utilisé pour des cultures sans sérum et sans cellules nourricières. Le milieu est renouvelé 3 fois par semaine. Pour la prolifération de masse à court et à long terme, les kératinocytes ont étéensemencés à 1000 cellules / cm² et sous-cultivés chaque semaine jusqu'à épuisement de la capacité de croissance, qui peut varier selon les caractéristiques du milieu. Les cellules nourricières ont étéensemencées à 5000 cellules / cm². Les nombres de doublements de population réalisés par les cultures ont été calculés après chaque passage, comme suit: $PD = (\log N / N_0) / \log 2$, où N_0 représente le nombre de cellules plaquées, et N le nombre de cellules obtenues après 1 semaine de croissance. Dans toutes les expériences, nous avons analysé l'influence des conditions inflammatoires par un prétraitement à l'interféron- γ (IFN- γ) (Peprotech) et au facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (R&D system).

IV. Transduction et expression inductible d'HLA-G1

1) Production de vecteurs lentiviraux

Les transductions lentivirales ont été réalisées à l'aide de vecteurs lentiviraux non réplicatifs produits par la société Vectalys. Les séquences d'intérêt ont été intégrées dans des plasmides dérivés du virus HIV-1 par clonage PCR et ligation. Deux vecteurs ont été utilisés au cours de ces travaux : ils permettent l'expression inductible par la doxycycline de la GFP et de la RFP, ou de la GFP et d'une séquence codant l'isoforme HLA-G1. Les séquences des différentes constructions sont en annexes.

2) Protocole de transduction des kératinocytes

La transduction se fait sur des kératinocytes à 20% de confluence, dans du milieu avec du sérum décomplémenté (inactivation par chauffage à 56°C). La multiplicité d'infection (M.O.I.) utilisée est de 20, pendant 24h à 37°C, en présence d'hexadiméthrine bromide (polybrène) à 8 µg/mL (Sigma-Aldrich). Ensuite, les cellules sont lavées 3 fois au PBS puis amplifiées dans du milieu pendant 3 jours jusqu'à 80% de confluence. Les cellules sont triées par cytométrie en flux (MoFlo, Beckman-Coulter) grâce à l'expression de la GFP. Les kératinocytes sont ensuite amplifiés à une densité de 1000/cm² ou clonés par cytométrie en flux dans des plaques de 96 puits.

V. Analyse de l'expression des marqueurs par cytométrie en flux

Pour l'analyse des marqueurs immunitaires et de l'expression à la surface cellulaire de l'intégrine $\alpha 6$ (ITA6), les kératinocytes traités sous forme de suspensions unicellulaires ont été marqués pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps monoclonal de rat anti-CD49f humain (ITA6) conjugué à la phycoérythrine (PE) (clone GoH3, BD Pharmingen). Les autres anticorps utilisés étaient: l'anticorps monoclonal de rat anti-EGFR humain conjugué à l'Alexa Fluor 405 (clone ICR10, Novus Biologicals), l'anticorps monoclonal de souris anti-PD-L1 humain conjugué au PE-cy7 (clone MIH1, Thermofisher), l'anticorps monoclonal de souris anti-CD40 humain conjugué au FITC (clone HB14, Thermofisher), l'anticorps monoclonal de souris anti-CMHI humain conjugué au FITC (clone W6-32, Thermofisher), l'anticorps monoclonal de souris anti-HLA-G humain conjugué à l'Alexa 700 (clone 87G, Novus Biologicals), l'anticorps monoclonal de souris anti-HLA-G humain conjugué à l'allophycocyanine (APC) (clone 5A6G7, Novus Biologicals), l'anticorps monoclonal de rat anti-ILT4 humain conjugué au PE (clone 42D1, Thermofisher), l'anticorps monoclonal de souris anti-ILT2 humain conjugué au FITC (clone GHI / 75, Miltenyi), l'anticorps monoclonal de souris anti-HLA-DR conjugué à l'APC (clone REA805, Miltenyi). Pour l'analyse de l'expression de HLA-G5, les kératinocytes adultes ont été fixés et perméabilisés en utilisant les solutions Cytofix / Cytoperm™ (BD Biosciences). Des anticorps non réactifs d'espèces et d'isotypes similaires, et couplés aux mêmes fluorochromes,

ont été utilisés comme contrôles isotypiques. Les profils d'expression des marqueurs ITA6, EGFR, PD-L1, CD40, CMHI, HLA-G, ILT2 et ILT4 ont été analysés en utilisant un trieur de cellules Astrios (Beckman-Coulter), un analyseur C6 Accuri (BD Biosciences), un Attune (Thermofisher) ou un MACSquant (Miltenyi).

VI. Imagerie et criblage à haut contenu

L'analyse des images a été réalisée à l'aide de la plate-forme de criblage à haut contenu (HCS) AnalysisCellInsight CX7 (Thermofisher). Les kératinocytes ont été ensemencés dans une plaque à 96 puits (TPP) à une concentration de 3000 cellules / cm². Après 1 semaine de croissance, les cellules ont été marquées pendant 1 heure à température ambiante en utilisant les anticorps suivants: anticorps monoclonal de rat anti-CD49f humain (ITA6) conjugué à la phycoérythrine (PE) (clone GoH3, BD Pharmingen), anticorps monoclonal de souris anti-PD-L1 conjugué à l'APC (clone MIH1, Thermofisher), anticorps monoclonal de souris anti-CD40 humain conjugué au FITC (clone HB14, Thermofisher), anticorps monoclonal de souris anti-CMHI humain conjugué au FITC (clone W6-32, Thermofisher), anticorps monoclonal de souris anti-HLA-G humain conjugué à l'Alexa 700 (clone 87G, Novus Biologicals), anticorps monoclonal de souris anti-HLA-G humain conjugué à l'allophycocyanine (APC) (clone 5A6G7, Novus Biologicals), anticorps monoclonal de rat anti-ILT4 humain conjugué au PE (clone 42D1, Thermofisher), anticorps monoclonal de souris anti-ILT2 humain conjugué au FITC (clone GHI / 75, Miltenyi). Pour l'analyse de l'expression de HLA-G5, les kératinocytes adultes ont été fixés et perméabilisés en utilisant les solutions Cytifix / CytopermTM (BD Biosciences). Des anticorps non réactifs d'espèces et d'isotypes similaires, et couplés aux mêmes fluorochromes, ont été utilisés comme contrôles isotypiques. Les colorations des noyaux ont été effectuées en utilisant du Hoescht (Thermofisher). Les profils d'expression des marqueurs ITA6, PD-L1, CD40, CMHI, HLA-G, ILT2 et ILT4 ont été analysés en utilisant le CX7 (Thermofisher).

VII. Western blot

Les protéines totales ont été extraites dans un tampon de lyse, Tris 20 mM, NaCl 250 mM, EDTA 2 mM supplémenté avec des anti-protéases (Roche). Les cellules ont été lysées à une concentration de 10^7 cellules / ml par sonication pendant 10 min. Les concentrations de protéines ont été déterminées en utilisant le kit Bradford Protein Assay (Bio-Rad). Soixante μ g de protéines ont été séparés par électrophorèse dans des gels prémoulés sans colorant Mini Protean TGX à 4-15% (Bio-Rad). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) en utilisant la cellule de transfert électrophorétique semi-sèche Trans-Blot® SD (Bio Rad). Les membranes ont été bloquées par une incubation d'une heure avec du TBS Tween 1% avec du lait en poudre sans matière grasse à 5%. Après une incubation de la membrane avec des anticorps primaires pendant 1 heure à température ambiante, des anticorps secondaires conjugués à la HRP (Pierce) ont été utilisés pour la détection du signal avec de l'ECL et de l'ECL max (Clarity Western ECL, Biorad). Le système Chemidoc (Bio-Rad) a été utilisé pour la détection et la quantification des signaux de Western Blot. Les principaux anticorps utilisés étaient: l'anticorps monoclonal de lapin anti-alpha-tubuline humaine (clone EP1332Y, Abcam), l'anticorps de souris anti-HLA-G humain (clone 4H84, Santa Cruz) et l'anticorps de souris anti-HLA-G5 humain (cône 5A6G7, Thermofisher). Les membranes ont été lavées 3 fois entre et après les marquages avec du TBS Tween 0,1%.

VIII. Analyse des propriétés immunogènes et immunosuppressives des cellules

Plusieurs tests permettant de mesurer les propriétés immunogènes et immunosuppressives des cellules ont été développés en collaboration avec les équipes de Nathalie Rouas-Freiss et Joël LeMaout. Les cellules dont on étudie l'immunogénicité peuvent être mise en contact avec des cellules du système immunitaire afin de mesurer son activation. Cela peut se faire avec des PBMC, en mesurant leur activation avec les marqueurs CD25, PD1 et CD69 en cytométrie après 24h, en mesurant leur prolifération ou en évaluant la cytotoxicité. En contrôle positif pour l'activation des PBMC, il est possible d'utiliser un anticorps IgG2a anti-

CD3, l'OKT3 ou des billes avec à leur surface des anticorps anti-CD2, CD3 et CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit, Miltenyi).

1) Test de prolifération en thymidine

Les PBMC ont été incubés (37°C, 5%CO₂) dans 100 µl de milieu RPMI (R5886, Sigma) + 20% SVF, enrichi en streptomycine et glucose pendant 1h. Elles peuvent être ou non stimulées avec des billes avec à leur surface des anticorps anti-CD2, CD3 et CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit, Miltenyi). Les PBMC sontensemencées à 100000 cellules par puit, avec une bille par cellule. La prolifération des PBMC a été quantifiée par l'incorporation de thymidine tritiée (20 Ci/mmol, PerkinElmer, Boston, USA) pendant les 16 dernières heures. Le recueil des données a été fait à J5 à l'aide d'un collecteur (FilterMate Harvester, PerkinElmer), puis la radioactivité a été quantifiée grâce à un compteur β.

Une cellule dite inhibitrice peut intervenir dans un test de prolifération. Dans le cadre de cette étude, il s'agit de kératinocytes. Ils sont incubés dans des plaques de culture 96 puits (collagen 1 96-well, BD biocoat) avec ou sans IFN-γ et TNFα, pendant 48h. Ensuite, les PBMC sont ajoutés comme décrit précédemment.

La capacité des kératinocytes à induire ou non la prolifération des PBMC est également mesurée. Les kératinocytes sontensemencés à différents ratios dans les plaques de 96 puits. Ensuite, 100000 PBMC sont mis en contact avec les kératinocytes de chaque puit. Les résultats de l'immunogénicité des kératinocytes sont présentés en comparant l'absorption de thymidine par les PBMC en présence ou non de kératinocytes.

2) Test de prolifération en cytométrie en flux

Les PBMC ont été incubés (37°C, 5%CO₂) dans 100 µl de milieu RPMI (R5886, Sigma) + 20% SVF, enrichi en streptomycine et glucose pendant 1h. Les PBMC sont incubées 20 min avec un colorant (eBioscience Cell Proliferation Dye eFluor 450, Thermofisher). Elles peuvent être ou non stimulées avec des billes avec à leur surface des anticorps anti-CD2, CD3 et CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit, Miltenyi). Les PBMC

sont ensemencées à 100000 cellules par puit, avec une bille par cellule. La prolifération des PBMC a été quantifiée par la diminution de l'expression du colorant à la surface des cellules au bout de 7 jours. Le recueil des données a été fait à J7 par cytométrie en flux.

Une cellule dite inhibitrice peut intervenir dans un test de prolifération. Dans le cadre de cette étude, il s'agit de kératinocytes. Ils sont incubés dans des plaques de culture 96 puits (collagen 1 96-well, BD biocoat) avec ou sans IFN- γ et TNF α , pendant 48h. Ensuite, les PBMC sont ajoutés comme décrit précédemment.

La capacité des kératinocytes à induire ou non la prolifération des PBMC est également mesurée. Les kératinocytes sont ensemencés à différents ratios dans les plaques de 96 puits. Ensuite, 100000 PBMC sont mis en contact avec les kératinocytes de chaque puit. Les résultats de l'immunogénicité des kératinocytes sont présentés en comparant l'absorption de thymidine par les PBMC en présence ou non de kératinocytes.

3) Test avec les surnageants

Pour évaluer l'impact du surnageant de kératinocytes sur la modulation de la prolifération des PBMC, les kératinocytes de 3 donneurs ont été amplifiés pendant 7 jours comme spécifié dans la section culture cellulaire. Le milieu a été changé tous les deux jours. A 80% de confluence des kératinocytes et après 48 heures, le surnageant a été recueilli puis centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Ces surnageants ont ensuite été utilisés pour des dosages de prolifération de PBMC. Le même protocole a été utilisé avec des surnageants de couches nourricières de fibroblastes pour déterminer le rôle de chaque type cellulaire.

4) Dégranulation des cellules effectrices

La mesure de la dégranulation des cellules effectrices peut se faire en mesurant l'expression de CD107a (LAMP-1), une protéine exprimée à la surface des NK et des LT CD8+ lors de leur dégranulation ^{168,448}.

5) Tests de neutralisation

Nous avons testé le rôle potentiel de molécules tolérogènes telles que PD-L1, le TGF- β et l'IL-10, dans les propriétés inhibitrices des kératinocytes que nous avons observées. A cet effet, les kératinocytes ont été incubés avant et pendant le test de prolifération avec des anticorps bloquants dirigés contre le TGF- β humain (clone 1D11, R&D Systems), l'IL-10 (clone B-S10, Diaclone), le PD-L1 (clone 6E11, Genentech) ou les isotypes contrôles appropriés de la société correspondante. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicats.

6) Cytotoxicité au chrome

La mesure de la cytotoxicité peut se faire en mesurant le relargage de chrome 51 radioactif ⁴⁴⁹. Ce test mesure la capacité des cellules effectrices à lyser des cellules préalablement marquées par du chrome radioactif. Pendant 1 heure, un million de cellules cibles sont incubées en présence de 100 μ Ci de chrome 51 radioactif (⁵¹Cr*) dans 125 μ l de milieu RPMI 1640 additionné de 30% de SVF. L'incubation est réalisée dans une étuve (atmosphère humide, 5% de CO₂) à 37°C. Les cellules sont agitées toutes les 15 minutes. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans du milieu RPMI complet (10% SVF) afin d'éliminer l'excès d'isotope radioactif non incorporé. Les cellules effectrices sont réparties dans une microplaque à différentes concentrations et 5000 cellules cibles marquées au ⁵¹Cr* sont ajoutées dans chaque puits. Après 4 heures d'incubation à 37°C, le surnageant est récolté et la présence de ⁵¹Cr* relargué par les cellules mortes est mesurée par un compteur γ . Les cellules effectrices sont des PBMC. Il faut un million de PBMC par puit.

Le pourcentage de lyse est déterminé par la formule suivante:

$$\% \text{ de lyse} = (\text{CPM}_{\text{exp}} - \text{CPM}_{\text{spont}}) * 100 / (\text{CPM}_{\text{max}} - \text{CPM}_{\text{spont}})$$

Où CPM_{exp} représente la radioactivité moyenne du surnageant des puits expérimentaux, CPM_{spont} est la radioactivité de puits où seules des cellules tumorales marquées sont présentes et CPM_{max} est la radioactivité des puits dans lesquels les cellules cibles marquées sont lysées par un détergent.

IX. Statistiques

La significativité statistique des différences observées a été déterminée en utilisant le test U bilatéral de Mann-Whitney ou le t-test. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. La différence est considérée comme significative lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

RÉSULTATS

I. Propriétés immunitaires des kératinocytes humains

Mestrallet, G.; Auvré, F.; Schenowitz, C.; Carosella, E.D.; LeMaoult, J.; Martin, M.T.; Rouas-Freiss, N.; Fortunel, N.O. Human Keratinocytes Inhibit CD4+ T-Cell Proliferation through TGFB1 Secretion and Surface Expression of HLA-G1 and PD-L1 Immune Checkpoints. *Cells* 2021, 10, 1438. <https://doi.org/10.3390/cells10061438>

1) Les kératinocytes amplifiés sont hypo-immunogéniques et limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 +.

Afin d'évaluer, d'un point de vue immunologique, si des kératinocytes allogéniques pouvaient être utilisés sans risque de rejet à la place de kératinocytes autologues, j'ai étudié leur capacité à moduler la prolifération des PBMC dans des conditions allogéniques. J'ai d'abord analysé l'expression de molécules co-stimulantes (c'est-à-dire HLA-I, HLA-DR, CD86 et CD40) par cytométrie en flux. Ces résultats montrent que les kératinocytes amplifiés expriment HLA-I et CD40, mais affichent de très faibles niveaux de HLA-DR et CD86 (**Figure 25 A**). Les kératinocytes expriment donc peu de molécules permettant une forte stimulation des lymphocytes T.

Ensuite, j'ai analysé à la fois les propriétés immunogènes et immunosuppressives des kératinocytes amplifiés dans des conditions allogéniques, c'est-à-dire face à des PBMC d'autres donneurs que ceux des kératinocytes. À cette fin, les kératinocytes ont d'abord été incubés avec des PBMC pendant 5 jours pour évaluer leur capacité à induire une alloprolifération des PBMC. Des PBMC activées par des billes CD3 + CD28 + ont été utilisés comme témoins positifs pour la prolifération des PBMC. Les résultats ont montré que les kératinocytes en quantité la plus élevée (c'est-à-dire 25000 cellules) n'étaient pas capables d'induire une alloprolifération de PBMC ($p < 0,05$, $n = 3$ donneurs distincts de kératinocytes) (**Figure 25 B**). Deuxièmement, pour évaluer les propriétés immunomodulatrices des kératinocytes, je les ai mis en présence de PBMC activés par des billes. Les résultats ont montré une prolifération de PBMC plus faible en présence de kératinocytes (**Figure 25 B**).

Ensuite, afin de cibler l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + par les kératinocytes, des PBMC activées, préalablement marqués avec un marqueur de prolifération, ont été incubés avec différentes quantités de kératinocytes. J'ai observé que les kératinocytes limitaient la prolifération des lymphocytes T CD4 + d'une manière ratio-dépendante ($p < 0,05$, $n = 3$ PBMC) (**Figure 25 C/D**). Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC. De même, des tests de cytotoxicité par les NK ont été réalisés. On observe que les kératinocytes ne sont pas lysés par les NK. Ils peuvent en revanche également inhiber la lyse de K562 s'ils sont placés en troisième cellule (voir données supplémentaire **Fig Sup 12**). Ainsi, les kératinocytes amplifiés semblent hypo-immunogéniques in vitro et présentent des propriétés immunomodulatrices, telles que l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 +.

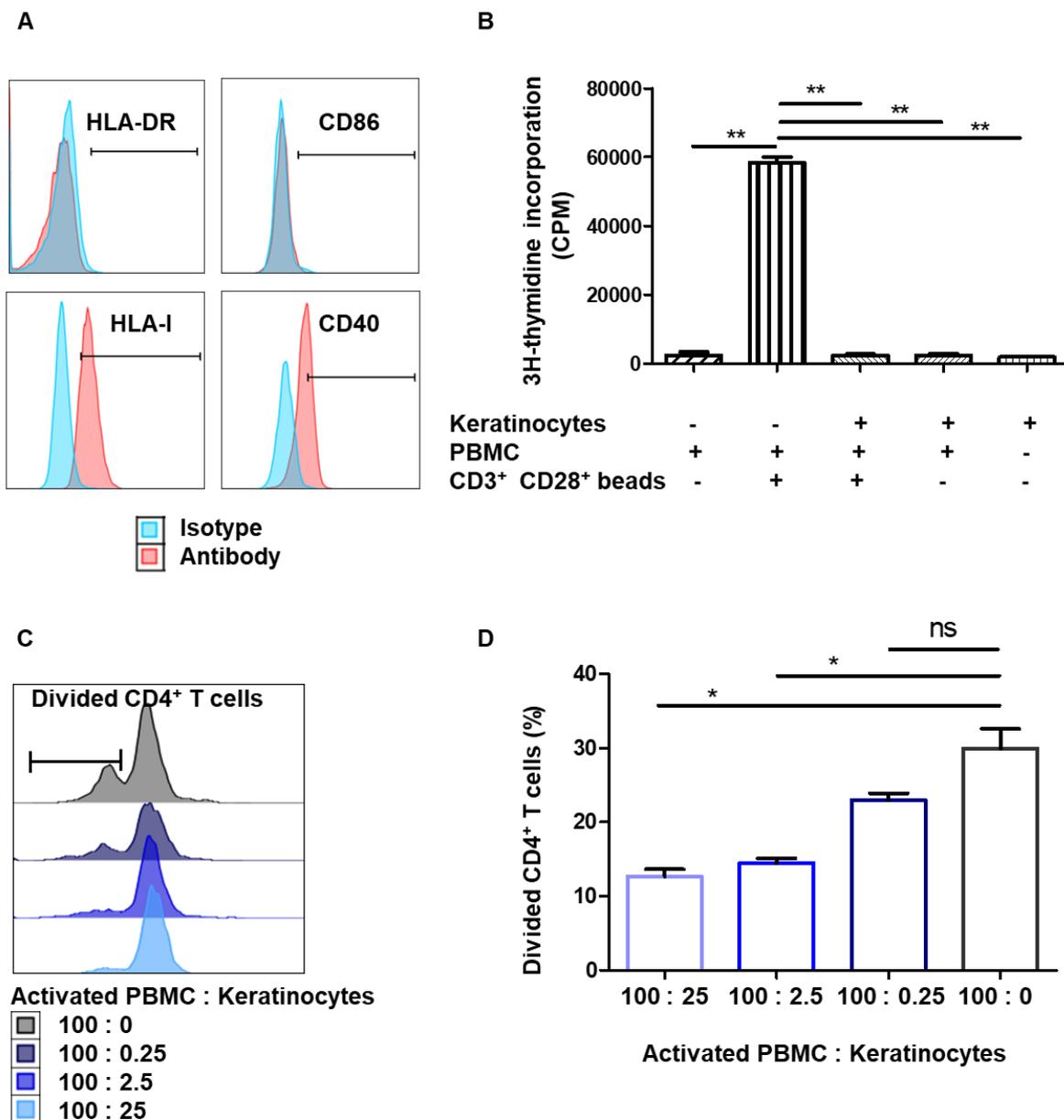


Figure 25) Les kératinocytes amplifiés sont hypo-immunogéniques et limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 +.

A Les kératinocytes sont amplifiés pendant 7 jours dans un milieu contenant du sérum et des cellules nourricières. Des profils représentatifs de cytométrie en flux de l'expression de HLA-DR, HLA-I, CD40 et CD86 sont présentés. **B** 25 000 kératinocytes de 3 donneurs différents sont incubés ou non avec 100 000 PBMC pendant 5 jours. Des PBMC activées par des billes CD3 + CD28 + ont été utilisées comme témoins positifs. La prolifération des PBMC a été quantifiée par incorporation de thymidine au jour 5 (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). **C/D** 25000, 2500, 250 ou 0 kératinocytes d'un donneur représentatif sont incubés avec 100000

PBMC pendant 7 jours. Les PBMC sont pré-marquées avec un colorant. Les PBMC ont été activées par des billes CD3 + CD28 +. La prolifération des PBMC a été quantifiée par la diminution du colorant au jour 7. **C** Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 7. **D** Inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + de manière dose-dépendante (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test. *: $p < 0,05$ et **: $p < 0,001$. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC.

2) Les kératinocytes amplifiés limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 + qu'ils soient dans des conditions inflammatoires ou non.

J'ai ensuite cherché à savoir si les propriétés immunitaires des kératinocytes variaient en fonction du contexte inflammatoire, qui est fréquent lors d'une greffe cutanée. Pour imiter ces conditions inflammatoires, les kératinocytes d'un donneur représentatif ont été amplifiés en présence de 10 ng / mL de cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF- α . Pour attester des effets biologiques des deux cytokines, j'ai mesuré l'expression de HLA-DR à la surface des kératinocytes par cytométrie en flux (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 4$). Comme attendu, j'ai observé une surexpression de HLA-DR par les kératinocytes stimulés par IFN γ et TNF- α (**Figure 26 A**). Afin d'évaluer l'impact de l'IFN γ et du TNF- α sur leurs propriétés immunitaires, des kératinocytes préalablement stimulés ou non par 10 ng / mL d'IFN γ et de TNF- α ont été incubés avec des PBMC activés. Les résultats ont montré que les kératinocytes amplifiés conservaient leur capacité à inhiber la prolifération des PBMC en présence d'IFN γ et de TNF- α (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$) (**Figure 26 B**). Ensuite, j'ai mesuré l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + par différentes quantités de kératinocytes, stimulés ou non par 10 ng / mL d'IFN γ et de TNF- α . Je n'ai observé aucune différence de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + par les kératinocytes avec ou sans IFN γ et TNF- α (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$) (**Figure 26 C/D**). Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC. Les kératinocytes amplifiés limitent donc la prolifération des lymphocytes T CD4 + qu'ils soient en condition inflammatoire ou non.

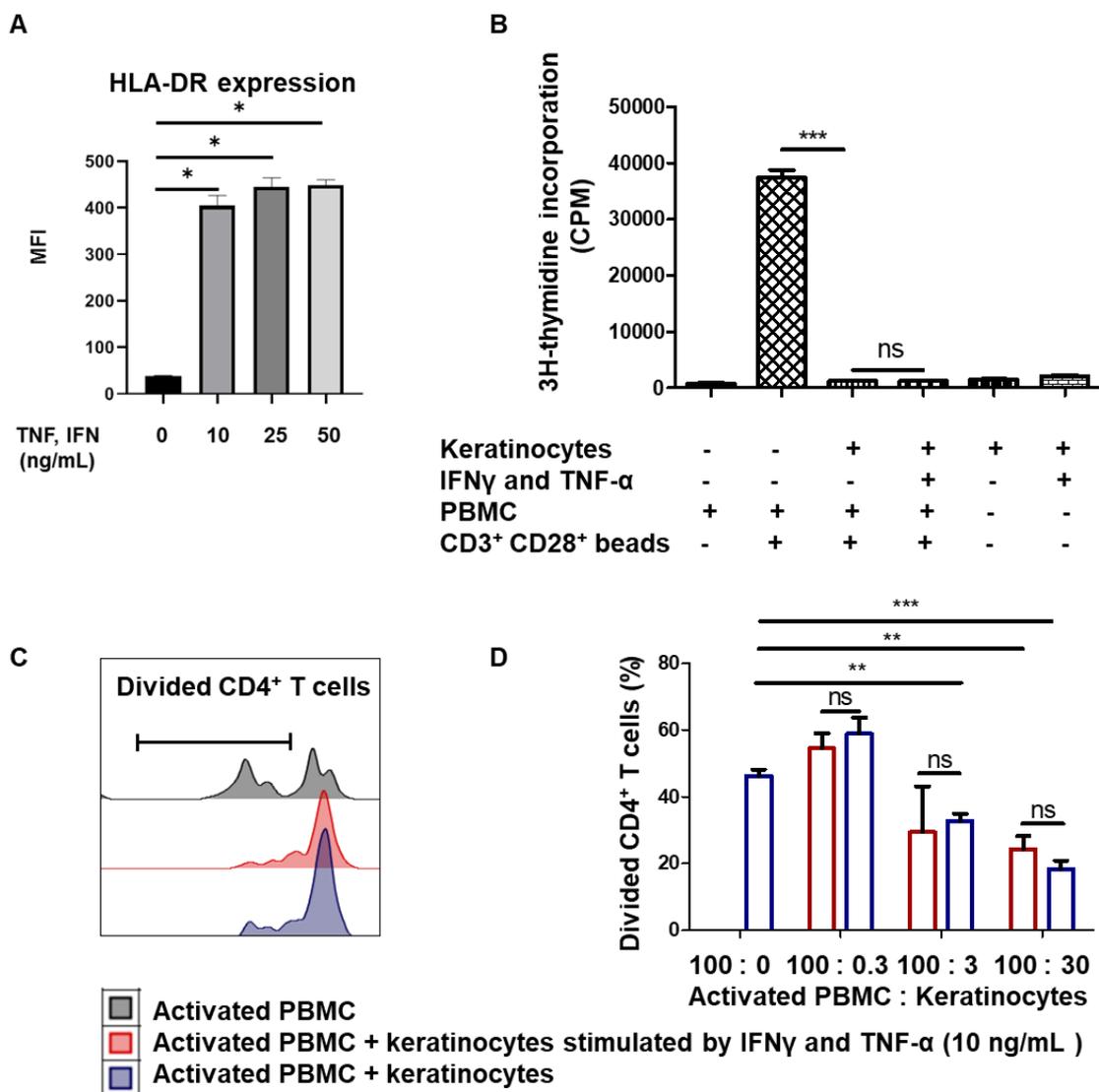


Figure 26) Les kératinocytes amplifiés limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 + qu'ils soient dans des conditions inflammatoires ou non.

A Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 2 jours avec de l'IFN γ et du TNF- α . L'analyse de l'expression de HLA-DR a été réalisée par cytométrie en flux (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 4$). Test U de Mann-Whitney. **B** 20000 kératinocytes d'un donneur représentatif, stimulés ou non par 10 ng / mL d'IFN γ et de TNF- α pendant 2 jours, sont incubés ou non avec 100 000 PBMC pendant 5 jours. Des PBMC activées par des billes CD3 + CD28 + ont été utilisées comme témoins positifs. La prolifération des PBMC a été quantifiée par incorporation de thymidine au jour 5 (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). **C/D** Les kératinocytes stimulés ou non par 10 ng / mL d'IFN γ et de TNF- α pendant 2 jours sont incubés avec 100 000 PBMC pendant 7 jours. Les PBMC sont activées par des billes CD3 + CD28 +. La prolifération des PBMC a été quantifiée par la diminution du colorant au jour 7.

C Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 7. **D** Prolifération des lymphocytes T CD4 + en fonction des conditions inflammatoires (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test. *: $p < 0,05$ et **: $p < 0,001$. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC.

3) L'immunomodulation par les kératinocytes amplifiés fait intervenir des facteurs solubles comme le TGF- β 1.

Ensuite, j'ai cherché à identifier les mécanismes impliqués dans l'immunomodulation médiée par les kératinocytes. Pour étudier le rôle des facteurs solubles, les kératinocytes ont été amplifiés et leur surnageant de culture a été collecté. Les résultats ont montré qu'en présence du surnageant de kératinocytes, la prolifération des PBMC était inhibée (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$) (**Figure 27 A**), amenant à conclure que les propriétés immunomodulatrices des kératinocytes amplifiés impliquaient des facteurs solubles. Ensuite, des PBMC activées pré-marquées avec un colorant de prolifération ont été incubés avec des différentes dilutions de surnageants de kératinocytes. J'ai observé que ces surnageants limitaient la prolifération des lymphocytes T CD4 + de manière dose-dépendante (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$) (**Figure 27 B/C**). Comme les kératinocytes ont été amplifiés avec une couche nourricière de fibroblastes, j'ai vérifié si le surnageant de ces fibroblastes pouvait être impliqué dans l'inhibition décrite ci-dessus. Les expériences utilisant ce surnageant de fibroblastes n'ont montré aucune immunomodulation de la prolifération des PBMC (voir données supplémentaires **Fig Sup 1**). L'effet immunomodulateur était donc dû à des facteurs solubles produits par les kératinocytes et pas par les fibroblastes. Il a été précédemment montré que le TGF- β 1 était un facteur soluble qui réduit la prolifération des lymphocytes T et qui est connu pour être produit par les kératinocytes⁴⁵⁰. À cet égard, j'ai pu détecter l'expression du TGF- β 1 par les kératinocytes (**Figure 27 D/E**). Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC. Pour évaluer le rôle de cette cytokine dans l'effet inhibiteur observé avec le surnageant de kératinocytes, j'ai utilisé un anticorps bloquant anti-TGF- β 1. Les résultats ont montré que l'anti-TGF- β 1 a partiellement levé l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + en présence de surnageant de kératinocytes (**Figure 27 F**). Ainsi, les propriétés

immunosuppressives des kératinocytes amplifiés impliquent des facteurs solubles, dont le TGF- β 1.

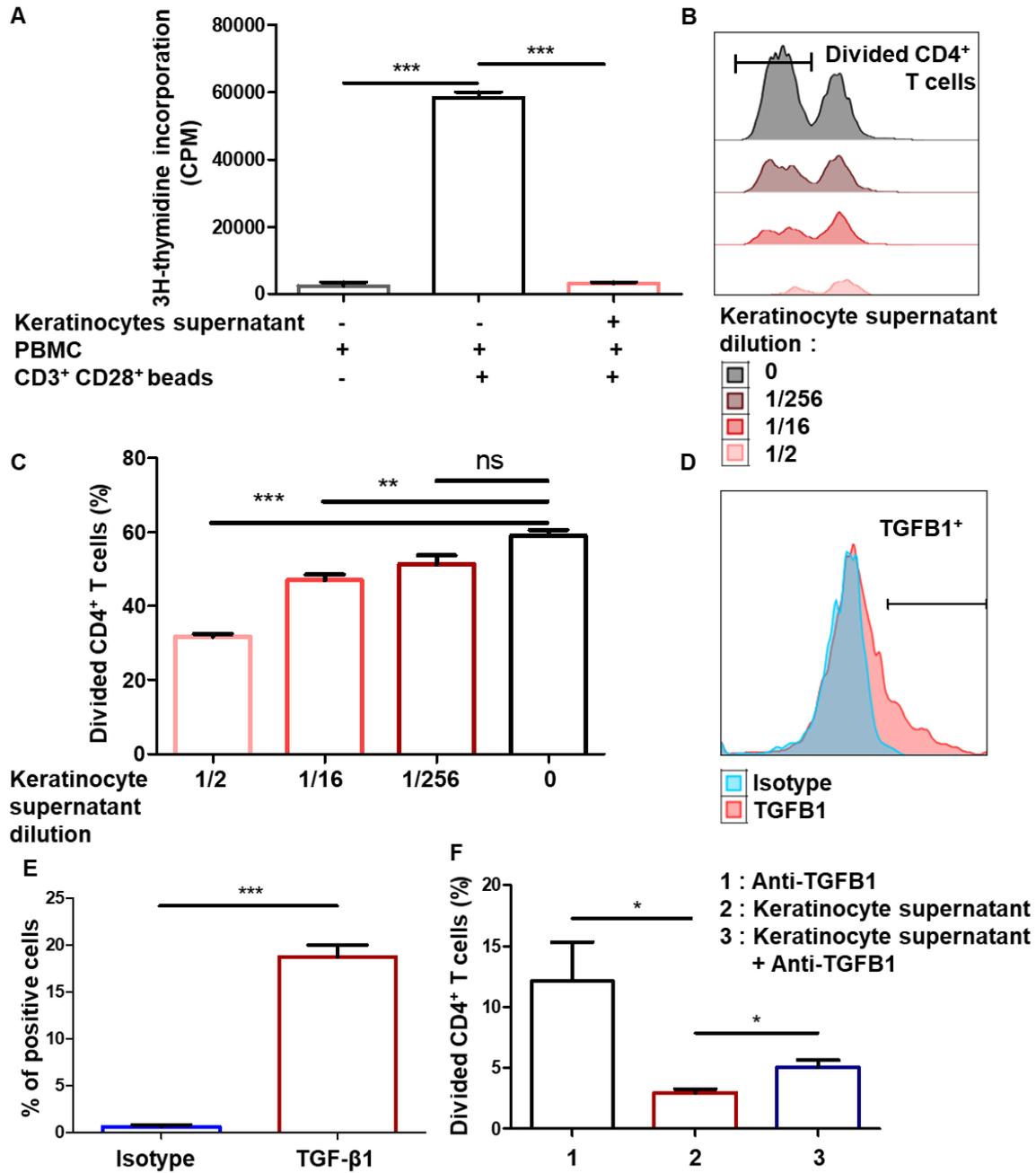


Figure 27) L'immunomodulation par des kératinocytes amplifiés implique des facteurs solubles.

A Les kératinocytes de 3 donneurs différents sont amplifiés 2 jours. Ensuite, les surnageants sont incubés ou non avec 100 000 PBMC pendant 5 jours. Les PBMC activées par des billes CD3 + CD28 + sont utilisées comme témoins positifs. La prolifération des PBMC a été

quantifiée par incorporation de thymidine au jour 5 (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). **B/C** Différentes concentrations de surnageants de kératinocytes d'un donneur représentatif sont incubées avec 100 000 PBMC pendant 7 jours. Les PBMC sont pré-marquées avec un colorant. Les PBMC sont activées par des billes CD3 + CD28 +. La prolifération des PBMC a été quantifiée par la diminution du colorant au jour 7. **B** Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 7. **C** Inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + en fonction de la dilution du surnageant de kératinocytes (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). **D/E** Analyse par cytométrie en flux des taux de TGF- β 1 sur les kératinocytes. **F** test de prolifération avec blocage du TGF- β 1. Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test. *: $p < 0,05$ et **: $p < 0,001$. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC.

4) L'immunomodulation par les kératinocytes amplifiés implique le checkpoint immunitaires PD-L1.

Ensuite, j'ai cherché à savoir si les propriétés immunosuppressives des kératinocytes impliquaient également HLA-G et PD-L1. Puisque HLA-G et PD-L1 sont des molécules de point de contrôle immunitaire bien décrites et impliquées dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T, j'ai étudié leur expression par des kératinocytes amplifiés. L'analyse par cytométrie de flux a montré que PD-L1 et HLA-G étaient exprimés à la surface des kératinocytes (**Figure 28 A**). PD-L1 est largement exprimé par les kératinocytes amplifiés, et l'expression de HLA-G est beaucoup plus faible, à la fois en termes d'intensité et de nombre de cellules positives (**Figure 28 B**). J'ai ensuite étudié quelles isoformes d'HLA-G étaient exprimées par les kératinocytes. L'analyse par Western blot utilisant l'anticorps anti-HLA-G 4H84 a montré une bande correspondant à l'isoforme membranaire HLA-G1 (39 KDa) (voir données supplémentaires **Fig Sup 2**). Pour vérifier l'absence d'expression de l'isoforme soluble HLA-G5, qui est d'un poids moléculaire similaire, j'ai utilisé l'anticorps 5A6G5 reconnaissant sélectivement cette isoforme et aucune bande n'a été détectée dans les lysats de kératinocytes. Au final, ces données ont montré que les kératinocytes expriment l'isoforme membranaire HLA-G1. Dans d'autres modèles cellulaires tels que les cellules souches mésenchymateuses, une stimulation à l'IFN γ et au TNF- α augmente l'expression des points de contrôle immunitaires comme HLA-G³⁰⁸. De même, j'ai montré une surexpression des

molécules HLA-G1 et PD-L1 sur les kératinocytes traités avec de l'IFN γ et du TNF- α (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 4$) (**Figure 28 C**).

Pour évaluer le rôle respectif de HLA-G et PD-L1 dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + médiée par les kératinocytes, j'ai trié ces cellules en fonction de leur expression d'HLA-G1 ou de PD-L1. Les PBMC activées pré-marqués avec un colorant de prolifération ont été incubés avec des kératinocytes HLA-G⁻ PD-L1⁻, HLA-G⁺ PD-L1⁻, HLA-G⁻ PD-L1⁺ ou HLA-G⁺ PD-L1⁺ (**Figure 28 D**). J'ai observé que les kératinocytes PD-L1 + inhibaient la prolifération des lymphocytes T CD4 + (**Figure 28 E**). Cette inhibition était légèrement augmentée lorsque les kératinocytes exprimaient les deux points de contrôle. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC. En bloquant PD-L1, j'ai partiellement restauré la prolifération des lymphocytes T CD4 + (**Figure 28 F**). Malheureusement, étant donné qu'aucun anticorps bloquant d'HLA-G n'est disponible dans le commerce, je n'ai pas pu confirmer formellement le rôle de ce point de contrôle immunitaire. Par conséquent, les propriétés immunosuppressives des kératinocytes amplifiés impliquent au moins la molécule de point de contrôle immunitaire PD-L1.

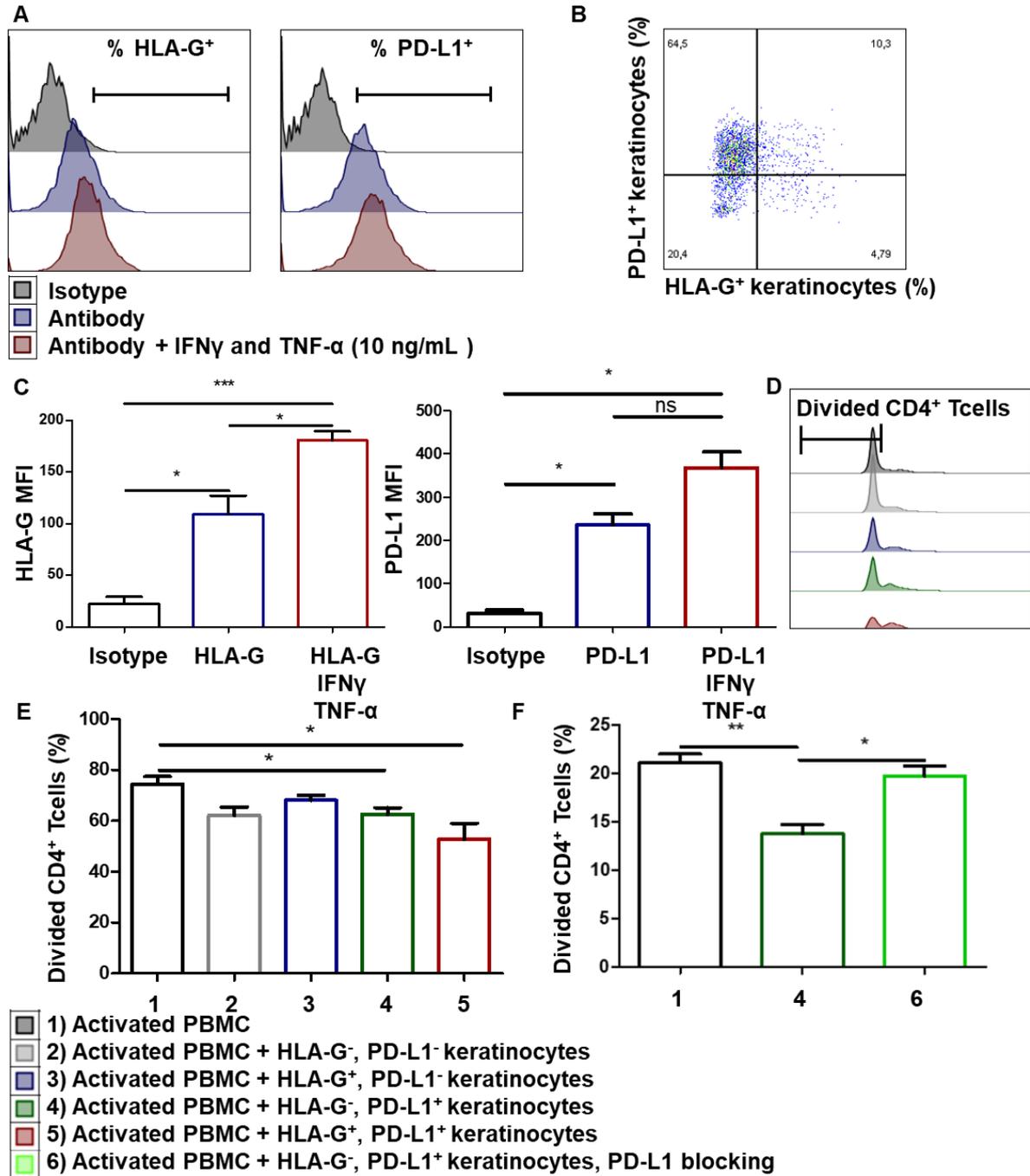


Figure 28) L'immunomodulation par des kératinocytes amplifiés implique le point de contrôle immunitaire PD-L1.

A/B Les cellules de 3 donneurs ont été cultivées pendant 2 jours avec de l'IFN γ et du TNF α . **A** Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 2. **B** L'analyse de l'expression de HLA-G1 (anticorps 87G) et PD-L1 a été réalisée par cytométrie en flux (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). t-Test apparié. *: $p < 0,05$ et **: $p < 0,001$ **C/D** 10000 kératinocytes triés comme suit :

HLA-G-, HLA-G +, PD-L1- ou PD-L1+, ont été incubés avec 100000 PBMC pendant 7 jours. Les PBMC sont activées par des billes CD3 + CD28 +. La prolifération des PBMC est quantifiée par la diminution du colorant au jour 7. **C** Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 7. **D** L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + varie en fonction de la présence de HLA-G ou PD-L1 (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test. *: $p < 0,05$ et **: $p < 0,001$. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC.

5) Les kératinocytes extraits de tissus expriment HLA-G1, ce qui les rend immunomodulateurs.

J'ai ensuite étudié si les propriétés immunosuppressives observées dans les kératinocytes amplifiés étaient biologiquement pertinentes en considérant des kératinocytes directement extraits du tissu cutané. Les cellules de neuf donneurs sains ont été extraites des tissus cutanés mais n'ont pas été amplifiées ex vivo. Fait intéressant, je n'ai observé aucune expression de PD-L1 tandis que l'expression de HLA-G1 était détectée sur les kératinocytes tissulaires par cytométrie en flux (moyenne + SEM, $n = 9$) (**Figure 29 A/B**). À noter, lorsque l'EGF a été retiré du milieu d'amplification des kératinocytes, une forte diminution de l'expression de PD-L1 a été observée, démontrant que l'EGF contribue à induire l'expression de PD-L1 sur les kératinocytes amplifiés (voir données supplémentaires **Fig Sup 10**). Par immunohistochimie, l'expression de HLA-G1 a été détectée dans tout l'épiderme (**Figure 29 C**). En effet, l'expression de HLA-G est localisée entre celle de la laminine 5, un marqueur de la lame basale, et celle de l'involucrine, un marqueur de la couche cornée. Ensuite, j'ai évalué le rôle d'HLA-G1 dans la contribution à l'immunomodulation tissulaire des kératinocytes. A cet effet, les kératinocytes extraits de tissu ont été triés en fonction de leur expression d'HLA-G1 et testés vis-à-vis de PBMC allogéniques activés. J'ai observé que les kératinocytes tissulaires HLA-G + inhibaient d'avantage la prolifération des cellules T CD4 + que les kératinocytes HLA-G- (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$) (**Figure 29 D/E**). Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC. Les kératinocytes du tissu cutané ont donc limité la prolifération des lymphocytes T CD4 + via l'expression du point de contrôle immunitaire HLA-G1.

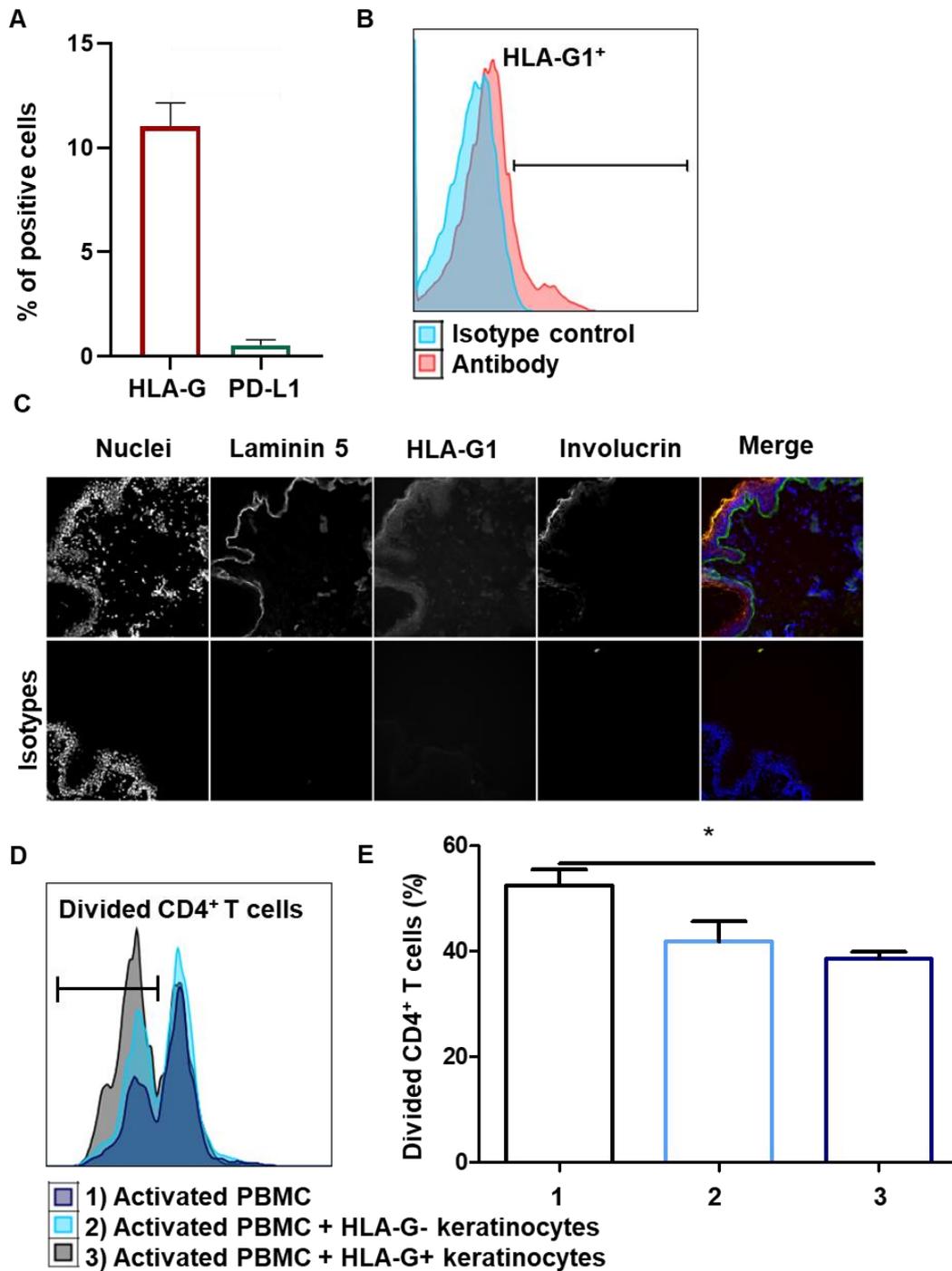


Figure 29) Les kératinocytes tissulaires expriment HLA-G1 qui leur permet d’être immunomodulateurs.

A/B Les cellules de neuf donneurs représentatifs sont extraites. **A** Analyse par cytométrie de flux de l’expression de PD-L1 et d’HLA-G1 sur les kératinocytes (moyenne + SEM, n = 9). Les p values exactes ont été déterminées selon le test apparié de Wilcoxon. **B** Profils représentatifs de l’expression de HLA-G1 (anticorps 87G) sur les kératinocytes juste extraits

du tissu. **C** Expression de HLA-G dans tout l'épiderme (immunohistochimie). La laminine 5 est un marqueur de la lame basale et l'involucrine est un marqueur de la couche cornée. **D/E** 10 000 kératinocytes juste extraits du tissu, triés comme suit : HLA-G- ou HLA-G+, ont été incubés avec 100 000 PBMC pendant 7 jours. Les PBMC sont activées par des billes CD3 + CD28 +. La prolifération des PBMC est quantifiée par la diminution du colorant au jour 7. **D** Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 7. **E** L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + varie en fonction de la présence de kératinocytes et de HLA-G (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test. *: $p < 0,05$ et **: $p < 0,001$. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC.

II. Bio-ingénierie de kératinocytes plus immunomodulateurs, rôle d'HLA-G

Mestrallet, G.; Auvré, F.; Schenowitz, C.; Carosella, E.D.; LeMaoult, J.; Martin, M.T.; Rouas-Freiss, N.; Fortunel, N.O. Human Keratinocytes Inhibit CD4+ T-Cell Proliferation through TGFB1 Secretion and Surface Expression of HLA-G1 and PD-L1 Immune Checkpoints. *Cells* 2021, 10, 1438. <https://doi.org/10.3390/cells10061438>

1) Transduction de kératinocytes avec un vecteur HLA-G1 inducible.

Pour mieux caractériser la capacité d'HLA-G à moduler l'immunomodulation par les kératinocytes, nous avons construit des vecteurs permettant son expression inducible par les kératinocytes. Le vecteur contrôle permet l'expression inducible de RFP après l'addition de doxycycline, tandis que le vecteur d'intérêt permet l'expression de HLA-G1 (**Figure 30 A**). Les cellules transduites d'un donneur représentatif ont été amplifiées pendant 7 jours. Par Western Blot, j'ai observé une expression inducible de dimères et monomères d'HLA-G1 sur les kératinocytes en ajoutant de la doxycycline, avec détection de l' α -tubuline comme contrôle de charge (moyenne + SEM, $p < 0,0001$, $n = 3$) (**Figure 30 B/C**). Les cellules K562 transduites avec HLA-G1 ont été utilisées comme contrôle positif avec l'anticorps 4H84. J'ai

pu confirmer ces résultats en mesurant les niveaux d'HLA-G1 par cytométrie en flux dans ces conditions (moyenne + SEM, n = 3) (**Figure 30 D/E**). Aucune toxicité de la doxycycline sur les kératinocytes n'a été observée à la dose utilisée (voir données supplémentaires **Fig Sup 4**). Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC. Nous avons donc pu générer des kératinocytes exprimant une forte dose de HLA-G de manière inductible. L'expression inductible de HLA-G1 augmente l'immunomodulation par les kératinocytes amplifiés.

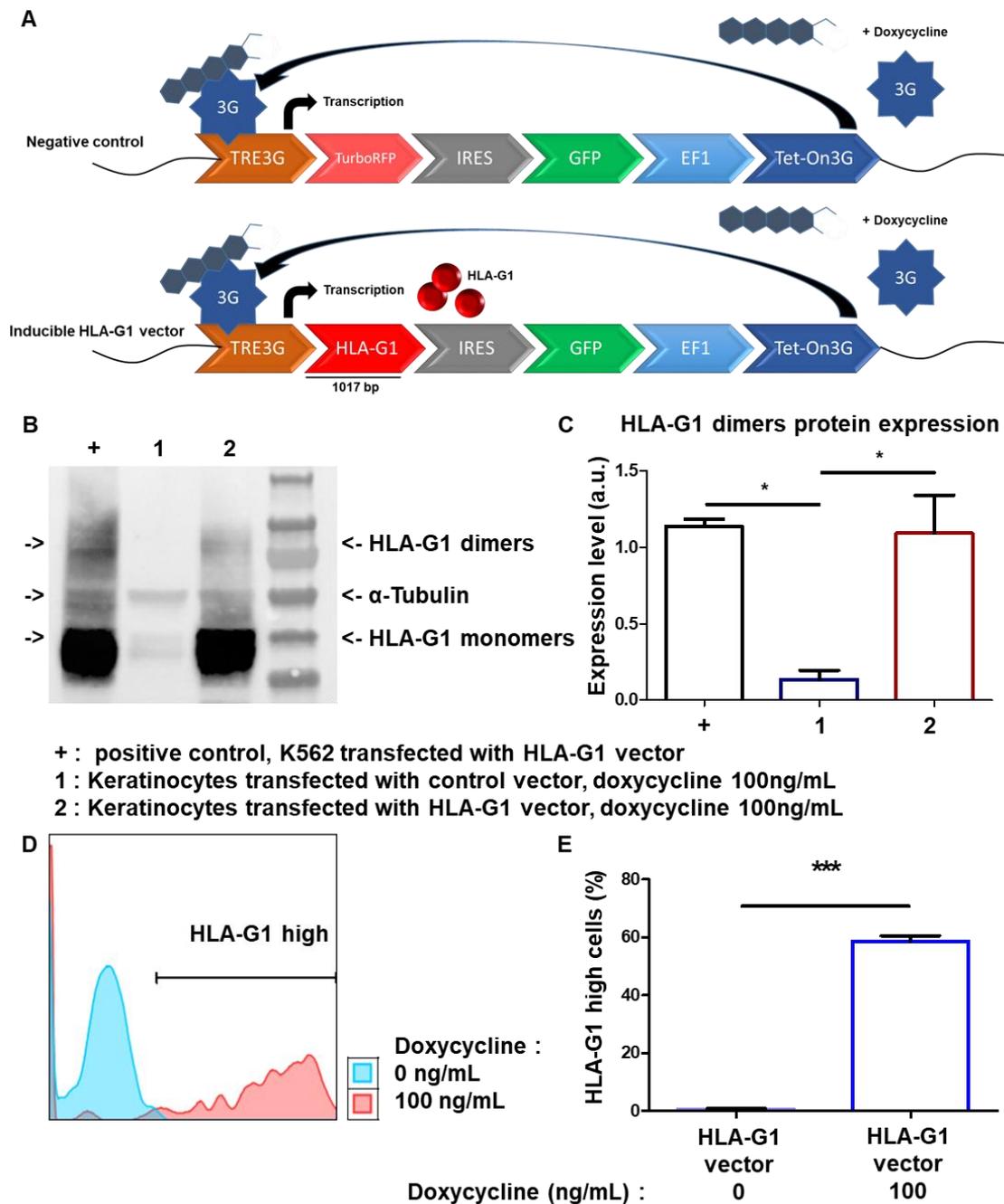


Figure 30) Transduction de kératinocytes avec un vecteur HLA-G1 inducible.

A Construction de vecteurs permettant l'expression inducible de HLA-G1 par les kératinocytes. **B/C/D/E** Les cellules transduites d'un donneur représentatif ont été cultivées pendant 7 jours. L'expression de HLA-G1 sur les kératinocytes a été induite par la doxycycline. **B** Photographie d'un gel typique correspondant à différentes cultures, avec détection de l' α -tubuline comme contrôle de charge. Les cellules K562 transduites avec HLA-

G1 ont été utilisées comme contrôle positif avec l'anticorps 4H84. **C** Quantification par Weestern blot de l'expression d'HLA-G1 (moyenne + SEM, $p < 0,0001$, $n = 3$). **D** Profils représentatifs de l'expression de HLA-G1 sur les cellules transduites. **E** Analyse par cytométrie en flux des taux de HLA-G1 (moyenne + SEM, $n = 3$) sur les kératinocytes. Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test apparié. *: $p < 0,05$ et **: $p < 0,001$. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC.

2) L'expression inductible de HLA-G1 augmente l'immunomodulation par les kératinocytes amplifiés.

Enfin, j'ai examiné si les kératinocytes transduits par le vecteur HLA-G et présentant une expression inductible d'HLA-G élevée étaient plus immunosuppresseurs que les kératinocytes amplifiés normaux. Les résultats ont montré que les kératinocytes HLA-G + induisaient une plus grande inhibition de la prolifération des cellules T CD4 +, par rapport aux kératinocytes HLA-G- en l'absence de doxycycline (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$) (**Figure 31 A/B**). Je n'ai observé aucune différence entre les kératinocytes non transduits et les kératinocytes transduits mais non induits. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC. En surexprimant HLA-G1 sur les kératinocytes, j'ai donc augmenté leurs propriétés immunosuppressives.

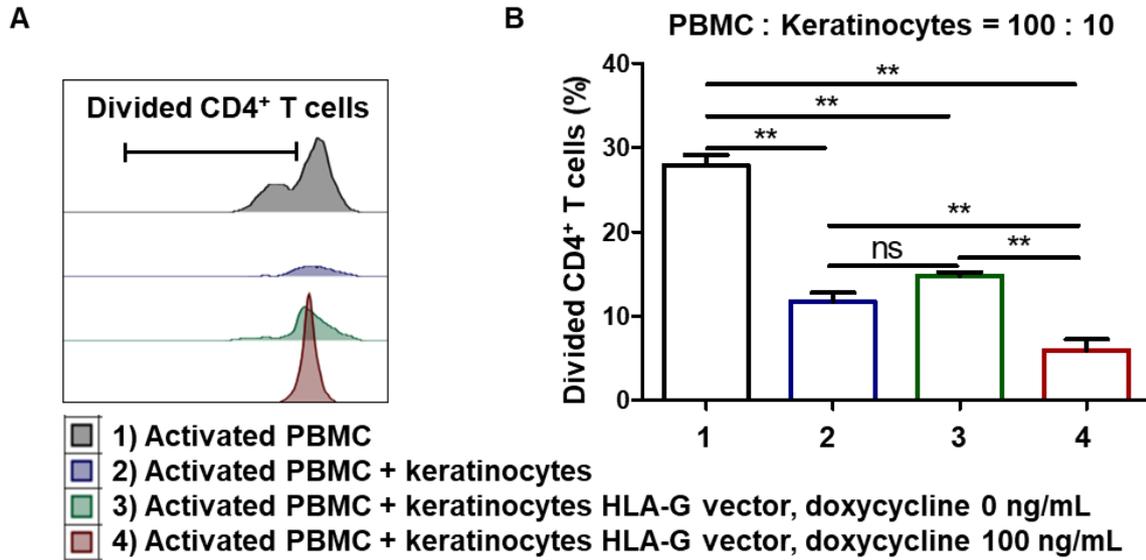


Figure 31) L'expression inductible de HLA-G1 augmente l'immunomodulation par les kératinocytes amplifiés.

10000 kératinocytes, transduits ou non avec le vecteur HLA-G1, sont incubés avec 100000 PBMC pendant 7 jours. L'expression de HLA-G1 a été induite ou non sur les kératinocytes par addition de doxycycline. Les PBMC sont pré-marquées avec un colorant. Les PBMC sont activées par des billes CD3 + CD28 +. La prolifération des PBMC a été quantifiée par la diminution du colorant au jour 7. **A** Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 7. **B** Prolifération des cellules T CD4 + en fonction de la présence de kératinocytes et d'HLA-G (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test. *: $p < 0,05$ et **: $p < 0,001$. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC.



Article

Human Keratinocytes Inhibit CD4⁺ T-Cell Proliferation through TGFB1 Secretion and Surface Expression of HLA-G1 and PD-L1 Immune Checkpoints

Guillaume Mestrallet ^{1,2}, Frédéric Auvré ^{1,2}, Chantal Schenowitz ^{3,4}, Edgardo D. Carosella ^{3,4}, Joel LeMaoult ^{3,4,*}, Michèle T. Martin ^{1,2,*}, Nathalie Rouas-Freiss ^{3,4,*} and Nicolas O. Fortunel ^{1,2,*}

¹ CEA, Laboratory of Genomics and Radiobiology of Keratinopoiesis, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Francois Jacob Institute of Biology, DRF, 91000 Evry, France; guillaume.mestrallet@cea.fr (G.M.); frederic.auvre@cea.fr (F.A.)

² Université Paris-Saclay, 91190 Saint-Aubin, France

³ CEA, DRF, Francois Jacob Institute of Biology, Hemato-Immunology Research Department, Saint-Louis Hospital, 75010 Paris, France; chantal.schenowitz@cea.fr (C.S.); edgardo.carosella@cea.fr (E.D.C.)

⁴ U976 HIPI Unit, IRSL, Université Paris, 75010 Paris, France

* Correspondence: joel.lemaoult@cea.fr (J.L.); michele.martin@cea.fr (M.T.M.); nathalie.rouas-freiss@cea.fr (N.R.-F.); nicolas.fortunel@cea.fr (N.O.F.); Tel.: +33-1-60-87-34-91 (M.T.M.); +33-1-57-27-68-01 (N.R.-F.); +33-1-60-87-34-92 (N.O.F.)

† These authors contributed equally to this article.



Citation: Mestrallet, G.; Auvré, F.; Schenowitz, C.; Carosella, E.D.; LeMaoult, J.; Martin, M.T.; Rouas-Freiss, N.; Fortunel, N.O. Human Keratinocytes Inhibit CD4⁺ T-Cell Proliferation through TGFB1 Secretion and Surface Expression of HLA-G1 and PD-L1 Immune Checkpoints. *Cells* **2021**, *10*, 1438. <https://doi.org/10.3390/cells10061438>

Academic Editor: Cord Brakebusch

Received: 10 May 2021

Accepted: 4 June 2021

Published: 8 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Human skin protects the body against infection and injury. This protection involves immune and epithelial cells, but their interactions remain largely unknown. Here, we show that cultured epidermal keratinocytes inhibit allogenic CD4⁺ T-cell proliferation under both normal and inflammatory conditions. Inhibition occurs through the secretion of soluble factors, including TGFB1 and the cell-surface expression of HLA-G1 and PD-L1 immune checkpoints. For the first time, we here describe the expression of the HLA-G1 protein in healthy human skin and its role in keratinocyte-driven tissue immunomodulation. The overexpression of HLA-G1 with an inducible vector increased the immunosuppressive properties of keratinocytes, opening up perspectives for their use in allogeneic settings for cell therapy.

Keywords: skin immunity; human keratinocytes; immunomodulation; HLA-G1; PD-L1; TGFB1; tolerance

1. Introduction

Skin grafting can be necessary in various pathological conditions, such as burns [1], traumatic injury or ulcers (Buruli ulcer, diabetes, pressure, venous ulcer), postoperatively, postinfection (necrotizing fasciitis, purpura fulminans), or in genetic diseases such as junctional epidermolysis bullosa [2].

Keratinocytes constitute the main cellular component of the epidermis. In bioengineered skin-substitute transplantation to replace large skin areas, they are obtained from biopsies of a few square centimeters in healthy body areas that are known to heal well, with minimal genotoxic exposure. The keratinocytes are then amplified *ex vivo* for 1 to 3 weeks, and used to generate epithelial sheets fixed on gauze, which are then deposited on the wounded area [3,4]. The current gold-standard keratinocyte amplification process is based on Green's pioneering work [5], involving the principle of co-culturing keratinocytes and murine growth-arrested feeder fibroblasts. There have been several clinical studies on *ex vivo* keratinocyte amplification for skin autografts. One reported 65% transplant uptake in 63 burn patients, with 84% patient survival at 7 days [6]. Another reported 72.7% transplant uptake in 88 burn patients, with 91% patient survival [7].

However, when 40–90% of the skin surface is burned, *ex vivo* keratinocyte amplification is time-consuming and is variable in both quantitative and qualitative terms. Moreover,

in some elderly patients or significantly inflammatory contexts, poor healing capacity can complexify clinical procedures that involve harvesting autologous skin biopsies. For these reasons, it would be useful to have banks of well-documented allogeneic bioengineered grafts as alternative materials. However, this approach is limited by the problem of transplant rejection. In allogeneic skin grafts, strong rejection is observed after 7 to 10 days. Immunosuppressants have been used to treat burn patients: methylprednisolone, cyclosporine, prednisone, anti-thymocyte globulin and azathioprine [8,9]. However, it is difficult to draw any conclusion from these studies, due to the very small numbers of patients involved. The use of immunosuppressants is also problematic because the donor site is left more susceptible to infection, and the treatment may have toxic effects on other organs such as the kidneys. It is therefore important to study the role of immune checkpoint molecules in the skin, so as to open up new approaches for reducing allograft rejection.

The overexpression of immune checkpoint molecules such as CTLA4-Ig and PD-L1 in human embryonic stem cells (hESCs) was shown to limit their rejection in humanized murine models [10]. The PD-L1 immune checkpoint molecule binds to the PD-1 protein expressed on the surface of T-cells, inhibiting their activity [11] and decreasing the autoimmune reaction [12]. HLA-G is another immune checkpoint molecule, originally described as enabling maternal-fetal tolerance [13,14]. HLA-G inhibits immune-cell functions such as the cytolytic function of NK- and T-cells, the alloproliferative response of CD4⁺ T-cells, antibody production by B-cells and the antigen-presenting function of dendritic cells [15,16]. Notably, patients expressing HLA-G were significantly less prone to acute and chronic rejection in solid-organ transplantation (heart, kidney, liver or lung) [17–21]. Tolerance induction by HLA-G was also demonstrated in murine models [22–25]. The HLA-G primary transcript is alternately spliced, giving rise to seven spliced transcripts that lead to seven protein isoforms. The HLA-G1 to G4 isoforms are membrane-bound, while the HLA-G5 to G7 isoforms are their soluble counterparts. The HLA-G1 protein is the full-length isoform, with three extracellular domains ($\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$), and it is also the main HLA-G isoform expressed *in vivo* [26].

Several approaches to using membrane-bound or soluble HLA-G forms as immunoregulatory agents in transplantation have been documented. The first was to use epithelial cells derived from HLA-G⁺ amniotic cells. These epithelial cells express HLA-G but not HLA-DR or the co-stimulation molecules CD40, CD80 and CD86. They are also able to limit peripheral blood mononuclear cell (PBMC) alloproliferation [26]. The second approach was to overexpress HLA-G in embryonic stem cells and their epidermal derivatives, reducing lysis by NK cells and inhibiting T-cell alloproliferation in mixed lymphocyte reactions [27]. The third approach was to use the soluble form of HLA-G to inhibit transplant rejection. Notably, the expression of the HLA-G tetramer in transgenic mice reduced acute skin allograft rejection [22]. Additionally, various recombinant HLA-G proteins enhanced tolerance to skin allografting in mice [23]. Taken together, these results identify HLA-G as a promising molecule to limit skin allograft rejection.

The present *ex vivo* study reports the ability of both non-cultured tissue-extracted keratinocytes and keratinocytes amplified in culture to reduce CD4⁺ T-cell proliferation, and proposes approaches to boost these immunomodulatory properties.

2. Materials and Methods

2.1. Human Tissues and Cells

The present study was approved by the review board of the iRCM (Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, CEA (Atomic Energy Commission), Fontenay-aux-Roses, France), and is in accordance with the scientific, ethical, safety and publication policy of the CEA (CODECO number DC-2008-228, reviewed by the ethical research committee IDF-3). PBMCS were collected from healthy donors in the French Blood Bank (EFS) at Saint Louis Hospital, Paris, after informed consent was obtained. Human skin tissue from healthy adult donors was collected in the context of breast reduction surgery, after obtaining informed consent. Epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts were extracted as

previously described [28]. Briefly, enzymatic treatment with a solution containing (*v/v*) 3/4 grade II dispase 2.4 U mL⁻¹ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and 1/4 trypsin 0.25% (Gibco) was conducted for 24 h at 4 °C. We used two categories of cells in this study: cells directly extracted from the tissue and not amplified (tissue keratinocytes), and cells extracted from the tissue, amplified and used between passage 1 and 3 in culture (amplified keratinocytes).

2.2. Cell Culture

Amplified adult epidermal keratinocytes were obtained as follows: bulk cultures were generated in a serum-containing medium, in the presence of a feeder layer of human dermal fibroblasts growth-arrested by 60 Gy γ irradiation [29]. All cultures were performed in plastic flasks coated with type-I collagen (BioCoat, Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France). The composition of the serum-containing medium consisted of DMEM and Ham's F12 media (Gibco, ThermoFisher, Les Ulis, France) (*v/v*, 3/1 mixture), 10% fetal calf serum (Hyclone, Fisher Scientific, Illkirch, France), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF) (Chemicon, Fisher Scientific, Illkirch, France), 5 μ g/mL transferrin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 5 μ g/mL insulin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 0.4 μ g/mL hydrocortisone (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 180 μ M adenine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 2 mM tri-iodothyronine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 2 mM L-glutamine (Gibco, ThermoFisher, Les Ulis, France), and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco, ThermoFisher, Les Ulis, France). The medium was renewed 3 times a week. For cell amplification, keratinocytes were seeded at 1000 cells/cm² and sub-cultured weekly. Feeder cells were seeded at 5000 cells/cm². In all experiments, the influence of inflammatory conditions was analyzed through pretreatment with interferon- γ (IFN- γ) (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (R&D Systems, Bio-Techne, Noyal Châtillon sur Seiche, France).

2.3. Flow Cytometry Analysis

For analysis of cell-surface immune marker expression, keratinocytes were processed as single-cell suspensions and stained for 1 h at room temperature with monoclonal antibodies. The staining antibodies used were as follows: PE-cy7-conjugated mouse anti-human PD-L1 monoclonal antibody (clone MIH1, Thermo Fisher, Les Ulis, France), FITC-conjugated mouse anti-human CD40 monoclonal antibody (clone HB14, Thermo Fisher, Les Ulis, France), FITC-conjugated mouse anti-human MHC1 monoclonal antibody (clone W6-32, Thermo Fisher, Les Ulis, France), Alexa 700-conjugated mouse anti-human HLA-G monoclonal antibody (clone 87G, Novus Biologicals, Lille, France), PE-conjugated rat anti-human ILT4 monoclonal antibody (clone 42D1, Thermo Fisher, Les Ulis, France), FITC-conjugated mouse anti-human ILT2 monoclonal antibody (clone GHI/75, Miltenyi, Paris, France), and APC-conjugated mouse anti-human HLA-DR monoclonal antibody (clone REA805, Miltenyi, Paris, France). Non-reactive antibodies of similar species and isotype, coupled with the same fluorochromes, were used as isotypic controls. HLA-DR, PD-L1, CD40, MHC1, HLA-G, ILT2 and ILT4 expression profiles were analyzed using an Astrios cell-sorter (Beckman Coulter, Villepinte, France) or C6 Accuri (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), Attune NxT (Thermo Fisher, Les Ulis, France) or MACSquant (Miltenyi, Paris, France) analyzer. Anti-ILT2 and anti-ILT4 antibodies were used to generate the data presented in Figure S6. Data were analyzed using FlowJo software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

2.4. Cell Sorting

Adult epidermal keratinocytes were sorted according to HLA-G or PD-L1 expression, using PE-cy7-conjugated mouse anti-human PD-L1 monoclonal antibody (clone MIH1, Thermo Fisher, Les Ulis, France) and Alexa 700-conjugated mouse anti-human HLA-G monoclonal antibody (clone 87G, Novus Biologicals, Lille, France). Appropriate isotype

controls were systematically used. Cells were sorted using a FACS Aria 3 sorter (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

2.5. Western Blotting

Total proteins were extracted from cells in lysis buffer: 20 mM Tris, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA supplemented with anti-proteases (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Cells were lysed by sonication at a concentration of 10^7 cells/mL for 10 min. Protein concentrations were determined using the Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). In total, 60 µg of protein was separated by electrophoresis in 4–15% Mini Protean TGX Stain free pre-cast gels (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) using Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Membranes were blocked by 1 h incubation with TBS Tween 1% and non-fat dry milk 5%. After membrane incubation with primary antibodies for 1 h at room temperature, HRP-conjugated secondary antibodies (Pierce, Thermo Fisher, Les Ulis, France) were used for signal detection in ECL and ECL max (Clarity Western ECL, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The Chemidoc system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used for the detection and quantification of Western blot signals. The primary antibodies used were anti-human alpha-tubulin rabbit monoclonal antibody (clone EP1332Y, Abcam, Paris, France), mouse anti-human HLA-G (clone 4H84, Santa Cruz, Heidelberg, Germany), and mouse anti-human HLA-G5 (clone 5A6G7, Thermo Fisher, Les Ulis, France). Membranes were washed 3 times with TBS Tween 0.1% between and after stainings. The 4H84 antibody recognizes all HLA-G isoforms while 5A6G7 recognizes the soluble isoforms HLA-G5 and HLA-G6 [30,31]. The 87G antibody recognizes both the HLA-G1 and HLA-G5 isoforms [32].

2.6. Immunofluorescence

For native epidermises extracted from adult donors, 8 µm-thick sections were cut by cryostat. After blocking non-specific antibody binding with BSA 3% for 1 h at room temperature, sections were incubated for 1 h at room temperature with the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-involucrin (IVL) antibody (ab53112, Abcam, Paris, France), and mouse monoclonal anti-laminin 5 (LAM5) (clone P3H9-2, Abcam, Paris, France). Staining was then revealed for 30 min at room temperature using the following secondary antibodies: Alexa Fluor 594 (AF594)-conjugated goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France), and Alexa Fluor 594 (AF594)-conjugated goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France). Appropriate isotype controls were systematically used. HLA-G1 was stained with Alexa 700-conjugated mouse anti-human HLA-G monoclonal antibody (clone 87G, Novus Biologicals, Lille, France). Nuclei were stained with Dapi (Fluoroshield[™], Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Images were acquired using the AnalysisCellInsight CX7 High-Content Screening (HCS) Platform (Thermo Fisher, Les Ulis, France), or an Axio-observer Z1 (Zeiss, Marly le Roi, France) or SP8 (Leica, Nanterre, France) microscope.

2.7. Cell Transduction for Inducible Expression of HLA-G1

Lentiviral transductions were carried out using non-replicative lentiviral vectors (Flash Therapeutics, Toulouse, France). Two vectors were used, for the expression of GFP and doxycycline-inducible RFP (control vector), or of GFP and doxycycline-inducible HLA-G1 (HLA-G1 vector). The maps of the constructions are provided in the Supplementary Materials (Figure S1). Transductions were performed on keratinocytes at 20% confluence, in medium with heat-depleted serum. The multiplicity of infection (M.O.I.) was 20, for 24 h at 37 °C, in the presence of hexadimethrine bromide (polybrene) at 8 µg/mL (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The cells were then washed 3 times with PBS and amplified in medium for 3 days up to 80% confluence. They were then sorted by flow cytometry (MoFlo ASTRIOS, Beckman Coulter, Villepinte, France) based on GFP

expression. The keratinocytes were then amplified to a density of 1000/cm² or deposited in predefined numbers by flow cytometry in 96-well plates.

2.8. PBMC Proliferation Measured by ³H-Thymidine Incorporation

Keratinocytes were seeded at various ratios in 96-well culture plates (collagen-1 96-well, BD BioCoat, Le Pont de Claix, France) and incubated for 48 h at 37 °C, in 5% CO₂ with or without IFN- γ and TNF α . Then, PBMCs were incubated for 1 h at 37 °C, in 5% CO₂ in 100 μ L RPMI medium (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 20% FCS, enriched in streptomycin and glucose. Then, PBMCs were stimulated or not by anti-CD2:anti-CD3:anti-CD28-coated beads (T-Cell Activation/Expansion Kit, Miltenyi, Paris, France), and seeded or not with keratinocytes, at 100,000 cells per well, with one bead per cell. Sixteen hours before collection on day 5, PBMCs were incubated with tritiated thymidine (20 Ci/mol, PerkinElmer, Boston, MA, USA). Cells were collected on day 5 (FilterMate Harvester, PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France), and radioactivity was quantified with a β -counter. Keratinocytes' ability to modulate PBMC proliferation was analyzed by comparing thymidine incorporation by PBMCs in the presence versus absence of keratinocytes.

2.9. Flow Cytometry-Based Analysis of CD4⁺ T-Cell Proliferation

Keratinocytes were seeded at various ratios in 96-well culture plates (collagen-1 96-well, BD BioCoat, Le Pont de Claix, France) and incubated for 48 h at 37 °C, in 5% CO₂ with or without IFN- γ and TNF α . Then, PBMCs were incubated for 1 h at 37 °C, in 5% CO₂ in 100 μ L RPMI medium (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 20% FCS, enriched in streptomycin and glucose. PBMCs were incubated for 20 min with a proliferation dye (eBioscience Cell Proliferation Dye eFluor 450, Thermo Fisher, Les Ulis, France), then stimulated or not by anti-CD2:anti-CD3:anti-CD28-coated beads (T-Cell Activation/Expansion Kit, Miltenyi, Paris, France), and seeded or not with keratinocytes, at 100,000 cells per well, with one bead per cell. PBMC was quantified by reduction in cell dye intensity after 7 days. Collection was made on day 7, using a flow cytometer. Keratinocytes' ability to modulate CD4⁺ T-cell proliferation was analyzed by comparing CD4⁺ T-cell dye intensity decrease in the presence versus absence of keratinocytes.

2.10. Supernatant Collection

To evaluate the impact of the keratinocyte supernatant on PBMC proliferation, keratinocytes from 3 donors were amplified for 7 days, as specified in the Cell Culture section above. The medium was changed every 2 days. At 80% keratinocyte confluence and after 48 h, the supernatant was collected and centrifuged to remove cellular debris. These supernatants were then used for the PBMC proliferation assays. The same protocol was used with supernatants of fibroblast feeder layers, in order to ascertain the role of each cell type.

2.11. Antibody Blocking Experiments

To analyze the role of tolerogenic molecules such as TGFB1, PD-L1 and IL-10 in the inhibitory properties of keratinocytes, cells were incubated at days 1 and 3 with blocking antibodies directed against human TGFB1 (clone 1D11, R&D Systems, Bio-Techne, Noyal Châtillon sur Seiche, France) and PD-L1 (clone 6E11, Genentech, Californie, USA) [30,31,33]. Appropriate isotype controls were systematically used. All CD4⁺ T-cell proliferation assays were performed in triplicate.

2.12. Statistics

Significant differences were assessed via 2-tailed Mann-Whitney U-test or *t*-test. All data are presented as mean \pm SEM. Differences were considered significant for $p < 0.05$; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ and **** = $p < 0.0001$.

3. Results

3.1. Amplified Keratinocytes Are Hypoimmunogenic and Limit CD4⁺ T-Cell Proliferation

The expression of molecules that co-stimulate T-cells (i.e., HLA-I, HLA-DR, CD86, and CD40) was first analyzed by flow cytometry in amplified keratinocytes. Keratinocytes expressed HLA-I and CD40, but displayed very low levels of HLA-DR and CD86 (Figure 1A). Keratinocytes therefore lack critical T-cell stimulation molecules when cultured under standard amplification conditions.

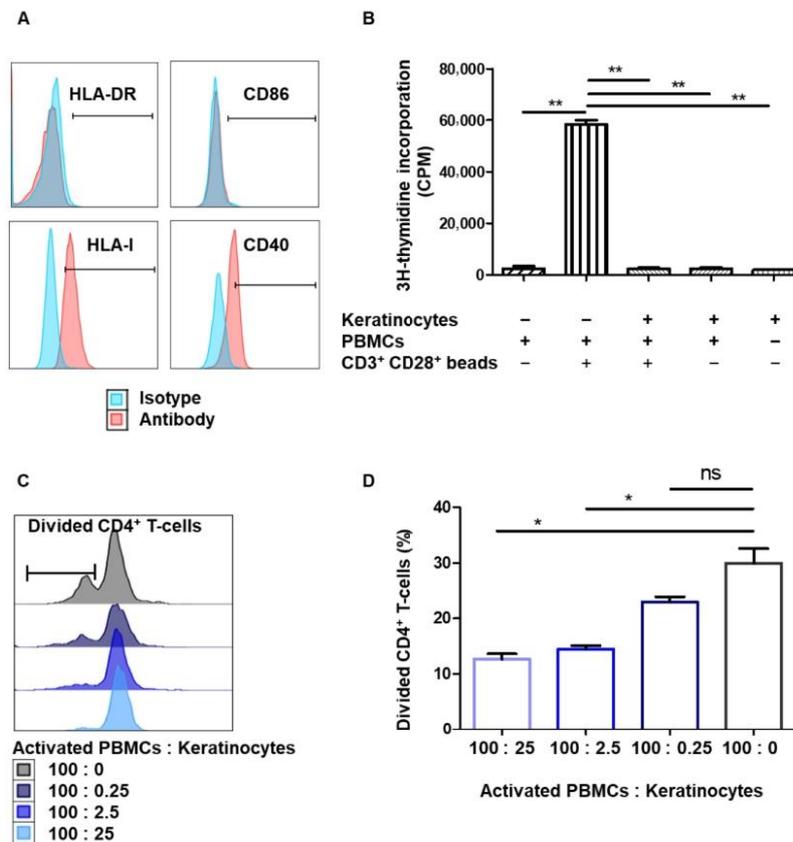


Figure 1. Amplified keratinocytes are hypoimmunogenic and limit CD4⁺ T-cell proliferation. (A) The keratinocytes were amplified for 7 days in a serum+feeder medium. Representative flow cytometry profiles of HLA-DR, HLA-I, CD40 and CD86 are shown. (B) In total, 25,000 keratinocytes from 3 different donors were incubated or not with 100,000 PBMCs for 5 days. PBMCs activated by CD3⁺ CD28⁺ beads were used as positive controls. PBMC proliferation was quantified by thymidine incorporation at day 5 (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). (C,D). In total, 25,000, 2500, 250 or 0 keratinocytes of one representative donor were incubated with 100,000 PBMCs for 7 days. PBMCs were pre-marked with a proliferation dye, and activated by CD3⁺ CD28⁺ beads. PBMC proliferation was quantified by dye reduction at day 7. (C) Representative flow cytometry profiles at day 7. (D) CD4⁺ T-cell proliferation was inhibited dose-dependently by keratinocytes (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$ PBMC). Exact p -values were determined using the t -test. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$.

We then analyzed both the immunogenic and immunosuppressive properties of amplified keratinocytes under allogeneic conditions, i.e., facing HLA-mismatched PBMCs.

Keratinocytes were first incubated with PBMC for 5 days to evaluate their ability to induce PBMC alloproliferation. PBMCs activated by CD3⁺ and CD28⁺ beads were used as positive controls for PBMC proliferation. At the highest quantity (i.e., 25,000 cells), keratinocytes were not able to induce PBMC alloproliferation ($p < 0.05$, $n = 3$ distinct keratinocyte donors) (Figure 1B). Secondly, to assess the immunomodulatory properties of keratinocytes, we added them to bead-activated PBMCs. The results show lower PBMC proliferation in the presence of keratinocytes (Figure 1B). Then, to target the inhibition of CD4⁺ T-cell proliferation by keratinocytes, activated PBMCs pre-stained with a proliferation dye marker were incubated with serial ratios of keratinocytes. Keratinocytes ratio-dependently limited CD4⁺ T-cell proliferation ($p < 0.05$, $n = 3$ PBMC donors) (Figure 1C,D). Thus, amplified keratinocytes appear hypoinmunogenic *in vitro* and display immunomodulatory properties, such as the inhibition of CD4⁺ T-cell proliferation.

3.2. Amplified Keratinocytes Limit CD4⁺ T-Cell Proliferation Whether in Inflammatory Conditions or Not

We then investigated whether the immune properties of keratinocytes varied according to the inflammatory context. To mimic inflammatory conditions, keratinocytes from one representative donor were amplified in the presence of 10 ng/mL IFN γ and TNF- α pro-inflammatory cytokines. To determine the biological effects of the two cytokines, we measured HLA-DR expression at the keratinocyte cell surface by flow cytometry (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 4$). As expected, we observed HLA-DR overexpression in keratinocytes stimulated by IFN γ and TNF- α (Figure 2A). In order to evaluate the impact of IFN γ and TNF- α on their immune properties, keratinocytes previously stimulated with 10 ng/mL IFN γ and TNF- α or not stimulated were incubated with activated PBMCs. The amplified keratinocytes retained their ability to inhibit PBMC proliferation in the presence of IFN γ and TNF- α (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$) (Figure 2B). We then measured the inhibition of CD4⁺ T-cell proliferation by various quantities of keratinocytes, stimulated by 10 ng/mL IFN γ and TNF- α or not. There was no difference in CD4⁺ T-cell proliferation inhibition between keratinocytes with or without IFN γ and TNF- α (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$) (Figure 2C,D). Amplified keratinocytes therefore limit CD4⁺ T-cell proliferation independently of inflammatory conditions.

3.3. Immunomodulation Mediated by Amplified Keratinocytes Involves Soluble Factors

Next, we sought to identify the mechanisms involved in immunomodulation mediated by keratinocytes. To study the role of soluble factors, keratinocytes were amplified and the culture supernatant was collected. The results show that PBMC proliferation was inhibited in the presence of the keratinocyte supernatant (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$) (Figure 3A), showing that the immunomodulatory properties of amplified keratinocytes involve soluble factors. Then, activated PBMCs pre-stained with a proliferation dye marker were incubated with increasing dilutions of keratinocyte supernatant. The supernatants dose-dependently limited CD4⁺ T-cell proliferation (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$) (Figure 3B,C). As keratinocytes were amplified with a feeder layer of fibroblasts, we tested whether the supernatant from the fibroblasts could be involved in this inhibition. Experiments using the fibroblast supernatant did not show any immunomodulation of PBMC proliferation (see Supplementary Materials Figure S2). The immunomodulating effect was therefore due to soluble factors produced by the keratinocytes. It has previously been shown that TGF β 1 is a soluble factor that reduces mouse T-cell proliferation [32] and which is known to be produced by human epidermal keratinocytes [34]. In this regard, we were able to detect TGF β 1 expression by amplified keratinocytes (Figure 3E). To assess the role of this cytokine in the inhibitory effect observed with the keratinocyte supernatant, we performed blocking using the anti-TGF β 1 antibody. Anti-TGF β 1 partially reversed the inhibition of CD4⁺ T-cell proliferation in the presence of the keratinocyte supernatant (Figure 3F). Thus, the immunosuppressive properties of amplified keratinocytes involve soluble factors, including TGF β 1.

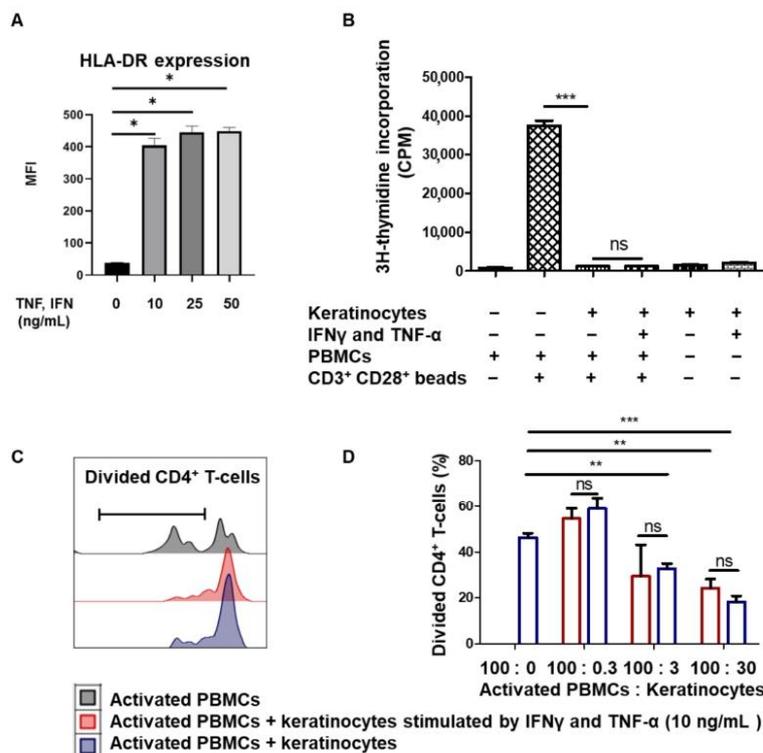


Figure 2. Amplified keratinocytes limit CD4⁺ T-cell proliferation whether they are in inflammatory conditions or not. (A) Cells from one representative donor were cultured for 2 days with IFN γ and TNF- α . HLA-DR expression was analyzed by flow cytometry (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 4$; Mann–Whitney U-test). (B) In total, 20,000 keratinocytes from 1 representative donor, stimulated or not by 10 ng/mL IFN γ and TNF- α for 2 days, were incubated or not with 100,000 PBMCs for 5 days. PBMCs activated by CD3⁺ CD28⁺ beads were used as positive controls. PBMC proliferation was quantified by thymidine incorporation at day 5 (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). (C,D) Keratinocytes stimulated or not by 10 ng/mL IFN γ and TNF- α for 2 days were incubated with 100,000 PBMCs for 7 days. PBMCs were activated by CD3⁺ CD28⁺ beads. PBMC proliferation was quantified by dye decrease at day 7. (C) Representative flow cytometry profiles at day 7. (D) CD4⁺ T-cell proliferation according to inflammatory conditions (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). Exact p-values were determined using the *t*-test. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$.

3.4. Immunomodulation by Amplified Keratinocytes Involves the PD-L1 Immune Checkpoint Protein

We then considered whether the immunosuppressive properties of keratinocytes also involved HLA-G and PD-L1. Since HLA-G and PD-L1 are well-described immune checkpoint molecules involved in T-cell proliferation inhibition, we looked for their expression by amplified keratinocytes. Flow cytometry analysis showed that both PD-L1 and HLA-G were expressed at the keratinocyte cell surface (Figure 4A). While PD-L1 was strongly expressed by amplified keratinocytes, HLA-G expression was much lower, in terms of both intensity and number of positive cells (Figure 4B). We then investigated which HLA-G isoforms were expressed by keratinocytes. Western blot analysis using the 4H84 anti-HLA-G antibody showed a band corresponding to the membrane-bound HLA-G1 isoform (39 KDa) (see Supplementary Materials Figure S3). To verify the lack of expression of the soluble

HLA-G5 isoform, we used the 5A6G5 antibody, which selectively recognizes this isoform. No band was detected in keratinocyte lysates. Taken together, these data showed that keratinocytes express the membrane-bound HLA-G1 isoform. In other cellular models, such as mesenchymal stem cells, IFN γ and TNF- α , licensing increased the expression of immune checkpoints such as HLA-G [35]. Similarly, we demonstrated the overexpression of both HLA-G1 and PD-L1 molecules on keratinocytes treated with IFN γ and TNF- α (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 4$) (Figure 4C).

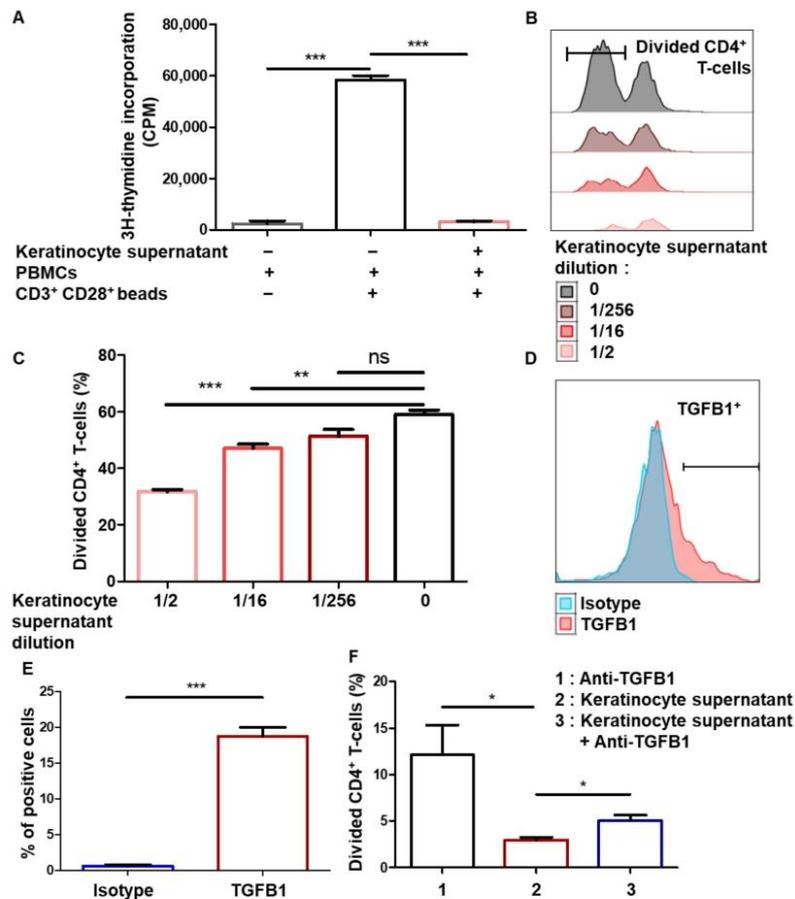


Figure 3. Immunomodulation mediated by amplified keratinocytes involves soluble factors. (A) Keratinocytes from 3 different donors were amplified for 2 days. Then, supernatants were incubated or not with 100,000 PBMCs for 5 days. PBMCs activated by CD3⁺ CD28⁺ beads were used as positive controls. PBMC proliferation was quantified by thymidine incorporation at day 5 (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). (B,C) Different concentrations of keratinocyte supernatant from 1 representative donor were incubated with 100,000 PBMCs for 7 days. PBMCs were pre-marked with a proliferation dye. PBMCs were activated by CD3⁺ CD28⁺ beads. PBMC proliferation was quantified by dye decrease at day 7. (B) Representative flow cytometry profiles at day 7. (C) CD4⁺ T-cell proliferation inhibition as a function of keratinocyte supernatant dilution (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). (D,E) Flow cytometry analysis of TGFB1 levels in keratinocytes. (F) CD4⁺ T-cell proliferation assay with TGFB1 blocking. Exact p-values were determined using the *t*-test. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ $n = 3$.

To evaluate the respective roles of HLA-G1 and PD-L1 in keratinocyte-mediated CD4⁺ T-cell proliferation inhibition, we sorted cells according to HLA-G1 or PD-L1 expression. Activated PBMCs pre-stained with a proliferation marker were incubated with the same numbers of HLA-G⁻ PD-L1⁻, HLA-G⁺ PD-L1⁻, HLA-G⁻ PD-L1⁺ or HLA-G⁺ PD-L1⁺ keratinocytes (Figure 4D). PD-L1⁺ keratinocytes inhibited CD4⁺ T-cell proliferation (Figure 4E), and inhibition was slightly greater when keratinocytes expressed both checkpoints. Notably, blocking PD-L1 restored CD4⁺ T-cell proliferation (Figure 4F). Unfortunately, since no reliable HLA-G-blocking antibody is commercially available, we could not formally confirm the role of this immune checkpoint. Thus, the immunosuppressive properties of amplified keratinocytes involve at least the PD-L1 immune checkpoint molecule.

3.5. Tissue keratinocytes Express HLA-G1, Which Contributes to Their Immunomodulatory Properties

We investigated whether the immunosuppressive properties observed in amplified keratinocytes were biologically relevant, in terms of keratinocytes directly extracted from the skin tissue. Cells from nine healthy donors were extracted from skin tissue but were not amplified *ex vivo*. Interestingly, there was no expression of PD-L1 on tissue keratinocytes, whereas HLA-G1 expression was detected by flow cytometry (mean + SEM, $n = 9$) (Figure 5A,B). Notably, when EGF was removed from the keratinocyte amplification medium, PD-L1 expression decreased sharply, demonstrating that at least EGF contributes to the expression of PD-L1 in amplified keratinocytes (see Supplementary Materials Figure S4). In terms of immunohistochemistry, HLA-G1 was found to be expressed throughout the living layers of the epidermis (Figure 5C). HLA-G1 expression was localized between that of laminin 5, a basal lamina marker, and that of involucrin, a horny-layer marker. We then assessed the contribution of HLA-G1 to tissue keratinocyte-driven immunomodulation. Tissue-extracted keratinocytes were sorted according to HLA-G1 expression and tested for activated allogeneic PBMCs. HLA-G⁺ tissue keratinocytes inhibited CD4⁺ T-cell proliferation more strongly than HLA-G⁻ keratinocytes (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$) (Figure 5D,E). Notably, there was no overexpression of PD-L1 and TGFB1 in keratinocytes following the addition of doxycycline (see Supplementary Materials Figure S5). The immune checkpoint HLA-G1 thus contributes to the inhibition of CD4⁺ T-cell proliferation by tissue keratinocytes.

3.6. Inducible Expression of HLA-G1 in Amplified Keratinocytes Increases Their Immunomodulatory Properties

Since the HLA-G1 expression by tissue and amplified keratinocytes is low, we wondered whether the associated immunomodulation could be increased by boosting HLA-G1 expression. We therefore designed a lentiviral vector to induce HLA-G1 expression after the addition of doxycycline and compared it to a control vector that inducibly expressed RFP (Figure 6A). Transduced cells from one representative skin donor were amplified for 7 days. Flow cytometry showed strong inducible HLA-G1 expression in keratinocytes after the addition of doxycycline (mean + SEM, $n = 3$) (Figure 6B). This was confirmed by Western blot analysis using the 4H84 mAb, in which monomers as well as dimers (functional proteins) of HLA-G1 were detected. Detection of α -tubulin was used as the positive control (mean + SEM, $p < 0.0001$, $n = 3$) (Figure 6C). K562 cells transduced with HLA-G1 were used as HLA-G⁺-positive controls. No toxicity of doxycycline on keratinocytes was observed (data not shown). We therefore generated keratinocytes that could be induced to express a high level of cell-surface HLA-G1.

Finally, we examined whether transduced keratinocytes displaying inducible HLA-G1 expression were more immunosuppressive than regular amplified keratinocytes. The results showed that the transduced keratinocytes induced significantly greater inhibition of CD4⁺ T-cell proliferation after doxycycline treatment than transduced keratinocytes in the absence of doxycycline (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$) (Figure 6D,E). There was no difference between non-transduced keratinocytes and keratinocytes that were transduced but not induced. Thus, overexpressing HLA-G1 in keratinocytes increased their immunosuppressive properties.

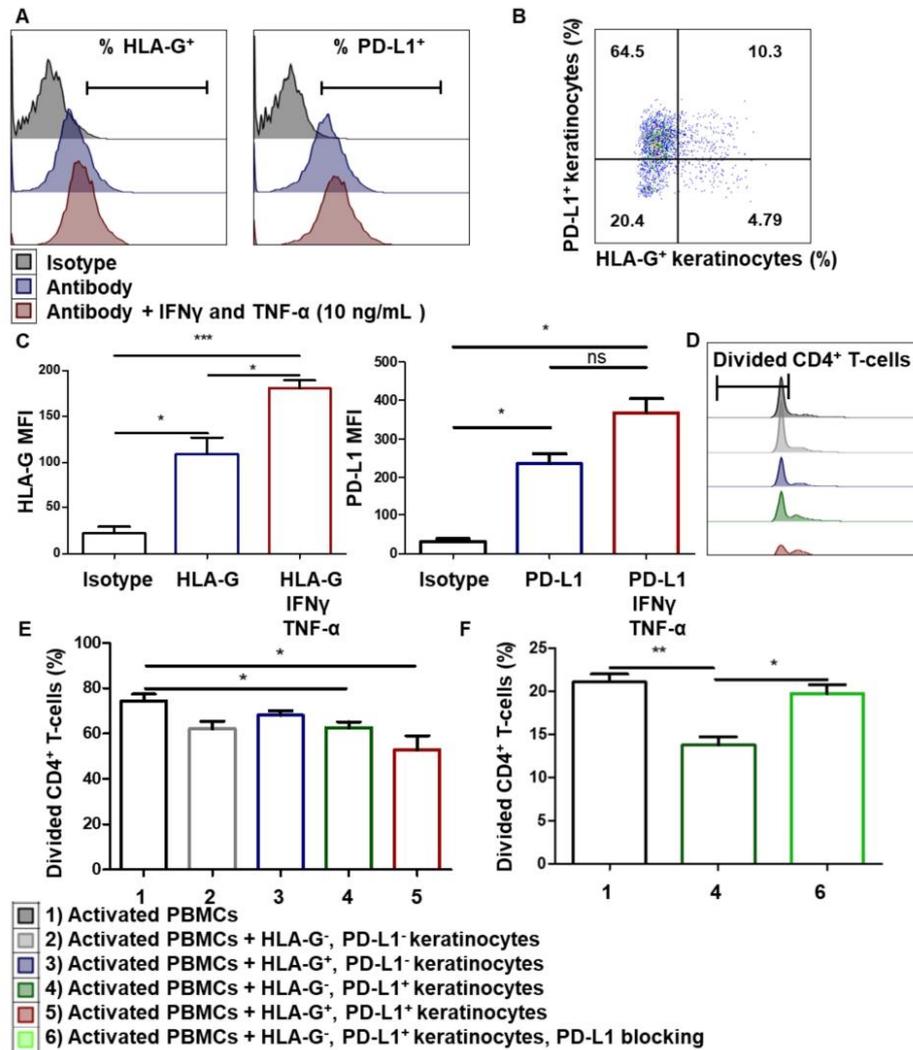


Figure 4. Immunomodulation by amplified keratinocytes involves the PD-L1 immune checkpoint. (A–C) Cells from 3 donors were cultured for 2 days with IFN γ and TNF- α . (A) Representative flow cytometry profiles at day 2. (B) Expression of PD-L1 and HLA-G on keratinocytes. (C) Analysis of HLA-G1 (87G) and PD-L1 expression was performed by flow cytometry (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). Paired t -test. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.001$. (D–F) In total, 10,000 keratinocytes sorted as HLA-G⁻, HLA-G⁺, PD-L1⁻ or PD-L1⁺ were incubated with 100,000 PBMCs for 7 days. PBMCs were activated by CD3⁺ CD28⁺ beads. PBMC proliferation was quantified by dye decrease at day 7. (D) Representative flow cytometry profiles at day 7. (E) CD4⁺ T-cell proliferation inhibition varied according to the presence of HLA-G or PD-L1 (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). (F) Effect of PD-L1 blocking. Exact p -values were determined using the t -test. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$, $n = 3$.

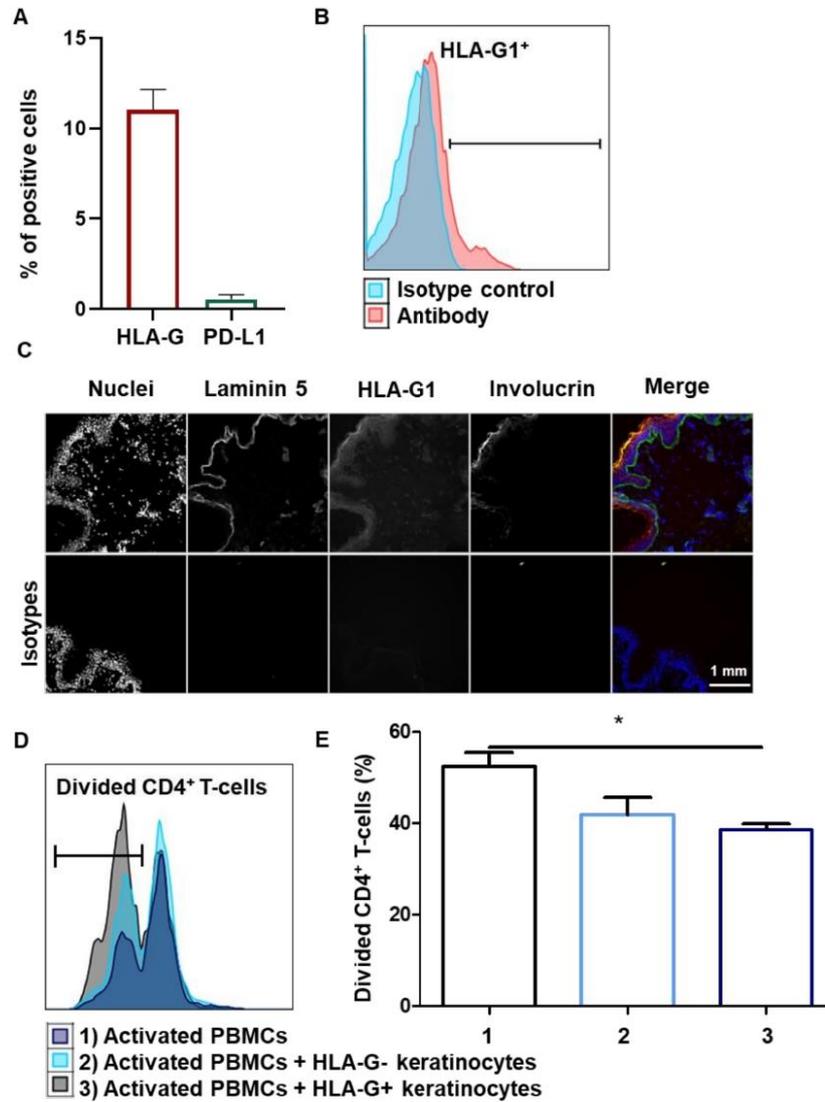


Figure 5. Tissue keratinocytes express HLA-G1, making them immunomodulators. (A,B) Cells from 9 representative adult donors were extracted. (A) Analysis by flow cytometry of PD-L1 and HLA-G1 expression on keratinocytes (mean + SEM, $n = 9$). Exact p-values were determined via Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (B) Representative profiles of HLA-G1 (87G) expression on keratinocytes just extracted from tissue. (C) Expression of HLA-G in the whole epidermis (immunohistochemistry). Laminin 5 is a basal lamina marker and involucrin is a horny-layer marker. (D,E) In total, 10,000 keratinocytes just extracted from tissue, sorted as HLA-G⁻ or HLA-G⁺, were incubated with 100,000 PBMCs for 7 days. PBMCs were activated by CD3⁺ CD28⁺ beads. PBMC proliferation was quantified by dye decrease at day 7. (D) Representative flow cytometry profiles at day 7. (E) CD4⁺ T-cell proliferation inhibition varied according to presence of keratinocytes and HLA-G (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). Exact p-values were determined using the *t*-test. *: $p < 0.05$.

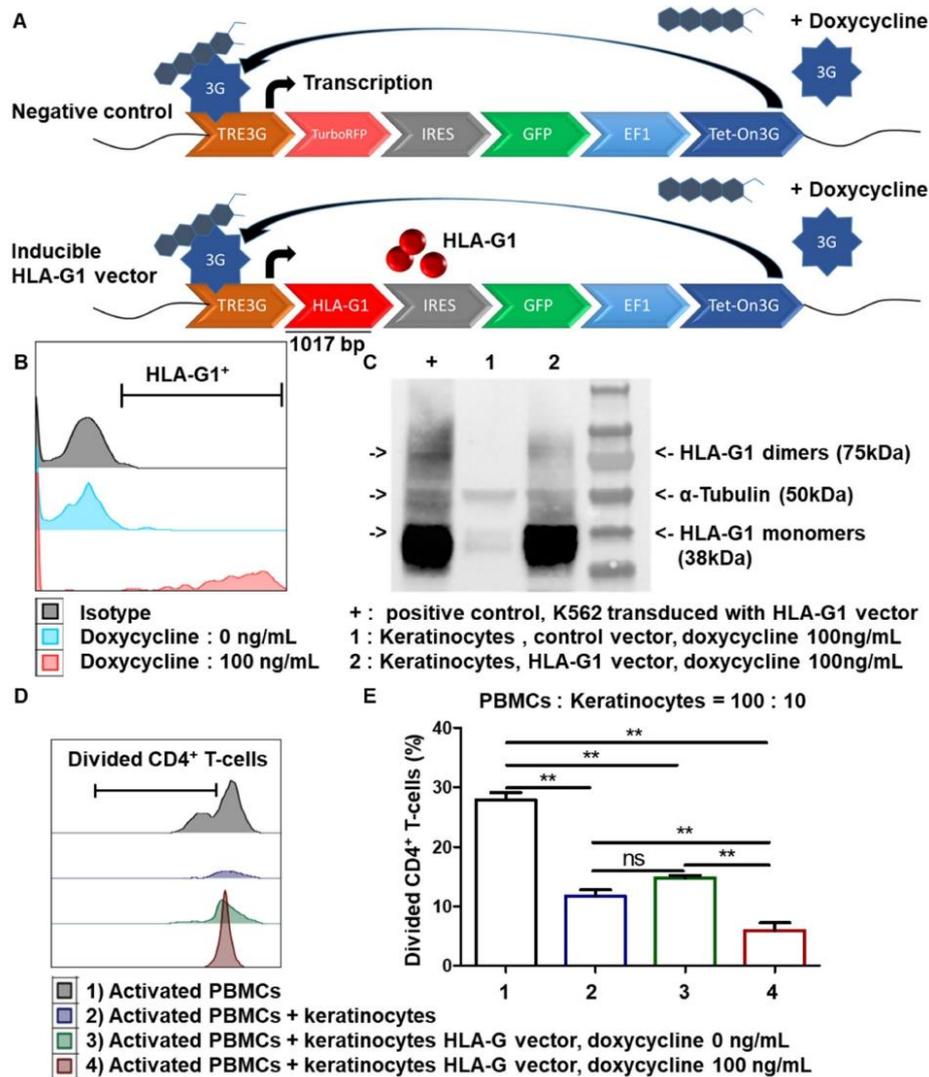


Figure 6. Inducible expression of HLA-G1 increases immunomodulation by amplifying keratinocytes. (A) Construction of vectors allowing inducible expression of HLA-G1 by keratinocytes. (B,C) Transduced cells from 1 representative donor were cultivated for 7 days after transduction. HLA-G1 expression on keratinocytes was induced by doxycycline. (B) Representative profiles of HLA-G1 expression on transduced cells. (C) Typical gel photograph corresponding to different cultures, with α -tubulin detection as loading control. K562 cells transduced with HLA-G1 were used as positive control with 4H84 antibody. (D,E) In total, 10,000 keratinocytes, transduced or not with HLA-G vector, were incubated with 100,000 PBMCs for 7 days. PBMCs were pre-marked with a proliferation dye. PBMCs were activated by CD3⁺ CD28⁺ beads. PBMC proliferation was quantified by dye decrease at day 7. (D) Representative flow cytometry profiles at day 7. (E) CD4⁺ T-cell proliferation depending on presence of keratinocytes and HLA-G1 (mean + SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). Exact p-values were determined using the t -test **: $p < 0.01$, $n = 3$.

4. Discussion

We here present results showing that human skin keratinocytes are able to inhibit CD4⁺ T-cell proliferation via secretion of TGFβ1 as well as expression of HLA-G1 and PD-L1 immune checkpoints. It is notably the first time that the expression of HLA-G protein has been described in healthy human epidermis.

The keratinocytes obtained from skin samples from healthy donors expressed immune markers on their surface. Over 95% expressed MHCI; in contrast, less than 5% expressed HLA-DR or CD86, and a few expressed the CD40 costimulatory molecule. The capacity of keratinocytes to perform antigen presentation to CD4⁺ T-cells through HLA class II expression *in vitro* is therefore limited. On the other hand, keratinocytes showed immunosuppressive properties *in vitro*, reducing CD4⁺ T-cell proliferation in allogeneic conditions. Although differences in the frequency of divided CD4⁺ T-cells varied according to each PBMC donor, inhibition mediated by keratinocytes was observed in all cases. Adding IFN-γ and TNF-α to mimic an inflammatory context altered keratinocyte HLA marker expression. Keratinocytes notably overexpress HLA-DR, as previously shown with mesenchymal stem cells (MSCs) [35]. However, even under these inflammatory conditions, keratinocyte-mediated CD4⁺ T-cell proliferation inhibition was still observed.

The inhibition of CD4⁺ T-cell proliferation by keratinocytes appeared to be mediated by soluble factors, such as TGFβ1, and by immune checkpoints, including PD-L1 and HLA-G1. Interestingly, HLA-G and TGFβ1 have been shown to be interdependent, as HLA-G upregulates TGFβ1 expression and vice versa, constituting an auto-induction loop that amplifies the tolerogenic background. [36,37]. TGFβ1 reduces T-cell activation and proliferation through the Smad3 pathway [37–39]. Thus, the TGFβ1 produced by keratinocytes probably contributes to their ability to inhibit CD4⁺ T-cell proliferation. These TGFβ immunosuppressive properties were also described for bronchial epithelial cells, in combination with IL-10 and HLA-G [33].

Studies in mice showed that skin keratinocytes expressing PD-L1 reduced T-cell proliferation and effector function at local inflammatory sites [40]. PD-L1 expression also correlates with a higher rate of Treg cells in the skin [41]. PD-L1 binds to the PD-1 expressed on the surface of T-cells, which in turn inhibits their activity [11] and limits autoimmune reactions [12]. Here, we demonstrated the strong expression of PD-L1 in amplified keratinocytes, contributing to their ability to modulate CD4⁺ T-cell proliferation. However, we did not observe any PD-L1 expression in keratinocytes directly extracted from the tissue without *in vitro* amplification. The induction of PD-L1 expression by keratinocytes during amplification in culture can be explained by the presence of growth factors such as EGF, as demonstrated here and also shown in other systems [42,43]. However, keratinocytes may be less exposed to EGF once they are grafted onto the patient, decreasing their expression of PD-L1 and its associated tolerogenic functions, and thus increasing the risk of rejection.

The epidermal expression of HLA-G was previously described in pathological contexts, such as skin cancer or inflammatory dermatosis [38]. HLA-G1 is also expressed in healthy human skin at the transcript level [39], but demonstration at the protein level has been lacking. HLA-G was detected in psoriasis, mainly in the macrophages of the dermo-epidermal junction [44]. HLA-G expression was also studied in patients with atopic dermatitis [45]. In this case, HLA-G was expressed by T-cells infiltrating tissue, macrophages and dendritic cells, and this expression of HLA-G could be favored by the expression of IL-10. In pemphigus vulgaris, a rare autoimmune skin disease, deletion in the HLA-G gene was found to be elevated at exon 8 [46,47]. There were also significantly higher soluble HLA-G levels in the circulating blood of patients with systemic lupus erythematosus [48]. HLA-G was also found in skin cancers, such as cutaneous lymphoma and skin basal and squamous cell carcinoma [49–51]. This expression has been particularly studied in melanoma—melanoma cells have less MHCI, which could make them more susceptible to lysis by NK cells. However, HLA-G expressed by melanoma cells was shown to protect them from NK lysis [52–56].

The present study demonstrated for the first time the expression of HLA-G1 protein by keratinocytes in the epidermis of several healthy donors. This successful detection may have been due to the use of more sensitive methods than in previous studies, and notably fluorescence-based assays. No expression of HLA-G receptors ILT2 or ILT4 was observed on amplified keratinocytes (see Supplementary Materials Figure S6), which supports the following mechanism: the action of HLA-G1 expressed in keratinocytes is not involved in an autocrine loop, but rather consists of the modulation of immune cell populations.

Functionally, we showed that keratinocytes from skin tissue reduced CD4⁺ T-cell proliferation through HLA-G1 expression. However, fewer than 10% of keratinocytes expressed HLA-G1 in the tissue. With a view to being able to use keratinocytes for skin allografts, we tried overexpressing this immune checkpoint in order to increase the immunosuppressive properties of amplified keratinocytes. Here, we showed that HLA-G1 expression obtained with an inducible vector boosted the immunosuppressive properties of amplified keratinocytes. These immunosuppressive cells used in allogeneic conditions could open up new therapeutic prospects for patients with severe burns or with a strong inflammatory context, in whom autologous skin transplant is not feasible. Thus, the transient use of amplified keratinocytes strongly overexpressing HLA-G could make a stop-gap allogeneic graft immediately available, in order to reduce inflammation and leave time for an autologous graft to be prepared. As amplified keratinocytes also strongly express PD-L1, this may boost the immunosuppressive effects of HLA-G, in cooperation with TGFβ1. Indeed, in the context of tumors, we recently reported that PD-L1 and HLA-G target distinct T-cell subpopulations. [57,58].

Taken together, the present results showed that human skin keratinocytes inhibit the proliferation of CD4⁺ T-cells via the expression of HLA-G1 and PD-L1 immune checkpoints. Increasing the expression of HLA-G1 further enhances immunomodulation, opening perspectives for the bioengineering of temporary allogeneic skin grafts. In current clinical strategies, grafted tissues that can contain autologous or allogeneic cellular components are not engineered to contribute to reducing the immune response when alone. At present, pharmacological treatments are available to keep acute and chronic immune reactions, including inflammation, under control. This specific research contribution offers new perspectives for next-generation cell therapy approaches, aiming at improving the control of tolerogenicity in skin substitute grafting, via the design of HLA-G1-vehicle cells. The prospects concern skin grafting in severe burns and irradiated patients, as well as more general applications in reconstructive surgery, including chronic wounds, and breast and maxillo-facial reconstruction.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10061438/s1>, Figure S1. Maps of HLA-G1 and control vectors. Figure S2. Fibroblast supernatant and PBMC proliferation inhibition. Figure S3. HLA-G isoform expressed in keratinocytes. Figure S4. Influence of EGF on PD-L1 expression in keratinocytes. Figure S5. Impact of induced HLA-G1 overexpression on PD-L1 and TGFβ1 expression in keratinocytes. Figure S6. Cell-surface expression of the HLA-G receptors ILT2 and ILT4 in keratinocytes.

Author Contributions: Conceptualization, G.M., J.L., M.T.M., N.R.-F. and N.O.F.; methodology, G.M., J.L., M.T.M., N.R.-F. and N.O.F.; validation, G.M., J.L., M.T.M., N.R.-F. and N.O.F.; formal analysis, G.M.; investigation, G.M. and C.S.; resources, G.M., F.A. and C.S.; writing—original draft preparation, G.M., J.L., M.T.M., N.R.-F. and N.O.F.; visualization, G.M., J.L., M.T.M., N.R.-F. and N.O.F.; supervision, J.L., M.T.M., N.R.-F. and N.O.F.; project administration, J.L., E.D.C., M.T.M., N.R.-F. and N.O.F.; funding acquisition, J.L., M.T.M., N.R.-F. and N.O.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. It was supported by CEA funds, including a CFR Ph.D. program grant (2018-2021).

Institutional Review Board Statement: The research project has been approved by the CEA-iRCM Review Board (2018).

Informed Consent Statement: Tissue and cell samples (skin and PBMCs) were collected from healthy adult donors after obtaining informed consent.

Acknowledgments: The authors thank Sophie Duchez, Claire Maillard and Christelle Doliger from the flow cytometry platform of Saint-Louis Hospital. Authors also thank Alexandre Lellouch (HEGP, Paris, France) for providing skin biopsies, and Jean-Jacques Lataillade (CTSA-IRBA, Clamart, France) for helpful discussions.

Conflicts of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Abbreviations

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| HLA-G | human leukocyte antigen G |
| MHC | major histocompatibility complex |
| PD-L1 | programmed death-ligand 1 |
| IFN- γ | interferon- γ |
| TGFB1 | transforming growth factor- β 1 |
| TNF- α | tumor necrosis factor- α |
| EGF | epidermal growth factor |
| NK | natural killer |
| CPM | count per minute |
| TRE | tetracycline response element |
| Tet | tetracycline |

References

- Gallico, G.G.; O'Connor, N.E.; Compton, C.C.; Kehinde, O.; Green, H. Permanent Coverage of Large Burn Wounds with Autologous Cultured Human Epithelium. *N. Engl. J. Med.* **1984**, *311*, 448–451. [[CrossRef](#)]
- Hirsch, T.; Rothoef, T.; Teig, N.; Bauer, J.W.; Pellegrini, G.; De Rosa, L.; Scaglione, D.; Reichelt, J.; Klausegger, A.; Kneisz, D.; et al. Regeneration of the Entire Human Epidermis Using Transgenic Stem Cells. *Nature* **2017**, *551*, 327–332. [[CrossRef](#)]
- Alexaline, M.M.; Trouillas, M.; Nivet, M.; Bourreau, E.; Leclerc, T.; Duhamel, P.; Martin, M.T.; Doucet, C.; Fortunel, N.O.; Lataillade, J.-J. Bioengineering a Human Plasma-Based Epidermal Substitute with Efficient Grafting Capacity and High Content in Clonogenic Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, *4*, 643–654. [[CrossRef](#)]
- Agrawal, N.A.; Zavlin, D.; Louis, M.R.; Reece, E.M. Stem Cells and Plastic Surgery. *Semin. Plast. Surg.* **2019**, *33*, 162–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Green, H.; Kehinde, O.; Thomas, J. Growth of Cultured Human Epidermal Cells into Multiple Epithelia Suitable for Grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 5665–5668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cirodde, A.; Leclerc, T.; Jault, P.; Duhamel, P.; Lataillade, J.-J.; Bargues, L. Cultured Epithelial Autografts in Massive Burns: A Single-Center Retrospective Study with 63 Patients. *Burns* **2011**, *37*, 964–972. [[CrossRef](#)]
- Sood, R.; Roggy, D.; Zieger, M.; Balledux, J.; Chaudhari, S.; Koumanis, D.J.; Mir, H.S.; Cohen, A.; Knipe, C.; Gabehart, K.; et al. Cultured Epithelial Autografts for Coverage of Large Burn Wounds in Eighty-Eight Patients: The Indiana University Experience. *J. Burn Care Res.* **2010**, *31*, 559–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Burke, J.F.; Quinby, W.C.; Bondoc, C.C.; Cosimi, A.B.; Russell, P.S.; Szyfelbein, S.K. Immunosuppression and Temporary Skin Transplantation in the Treatment of Massive Third Degree Burns. *Ann. Surg.* **1975**, *182*, 183–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wendt, J.R.; Ulich, T.; Rao, P.N. Long-Term Survival of Human Skin Allografts in Patients with Immunosuppression. *Plast. Reconstr. Surg.* **2004**, *113*, 1347–1354. [[CrossRef](#)]
- Rong, Z.; Wang, M.; Hu, Z.; Stradner, M.; Zhu, S.; Kong, H.; Yi, H.; Goldrath, A.; Yang, Y.-G.; Xu, Y.; et al. An Effective Approach to Prevent Immune Rejection of Human ESC-Derived Allografts. *Cell Stem Cell* **2014**, *14*, 121–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fife, B.T.; Bluestone, J.A. Control of Peripheral T-Cell Tolerance and Autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 Pathways. *Immunol. Rev.* **2008**, *224*, 166–182. [[CrossRef](#)]
- Keir, M.E.; Butte, M.J.; Freeman, G.J.; Sharpe, A.H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, *26*, 677–704. [[CrossRef](#)]
- Rouas-Freiss, N.; Gonçalves, R.M.; Menier, C.; Dausset, J.; Carosella, E.D. Direct Evidence to Support the Role of HLA-G in Protecting the Fetus from Maternal Uterine Natural Killer Cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11520–11525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ponte, M.; Cantoni, C.; Biassoni, R.; Tradori-Cappai, A.; Bentivoglio, G.; Vitale, C.; Bertone, S.; Moretta, A.; Moretta, L.; Mingari, M.C. Inhibitory Receptors Sensing HLA-G1 Molecules in Pregnancy: Decidua-Associated Natural Killer Cells Express LIR-1 and CD94/NKG2A and Acquire P49, an HLA-G1-Specific Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5674–5679. [[CrossRef](#)]
- Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N.; Tronik-Le Roux, D.; Moreau, P.; LeMaout, J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv. Immunol.* **2015**, *127*, 33–144. [[CrossRef](#)]

16. Carosella, E.D.; Moreau, P.; Lemaoult, J.; Rouas-Freiss, N. HLA-G: From Biology to Clinical Benefits. *Trends Immunol.* **2008**, *29*, 125–132. [[CrossRef](#)]
17. Lila, N.; Carpentier, A.; Amrein, C.; Khalil-Daher, I.; Dausset, J.; Carosella, E.D. Implication of HLA-G Molecule in Heart-Graft Acceptance. *Lancet* **2000**, *355*, 2138. [[CrossRef](#)]
18. Créput, C.; Durrbach, A.; Menier, C.; Guettier, C.; Samuel, D.; Dausset, J.; Charpentier, B.; Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N. Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression in Biliary Epithelial Cells Is Associated with Allograft Acceptance in Liver-Kidney Transplantation. *J. Hepatol.* **2003**, *39*, 587–594. [[CrossRef](#)]
19. Naji, A.; Le Rond, S.; Durrbach, A.; Krawice-Radanne, I.; Créput, C.; Daouya, M.; Caumartin, J.; LeMaoult, J.; Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N. CD3+CD4low and CD3+CD8low Are Induced by HLA-G: Novel Human Peripheral Blood Suppressor T-Cell Subsets Involved in Transplant Acceptance. *Blood* **2007**, *110*, 3936–3948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Deschaseaux, F.; Delgado, D.; Pistoia, V.; Giuliani, M.; Morandi, F.; Durrbach, A. HLA-G in Organ Transplantation: Towards Clinical Applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 397–404. [[CrossRef](#)]
21. Brugière, O.; Thabut, G.; Krawice-Radanne, I.; Rizzo, R.; Dauriat, G.; Danel, C.; Suberbielle, C.; Mal, H.; Stern, M.; Schilte, C.; et al. Role of HLA-G as a Predictive Marker of Low Risk of Chronic Rejection in Lung Transplant Recipients: A Clinical Prospective Study. *Am. J. Transplant.* **2015**, *15*, 461–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Horuzsko, A.; Lenfant, F.; Munn, D.H.; Mellor, A.L. Maturation of Antigen-Presenting Cells Is Compromised in HLA-G Transgenic Mice. *Int. Immunol.* **2001**, *13*, 385–394. [[CrossRef](#)]
23. LeMaoult, J.; Daouya, M.; Wu, J.; Loustau, M.; Horuzsko, A.; Carosella, E.D. Synthetic HLA-G Proteins for Therapeutic Use in Transplantation. *FASEB J.* **2013**, *27*, 3643–3651. [[CrossRef](#)]
24. Naji, A.; Menier, C.; Morandi, F.; Agaugue, S.; Maki, G.; Ferretti, E.; Bruel, S.; Pistoia, V.; Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N. Binding of HLA-G to ITIM-Bearing Ig-like Transcript 2 Receptor Suppresses B Cell Responses. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 1536–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nguyen-Lefebvre, A.T.; Ajith, A.; Portik-Dobos, V.; Horuzsko, D.D.; Mulloy, L.L.; Horuzsko, A. Mouse Models for Studies of HLA-G Functions in Basic Science and Pre-Clinical Research. *Hum. Immunol.* **2016**, *77*, 711–719. [[CrossRef](#)]
26. Cai, Y.-J.; Huang, L.; Leung, T.-Y.; Burd, A. A Study of the Immune Properties of Human Umbilical Cord Lining Epithelial Cells. *Cytotherapy* **2014**, *16*, 631–639. [[CrossRef](#)]
27. Zhao, L.; Teklemariam, T.; Hantash, B.M. Heterologous Expression of Mutated HLA-G Decreases Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells and Their Epidermal Derivatives. *Stem Cell Res.* **2014**, *13*, 342–354. [[CrossRef](#)]
28. Fortunel, N.O.; Chadli, L.; Lemaître, G.; Auvré, F.; Domingues, S.; Bouissou-Cadio, E.; Vaigot, P.; Cavallero, S.; Deleuze, J.-F.; et al. KLF4 Inhibition Promotes the Expansion of Keratinocyte Precursors from Adult Human Skin and of Embryonic-Stem-Cell-Derived Keratinocytes. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *3*, 985–997. [[CrossRef](#)]
29. Fortunel, N.O.; Cadio, E.; Vaigot, P.; Chadli, L.; Moratille, S.; Bouet, S.; Roméo, P.-H.; Martin, M.T. Exploration of the Functional Hierarchy of the Basal Layer of Human Epidermis at the Single-Cell Level Using Parallel Clonal Microcultures of Keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, 387–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mayoux, M.; Roller, A.; Pulko, V.; Sammiceli, S.; Chen, S.; Sum, E.; Jost, C.; Fransen, M.F.; Buser, R.B.; Kowanetz, M.; et al. Dendritic Cells Dictate Responses to PD-L1 Blockade Cancer Immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaav7431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Van Caam, A.; Aarts, J.; van Ee, T.; Vitters, E.; Koenders, M.; van de Loo, F.; van Lent, P.; van den Hoogen, F.; Thurlings, R.; Vonk, M.C.; et al. TGFβ-Mediated Expression of TGFβ-Activating Integrins in SSc Monocytes: Disturbed Activation of Latent TGFβ? *Arthritis Res. Ther.* **2020**, *22*, 42. [[CrossRef](#)]
32. Delisle, J.-S.; Giroux, M.; Boucher, G.; Landry, J.-R.; Hardy, M.-P.; Lemieux, S.; Jones, R.G.; Wilhelm, B.T.; Perreault, C. The TGF-β-Smad3 Pathway Inhibits CD28-Dependent Cell Growth and Proliferation of CD4 T Cells. *Genes Immun.* **2013**, *14*, 115–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dupin, C.; Lhuillier, E.; Létuvé, S.; Pretolani, M.; Thabut, G.; Mal, H.; Carosella, E.; Schilte, C.; Mordant, P.; Castier, Y.; et al. Inhibition of T Cell Alloreactivity by Bronchial Epithelium Is Impaired in Lung Transplant Recipients, Through Pathways Involving TGF-β, IL-10 and HLA-G. *Transplantation* **2017**, *101*, 2192–2199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sivan, V.; Vozenin-Brotons, M.-C.; Tricaud, Y.; Lefaix, J.-L.; Cosset, J.-M.; Dubray, B.; Martin, M.T. Altered Proliferation and Differentiation of Human Epidermis in Cases of Skin Fibrosis after Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2002**, *53*, 385–393. [[CrossRef](#)]
35. Du, W.-J.; Reppel, L.; Leger, L.; Schenowitz, C.; Huselstein, C.; Bensoussan, D.; Carosella, E.D.; Han, Z.-C.; Rouas-Freiss, N. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow and Adipose Tissue Maintain Their Immunosuppressive Properties After Chondrogenic Differentiation: Role of HLA-G. *Stem Cells Dev.* **2016**, *25*, 1454–1469. [[CrossRef](#)]
36. McIntire, R.H.; Morales, P.J.; Petroff, M.G.; Colonna, M.; Hunt, J.S. Recombinant HLA-G5 and -G6 Drive U937 Myelomonocytic Cell Production of TGF-Beta1. *J. Leukoc. Biol.* **2004**, *76*, 1220–1228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Guan, Z.; Song, B.; Liu, F.; Sun, D.; Wang, K.; Qu, H. TGF-β Induces HLA-G Expression through Inhibiting MiR-152 in Gastric Cancer Cells. *J. Biomed. Sci.* **2015**, *22*, 107. [[CrossRef](#)]
38. Urošević, M. HLA-G in the Skin—Friend or Foe? *Semin. Cancer Biol.* **2007**, *17*, 480–484. [[CrossRef](#)]
39. Ulbrecht, M.; Rehberger, B.; Strobel, I.; Messer, G.; Kind, P.; Degitz, K.; Bieber, T.; Weiss, E.H. HLA-G: Expression in Human Keratinocytes In Vitro and in Human Skin In Vivo. *Eur. J. Immunol.* **1994**, *24*, 176–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Ritprajak, P.; Hashiguchi, M.; Tsushima, F.; Chalermarp, N.; Azuma, M. Keratinocyte-Associated B7-H1 Directly Regulates Cutaneous Effector CD8⁺ T Cell Responses. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 4918–4925. [[CrossRef](#)]
41. Miao, X.; Xu, R.; Fan, B.; Chen, J.; Li, X.; Mao, W.; Hua, S.; Li, B. PD-L1 Reverses Depigmentation in Pmel-1 Vitiligo Mice by Increasing the Abundance of Tregs in the Skin. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1605. [[CrossRef](#)]
42. Sun, C.; Mezzadra, R.; Schumacher, T.N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* **2018**, *48*, 434–452. [[CrossRef](#)]
43. Yi, M.; Niu, M.; Xu, L.; Luo, S.; Wu, K. Regulation of PD-L1 Expression in the Tumor Microenvironment. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 10. [[CrossRef](#)]
44. Aractingi, S.; Briand, N.; Le Danff, C.; Viguié, M.; Bachelez, H.; Michel, L.; Dubertret, L.; Carosella, E.D. HLA-G and NK Receptor Are Expressed in Psoriatic Skin: A Possible Pathway for Regulating Infiltrating T Cells? *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 71–77. [[CrossRef](#)]
45. Khosrotehrani, K.; Danff, C.L.; Reynaud-Mendel, B.; Dubertret, L.; Carosella, E.D.; Aractingi, S. HLA-G Expression in Atopic Dermatitis. *J. Investig. Dermatol.* **2001**, *117*, 750–752. [[CrossRef](#)]
46. Gazit, E.; Slomov, Y.; Goldberg, I.; Brenner, S.; Loewenthal, R. HLA-G Is Associated with Pemphigus Vulgaris in Jewish Patients. *Hum. Immunol.* **2004**, *65*, 39–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Gazit, E.; Loewenthal, R. The Immunogenetics of Pemphigus Vulgaris. *Autoimmun. Rev.* **2005**, *4*, 16–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bae, S.-C.; Lee, Y.H. Association of HLA-G Polymorphisms with Systemic Lupus Erythematosus and Correlation between Soluble HLA-G Levels and the Disease: A Meta-Analysis. *Z. Rheumatol.* **2021**, *80*, 96–102. [[CrossRef](#)]
49. Aractingi, S.; Kanitakis, J.; Euvrard, S.; Danff, C.L.; Carosella, E.D. Selective Expression of HLA-G in Malignant and Premalignant Skin Specimens in Kidney Transplant Recipients. *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 232–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Urošević, M.; Kamarashev, J.; Burg, G.; Dummer, R. Primary Cutaneous CD8⁺ and CD56⁺ T-Cell Lymphomas Express HLA-G and Killer-Cell Inhibitory Ligand, ILT2. *Blood* **2004**, *103*, 1796–1798. [[CrossRef](#)]
51. Urošević, M.; Kempf, W.; Zagrodnik, B.; Panizzon, R.; Burg, G.; Dummer, R. HLA-G Expression in Basal Cell Carcinomas of the Skin Recurring after Radiotherapy. *Clin. Exp. Dermatol.* **2005**, *30*, 422–425. [[CrossRef](#)]
52. Geertsen, R.C.; Hofbauer, G.F.L.; Yue, F.-Y.; Manolio, S.; Burg, G.; Dummer, R. Higher Frequency of Selective Losses of HLA-A and -B Allospecificities in Metastasis Than in Primary Melanoma Lesions. *J. Investig. Dermatol.* **1998**, *111*, 497–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ferrone, S.; Marincola, F.M. Loss of HLA Class I Antigens by Melanoma Cells: Molecular Mechanisms, Functional Significance and Clinical Relevance. *Immunol. Today* **1995**, *16*, 487–494. [[CrossRef](#)]
54. Ljunggren, H.G.; Kärre, K. In Search of the “Missing Self”: MHC Molecules and NK Cell Recognition. *Immunol. Today* **1990**, *11*, 237–244. [[CrossRef](#)]
55. Paul, P.; Rouas-Freiss, N.; Khalil-Daher, I.; Moreau, P.; Riteau, B.; Le Gal, F.A.; Avril, M.F.; Dausset, J.; Guillet, J.G.; Carosella, E.D. HLA-G Expression in Melanoma: A Way for Tumor Cells to Escape from Immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4510–4515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Paul, P.; Cabestré, F.A.; Le Gal, F.A.; Khalil-Daher, I.; Le Danff, C.; Schmid, M.; Mercier, S.; Avril, M.F.; Dausset, J.; Guillet, J.G.; et al. Heterogeneity of HLA-G Gene Transcription and Protein Expression in Malignant Melanoma Biopsies. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1954–1960.
57. Dumont, C.; Jacquier, A.; Verine, J.; Noel, F.; Goujon, A.; Wu, C.-L.; Hung, T.-M.; Desgrandchamps, F.; Culine, S.; Carosella, E.D.; et al. CD8⁺PD-1⁻ILT2⁺ T Cells Are an Intratumoral Cytotoxic Population Selectively Inhibited by the Immune Checkpoint HLA-G. *Cancer Immunol. Res.* **2019**, *27*, 1619–1632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Jacquier, A.; Dumont, C.; Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N.; LeMaout, J. Cytometry-Based Analysis of HLA-G Functions According to ILT2 Expression. *Hum. Immunol.* **2020**, *81*, 168–177. [[CrossRef](#)]



Article

Human Keratinocytes Inhibit CD4⁺ T-Cell Proliferation through TGFB1 Secretion and Surface Expression of HLA-G1 and PD-L1 Immune Checkpoints

Guillaume Mestrallet ^{1,2}, Frédéric Auvré ^{1,2}, Chantal Schenowitz ^{3,4}, Edgardo D. Carosella ^{3,4}, Joel LeMaout ^{3,4,*}, Michèle T. Martin ^{1,2,*}, Nathalie Rouas-Freiss ^{3,4,*} and Nicolas O. Fortune ^{1,2,*}

¹ CEA, Laboratory of Genomics and Radiobiology of Keratinopoiesis, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Francois Jacob Institute of Biology, DRF, 91000 Evry, France; guillaume.mestrallet@cea.fr (G.M.); frederic.auvre@cea.fr (F.A.)

² Université Paris-Saclay, 91190 Saint-Aubin, France

³ CEA, DRF, Francois Jacob Institute of Biology, Hemato-Immunology Research Department, Saint-Louis Hospital, 75010 Paris, France; chantal.schenowitz@cea.fr (C.S.); edgar.do.carosella@cea.fr (E.D.C.)

⁴ U976 HIPI Unit, IRSL, Université Paris, 75010 Paris, France

* Correspondence: joel.lemaout@cea.fr (J.L.); michele.martin@cea.fr (M.T.M.); nathalie.rouas-freiss@cea.fr (N.R.-F.); nicolas.fortunel@cea.fr (N.O.F.); +33-1-60-87-34-91 (M.T.M.); +33-1-57-27-68-01 (N.R.-F.); +33-1-60-87-34-92 (N.O.F.)

† These authors contributed equally to this article.

Supplementary Materials

Figure S1. Maps of HLA-G1 and control vectors.

Figure S2. Fibroblast supernatant and PBMC proliferation inhibition.

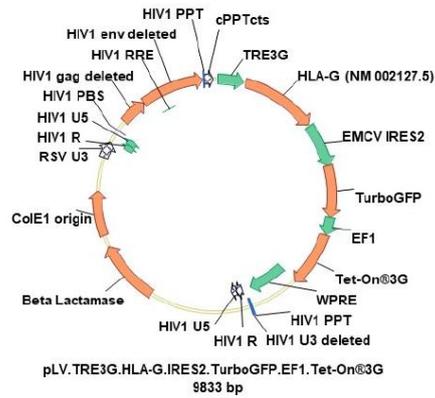
Figure S3. HLA-G isoform expressed in keratinocytes.

Figure S4. Influence of EGF on PD-L1 expression in keratinocytes.

Figure S5. Impact of induced HLA-G1 overexpression on PD-L1 and TGFB1 expression in keratinocytes.

Figure S6. Cell-surface expression of the HLA-G receptors ILT2 and ILT4 in keratinocytes.

Inducible expression of HLA-G1



Inducible expression of RFP (control vector)

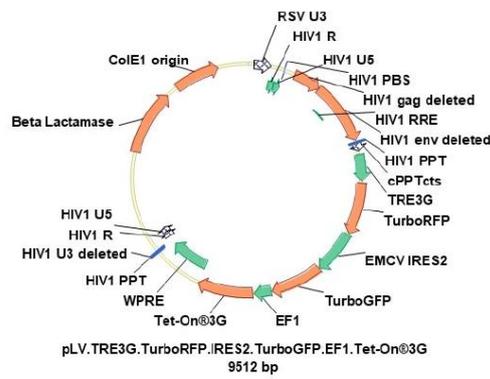


Figure S1. Maps of HLA-G1 and control lentiviral vectors.

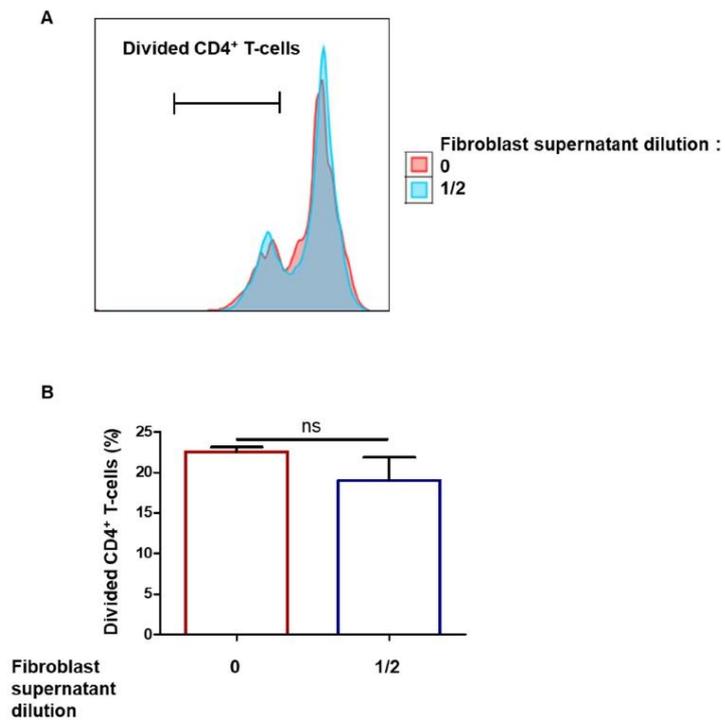


Figure S2. Fibroblast supernatant and PBMC proliferation inhibition. Fibroblast supernatants from one representative donor were incubated with 100,000 PBMCs for 7 days. PBMCs were pre-marked with a dye and activated using CD3⁺ CD28⁺ beads. PBMC proliferation was quantified by dye decrease at day 7. (A) Representative flow cytometry profiles at day 7. (B) CD4⁺ T-cell proliferation depending on presence of fibroblast supernatant (mean+SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). Exact p-values were determined on t-test.

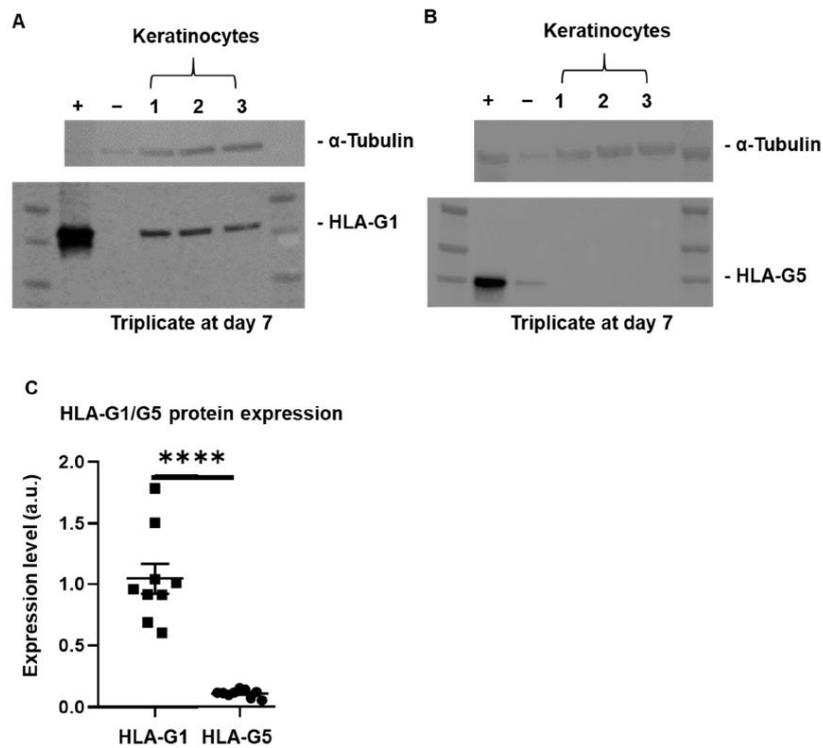


Figure S3. HLA-G isoform expressed in keratinocytes. Cells from one representative donor were cultivated for 7 days after removal in an undefined medium with serum and a layer of feeder cells. Analysis by Western blotting. (A) Typical gel photograph corresponding to 3 different cultures, with α -tubulin detection as loading control. K562 cells were used as negative control and K562 cells transduced with HLA-G1 were used as positive control with 4H84 antibody. (B) Typical gel photograph corresponding to 3 different cultures, with α -tubulin detection as loading control. M8 cells were used as negative control and M8 cells transduced with HLA-G5 were used as positive control with 5A6G7 antibody. (C) Scatter plot of quantification (mean+SEM, $p < 0.0001$, $n = 9$). Exact p -values were determined using the Mann-Whitney U-test. ****, $p < 0.0001$.

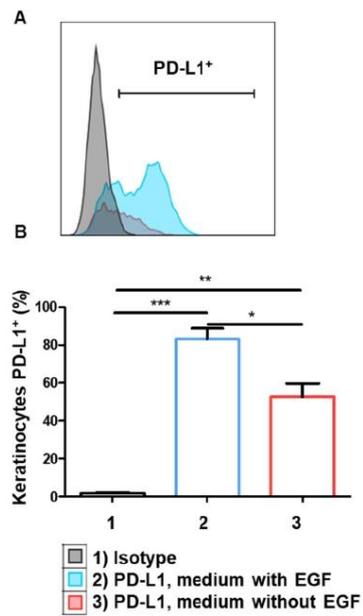


Figure S4. Influence of EGF on PD-L1 expression in keratinocytes. Amplified keratinocytes expressing PD-L1 were reamplified with medium with or without EGF. (A) Representative cytometry profiles after 7 days. (B) PD-L1 expression according to presence of EGF in the medium (mean+SEM, $p < 0,05$, $n=3$). Exact p-values were determined on t-test. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, and ***: $p < 0,001$.

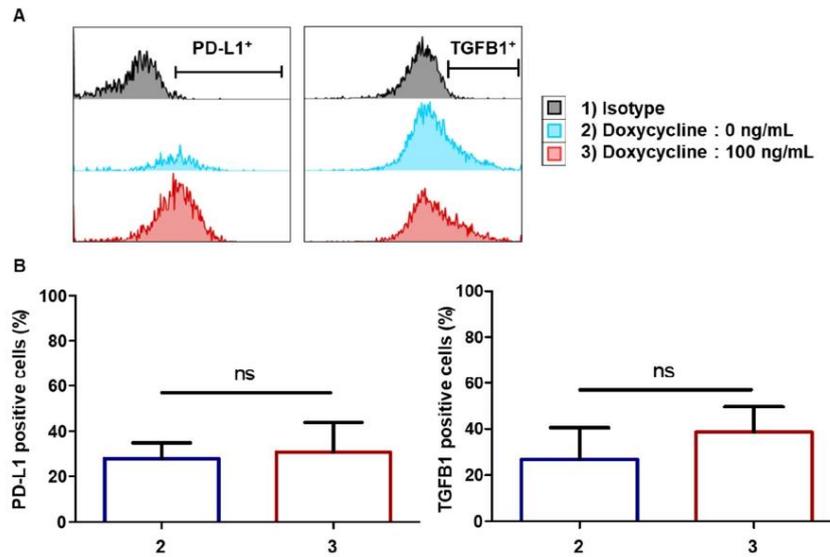


Figure S5. Impact of induced HLA-G1 overexpression on PD-L1 and TGFB1 expression in keratinocytes. Keratinocytes cultures of transduced with the lentiviral vector allowing doxycycline-inducible expression of HLA-G1 were maintained for 7 days in induced and non-induced conditions. Expression of PD-L1 and TGFB1 proteins was analyzed in both control and HLA-G1-overexpressing keratinocytes. (A) Representative profiles of PD-L1 and TGFB1 expression are shown. (B) Absence of PD-L1 and TGFB1 protein expression modulation in response to HLA-G1 overexpression induced by doxycycline treatment (mean±SEM, $p < 0.05$, $n = 3$). Exact p-values were determined using the t-test.

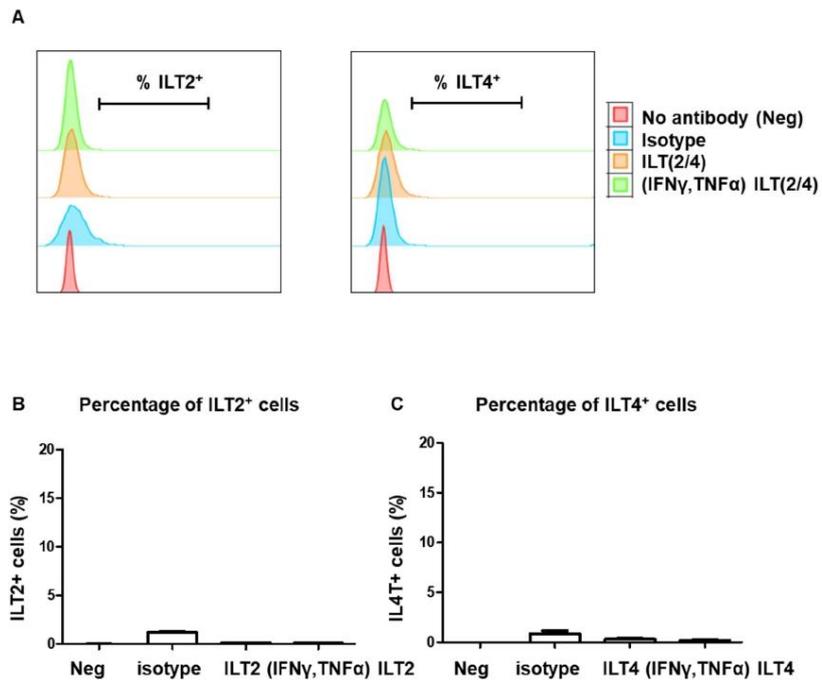


Figure S6. Cell-surface expression of the HLA-G receptors ILT2 and ILT4 in keratinocytes. Cell cultures were performed during 2 days in the absence or presence of 10 ng/mL of IFN_γ and 10 ng/mL TNF_α to mimic an inflammatory context, and keratinocytes were analyzed for ILT2 and ILT4 cell-surface expression by flow cytometry. (A) Representative profiles are shown. Absence keratinocytes positive for both ILT2 (B) and ILT4 (C) cell-surface expression.

III. Propriétés immunitaires des kératinocytes en fonction de leur degré d'immaturité

(Mestrallet, G. et al. *Manuscrit en cours de préparation*)

1) Les précurseurs de kératinocytes du tissu limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 +.

Je me suis ensuite demandé si les progéniteurs de kératinocytes, les cellules souches adultes ou les cellules différenciées pouvaient moduler différemment la prolifération des cellules T CD4 +. Par cytométrie en flux, les kératinocytes de trois donneurs ont été triés en fonction de leur niveau d'immaturité (**Figure 32 A**). Les cellules souches de kératinocytes expriment un phénotype ITA6^{high} EGF-R^{low}, les cellules progénitrices expriment un phénotype ITA6^{high} EGF-R^{high} et les cellules différenciées expriment un phénotype ITA6^{low}. Ces cellules ont été incubées avec des PBMC activés pré-marqués avec un colorant de prolifération (**Figure 32 B**). J'ai observé des différences dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + en fonction du niveau d'immaturité des kératinocytes (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$) (**Figure 32 C**). Les précurseurs des kératinocytes ont pu limiter la prolifération des lymphocytes T CD4 +. J'ai également observé que cette inhibition de la prolifération des cellules CD4 + T augmente en fonction du nombre de précurseurs de kératinocytes (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$) (**Figure 32 D**). Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC. Les précurseurs de kératinocytes dans le tissu étaient donc davantage capables d'inhiber la prolifération des cellules T CD4 + que les cellules différenciées.

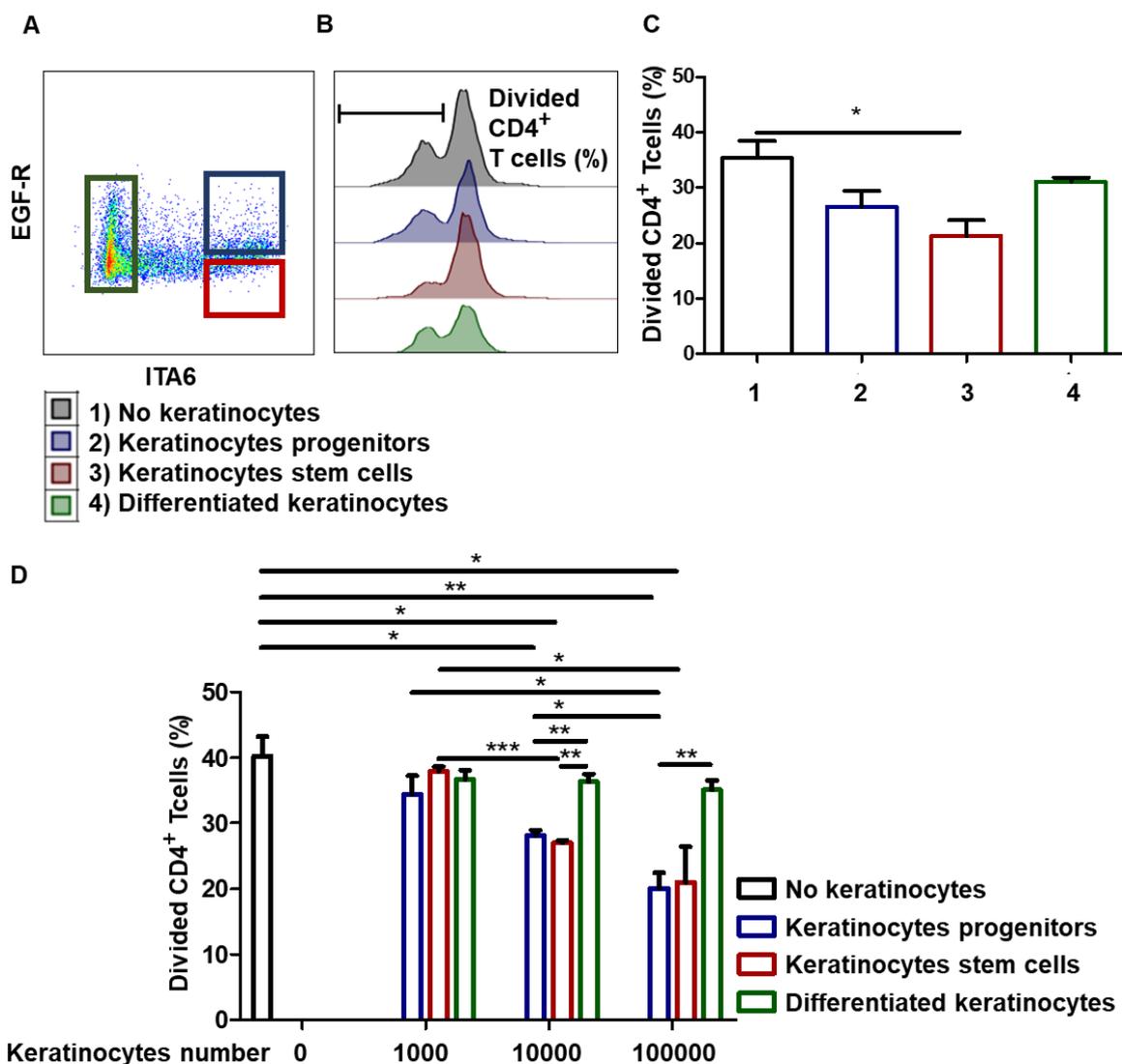


Figure 32) Les précurseurs de kératinocytes du tissu limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 +.

A Profils de cytométrie en flux représentatifs des kératinocytes triés en fonction de leur niveau d'immaturité. **B/C/D** 1000, 10000 ou 100000 kératinocytes (progéniteurs, cellules souches adultes ou cellules différenciées) d'un donneur représentatif ont été incubés avec 100000 PBMC pendant 7 jours. Les PBMC ont été pré-marquées avec un colorant de prolifération. Les PBMC ont été activés par des billes CD3 + CD28 +. La prolifération des PBMC a été quantifiée par la diminution du colorant au jour 7. **B** Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 7. **C** Inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + selon le niveau d'immaturité des kératinocytes (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). **D** Inhibition de la prolifération des cellules T CD4 + en fonction du nombre de kératinocytes et du taux d'immaturité (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). Les p values exactes ont été déterminées

selon le t-test. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC.

2) Les précurseurs de kératinocytes limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 + après amplification ex vivo.

Pour déterminer si les précurseurs de kératinocytes amplifiés peuvent encore inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 +, ces cellules ont été amplifiées pendant 1 à 3 semaines. Les kératinocytes amplifiés ont de faibles niveaux d'EGF-R, mais ont des niveaux élevés d'ITA6 (voir données supplémentaires **Fig Sup 6/7/8**). Cela permet de sélectionner des kératinocytes amplifiés immatures uniquement par expression d'ITA6. Les kératinocytes ont donc été triés en fonction de leur niveau d'ITA6 (**Figure 33 A**). Pour déterminer si les précurseurs des kératinocytes peuvent encore inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 + après amplification, ces cellules ont été incubées avec des PBMC activés pré-marqués avec un colorant de prolifération (**Figure 33 B**). J'ai observé que les précurseurs des kératinocytes inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4 + après amplification (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$) (**Figure 33 C**). Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC. Les précurseurs des kératinocytes conservent donc leur capacité de limiter la prolifération des lymphocytes T CD4 + après amplification.

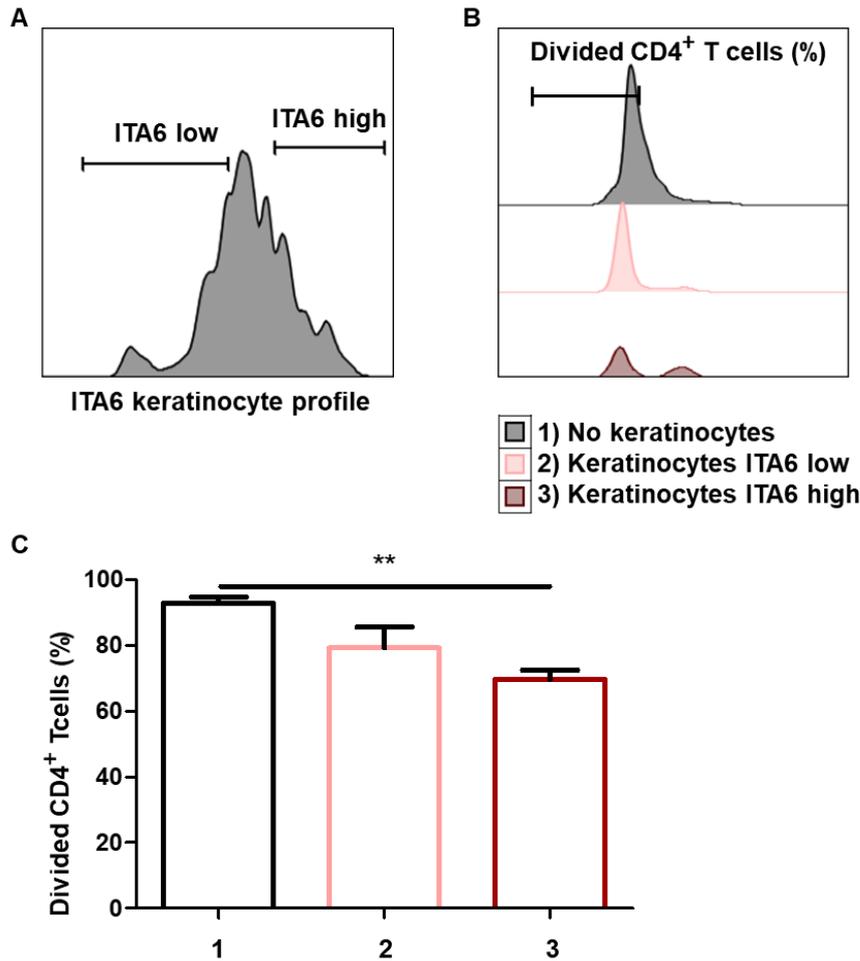


Figure 33) Les précurseurs de kératinocytes limitent la prolifération des lymphocytes T CD4 + après amplification ex vivo.

A Profils de cytométrie en flux représentatifs des kératinocytes triés en fonction de leur niveau d'ITA6. **B/C** 10 000 kératinocytes, triés selon leur expression d'ITA6 après amplification, ont été incubés avec 100 000 PBMC pendant 7 jours. Les PBMC ont été pré-marquées avec un colorant. Les PBMC ont été activées par des billes CD3 + CD28 +. La prolifération des PBMC a été quantifiée par la diminution du colorant au jour 7. **B** Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 7. **C** Inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + selon l'expression des kératinocytes ITA6 (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test. Ces résultats ont été vérifiés pour trois donneurs différents de kératinocytes et pour trois donneurs différents de PBMC.

3) Expression de HLA-G1 et PD-L1 selon le niveau d'ITA6 sur des kératinocytes amplifiés.

J'ai ensuite étudié les mécanismes impliqués dans la capacité des précurseurs de kératinocytes à inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 +. Par imagerie, j'ai observé l'expression des points de contrôle immunitaires HLA-G et PD-L1 selon l'expression d'ITA6 sur les kératinocytes amplifiés pendant 7 jours (**Figure 34 A/C**). J'ai observé que les kératinocytes amplifiés ayant les niveaux les plus élevés d'ITA6 surexpriment HLA-G et PD-L1 (moyenne + SEM, $p < 0,0001$, $n = 1000$ cellules * 3 répliquats de culture) (**Figure 34 B/D**). J'ai observé les mêmes profils par cytométrie en flux (**Figure 34 E/G**). Les kératinocytes amplifiés avec des niveaux élevés d'ITA6 expriment plus de HLA-G et de PD-L1 pendant 3 semaines (moyenne + SEM, $n = 6$) (**Figure 34 F/H**). Les kératinocytes amplifiés avec des niveaux élevés d'EGF-R expriment également plus de HLA-G pendant 3 semaines (moyenne + SEM, $n = 6$) (voir données supplémentaires **Fig Sup 9**). Les précurseurs de kératinocytes amplifiés expriment donc plus de points de contrôle immunitaires HLA-G et PD-L1.

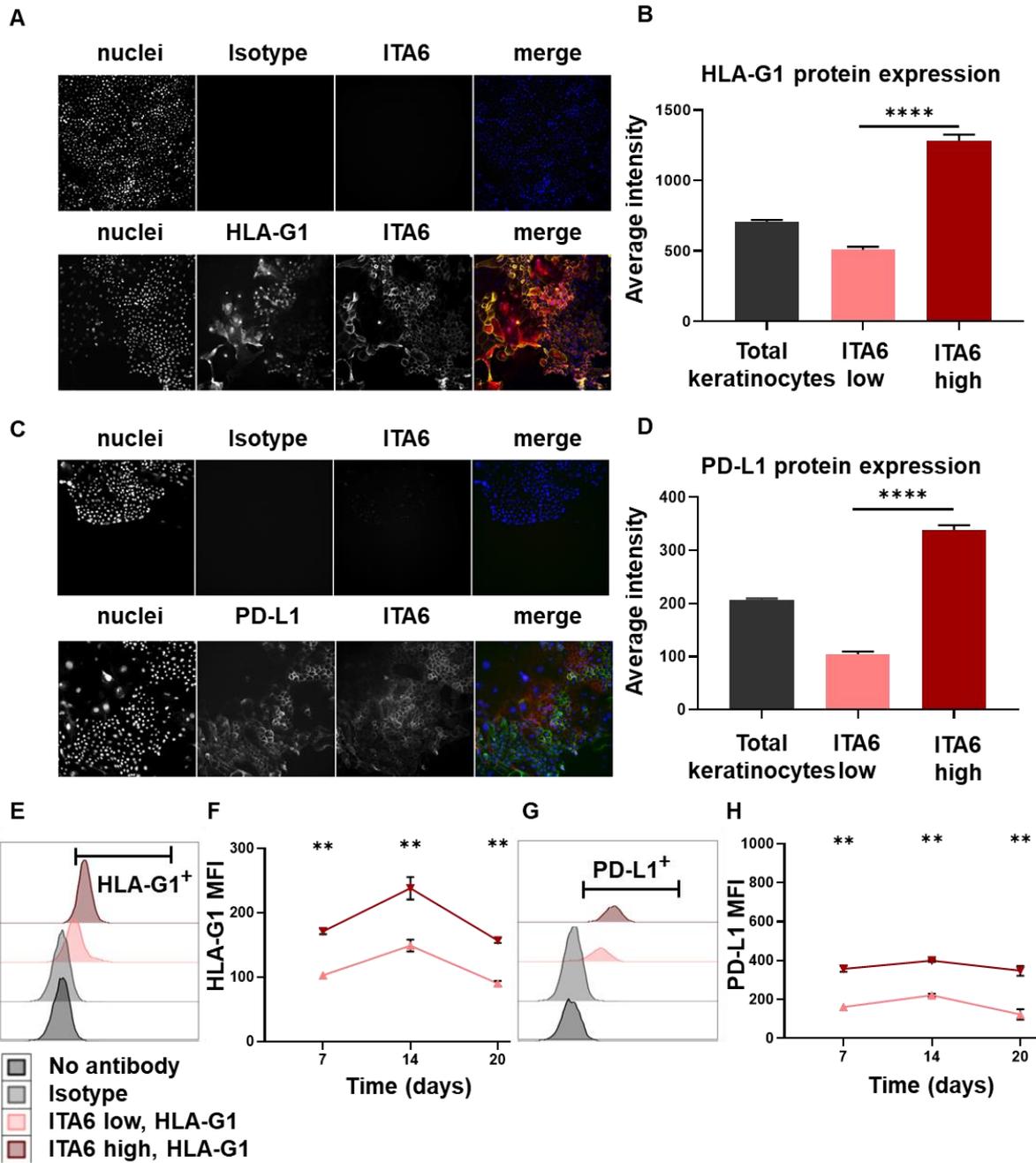


Figure 34) Expression d'HLA-G1 et de PD-L1 selon le niveau d'ITA6 sur des kératinocytes amplifiés.

Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 7, 14 ou 20 jours dans un milieu non défini avec du sérum et une couche de cellules nourricières. Analyse par imagerie. Profils représentatifs A/C de l'expression d'HLA-G1 et de PD-L1 selon l'expression d'ITA6 sur des kératinocytes amplifiés pendant 7 jours. B/D Analyse par imagerie des niveaux d'HLA-G1 et de PD-L1 (intensité moyenne de fluorescence) (moyenne + SEM, $p < 0,0001$, $n = 1000$ cellules * 3 répliquats de culture). E/G Profils de cytométrie en flux représentatifs de l'expression d'HLA-G1 et de PD-L1 sur les kératinocytes amplifiés pendant 7 jours. F/H

Analyse par cytométrie en flux de l'expression d'HLA-G1 et de PD-L1 (moyenne + SEM, n = 6) en fonction du niveau d'ITA6 sur des kératinocytes amplifiés pendant 7/14/20 jours. Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney.

Human keratinocytes precursors limit CD4⁺ T cell proliferation and overexpress HLA-G and PD-L1 immune checkpoints

Guillaume Mestrallet^{1,2}, ...

¹ Université Paris-Saclay, Paris, France

² Alternative Energies and Atomic Energy Commission, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Laboratory of Genomics and Radiobiology of Keratinopoiesis, Evry, France

³ CEA, DRF-Francois Jacob Institute, Hemato-Immunology Research Department, Saint-Louis Hospital, Paris, France

⁴ U976 HIPI Unit, IRSL, Université Paris, Paris, France

Conflicts of Interest: the authors declare no conflicts of interest.

Human keratinocytes precursors limit CD4⁺ T cell proliferation and overexpress HLA-G and PD-L1 immune checkpoints

ABSTRACT

Stem cells are essential for the maintenance and renewal of tissues, but their ability to be protected from immune reactions remains unclear. Here, we show that keratinocyte precursors of the interfollicular epidermis are able to inhibit CD4⁺ T cell proliferation. The immune escape of keratinocyte precursors may be explained by an overexpression of HLA-G and PD-L1 immune checkpoints. Since cancer initiator cells have characteristics of stem cells, these results indicate prospects for investigating immune escape in skin cancer and autoimmune pathologies.

KEY WORDS

Immunomodulation, HLA-G, PD-L1, tolerance, keratinocytes stem cells, immune checkpoints

INTRODUCTION

Little is known between the stemness of keratinocytes and their immune properties in the interfollicular epidermis. It is important to understand the immune properties of adult stem cells and the immune escape phenomenon that can occur during cancer stem cell proliferation.

Adult stem cells are crucial for maintaining and renewing tissue (Blanpain et Fuchs 2014). Several markers of precursor cells of the interfollicular epidermis have been described. Integrin $\alpha 6$ (ITA6) is an epidermis basal layer marker. Stem cells of the interfollicular epidermis were characterized by a ITA6^{high} phenotype (A. Li, Simmons, et Kaur 1998). Keratinocytes stem cells were also characterized by an EGF-R^{low} phenotype (EGF receptor) (Fortunel et al. 2003). They are distinguished from progenitor cells which express an ITA6^{high} EGF-R^{high} phenotype and have a strong short-term proliferative capacity (Fortunel et al. 2003). Many other genes were involved in the maintenance of a stem phenotype of human keratinocytes, such as KLF4 (Fortunel et al. 2019), GRHL3 and ZNF750 promoting their differentiation, and HNRNPK, MYC, CYR61, FGF1, EGF-R promoting their proliferation (J. Li et al. 2019). These genes (KLF4, cMYC, OCT3/4 and SOX2) were targeted to generate iPSCs from keratinocyte (Shrestha, Wen, et Tsai 2019).

Mechanisms involved in the regeneration of the epidermis and also inflammation have been demonstrated. KLF4 regulates anti-inflammatory genes in murine keratinocytes via an interaction with the glucocorticoid receptor (GR) (Sevilla et al. 2015). This regulation was done via the mediators of inflammation Tsc22d3 and Zfp36. The interaction between KLF4 and GR therefore plays on the keratinocyte differentiation/proliferation balance. In case of a mice skin injury and following alteration of intercellular junctions, resident epithelial stem cells modify their gene expression profile. These cells activate signals that promote the recruitment of immune cells (DCs and Treg cells). Treg cells then stimulate the proliferation of stem cells (Lay et al. 2018).

A phenomenon of immune escape from precursor cells has been observed in several systems, including mesenchymal stem cells (Du et al. 2016) and hair follicle stem cells (Agudo et al. 2018). We are investigating here whether this is also the case for the keratinocyte precursors of the human interfollicular epidermis and whether this could involve immune checkpoints. Studies on a mouse model have shown that keratinocytes expressing PD-L1 make it possible to reduce the proliferation and effector function of T cells at inflammatory sites (Ritprajak et al. 2010). Its expression was also reduced in the epidermis in psoriasis, which could promote the activity of effector cells (Kim et al. 2015). PD-L1 binds to PD-1, expressed on the surface of T cells, inhibits their activity (Fife et Bluestone 2008) and limits autoimmune reactions (Keir et al. 2008). HLA-G is another immune checkpoint molecule originally described as permitting maternal-fetal tolerance (Ponte et al. 1999; Rouas-Freiss et al. 1997). Notably, transplanted patients expressing HLA-G were significantly less prone to acute and chronic transplant rejection in solid organ transplantation such as in heart, kidney, liver and lung transplantation (Lila et al. 2000; Naji et al. 2007; Créput et al. 2003; Brugière et al. 2015). HLA-G inhibits the cytolytic function of NK and T cells, the alloproliferative response of CD4⁺ T cells, the antibody production by B cells and the antigen-presenting function of dendritic cells (Carosella et al. 2015; 2008). In cancer, HLA-G and PD-L1 have been shown to inhibit different populations of T cells (Jacquier et al. 2020; Dumont et al. 2019).

Studying the expression of HLA-G and PD-L1 immune checkpoints on keratinocytes according to their degree of immaturity could therefore provide a better understanding of the potential phenomenon of immune privilege of keratinocyte precursors.

METHODS

Human tissue and cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from healthy donors at the French Blood Bank (EFS) at Saint Louis Hospital, Paris after informed consent. Human skin tissue from adult healthy donors was collected in the context of breast reduction surgery, after informed consent. Epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts were extracted after enzymatic treatment, with a solution containing (v/v) 3/4 grade II dispase 2.4 U ml⁻¹ (Roche) and 1/4 trypsin 0.25% (Gibco) for 24h at 4 °C. We used two categories of cells in this study. On the one hand, cells directly extracted from the tissue and not amplified, and on the other hand, cells extracted from the tissue and then amplified.

Cell culture

Amplified adult epidermal keratinocytes were obtained as follows: bulk cultures were performed in a serum-containing medium, in the presence of a feeder layer of human dermal fibroblasts growth-arrested by γ irradiation (60 Gy). All cultures were performed in plastic flasks coated with type I collagen (Biocoat, Becton-Dickinson). Composition of the serum-containing medium included DMEM and Ham's F12 media (Gibco) (v/v, 3/1 mixture), 10% fetal calf serum (Hyclone), 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Chemicon), 5 μ g/ml

transferrin (Sigma), 5 µg/ml insulin (Sigma), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Sigma), 180 µM adenine (Sigma), 2 mM tri-iodothyronine (Sigma), 10⁻⁶M isoproterenol (Sigma), 2 mM L-glutamine (Gibco), and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco). Keratinocyte-SFM (Gibco) supplemented with EGF and PBE was used for serum- and feeder-free cultures. Medium was renewed 3 times a week. For short- and long-term mass proliferation assays, keratinocytes were seeded at 1000 cells/cm² and sub-cultured every week. Feeder cells were seeded at 5000 cells/cm².

Flow cytometry analysis

For analysis of cell-surface immune markers expression, keratinocytes were processed as single-cell suspensions and stained 1 hour at room temperature with monoclonal antibodies. Staining antibodies used were : phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-human CD49f (ITA6) monoclonal antibody (clone GoH3, BD Pharmingen), Alexa Fluor 405 conjugated rat anti-human EGF-R monoclonal antibody (clone ICR10, Novus Biologicals), PE-cy7 conjugated mouse anti-human PD-L1 monoclonal antibody (clone MIH1, Thermofisher), Alexa 700 conjugated mouse anti-human HLA-G monoclonal antibody (clone 87G, Novus Biologicals). Appropriate isotype controls were systematically used. ITA6, EGF-R, PD-L1, HLA-G expression profiles were analyzed using an Astrios cell-sorter (Beckman-Coulter), a C6 Accuri analyzer (BD Biosciences), an Attune NxT (Thermofisher) or a MACSquant (Miltenyi). Data were analysed using FlowJo software (BDbiosciences).

Cell sorting

Adult epidermal keratinocytes were sorted according to their ITA6 and EGF-R expression using phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-human CD49f (ITA6) monoclonal antibody (clone GoH3, BD Pharmingen) and Alexa Fluor 405 conjugated rat anti-human EGF-R monoclonal antibody (clone ICR10, Novus Biologicals). Appropriate isotype controls were systematically used. Cells were sorted using a FACS Aria 3 (BD Biosciences).

High-content imaging and screening

Image analysis were performed using AnalysisCellInsight CX7 High-Content Screening (HCS) Platform (Thermofisher). Keratinocytes were plated in 96 well plate (TPP) at a concentration of 3000 cells/cm². After 1 week of growth, cells were stained 1 hour at room temperature using following staining antibodies: phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-human CD49f (ITA6) monoclonal antibody (clone GoH3, BD Pharmingen), APC conjugated mouse anti-human PD-L1 monoclonal antibody (clone MIH1, Thermofisher), Alexa 700 conjugated mouse anti-human HLA-G monoclonal antibody (clone 87G, Novus Biologicals). Appropriate isotype controls were systematically used. Nuclei stainings were performed using Hoescht (Thermofisher). ITA6, PD-L1, CD40, MHC1 and HLA-G expression profiles were analyzed using CX7 (Thermofisher).

Flow cytometry based analysis of CD4⁺ T cell proliferation

Keratinocytes were seeded at different ratios in 96-well culture plates (collagen 1 96-well, BD biocoat) and incubated at 37 ° C., 5% CO₂ for 48 hours. Then, PBMCs were incubated at 37 ° C., 5% CO₂ in 100 µl of RPMI medium (Sigma) supplemented with 20% FCS, enriched in streptomycin and glucose for 1 hour. PBMC were incubated 20 min with a proliferation dye (eBioscience Cell Proliferation Dye eFluor 450, Thermofisher). Then, PBMCs were or were not stimulated by CD2-CD3-CD28 coated beads (T Cell Activation / Expansion Kit, Miltenyi). The PBMCs were seeded or not with keratinocytes, at 100,000 cells per well, with one bead per cell. The proliferation of PBMCs was quantified by dye intensity decrease on cells after 7 days. Collection was made on day 7 using a flow cytometer. The analysis of keratinocyte ability to modulate CD4⁺ T cell proliferation was performed by comparing the dye intensity decrease on CD4⁺ T cells in the presence or not of keratinocytes.

Antibody blocking experiments

To analyze the potential role of PD-L1 in the inhibitory properties of keratinocytes, cells were incubated at days 1 and 3 of the CD4⁺ T cell proliferation assay with blocking antibody (clone 6E11, Genentech) (Mayoux et al. 2020). All experiments were performed in triplicate.

Statistics

Statistical significance of the observed differences was determined using the Mann-Whitney two-sided U-test or T-test. All data were presented as mean±SEM. The difference was considered as significant when the P value was below 0.05. * : p<0.05 and ** : p<0.001

RESULTS*Keratinocyte precursors of the tissue limit CD4⁺ T cell proliferation.*

We wondered whether the keratinocytes progenitors, adult stem cells or differentiated cells could modulate CD4⁺ T cell proliferation differently. By flow cytometry, keratinocytes were sorted according to their immaturity level (**Figure 1 A**). Keratinocyte stem cells express an ITA6^{high} EGF-R^{low} phenotype, progenitor cells express an ITA6^{high} EGF-R^{high} phenotype, and differentiated cells express an ITA6^{low} phenotype. These cells were incubated with activated PBMC pre-marked with a proliferation dye (**Figure 1 B**). We observed differences in CD4⁺ T cell proliferation inhibition according to the keratinocyte immaturity level (mean±SEM, p<0.05, n=3) (**Figure 1 C**). Keratinocytes precursors were able to limit CD4⁺ T cell proliferation. We also observed that this CD4⁺ T cell proliferation inhibition increase according to the number of keratinocyte precursors (mean±SEM, p<0.05, n=3) (**Figure 1 D**).

Keratinocyte precursors in the tissue were therefore more able to inhibit CD4⁺ T cell proliferation than differentiated cells.

Keratinocyte precursors limit CD4⁺ T cell proliferation after ex vivo amplification.

To determine if amplified keratinocytes precursors can still inhibit CD4⁺ T cell proliferation, these cells were amplified for 1 to 3 weeks. Amplified keratinocytes have low levels of EGF-R, but have high levels of ITA6 (see supplementary data **Figure Sup 1**). This makes it possible to select immature amplified keratinocytes only through ITA6 expression. Keratinocytes were therefore sorted according to their ITA6 level (**Figure 2 A**). To determine if keratinocytes precursors can still inhibit CD4⁺ T cell proliferation after amplification, these cells were incubated with activated PBMC pre-marked with a proliferation dye (**Figure 2 B**). We observed that keratinocytes precursors inhibit CD4⁺ T cell proliferation after amplification (mean+SEM, $p < 0.05$, $n=3$) (**Figure 2 C**). Keratinocytes precursors therefore retain their ability to reduce CD4⁺ T cell proliferation after amplification.

Keratinocyte precursors overexpress the immune checkpoints HLA-G and PD-L1.

We then investigated the mechanisms involved in keratinocyte precursors ability to inhibit CD4⁺ T cell proliferation. By high content single-cell image analysis, we observed HLA-G and PD-L1 immune checkpoints expression according to ITA6 expression on amplified keratinocytes for 7 days (**Figure 3 A/C**). We observed that the amplified keratinocytes having the highest levels of ITA6 overexpress HLA-G and PD-L1 (mean+SEM, $p < 0.0001$, $n=1000$ cells*3 culture replicate) (**Figure 3 B/D**). We observed the same profiles by flow cytometry (**Figure 3 E/G**). Amplified keratinocytes with high levels of ITA6 express more HLA-G and PD-L1 for 3 weeks (mean+SEM, $n=6$) (**Figure 3 F/H**). Amplified keratinocytes with high levels of EGF-R express also more HLA-G for 3 weeks (mean+SEM, $n=6$) (see supplementary data **Figure Sup 2**). Amplified keratinocytes precursors therefore express more HLA-G and PD-L1 immune checkpoints.

DISCUSSION

The different populations of keratinocytes obtained from donor samples have different immune phenotypes. We distinguish on the one hand stem cells with an ITA6^{high} EGF-R^{low} phenotype, and on the other hand, progenitors with an ITA6^{high} EGF-R^{high} phenotype and differentiated keratinocytes with an ITA6^{low} phenotype (A. Li, Simmons, et Kaur 1998; Fortunel et al. 2003). Compared to differentiated keratinocytes, progenitors and stem cells inhibit CD4⁺ T cell proliferation in vitro. To determine if amplified keratinocytes precursors can still inhibit CD4⁺ T cell proliferation, these cells were amplified for 1 week. Amplified keratinocytes express little EGF-R, but have high levels of ITA6. This makes it possible to select immature amplified keratinocytes according to ITA6 expression. We observed that keratinocytes precursors retained their ability to limit CD4⁺ T cell proliferation after amplification.

Our results showed that the amplified keratinocytes having high levels of ITA6 overexpressed HLA-G and PD-L1. Studies in mice indicated that keratinocytes expressing PD-L1 reduced the proliferation and effector function of T cells at local inflammatory sites (Ritprajak et al. 2010). PD-L1 expression also correlated with a higher presence of Treg cells in the mice skin (Miao et al. 2018). PD-L1 binds to PD-1 expressed on the surface of T cells, inhibits their activity (Fife et Bluestone 2008), and limits autoimmune reactions (Keir et al. 2008). HLA-G inhibits the cytolytic function of NK and T cells, the alloproliferative response of CD4⁺ T cells, the antibody production by B cells and the antigen-presenting function of dendritic cells (Carosella et al. 2008; 2015). The phenomenon of immune privilege of epidermal precursors could therefore be explained by an overexpression of the HLA-G and PD-L1 immune checkpoints. This immune privilege involving immune checkpoints like HLA-G was also described in other types of immature cells. This was for example the case for mesenchymal stem cells (Du et al. 2016).

Adult tissue stem cells can develop into cancer cells, which may be enhanced by their ability to escape elimination by the immune system (Barker et al. 2009). HLA-G and PD-L1 inhibit different populations of T cells in cancer (Dumont et al. 2019; Jacquier et al. 2020). These immune checkpoints therefore promote tumor escape with respect to the immune system. As immunotherapies are increasingly used to direct the body's immune system against tumor (Rosenberg et Restifo 2015), it is important to understand the immune escape mechanisms of tumor initiator cells.

Another region of the epidermis enriched with stem cells is the hair follicle. In fact, human keratinocytes derived from the hair follicle can promote healing (Cotsarelis 2006) or be used to treat leg ulcers (Limat et al. 2003). Hair follicles are normally preserved from the immune system, a phenomenon called immune privilege. Murine hair follicle stem cells downregulate Nlrc5 and MHCI in their quiescent state (Agudo et al. 2018). Expression of Nlrc5 upregulates MHC1 on murine hair follicle stem cells, so its downregulation explains that of the MHC1. The alteration of this immune privilege is one of the causes of alopecia areata (Rajabi et al. 2018). This pathophysiological context was described as an autoimmune disorder, in which an abnormal infiltration of T cells causes local inflammation and the destruction of anagen hair follicles (Gilhar, Etzioni, et Paus 2012). Investigating the expression of immune checkpoints on keratinocyte precursors in hair follicle could therefore provide a better understanding of their immune privilege and associated pathologies.

Our work therefore shows that keratinocyte precursors can inhibit proliferation of CD4⁺ T cells. This may be explained by an overexpression of HLA-G and PD-L1 immune checkpoints, thus opening perspectives for investigating immune escape in skin cancer and autoimmune pathologies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the flow cytometry platform of Saint-Louis Hospital and the HEGP surgeons for skin biopsies. The authors thank also the CEA for funding this study as part of a PhD project.

ABBREVIATIONS

- ITA6 : Integrin $\alpha 6$
 EGF-R : EGF receptor
 KLF4 : Kruppel-like factor 4
 MHC : major histocompatibility complex
 HLA-G : human leucocyte antigen G
 PD-L1 : programmed death-ligand 1

REFERENCES

- Agudo, Judith, Eun Sook Park, Samuel A. Rose, Eziwoma Alibo, Robert Sweeney, Maxime Dhainaut, Koichi S. Kobayashi, et al. 2018. « Quiescent Tissue Stem Cells Evade Immune Surveillance ». *Immunity* 48 (2): 271-285.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.001>.
- Barker, Nick, Rachel A. Ridgway, Johan H. van Es, Marc van de Wetering, Harry Begthel, Maaïke van den Born, Esther Danenberg, Alan R. Clarke, Owen J. Sansom, et Hans Clevers. 2009. « Crypt Stem Cells as the Cells-of-Origin of Intestinal Cancer ». *Nature* 457 (7229): 608-11. <https://doi.org/10.1038/nature07602>.
- Blanpain, Cédric, et Elaine Fuchs. 2014. « Plasticity of Epithelial Stem Cells in Tissue Regeneration ». *Science* 344 (6189). <https://doi.org/10.1126/science.1242281>.
- Brugière, O., G. Thabut, I. Krawice-Radanne, R. Rizzo, G. Dauriat, C. Danel, C. Suberbielle, et al. 2015. « Role of HLA-G as a Predictive Marker of Low Risk of Chronic Rejection in Lung Transplant Recipients: A Clinical Prospective Study ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 15 (2): 461-71. <https://doi.org/10.1111/ajt.12977>.
- Carosella, Edgardo D., Philippe Moreau, Joël Lemaoult, et Nathalie Rouas-Freiss. 2008. « HLA-G: From Biology to Clinical Benefits ». *Trends in Immunology* 29 (3): 125-32. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.11.005>.
- Carosella, Edgardo D., Nathalie Rouas-Freiss, Diana Tronik-Le Roux, Philippe Moreau, et Joel LeMaoult. 2015. « HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule ». *Advances in Immunology* 127: 33-144. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.04.001>.
- Cotsarelis, George. 2006. « Epithelial Stem Cells: A Folliculocentric View ». *The Journal of Investigative Dermatology* 126 (7): 1459-68. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700376>.
- Créput, Caroline, Antoine Durrbach, Catherine Menier, Catherine Guettier, Didier Samuel, Jean Dausset, Bernard Charpentier, Edgardo D. Carosella, et Nathalie Rouas-Freiss. 2003. « Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression in Biliary Epithelial Cells Is Associated with Allograft Acceptance in Liver-Kidney Transplantation ». *Journal of Hepatology* 39 (4): 587-94. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(03\)00354-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(03)00354-4).
- Deschaseaux, Frederic, Diego Delgado, Vito Pistoia, Massimo Giuliani, Fabio Morandi, et Antoine Durrbach. 2011. « HLA-G in Organ Transplantation: Towards Clinical

- Applications ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (3): 397-404.
<https://doi.org/10.1007/s00018-010-0581-6>.
- Du, Wen-Jing, Loic Reppel, Léonore Leger, Chantal Schenowitz, Celine Huselstein, Danièle Bensoussan, Edgardo D. Carosella, Zhong-Chao Han, et Nathalie Rouas-Freiss. 2016. « Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow and Adipose Tissue Maintain Their Immunosuppressive Properties After Chondrogenic Differentiation: Role of HLA-G ». *Stem Cells and Development* 25 (19): 1454-69.
<https://doi.org/10.1089/scd.2016.0022>.
- Dumont, Clement, Alix Jacquier, Jerome Verine, Floriane Noel, Annabelle Goujon, Ching-Lien Wu, Tzu-Min Hung, et al. 2019. « CD8+PD-1-ILT2+ T Cells Are an Intratumoral Cytotoxic Population Selectively Inhibited by the Immune Checkpoint HLA-G ». *Cancer Immunology Research*, août. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0764>.
- Fife, Brian T., et Jeffrey A. Bluestone. 2008. « Control of Peripheral T-Cell Tolerance and Autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 Pathways ». *Immunological Reviews* 224 (1): 166-82. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x>.
- Fortunel, Nicolas O., Loubna Chadli, Julien Coutier, Gilles Lemaître, Frédéric Auvré, Sophie Domingues, Emmanuelle Bouissou-Cadio, et al. 2019. « KLF4 Inhibition Promotes the Expansion of Keratinocyte Precursors from Adult Human Skin and of Embryonic-Stem-Cell-Derived Keratinocytes ». *Nature Biomedical Engineering*, octobre, 1-13.
<https://doi.org/10.1038/s41551-019-0464-6>.
- Fortunel, Nicolas O., Jacques A. Hatzfeld, Pierre-Antoine Rosemary, Corinne Ferraris, Marie-Noëlle Monier, Valérie Haydont, Joanna Longuet, et al. 2003. « Long-Term Expansion of Human Functional Epidermal Precursor Cells: Promotion of Extensive Amplification by Low TGF-Beta1 Concentrations ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 19): 4043-52. <https://doi.org/10.1242/jcs.00702>.
- Gilhar, Amos, Amos Etzioni, et Ralf Paus. 2012. « Alopecia Areata ». *New England Journal of Medicine* 366 (16): 1515-25. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1103442>.
- Jacquier, A., C. Dumont, E. D. Carosella, N. Rouas-Freiss, et J. LeMaout. 2020. « Cytometry-Based Analysis of HLA-G Functions According to ILT2 Expression ». *Human Immunology*, février. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.02.001>.
- Keir, Mary E., Manish J. Butte, Gordon J. Freeman, et Arlene H. Sharpe. 2008. « PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity ». *Annual Review of Immunology* 26 (1): 677-704.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>.
- Kim, Dae Suk, Jung Hwan Je, Sung Hee Kim, Dongyun Shin, Tae-Gyun Kim, Do Young Kim, Soo Min Kim, et Min-Geol Lee. 2015. « Programmed Death-Ligand 1, 2 Expressions Are Decreased in the Psoriatic Epidermis ». *Archives of Dermatological Research* 307 (6): 531-38. <https://doi.org/10.1007/s00403-015-1588-5>.
- Lay, Kenneth, Shaopeng Yuan, Shiri Gur-Cohen, Yuxuan Miao, Tianxiao Han, Shruti Naik, H Amalia Pasolli, Samantha B Larsen, et Elaine Fuchs. 2018. « Stem cells repurpose proliferation to contain a breach in their niche barrier ». Édité par Valerie Horsley et Marianne E Bronner. *eLife* 7 (décembre): e41661. <https://doi.org/10.7554/eLife.41661>.
- Li, A., P. J. Simmons, et P. Kaur. 1998. « Identification and Isolation of Candidate Human Keratinocyte Stem Cells Based on Cell Surface Phenotype ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (7): 3902-7.
- Li, Jingting, Yifang Chen, Xiaojun Xu, Jackson Jones, Manisha Tiwari, Ji Ling, Ying Wang, Olivier Harismendy, et George L. Sen. 2019. « HNRNPK Maintains Epidermal Progenitor Function through Transcription of Proliferation Genes and Degrading Differentiation Promoting MRNAs ». *Nature Communications* 10 (1): 4198.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12238-x>.

- Lila, N., A. Carpentier, C. Amrein, I. Khalil-Daher, J. Dausset, et E. D. Carosella. 2000. « Implication of HLA-G Molecule in Heart-Graft Acceptance ». *Lancet (London, England)* 355 (9221): 2138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02386-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02386-2).
- Limat, Alain, Lars E. French, Lucia Blal, Jean-Hilaire Saurat, Thomas Hunziker, et Denis Salomon. 2003. « Organotypic Cultures of Autologous Hair Follicle Keratinocytes for the Treatment of Recurrent Leg Ulcers ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 48 (2): 207-14. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.69>.
- Mayoux, Maud, Andreas Roller, Vesna Pulko, Stefano Sammiceli, Stanford Chen, Eva Sum, Christian Jost, et al. 2020. « Dendritic Cells Dictate Responses to PD-L1 Blockade Cancer Immunotherapy ». *Science Translational Medicine* 12 (534). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav7431>.
- Miao, Xiao, Rong Xu, Bin Fan, Jie Chen, Xin Li, Weiwei Mao, Shengyuan Hua, et Bin Li. 2018. « PD-L1 Reverses Depigmentation in Pmel-1 Vitiligo Mice by Increasing the Abundance of Tregs in the Skin ». *Scientific Reports* 8 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19407-w>.
- Naji, Abderrahim, Solene Le Rond, Antoine Durrbach, Irene Krawice-Radanne, Caroline Creput, Marina Daouya, Julien Caumartin, Joel LeMaout, Edgardo D. Carosella, et Nathalie Rouas-Freiss. 2007. « CD3+CD4^{low} and CD3+CD8^{low} Are Induced by HLA-G: Novel Human Peripheral Blood Suppressor T-Cell Subsets Involved in Transplant Acceptance ». *Blood* 110 (12): 3936-48. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-083139>.
- Ponte, M., C. Cantoni, R. Biassoni, A. Tradori-Cappai, G. Bentivoglio, C. Vitale, S. Bertone, A. Moretta, L. Moretta, et M. C. Mingari. 1999. « Inhibitory Receptors Sensing HLA-G1 Molecules in Pregnancy: Decidua-Associated Natural Killer Cells Express LIR-1 and CD94/NKG2A and Acquire P49, an HLA-G1-Specific Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10): 5674-79.
- Rajabi, F., L. A. Drake, M. M. Senna, et N. Rezaei. 2018. « Alopecia areata: a review of disease pathogenesis ». *British Journal of Dermatology* 179 (5): 1033-48. <https://doi.org/10.1111/bjd.16808>.
- Ritprajak, Patcharee, Masaaki Hashiguchi, Fumihiko Tsushima, Narumon Chalernsarp, et Miyuki Azuma. 2010. « Keratinocyte-Associated B7-H1 Directly Regulates Cutaneous Effector CD8⁺ T Cell Responses ». *The Journal of Immunology* 184 (9): 4918-25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902478>.
- Rosenberg, Steven A., et Nicholas P. Restifo. 2015. « Adoptive Cell Transfer as Personalized Immunotherapy for Human Cancer ». *Science* 348 (6230): 62-68. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4967>.
- Rouas-Freiss, N., R. M. Gonçalves, C. Menier, J. Dausset, et E. D. Carosella. 1997. « Direct Evidence to Support the Role of HLA-G in Protecting the Fetus from Maternal Uterine Natural Killer Cytotoxicity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21): 11520-25.
- Sevilla, Lisa M., Víctor Latorre, Elena Carceller, Julia Boix, Daniel Vodák, Ian Geoffrey Mills, et Paloma Pérez. 2015. « Glucocorticoid Receptor and Klf4 Co-Regulate Anti-Inflammatory Genes in Keratinocytes ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 412 (septembre): 281-89. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.015>.
- Shrestha, Rupendra, Yao-Tseng Wen, et Rong-Kung Tsai. 2019. « Generation of HiPSC Line TCiERi001-A from Normal Human Epidermal Keratinocytes ». *Stem Cell Research* 41 (décembre): 101590. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101590>.

FIGURES

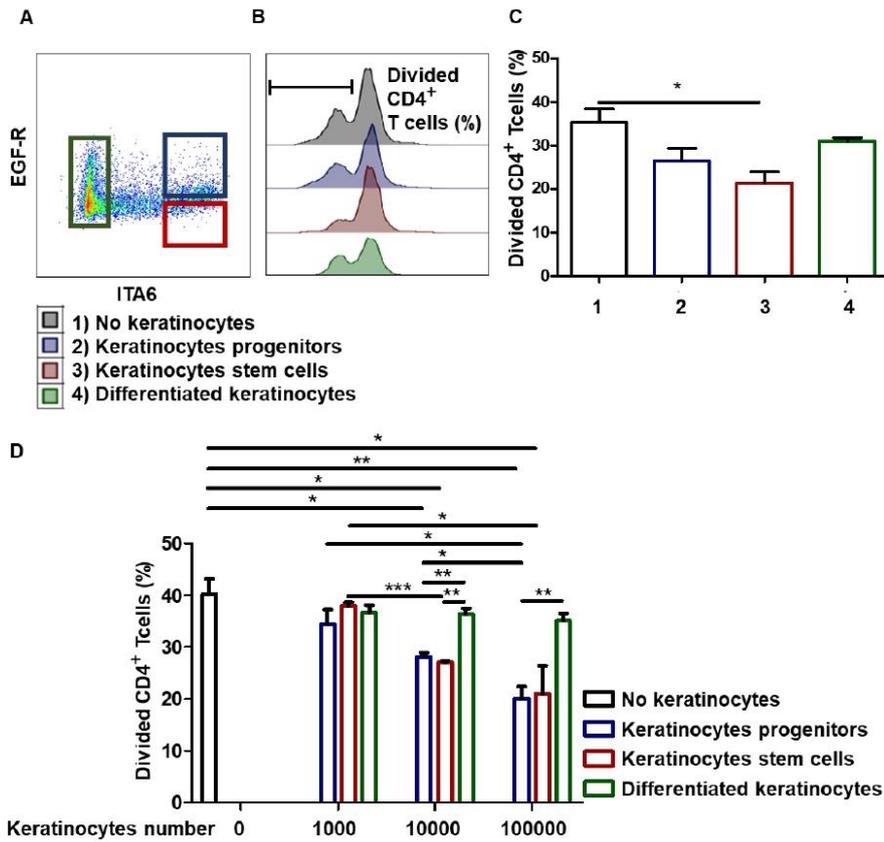


Fig 1) Keratinocyte precursors of the tissue limit CD4⁺ T cell proliferation.

A Representative flow cytometry profiles of keratinocytes sorted according to their immaturity level. **B/C/D** 1000, 10000 or 100000 keratinocytes (progenitors, adult stem cells or differentiated cells) of one representative donor were incubated with 100000 PBMC during 7 days. PBMCs were pre-marked with a proliferation dye. PBMC were activated by CD3⁺ CD28⁺ beads. PBMC proliferation was quantified by dye decrease at day 7. **B** Representative flow cytometry profiles at day 7. **C** CD4⁺ T cell proliferation inhibition according to the keratinocyte immaturity level (mean+SEM, p<0.05, n=3). **D** CD4⁺ T cell proliferation inhibition according to the keratinocyte number and immaturity level (mean+SEM, p<0.05, n=3). Exact p-values were determined according to the t-test.

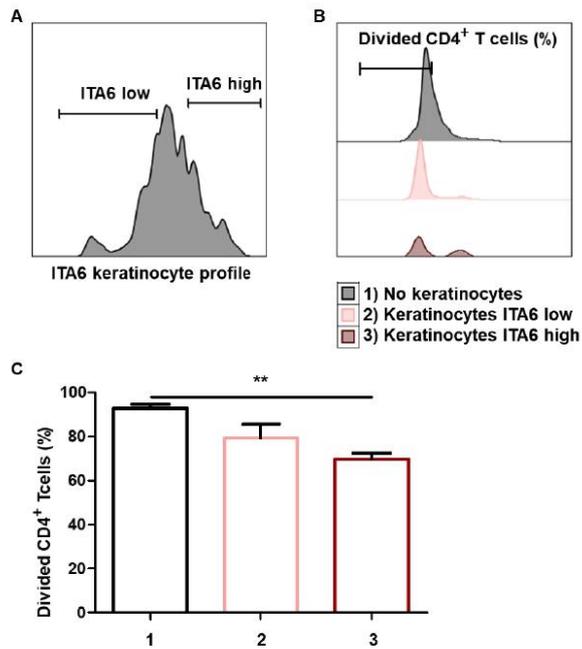


Fig 2) Keratinocyte precursors limit CD4⁺ T cell proliferation after ex vivo amplification.

A Representative flow cytometry profiles of keratinocytes sorted according to their ITA6 level. **B/C** 10000 keratinocytes, sorted according to their ITA6 expression after amplification, were incubated with 100000 PBMC during 7 days. PBMCs were pre-marked with a dye. PBMC were activated by CD3⁺ CD28⁺ beads. PBMC proliferation was quantified by dye decrease at day 7. **B** Representative flow cytometry profiles at day 7. **C** CD4⁺ T cell proliferation inhibition according to the keratinocyte ITA6 expression (mean+SEM, p<0.05, n=3). Exact p-values were determined according to the t-test.

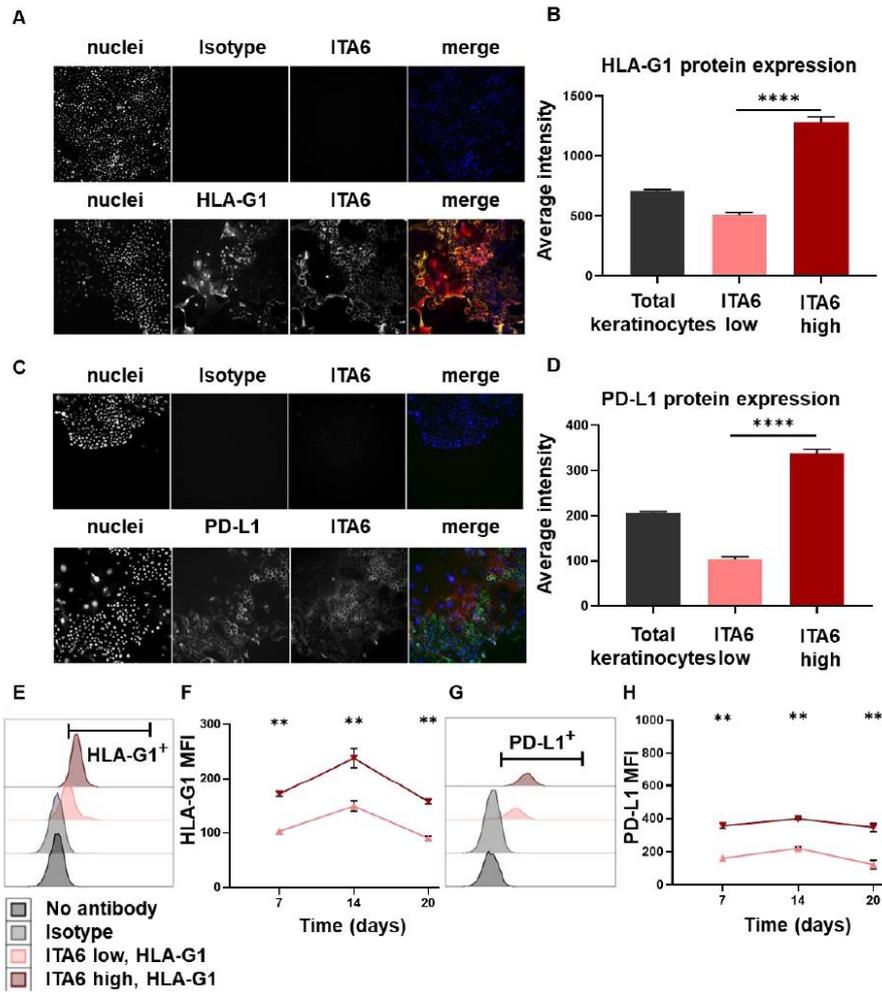


Fig 3) Keratinocyte precursors overexpress the immune checkpoints HLA-G1 and PD-L1.

Cells of one representative donor were cultivated 7, 14 or 20 days in a no defined medium with serum and a layer of feeder cells. Analysis by high content single-cell image analysis. **A/C** Representative profiles of HLA-G1 and PD-L1 expression according to ITA6 expression on amplified keratinocytes for 7 days. **B/D** High content single-cell image analysis of HLA-G1 and PD-L1 levels (Average intensity of fluorescence) (mean+SEM, $p < 0.0001$, $n = 1000$ cells*3 culture replicate). **E/G** Representative flow cytometry profiles of HLA-G1 and PD-L1 expression on keratinocytes amplified for 7 days. **F/H** Analysis by flow cytometry of HLA-G1 and PD-L1 (mean+SEM, $n = 6$) expression according to ITA6 level on keratinocytes amplified for 7/14/20 days. Exact p-values were determined according to the Mann-Whitney U-test.

SUPPLEMENTARY DATA

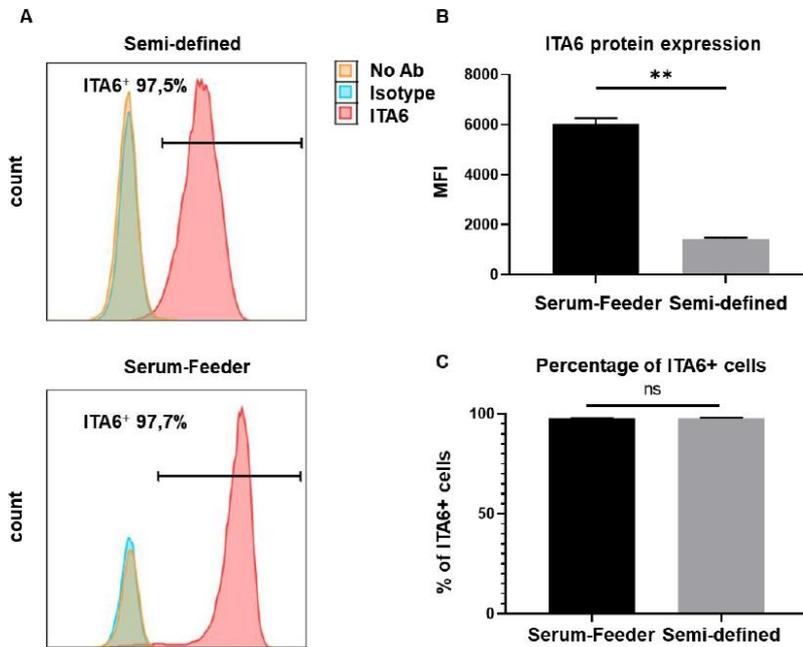


Fig Sup 1) Influence of the medium on ITA6 protein expression on keratinocytes.

Cells of one representative donor were cultivated 7 days after removal in semi-defined medium (KSEFM) or in a no defined medium with serum and a layer of feeder cells (GL3). ITA6 is a marker of basal. Analysis by flow cytometry. **A** Representative profiles of ITA6 expression on keratinocytes cultivated 7 days after removal in 2 media. **B** Analysis by flow cytometry of ITA6 expression (MFI) (mean+SEM, $p=0,0022$, $n=6$) on keratinocytes cultivated 7 days after removal in 2 media. **C** Percentage of ITA6⁺ cells (mean+SEM, $p=0,9143$, $n=6$) on keratinocytes cultivated 7 days after removal in 2 media. Exact p-values were determined according to the Mann-Whitney U-test.

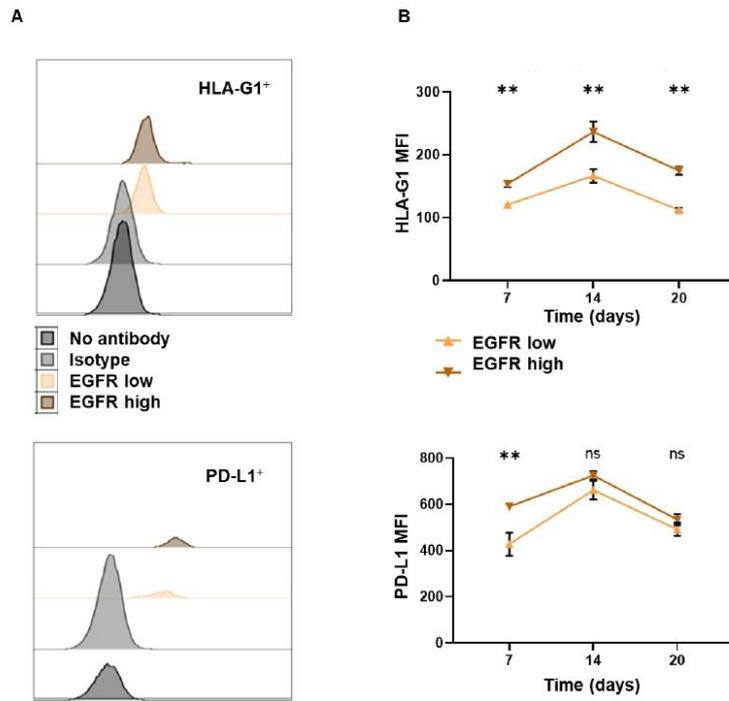


Fig Sup 2) HLA-G1 and PD-L1 expression according to EGF-R level on amplified keratinocytes.

Cells of one representative donor were amplified 7/17/20 days after removal in semi-defined medium (KSFM). **A** Representative profiles of HLA-G1 and PD-L1 expression on keratinocytes amplified for 7 days in KSFM. **B** Analysis by flow cytometry of HLA-G1 and PD-L1 (mean+SEM, n=6) expression according to EGFR level on keratinocytes amplified for 7/14/20 days in KSFM. Exact p-values were determined according to the Mann-Whitney U-test.

IV. Données supplémentaires

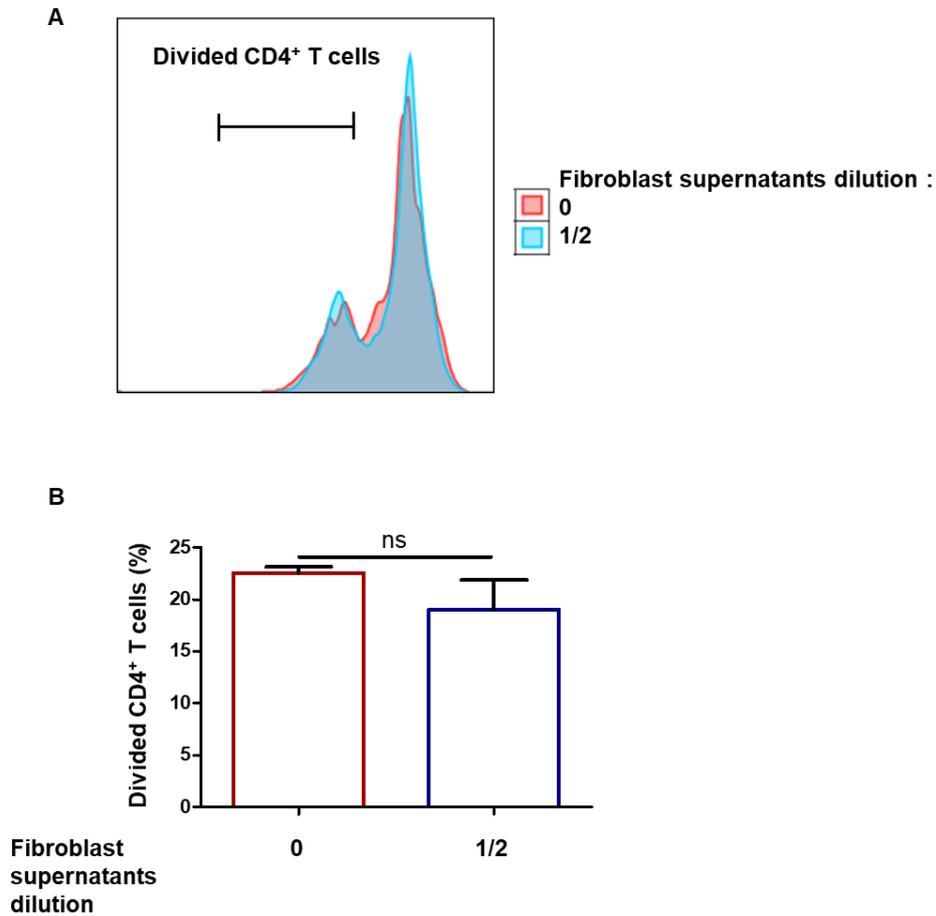


Figure supplémentaire 1) Surnageant de fibroblastes et inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺.

Les surnageants de fibroblastes d'un donneur représentatif sont incubés avec 100 000 PBMC pendant 7 jours. Les PBMC sont pré-marquées avec un colorant. Les PBMC sont activées par des billes CD3 + CD28 +. La prolifération des PBMC est quantifiée par la diminution du colorant au jour 7. **A** Profils de cytométrie en flux représentatifs au jour 7. **B** Prolifération des LT CD4 + en fonction de la présence de surnageant des fibroblastes (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test.

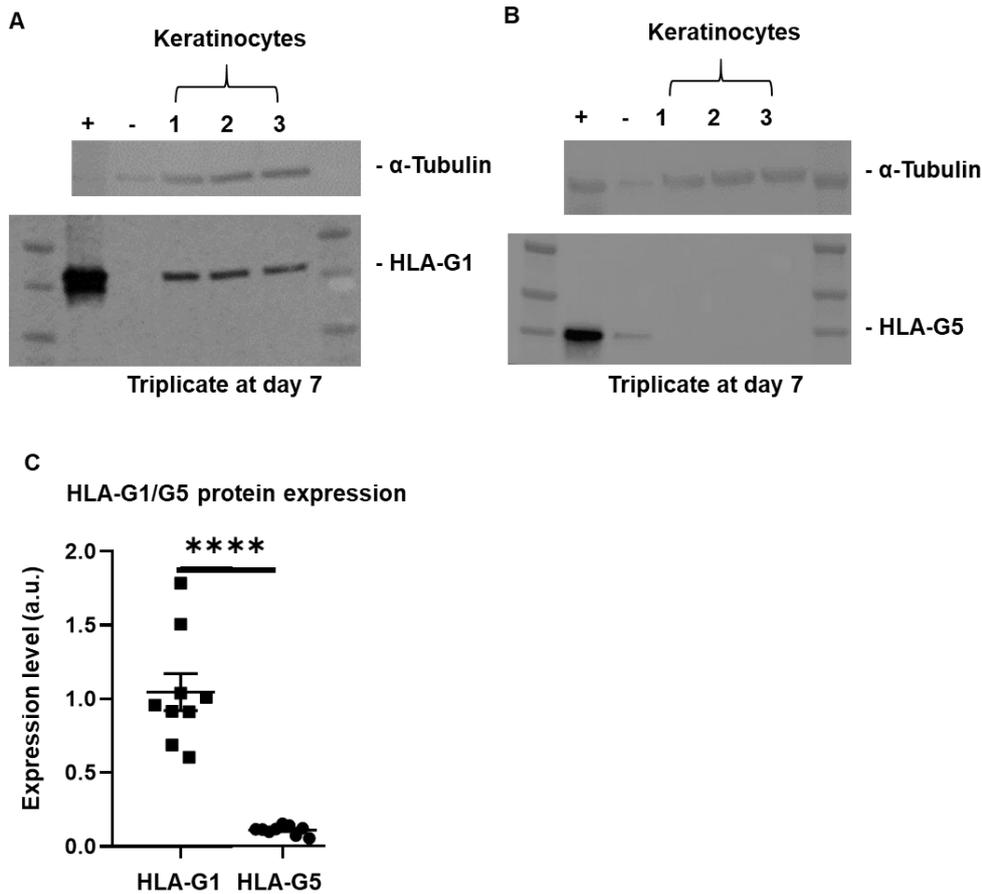


Figure supplémentaire 2) L'isoforme exprimée sur les kératinocytes est HLA-G1.

Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 7 jours dans un milieu non défini avec du sérum et une couche de cellules nourricières. **A** Analyse par Western Blot d'une photographie de gel typique correspondant à 3 cultures différentes, avec détection de l' α -tubuline comme contrôle de charge. Les cellules K562 sont utilisées comme contrôle négatif et les cellules K562 transduites avec HLA-G1 sont utilisées comme contrôle positif avec l'anticorps 4H84. **B** Photographie de gel typique correspondant à 3 cultures différentes, avec détection de l' α -tubuline comme contrôle de charge. Les cellules M8 sont utilisées comme contrôle négatif et les cellules M8 transduites avec HLA-G5 sont utilisées comme contrôle positif avec l'anticorps 5A6G7. **C** Scatter plot de quantification (moyenne + SEM, $p < 0,0001$, $n = 9$). Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney.

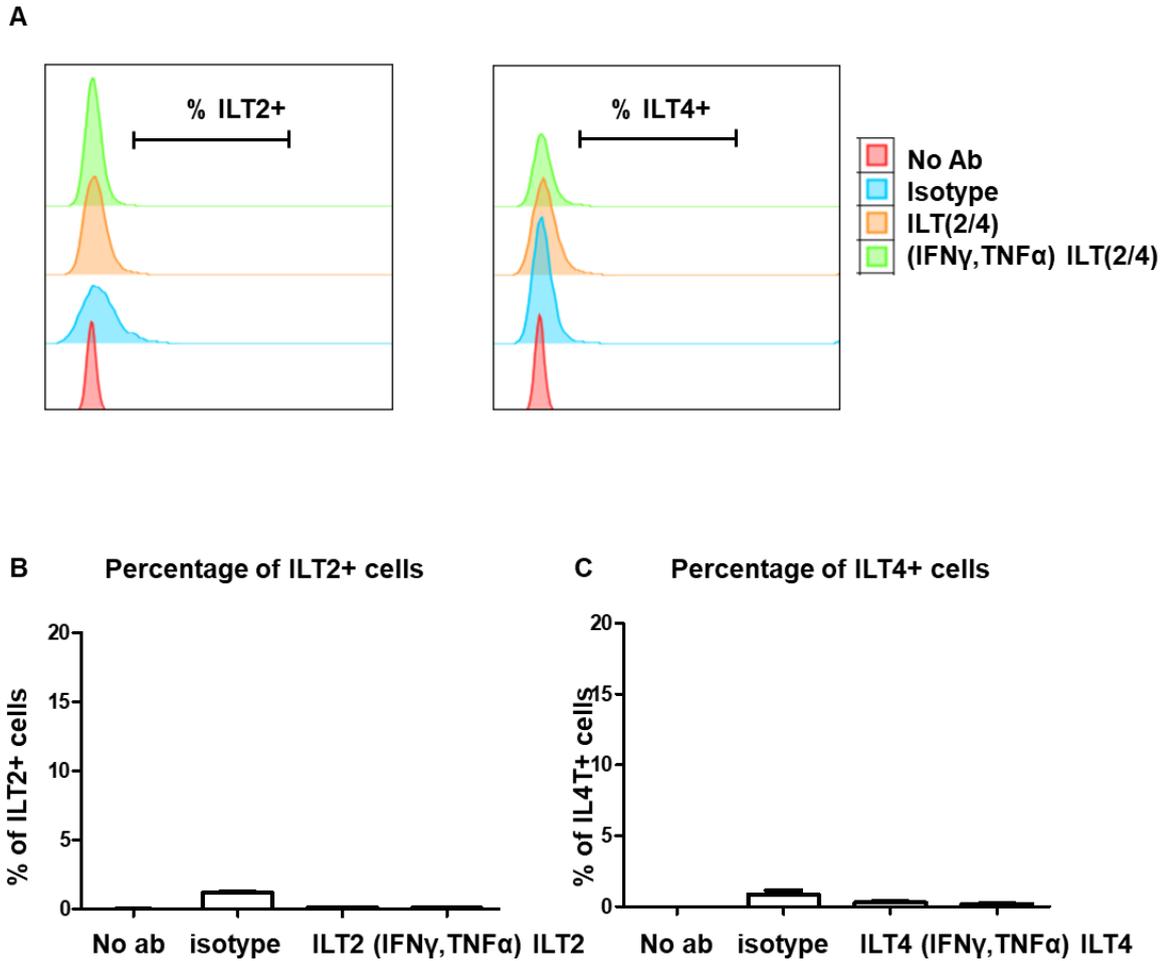
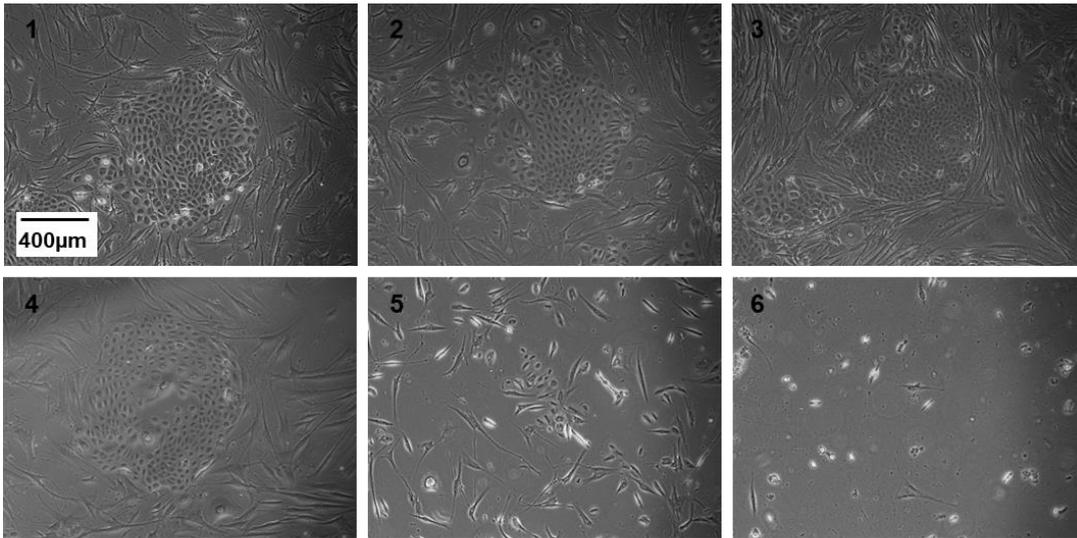


Figure supplémentaire 3) Expression d'ILT2 et d'ILT4 par les kératinocytes avec ou sans conditions inflammatoires.

Les cellules d'un donneur représentatif sont stimulées ou non pendant 2 jours avec 10 ng / mL d'IFN γ et de TNF α et marquées avec des anticorps anti-ILT2 et ILT4. ILT2 et ILT4 sont des récepteurs d'HLA-G. **A** Profils représentatifs de l'expression d'ILT2 et d'ILT4 sur les kératinocytes. **B** Pourcentage de cellules ILT2 + sur les kératinocytes. **C** Pourcentage de cellules ILT4 + sur les kératinocytes.

A



1 : No doxycycline
 2 : 10ng/mL
 3 : 100ng/mL
 4 : 1000ng/mL
 5 : 10000ng/mL
 6 : 100000ng/mL

B

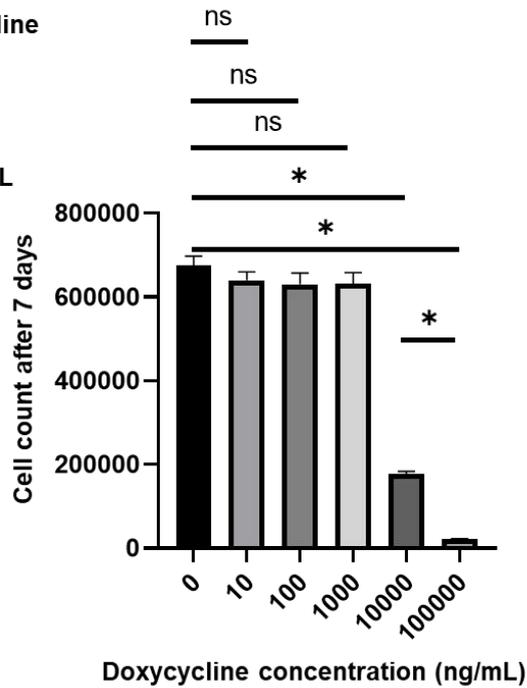


Figure supplémentaire 4) Toxicité de la doxycycline sur les kératinocytes.

A Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 7 jours dans un milieu non défini avec du sérum et une couche de cellules nourricières, avec 5 concentrations de doxycycline différentes après 3 jours. **B** Comptage des cellules après 7 jours. (Moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 4$ répliquats de culture). Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney.

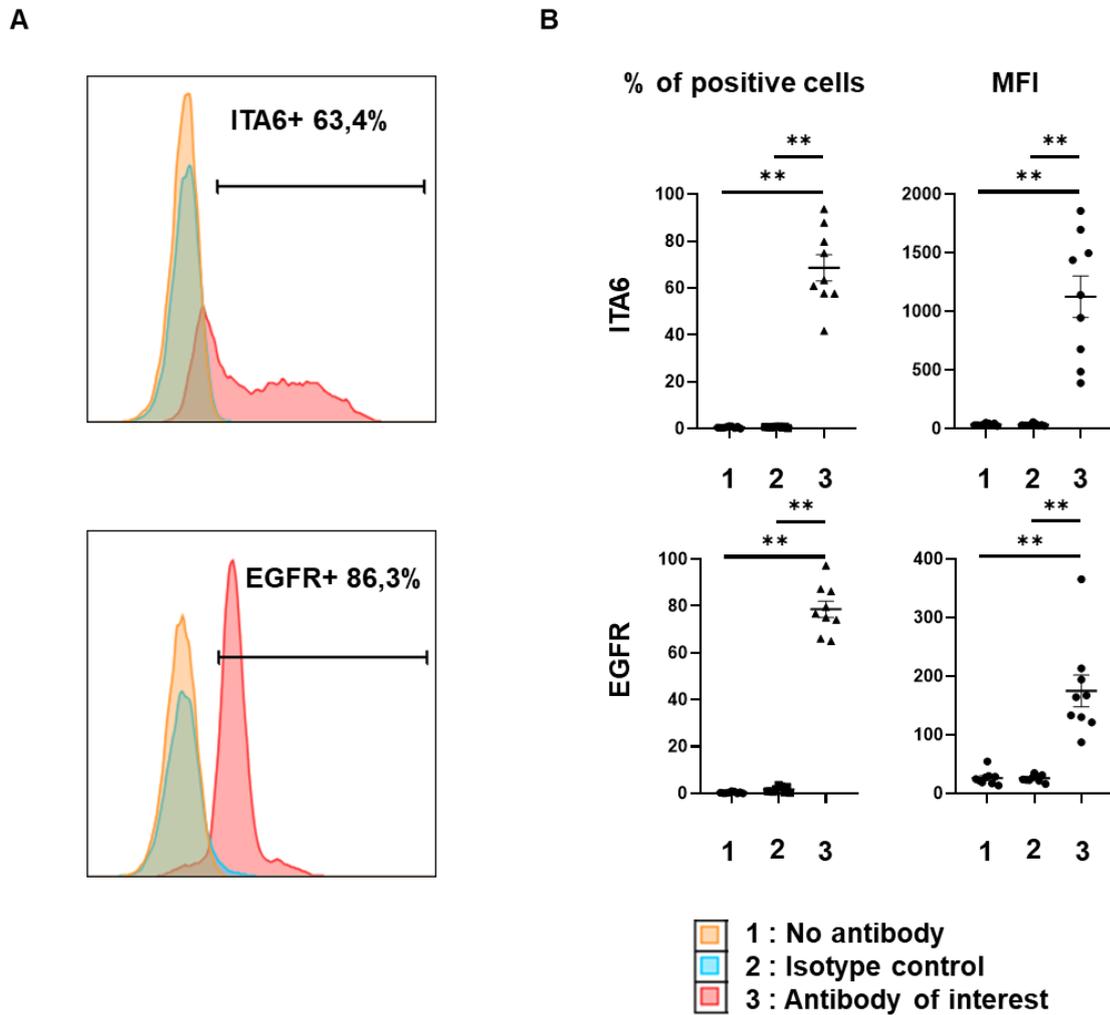


Figure supplémentaire 5) Niveaux d'ITA6 et d'EGFR sur les kératinocytes tissulaires.

Les cellules de neuf donneurs représentatifs sont extraites par dissociation mécanique et enzymatique (voir matériel et méthodes). **A** Profils représentatifs de l'expression d'ITA6 et d'EGFR sur les kératinocytes juste extraits du tissu. **B** Analyse par cytométrie en flux des taux d'ITA6 et d'EGFR (moyenne + SEM, n = 9) sur les kératinocytes juste extraits du tissu. Les p values exactes ont été déterminées selon le test apparié de Wilcoxon.

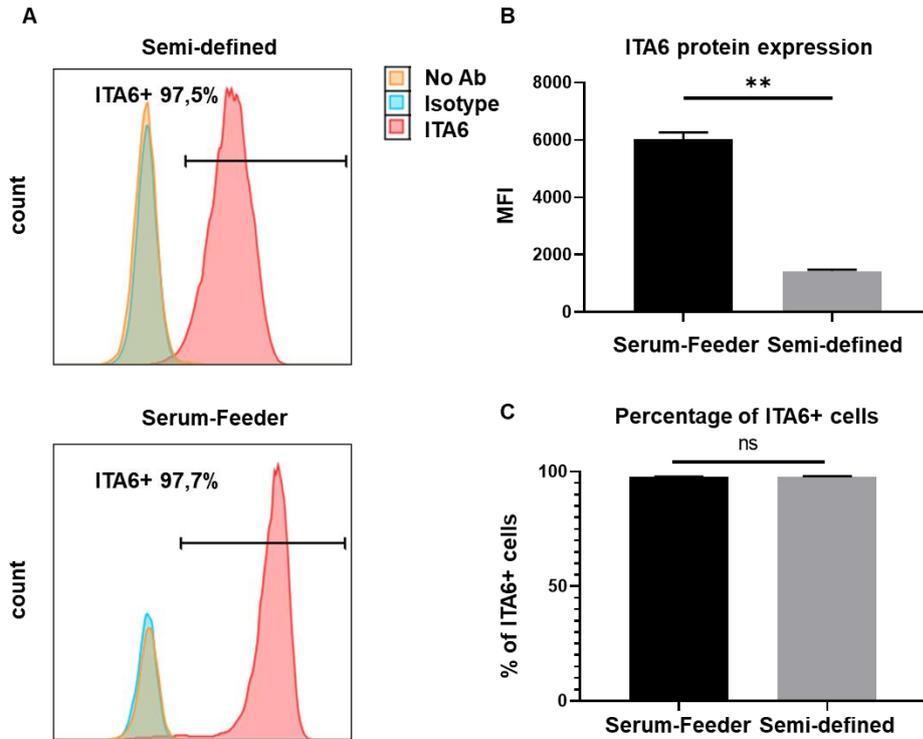


Figure supplémentaire 6) Influence du milieu sur l'expression d'ITA6 sur les kératinocytes.

Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 7 jours dans un milieu semi-défini (KSFM) ou dans un milieu non défini avec du sérum et une couche de cellules nourricières (GL3). L'ITA6 est un marqueur de la couche basale. Analyse par cytométrie en flux. **A** Profils représentatifs de l'expression d'ITA6 sur les kératinocytes cultivés 7 jours dans 2 milieux. **B** Analyse par cytométrie en flux de l'expression d'ITA6 (MFI) (moyenne + SEM, $p = 0,0022$, $n = 6$) sur des kératinocytes cultivés 7 jours dans 2 milieux. **C** Pourcentage de kératinocytes ITA6+ (moyenne + SEM, $p = 0,9143$, $n = 6$) cultivés 7 jours dans 2 milieux. Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney.

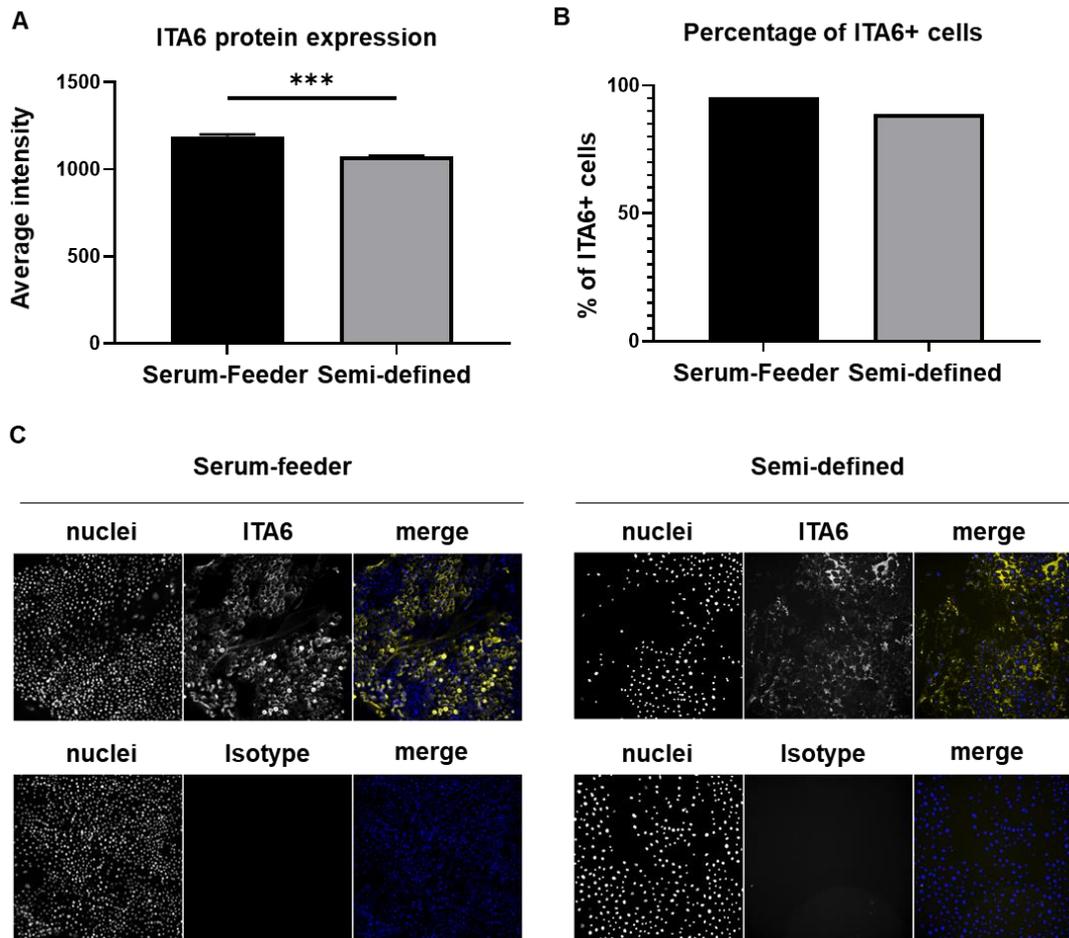


Figure supplémentaire 7) Influence du milieu sur l'expression d'ITA6 sur les kératinocytes.

Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 7 jours dans un milieu semi-défini (KSFM) ou dans un milieu non défini avec du sérum et une couche de cellules nourricières (GL3). L'ITA6 est un marqueur de la couche basale. **A** Analyse par imagerie des niveaux d'ITA6 (intensité moyenne de fluorescence) 7 jours dans 2 milieux (moyenne + SEM, $p = 0,0008$, $n = 1000$ cellules * 6 répliquats de culture). **B** Pourcentage de kératinocytes ITA6+ (nb cellules > 1000) cultivés 7 jours dans 2 milieux. **C** Profils représentatifs de l'expression d'ITA6 sur les kératinocytes cultivés 7 jours dans 2 milieux. Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney.

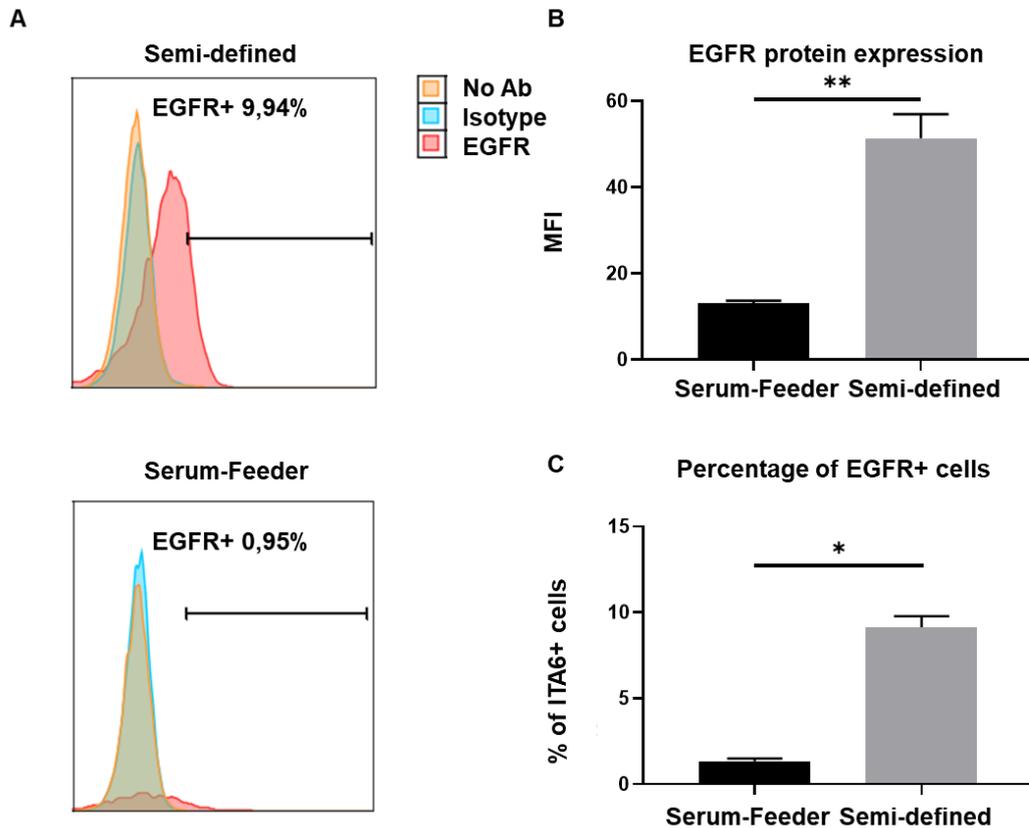


Figure supplémentaire 8) Influence du milieu sur l'expression d'EGFR par les kératinocytes.

Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 7 jours dans un milieu semi-défini (KSFM) ou dans un milieu non défini avec du sérum et une couche de cellules nourricières (GL3). L'EGFR est un marqueur de prolifération. Analyse par cytométrie en flux. **A** Profils représentatifs de l'expression d'EGFR sur les kératinocytes cultivés 7 jours dans 2 milieux. **B** Analyse par cytométrie en flux de l'expression d'ITA6 (MFI) (moyenne + SEM, $p = 0,0022$, $n = 6$) sur des kératinocytes cultivés 7 jours dans 2 milieux. **C** Pourcentage de kératinocytes EGFR+ (moyenne + SEM, $p = 0,0286$, $n = 6$) cultivés 7 jours dans 2 milieux. Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney.

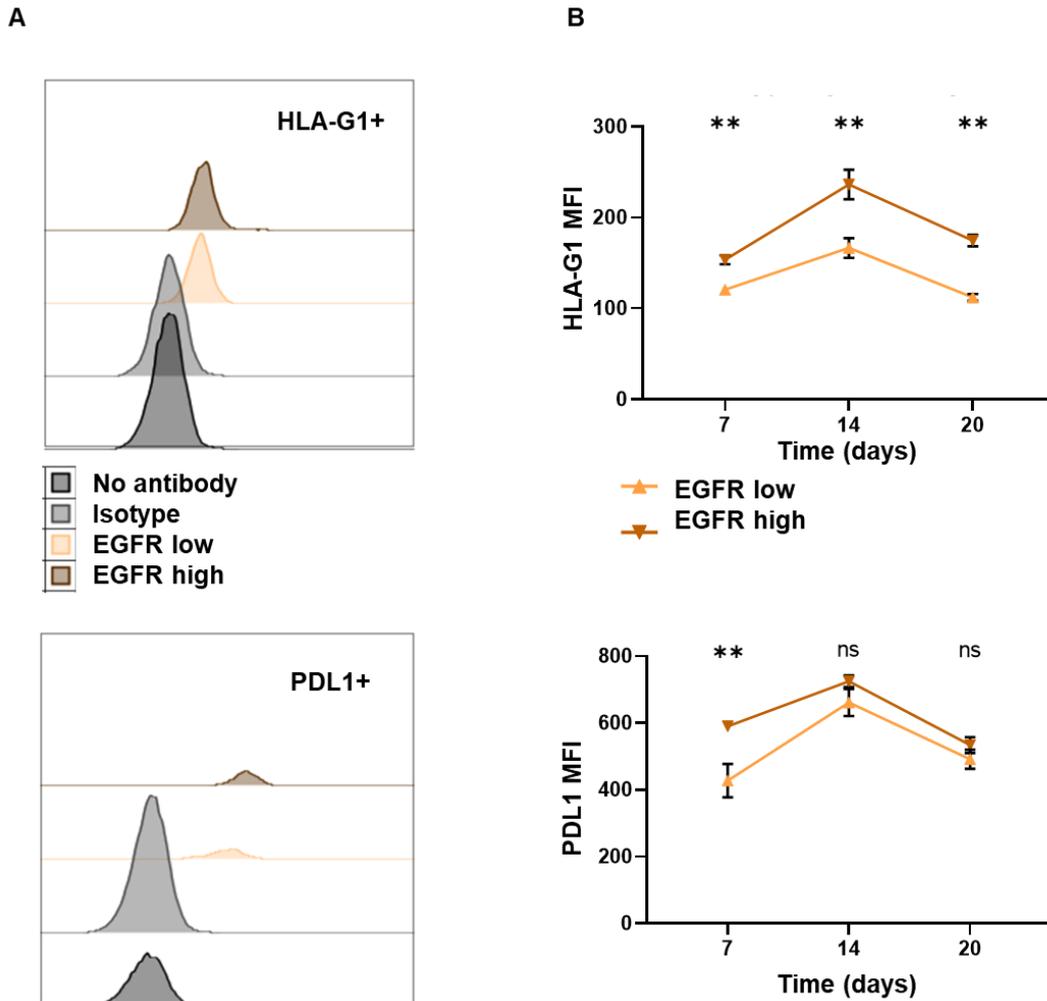


Figure supplémentaire 9) Expression d'HLA-G1 et de PD-L1 selon le niveau d'EGFR sur les kératinocytes amplifiés.

Les cellules d'un donneur représentatif sont amplifiées 7/17/20 jours en milieu semi-défini (KSFM). **A** Profils représentatifs de l'expression d'HLA-G1 et de PD-L1 sur les kératinocytes amplifiés pendant 7 jours dans KSFM. **B** Analyse par cytométrie en flux de l'expression d'HLA-G1 et de PD-L1 (moyenne + SEM, n = 6) en fonction du taux d'EGFR sur des kératinocytes amplifiés pendant 7/14/20 jours en KSFM. Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney.

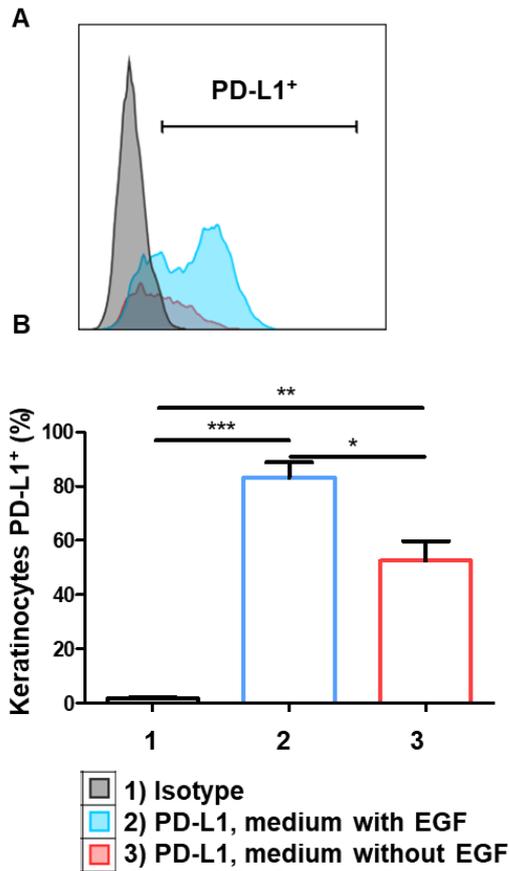


Figure supplémentaire 10) Influence de l'EGF sur l'expression de PD-L1 par les kératinocytes.

Les kératinocytes amplifiés exprimant PD-L1 ont ensuite été réamplifiés avec du milieu avec ou sans EGF. **A** profil de cytométrie représentatif après 7 jours. **B** Expression de PD-L1 en fonction de la présence d'EGF dans le milieu (moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 3$). Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test. *: $p < 0,05$ et **: $p < 0,001$.

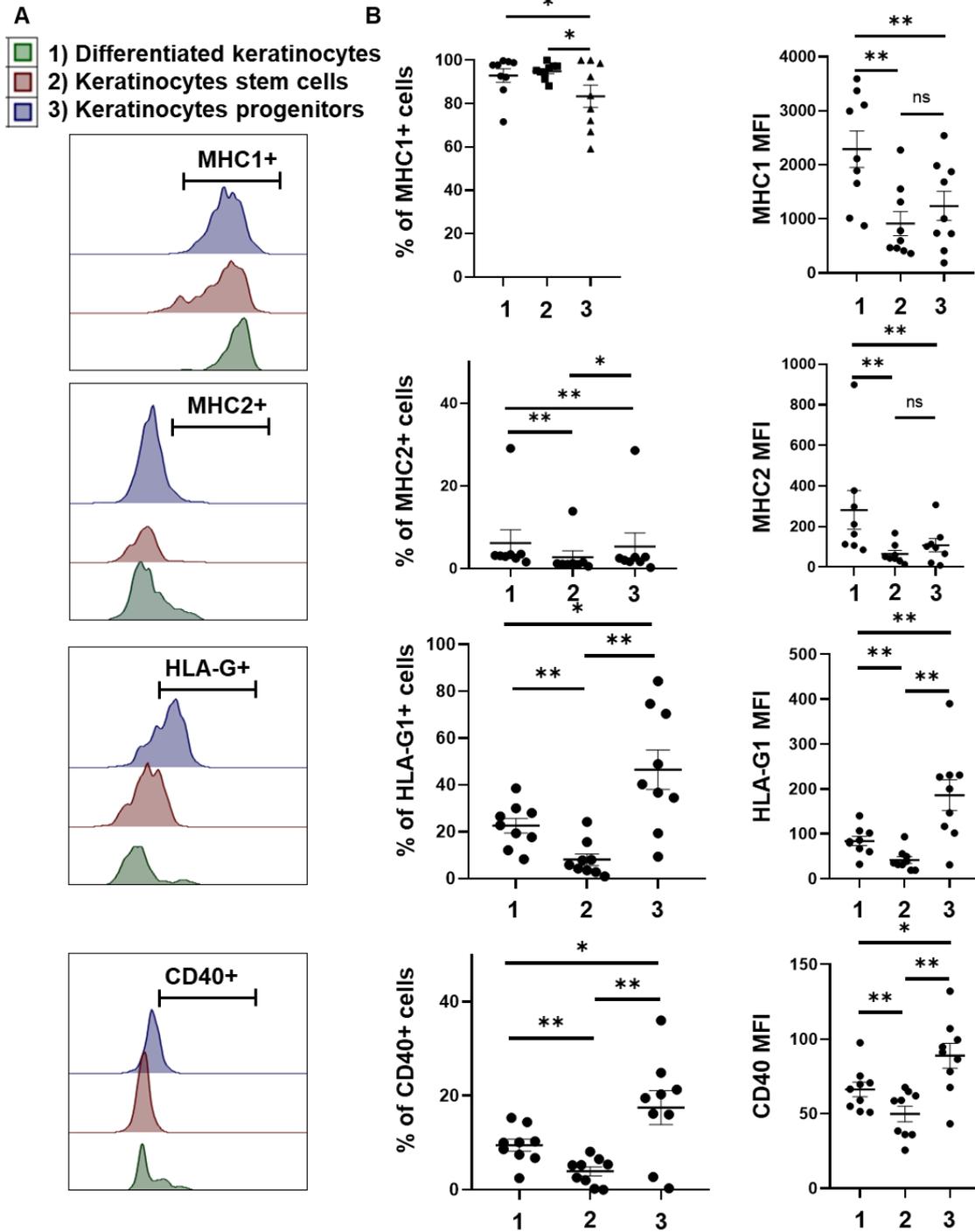


Figure supplémentaire 11) Profils immunitaires des cellules souches des kératinocytes, des cellules différenciées et des progéniteurs juste extraits du tissu.

Les cellules de neuf donneurs représentatifs sont extraites. Les cellules souches de kératinocytes (ITA6 high et EGFR low), les progéniteurs de kératinocytes (ITA6 high EGFR high) et les cellules différenciées (ITA6 low) sont triés par cytométrie en flux. **A** Profils représentatifs de l'expression de CMHI, CMHII, CD40 et HLA-G1 sur les cellules souches

des kératinocytes, les cellules différenciées et les progéniteurs juste extraits du tissu. **B** Analyse par cytométrie en flux de l'expression de CMHI, CMHII, CD40 et HLA-G1 (moyenne + SEM, n = 9) sur les kératinocytes en fonction de leur niveau d'immaturité. Les p values exactes ont été déterminées selon le test pairé de Wilcoxon.

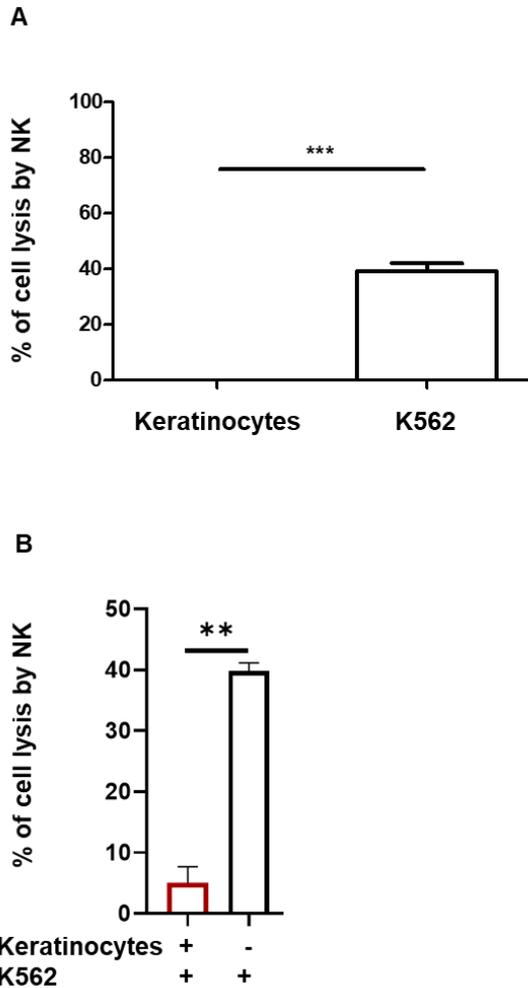


Figure supplémentaire 12) Kératinocytes et inhibition de la cytotoxicité des NK.

A 10 000 kératinocytes chromés d'un donneur représentatif (ou témoin positif avec des K562) sont incubés avec des PBMC de deux donneurs pendant 4h. Les kératinocytes ont été amplifiés ex-vivo pendant 7 jours. La lyse cellulaire par les NK est calculée (moyenne + SEM, $p < 0,05$, n = 3). **B** 5000 K562 chromés sont incubés avec les PBMC de deux donneurs pendant 4h. 10000 kératinocytes ont été ajoutés ou non en tant que troisièmes cellules. Les kératinocytes ont été amplifiés ex-vivo pendant 7 jours. La lyse cellulaire par les NK est calculée (moyenne + SEM, $p < 0,05$, n = 3). Les p values exactes ont été déterminées selon le t-test.

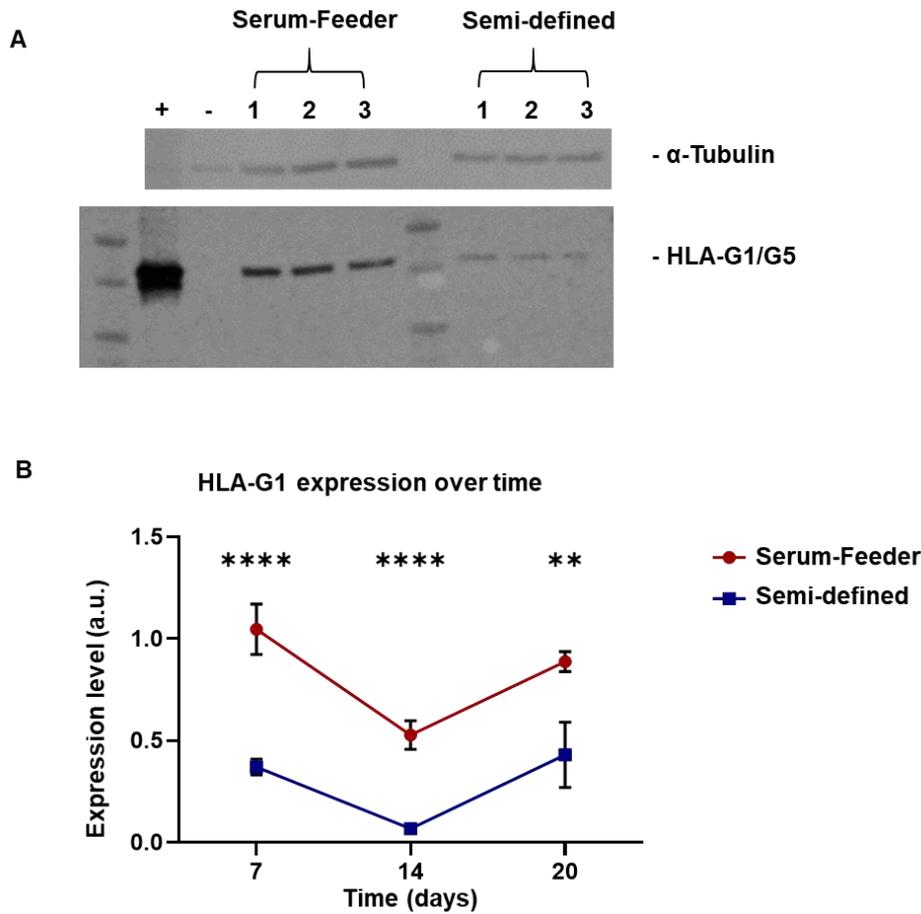


Figure supplémentaire 13) Influence du milieu sur l'expression de la protéine HLA-G1 sur les kératinocytes au cours du temps.

Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 20 jours dans un milieu semi-défini (KSFM) ou dans un milieu non défini avec du sérum et une couche de cellules nourricières (GL3). Analyse par Western Blot. Les cellules K562 sont utilisées comme contrôle négatif et les cellules K562 transduites avec HLA-G1 sont utilisées comme contrôle positif. **A** Une photographie sur gel typique correspondant à 3 cultures différentes après 7 jours, avec détection de l' -tubuline comme contrôle de chargement. **B** Nuage de points de quantification (moyenne + SEM, $p < 0,0001$, $n = 9$). Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney.

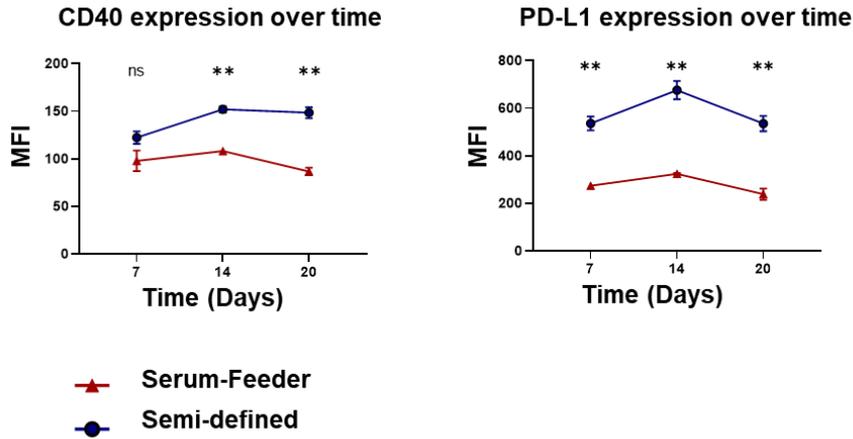


Figure supplémentaire 14) Expression de protéines immunitaires sur des kératinocytes amplifiés dans 2 milieux au cours du temps.

Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 20 jours dans un milieu semi-défini (KSFM) ou dans un milieu non défini avec du sérum et une couche de cellules nourricières (GL3). Analyse par cytométrie en flux. Analyse par cytométrie en flux des niveaux de PD-L1 et de CD40 (intensité de fluorescence moyenne) après 7/14/20 jours dans 2 milieux (moyenne + SEM, n = 6 répliquats). Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney. *: p <0,05, **: p <0,01

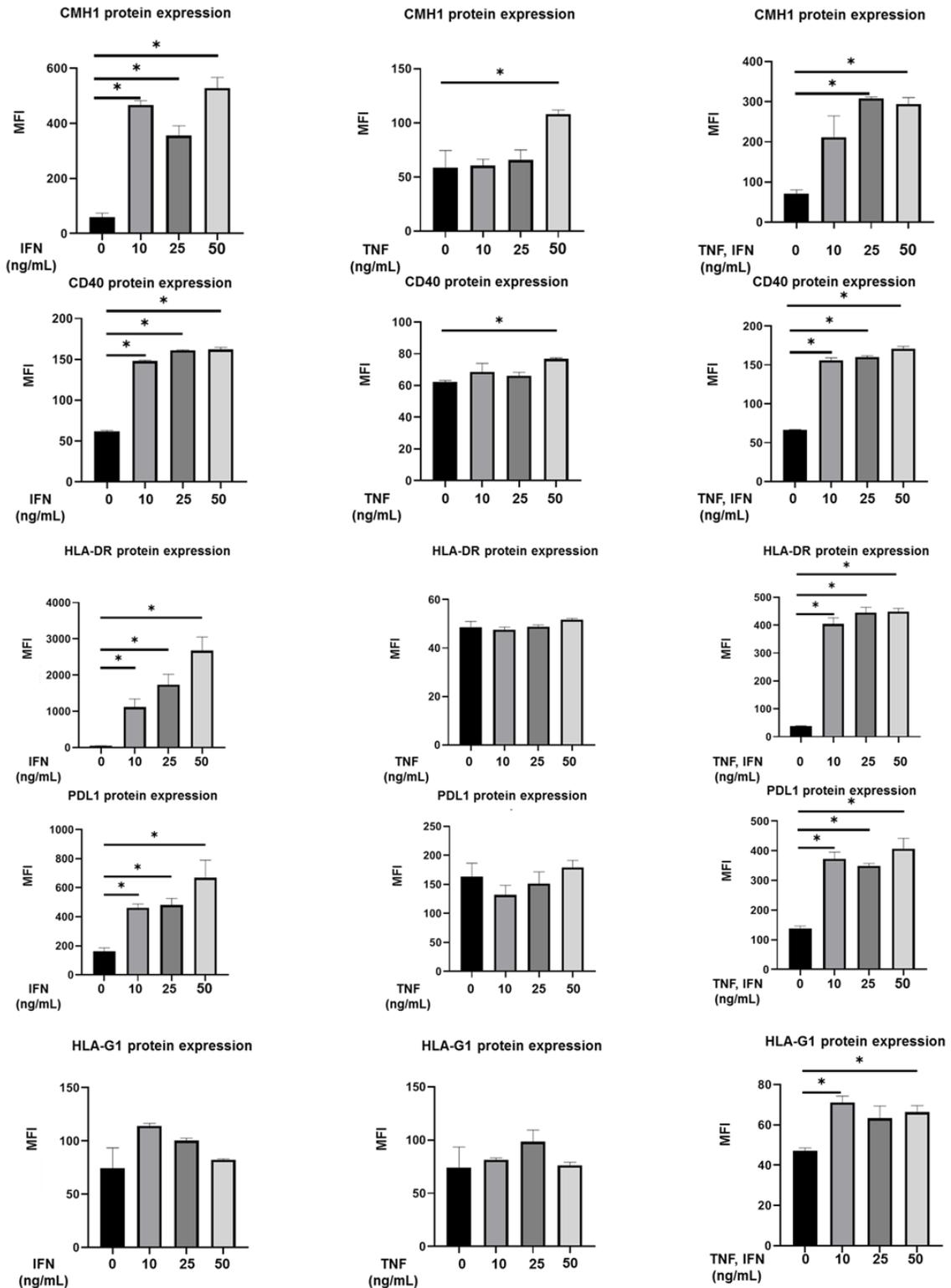


Figure supplémentaire 15) Expression des protéines immunitaires en fonction de la stimulation des kératinocytes avec de l'IFN- γ et/ou du TNF- α .

Les cellules d'un donneur représentatif sont cultivées 7 jours dans un milieu non défini avec du sérum et une couche de cellules nourricières (GL3). Analyse par cytométrie en flux

(moyenne + SEM, $p < 0,05$, $n = 4$ répliquats de culture). Les p values exactes ont été déterminées selon le test U de Mann-Whitney.

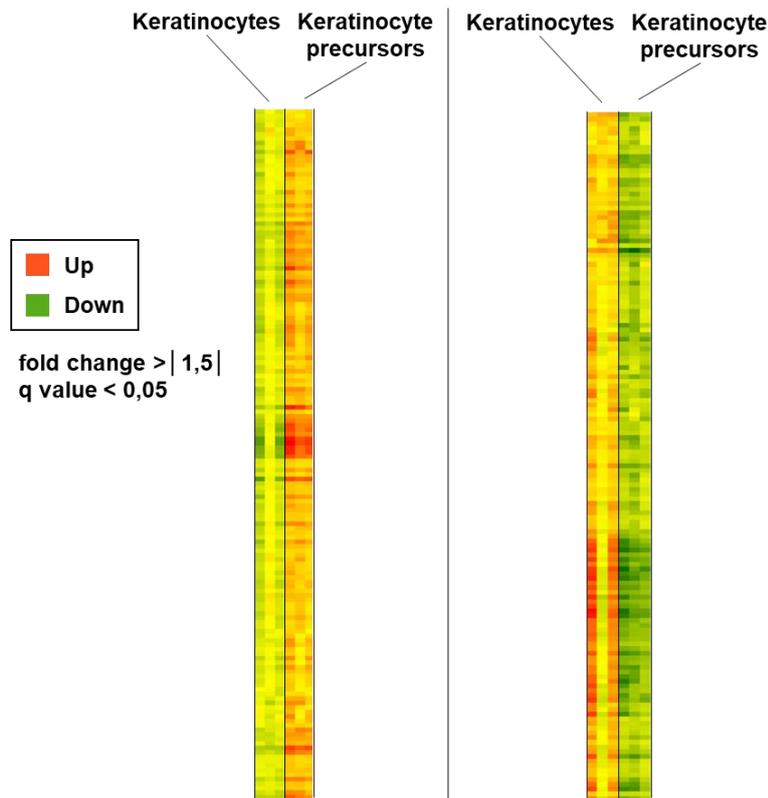


Figure supplémentaire 16) Transcrits du système immunitaire régulés à la hausse / à la baisse dans un modèle de précurseurs des kératinocytes.

300 transcripts de gènes liés à l'immunité sont modulés dans un modèle de précurseurs de kératinocytes (modèle KLF4 du laboratoire ³⁶). Ces précurseurs ont été obtenus par une sous-expression de KLF4. Pour les précurseurs, on observe une sous-expression d'ICAM1 qui permet le recrutement des LT par les kératinocytes, de CD55, un inhibiteur de la C3 convertase, et de PD-L1. En revanche, on observe une sur-expression des molécules de co-stimulation des LT CD40 et CD86, de CD14 qui permet la reconnaissance du LPS en association avec TLR4, des TLR1,2 et 5, des HLA-A, B et DQB1, et de l'IL-15RA, une des trois sous unités du récepteur à l'IL15.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les résultats que j'ai obtenus montrent que les kératinocytes sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 + via la sécrétion de cytokine TGF- β 1 ainsi que l'expression des points de contrôle immunitaires HLA-G et PD-L1. C'est la première fois que l'expression de la protéine HLA-G est décrite dans un épiderme sain ⁴⁵¹.

Les kératinocytes obtenus à partir d'échantillons de peau de donneurs sains expriment des marqueurs immunitaires à leur surface. Plus de 95% d'entre eux expriment le CMHI, en revanche, moins de 5% d'entre eux expriment HLA-DR et CD86, et certains d'entre eux la molécule costimulatrice CD40. La capacité des kératinocytes à faire de la présentation antigénique médiée par les HLA de classe II aux cellules T CD4 + in vitro est donc limitée. Les kératinocytes sont hypoimmunogéniques, ils ne sont pas capables d'induire l'alloprolifération des cellules T CD4+. De plus, les kératinocytes ont des propriétés immunosuppressives. Ils limitent la prolifération des cellules T CD4 + activées par des billes CD3 + CD28 +. En mimant un contexte inflammatoire avec l'ajout d'IFN- γ et de TNF- α , l'expression des marqueurs HLA est modulée sur les kératinocytes. Ils surexpriment en effet HLA-DR, comme précédemment montré avec sur des cellules souches mésenchymateuses (MSC) ³⁰⁸. Cependant, même dans ces conditions inflammatoires, on observe toujours une inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + médiée par les kératinocytes.

En simulant des conditions inflammatoires avec de l'IFN- γ et/ou du TNF- α , on observe une modulation de l'expression des marqueurs immunitaires des kératinocytes (voir données supplémentaires Fig Sup 15). L'IFN- γ induit une surexpression du CMHI et de CD40 dès 10ng/mL. Le TNF- α aussi, moins fortement et seulement à partir de 50ng/mL. L'IFN- γ induit une surexpression du HLA-DR et de PD-L1 dès 10ng/mL. Le TNF- α ne l'induit pas dans ces conditions. L'IFN- γ et le TNF- α seuls n'induisent pas de surexpression d'HLA-G1. En revanche, une combinaison synergique des deux l'induit à partir de 10ng/mL.

L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 + par les kératinocytes semble être médiée par des facteurs solubles, tels que le TGF- β , et par des points de contrôle immunitaires, tels que PD-L1 et HLA-G. Il a été montré dans d'autres systèmes que l'expression d'HLA-G induit celle de TGF- β 1 et vice versa, ce qui pourrait conduire à une boucle d'auto-induction ^{452,453}. Le TGF- β réduit la prolifération et l'activation des lymphocytes T ^{454,455}. En effet, la sous-expression du TGF- β chez la souris a montré une prolifération et une activation des lymphocytes T, ainsi que leur production de cytokines ⁴⁵⁴.

Le TGF- β limite la prolifération des lymphocytes T CD4 + par la voie Smad3⁴⁵⁰. Ainsi, le TGF- β produit par les kératinocytes contribue probablement à leur capacité d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 +. Ces propriétés immunosuppressives du TGF- β ont également été décrites pour les cellules épithéliales bronchiques, en association avec celles de l'IL-10 et d'HLA-G⁴⁵⁶.

Des études chez la souris ont montré que les kératinocytes exprimant PD-L1 réduisaient la prolifération et la fonction effectrice des cellules T au niveau des sites inflammatoires locaux³¹¹. L'expression de PD-L1 est également corrélée à une présence plus élevée de cellules Treg dans la peau²⁴⁷. PD-L1 se lie au PD-1 exprimé à la surface des cellules T, qui à son tour inhibe leur activité³⁰⁴, et limite les réactions auto-immunes³⁰⁵. Mon travail montre une forte induction de PD-L1 dans les kératinocytes amplifiés, ce qui contribue en partie à leur capacité à moduler la prolifération des cellules T CD4 +. Cependant, je n'observe pas d'expression de PD-L1 dans les kératinocytes directement extraits du tissu sans aucune amplification *in vitro*. Cette induction de l'expression de PD-L1 par les kératinocytes lors de l'amplification peut s'expliquer par la présence de facteurs de croissance tels que l'EGF, comme je l'ai démontré ici (voir données supplémentaires Fig Sup 10). Cela a également été démontré dans d'autres systèmes^{312,457}. L'exposition des kératinocytes à l'EGF peut être réduite une fois qu'ils sont greffés sur le patient. Cela pourrait donc diminuer leur expression de PD-L1 et augmenter les chances de rejet.

L'expression épidermique de HLA-G a été précédemment décrite dans un contexte pathologique tel que le cancer de la peau et les dermatoses inflammatoires⁴⁵⁸. Elle a été détectée au niveau transcriptomique dans du tissu cutané sain mais pas au niveau protéique⁴⁵⁹. HLA-G a été détecté dans le psoriasis, principalement dans les macrophages de la jonction dermo-épidermique³⁵³. L'expression d'HLA-G a également été étudiée chez des patients atteints de dermatite atopique⁴⁶⁰. Dans ce cas, HLA-G est exprimé par des cellules T infiltrant les tissus, les macrophages et les cellules dendritiques et cette expression d'HLA-G pourrait être favorisée par celle de l'IL-10. Dans le pemphigus vulgaris, une maladie cutanée auto-immune rare, il y a une fréquence accrue de délétion au niveau de l'exon 8 du gène codant HLA-G. Cela favorise l'expression d'HLA-G^{461,462}. Il y a également des niveaux d'HLA-G soluble significativement plus élevés dans la circulation des patients atteints de lupus érythémateux disséminé⁴⁶³. HLA-G a également été détecté dans les cancers de la peau tels que les lymphomes cutanés et les carcinomes basocellulaires et épidermoïdes de la peau⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁶. Cette expression a été particulièrement étudiée dans le cas du mélanome. Les cellules de mélanome ont moins de CMHI, ce qui pourrait les rendre plus sensibles à la lyse par les

NK. Cependant, il a été démontré que l'expression d'HLA-G par les cellules de mélanome les protégeait de la lyse médiée par les NK ^{431,467-470}. L'expression d'HLA-G par les tumeurs a d'ailleurs récemment conduit à la mise au point de cellules CAR-T dirigées contre ce checkpoint immunitaire ⁴⁷¹.

Mes travaux montrent pour la première fois une expression de la protéine HLA-G1 par des kératinocytes issus de tissus sains pour chacun des donneurs étudiés. La plupart des études précédentes utilisaient l'immunohistochimie pour détecter HLA-G, et non la cytométrie en flux et le Western blot comme dans cette étude. Il s'agirait donc plutôt d'une expression différentielle entre les tissus cutanés normaux et pathologiques. Aucune expression des récepteurs d'HLA-G ILT2 et ILT4 n'a été observée sur les kératinocytes (voir données supplémentaires Fig Sup 3). L'action d'HLA-G exprimé sur les kératinocytes ne se fait donc pas via une boucle autocrine mais plutôt via la modulation des cellules immunitaires.

D'un point de vue fonctionnel, j'ai montré que les kératinocytes issus des tissus cutanés et non amplifiés réduisent la prolifération des lymphocytes T CD4 + via l'expression d'HLA-G. Cependant, moins de 10% des kératinocytes expriment HLA-G dans le tissu. Dans l'idée d'utiliser des kératinocytes pour les allogreffes cutanées, il nous a semblé utile de surexprimer ce point de contrôle immunitaire afin d'augmenter les propriétés immunosuppressives des kératinocytes. Ici, je montre qu'en effet, en utilisant un vecteur inductible, HLA-G est surexprimé par les kératinocytes, ce qui augmente en conséquence leurs propriétés immunosuppressives. Ces cellules immunosuppressives utilisées dans des conditions allogéniques pourraient ouvrir des perspectives thérapeutiques aux patients présentant des brûlures sévères ou à fort contexte inflammatoire, chez qui une greffe de peau autologue n'est pas possible. Ainsi, l'utilisation transitoire de kératinocytes amplifiés surexprimant fortement HLA-G permettrait donc d'avoir des greffons allogéniques immédiatement disponibles, le temps de préparer un greffon autologue. Comme les kératinocytes amplifiés expriment également fortement PD-L1, cela pourrait renforcer les effets immuno-inhibiteurs d'HLA-G. En effet, il a récemment été décrit dans un contexte tumoral que PD-L1 et HLA-G ciblent des sous-populations distinctes de lymphocytes T ^{411,420}.

Des fibroblastes dermiques ont déjà été modifiés pour exprimer un HLA-G1 modifié en vue d'une potentielle application thérapeutique dans la transplantation allogénique. Dans leur travail, HLA-G1 a été modifié au niveau de la région 3'UTR, ce qui permet de limiter la régulation par les miARN. En outre, ils n'ont pas fait exprimer le motif RKKSSD (remplacé

par RAASSD) de rétention d'HLA-G dans le réticulum endoplasmique (ER), ce qui a augmenté son expression membranaire. Une région de 14 pb a également été supprimée entre l'exon 6 et l'exon 8, car le polymorphisme associé corrèle avec un différentiel d'expression d'HLA-G⁴⁴⁶. De la même manière que pour mon travail, ces fibroblastes dermiques HLA-G + étaient moins sensibles à la lyse par les cellules NK stimulées par de l'IL-2 et réduisaient la prolifération des PBMC après activation avec de la PHA. Il serait intéressant d'effectuer les mêmes modifications sur notre modèle avec un vecteur inductible pour évaluer l'impact de ces modifications sur l'expression d'HLA-G dans notre système.

De plus, il serait intéressant d'utiliser également la forme soluble d'HLA-G pour inhiber le rejet de greffe par HLA-G. Une molécule dérivée d'HLA-G a été testée lors de greffe de peau chez la souris et permet d'augmenter la tolérance³⁴⁹. L'injection de microbilles liées à HLA-G par un autre groupe de recherche dans des souris a permis une diminution du rejet aigu de la greffe de peau³⁹⁴. Une autre approche serait la mise au point d'exosomes ciblant le greffon et contenant des ARNm du gène HLA-G pour favoriser la tolérance de la greffe cutanée de manière transitoire⁴⁴¹. Il serait également intéressant de tester d'autres gènes immunomodulateurs candidats, comme PD-L1, CTLA-4, CD47 ou HLA-E, ou de travailler à une édition des molécules immunogènes, comme les CMHI et II classiques (Mestrallet, G. et al, Skin immunity and tolerance : Focus on epidermal keratinocytes, revue en cours de soumission, voir annexes). Des approches complémentaires à celle de cette étude pourraient impliquer l'utilisation d'un derme décellularisé. Il serait alors possible d'avoir une matrice plus complète à greffer, sur laquelle ensemercer des kératinocytes exprimant HLA-G pour limiter le rejet de greffe.

Le choix du milieu de culture influe sur l'expression d'HLA-G1 par les kératinocytes sains. Il y a une plus forte expression avec le milieu non défini, avec du sérum et des cellules nourricières (voir données supplémentaires Fig Sup 13). Ce sont ces conditions de culture qui sont utilisées aujourd'hui en clinique pour produire des greffons. Toutefois, en comparaison avec un milieu semi-défini, il y a moins d'expression d'autres marqueurs de co-stimulation (PD-L1 et CD40) (voir données supplémentaires Fig Sup 14). Ces résultats, couplés à l'évolution des contraintes réglementaires qui tendent à éliminer les composants xénogéniques des protocoles cliniques, indiquent qu'il faut continuer à travailler sur des milieux plus adaptés aux enjeux cliniques. Ces milieux devront être mieux définis, permettant à la fois le maintien de cellules souches, et l'obtention de greffons immunocompatibles.

La génération de greffons présente un double enjeu. D'une part le maintien de cellules souches épidermiques au potentiel régénérateur élevé, et d'autre part l'obtention d'un greffon

immunocompatible. En effet, les cellules souches adultes sont cruciales pour le maintien et le renouvellement du tissu ⁴⁷². On sait peu de choses sur le lien entre l'immaturation des kératinocytes et leurs propriétés immunitaires dans l'épiderme interfolliculaire. Il est également important de comprendre les propriétés immunitaires des cellules souches adultes si on considère le phénomène d'échappement immunitaire qui peut se produire lors de la prolifération des cellules souches cancéreuses. En reprenant des données déjà publiées, j'ai pu identifier environ 300 transcripts de gènes liés à l'immunité qui sont modulés dans un modèle de précurseurs de kératinocytes (modèle KLF4, ³⁶) (voir données supplémentaires Fig Sup 16).

Les différentes populations de kératinocytes obtenues à partir de donneurs sains ont des phénotypes immunitaires différents. On distingue d'une part les cellules souches de phénotype ITA6^{high} EGF-R^{low}, et d'autre part, les progéniteurs de phénotype ITA6^{high} EGF-R^{high} et les kératinocytes différenciés de phénotype ITA6^{low} ^{34,40}. Au cours de mon travail, j'ai pu voir que par rapport aux kératinocytes différenciés, les progéniteurs et les cellules souches inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4 + in vitro. Elles expriment également moins de CMHI et de CMHII que les cellules différenciées (voir données supplémentaire Fig Sup 11). Pour déterminer si les précurseurs de kératinocytes amplifiés peuvent encore inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 +, ces cellules ont été amplifiées pendant 1 semaine. Les kératinocytes amplifiés expriment peu d'EGF-R, mais ont des niveaux élevés d'ITA6. Cela permet de sélectionner des kératinocytes amplifiés immatures selon l'expression d'ITA6. J'ai observé que les précurseurs des kératinocytes conservaient leur capacité à limiter la prolifération des lymphocytes T CD4 + après amplification.

Mes résultats ont montré que ces kératinocytes amplifiés ayant des niveaux élevés d'ITA6 surexprimaient HLA-G et PD-L1. PD-L1 se lie au PD-1 exprimé à la surface des cellules T, inhibe leur activité ³⁰⁴ et limite les réactions auto-immunes ³⁰⁵. HLA-G inhibe la fonction cytolytique des cellules NK et T, la réponse alloproliférative des cellules T CD4 +, la production d'anticorps par les cellules B et la présentation antigénique des cellules dendritiques ^{390,473}. Le phénomène de privilège immunitaire des précurseurs épidermiques pourrait donc s'expliquer par une surexpression des checkpoints immunitaires HLA-G et PD-L1. Ce privilège immunitaire impliquant des points de contrôle immunitaires comme HLA-G a également été décrit dans d'autres types de cellules immatures. C'est par exemple le cas pour les cellules souches mésenchymateuses ³⁰⁸.

Les cellules souches des tissus adultes peuvent se transformer en cellules cancéreuses, ce qui peut impliquer leur capacité d'échappement à l'élimination par le système immunitaire

⁴⁷⁴. HLA-G et PD-L1 inhibent différentes populations de cellules T dans le cancer ^{411,420}. Ces checkpoints immunitaires favorisent l'échappement de la tumeur par rapport au système immunitaire. Les immunothérapies sont de plus en plus utilisées pour diriger le système immunitaire de l'organisme contre la tumeur ⁴⁷⁵. Il est donc d'autant plus important de comprendre les mécanismes d'échappement immunitaire des cellules initiateuses tumorales.

Une autre région de l'épiderme enrichie en cellules souches est le follicule pileux. En effet, les kératinocytes humains issus du follicule pileux peuvent favoriser la cicatrisation ¹⁵ ou être utilisés pour traiter les ulcères de jambe ⁶⁴. Les follicules pileux sont normalement préservés du système immunitaire, un phénomène appelé privilège immunitaire. Les cellules souches de follicules pileux murins sousexpriment Nlrc5 et le CMHI dans leur état quiescent ⁴⁷⁶. L'expression de Nlrc5 stimule celle du CMHI sur les cellules souches des follicules pileux murins, de sorte que sa sousexpression explique celle du CMHI. L'altération de ce privilège immunitaire est l'une des causes de l'alopecie areata ²⁴⁰. Ce contexte physiopathologique a été décrit comme une maladie auto-immune, dans laquelle une infiltration anormale des cellules T provoque une inflammation locale et la destruction des follicules pileux ²³⁹. L'étude de l'expression des points de contrôle immunitaires sur les précurseurs de kératinocytes dans le follicule pileux pourrait donc permettre de mieux comprendre leur privilège immunitaire et les pathologies associées.

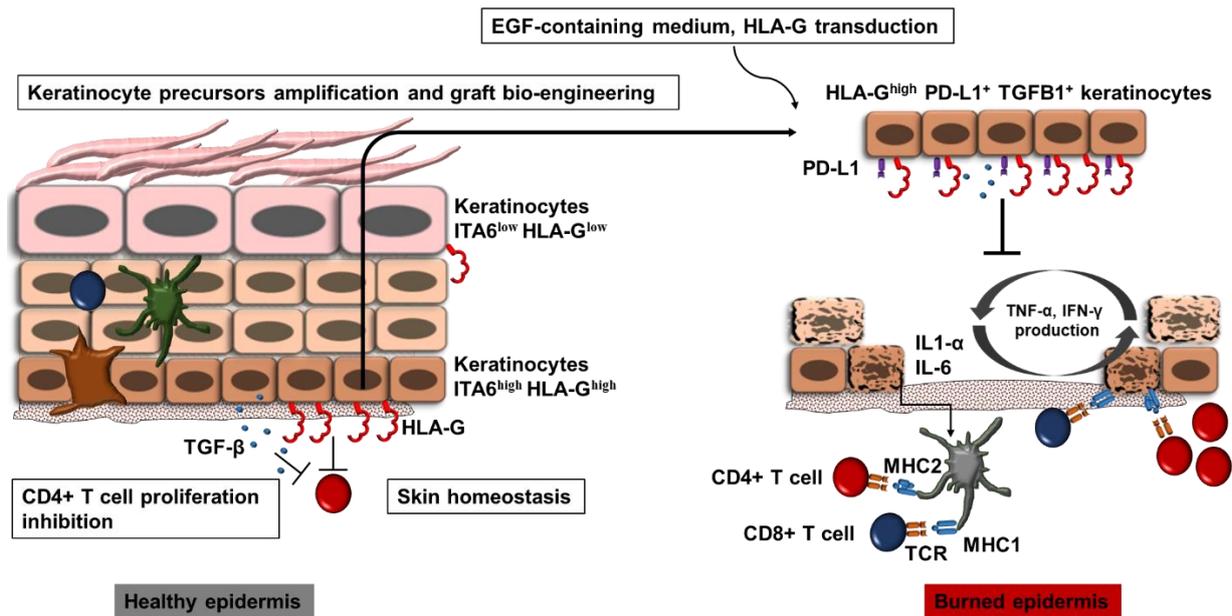


Figure 35) Propriétés immunitaires des kératinocytes, de leurs précurseurs, et bio-ingénierie de greffons.

Les kératinocytes inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4 + via l'expression des points de contrôle immunitaires HLA-G et PD-L1, ainsi que via la sécrétion de TGF-β. C'est la première fois que l'expression d'HLA-G est décrite au niveau protéique dans le tissu cutané sain. Mes travaux montrent également que les précurseurs des kératinocytes peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4+. Cela pourrait s'expliquer par une surexpression des points de contrôle immunitaires HLA-G et PD-L1. L'augmentation de l'expression de HLA-G, avec un vecteur inductible, ainsi que celle de PD-L1, par ajout d'EGF lors de l'amplification ex vivo, améliorent cette immunomodulation. Cela ouvre des perspectives pour la bio-ingénierie des greffes cutanées allogéniques transitoires.

CONCLUSION

Mes travaux montrent donc que les kératinocytes inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4 + via l'expression des points de contrôle immunitaires HLA-G et PD-L1, ainsi que via des facteurs solubles. C'est la première fois que l'expression d'HLA-G est décrite au niveau protéique dans le tissu cutané sain. L'augmentation de l'expression d'HLA-G améliore encore cette immunomodulation, ouvrant ainsi des perspectives pour la bio-ingénierie des greffes cutanées allogéniques transitoires. Mes travaux montrent également que les précurseurs des kératinocytes peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 +. Cela pourrait s'expliquer par une surexpression des points de contrôle immunitaires HLA-G et PD-L1, ouvrant ainsi des perspectives pour mieux comprendre l'échappement immunitaire des cellules tumorales de la peau et les pathologies auto-immunes cutanées.

ANNEXES

I. Revue (Manuscrit en cours de soumission)

1 **REVIEW ARTICLE**

2

3 **Skin immunity and tolerance: focus on epidermal keratinocytes**

4

5

6

7 **Guillaume Mestrallet^{1,2}, Nathalie Rouas-Freiss^{3,4}, Joel LeMaout^{3,4}, Nicolas O.**

8 **Fortunel^{1,2*}, Michele T. Martin^{1,2*}**

9

10 ¹ CEA, Laboratory of Genomics and Radiobiology of Keratinopoiesis, Institute of Cellular
11 and Molecular Radiobiology, Francois Jacob Institute of Biology, DRF, 91000, Evry, France;

12 ² Université Paris-Saclay, 91190, Saint-Aubin, France

13 ³ CEA, DRF, Francois Jacob Institute of Biology, Hemato-Immunology Research
14 Department, Saint-Louis Hospital, Paris, France.

15 ⁴ U976 HIPI Unit, IRSL, Université Paris, Paris, France

16

17 guillaume.mestrallet@cea.fr (GM)

18 Nathalie.Rouas-Freiss@cea.fr (NRF)

19 Joel.LeMaout@cea.fr (JLM)

20

21 * Corresponding authors

22 Michele T. Martin. Tel: 33 1 60 87 34 91; E-mail: michele.martin@cea.fr (M.T.M.)

23 Nicolas O. Fortunel. Tel: 33 1 60 87 34 92; E-mail: nicolas.fortunel@cea.fr (N.O.F.)

24

25

26 Key words: immunity, tolerance, human skin, keratinocytes, resident immune cells, HLA-G

27

28

29

30

31

32

33

34 **Abstract:**

35 Although the role of epidermal cells in skin regeneration has been extensively documented,
36 their functions in immunity and tolerance mechanisms are largely under-estimated. The aim of
37 the present review was to outline the current knowledge on the resident immune cells of
38 hematopoietic origin hosted in epidermis, and then to focus on the involvement of keratinocytes
39 in the complex skin immune networks acting in homeostasis and regeneration conditions. Based
40 on this knowledge, the mechanisms of immune tolerance are reviewed. In particular, strategies
41 based on immunosuppression mediated by HLA-G are highlighted, as recent advances in this
42 field open up perspectives in epidermis substitute bioengineering for temporary and permanent
43 skin replacement strategies.

44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66

67 **Highlights**

68

69 Skin constitutes a reservoir of resident immune cells, notably hosting T cells and Langerhans
70 cells. In the epidermis, the most abundant T cell subtype is $\alpha\beta$ CD8⁺ memory T cells.

71

72 Keratinocytes can present antigens to T cells *via* HLA molecule expression and drive the
73 formation of Th1 cell clusters. Furthermore, they can promote the maintenance of an immune
74 memory through epigenetic mechanisms and expression of cytokines and membrane receptors.

75

76 As immune rejection is still a major issue in allogeneic skin cell therapy and grafting, strategies
77 aiming at targeting HLA gatekeepers are explored in native skin keratinocytes and keratinocytes
78 generated by lineage-oriented differentiation of pluripotent stem cells.

79

80 Overexpression of the HLA-G1 and PD-L1 immune checkpoint molecules promotes
81 immunosuppressive properties in human keratinocytes, leading to inhibition of CD4⁺T cell
82 proliferation.

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101 **Outstanding questions**

102

103 Epigenetic mechanisms driving an immune memory and controlling inflammation have been
104 discovered in murine keratinocytes, and deserve future studies to be extended to human cells.

105

106 Although MHC components are widely expressed by epidermal keratinocytes, a basal
107 keratinocyte sub-population expresses neither MHC1 nor MHC2, which points on the necessity
108 to refine the knowledge of keratinocyte immune patterns in function of their differentiation
109 status. Investigations conducted at the single-cell level will certainly bring advances regarding
110 this question.

111

112 Preservation of functional keratinocyte stem cells during the successive steps of skin substitute
113 bioengineering processes is a prerequisite for the long-term survival of grafts. This critical point
114 still requires intensive investigation, notably concerning the specific immune properties of
115 epidermal stem cells and their possible contribution to the regulation of inflammatory reactions.

116

117 Current clinical strategies available for permanent skin replacement are based on historical
118 processes of graft bioengineering that use autologous keratinocytes. Ongoing investigations on
119 cellular and molecular tolerance mechanisms open new avenues to explore the possible uses of
120 allogeneic cells, and progress towards the setting of universal donor cell banks.

121

122 Immune checkpoint molecules, including programmed death-ligand 1 (PD-L1), cytotoxic T-
123 lymphocyte antigen 4 (CTLA4) and human leucocyte antigen G (HLA-G), reduce immune
124 activity in skin. As PD-L1 and HLA-G1 are expressed by keratinocytes, they represent
125 epidermal targets currently considered for the development of immune-suppressive strategies.

126

127 Research on immune-suppressive strategies also include genome editing, notably targeting
128 HLA genes in pluripotent cells, which deserve further developments.

129

130 Langerhans cells may also be involved in tolerance mechanisms, although this is disputed and
131 require further investigations.

132

133

134

135 **Glossary**

136

137 **Cytokines**

138 Soluble factors with immune properties. They include interleukins (ILs) and interferons (IFNs).

139 According to the context, they are pro or anti-inflammatory.

140

141 **Dendritic cells**

142 Skin-resident immune cells that allow antigen presentation to T cells and can migrate into

143 lymph nodes.

144

145 **Immune checkpoints**

146 Molecules reducing the immune activities of hematopoietic cells. They include Programmed

147 death-ligand 1 (PD-L1), Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) and Human leucocyte

148 antigen G (HLA-G).

149

150 **Langerhans cells**

151 Immune cells in the epidermis that allow antigen presentation to T cells and can migrate into

152 lymph nodes.

153

154 **Major histocompatibility complex**

155 A locus on vertebrate DNA containing genes that code for cell surface proteins essential for the

156 adaptive immune system. MHC1 allow antigen presentation to CD8+ T cells and MHC2 to

157 CD4+ T cells.

158

159 **Pathogen-associated molecular patterns**

160 Pathogens are identified *via* pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are

161 recognized by the pattern recognition receptors.

162

163 **Pattern recognition receptors**

164 Cellular receptors allowing pathogen recognition. They include Toll-like receptors (TLRs) and

165 Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs).

166

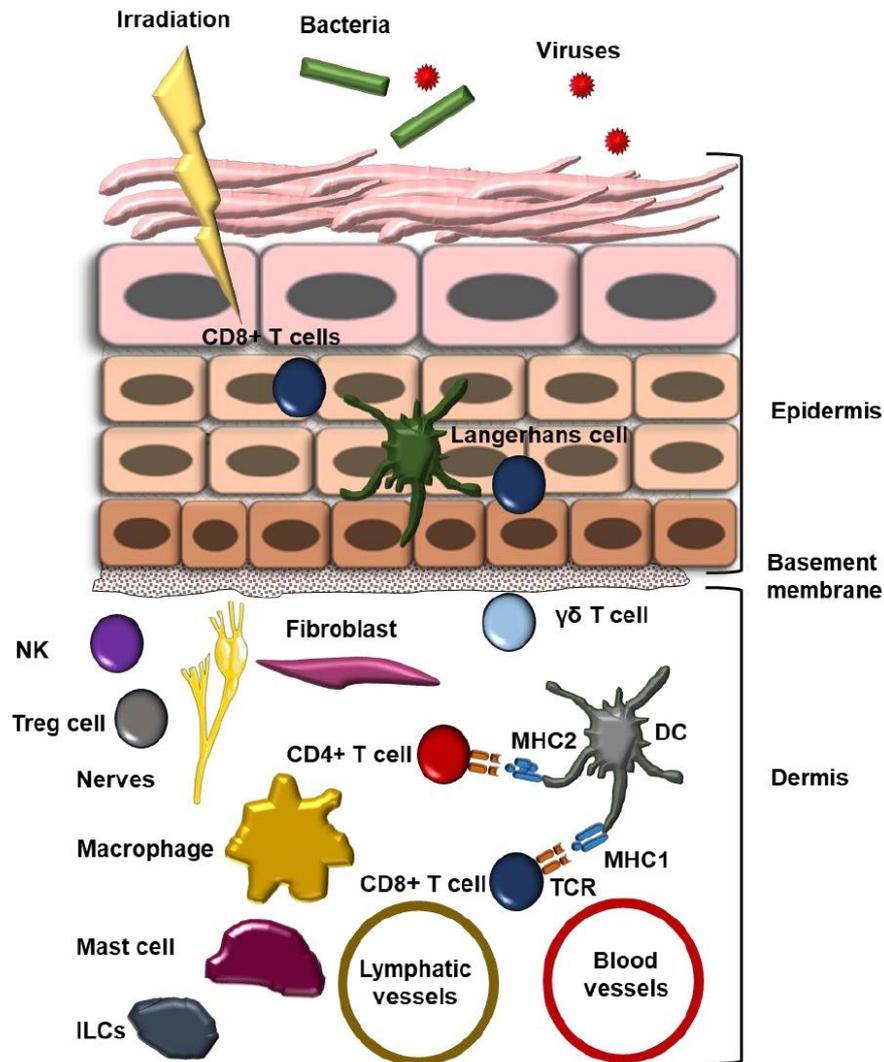
167 **Stem cells**

168 Cells with a high regeneration potential. In skin, they include tissue stem cells from
169 interfollicular epidermis and hair-follicle stem cells. Embryonic stem cell (ESC) and induced
170 pluripotent stem cells (iPSCs) are pluripotent cells, which can be differentiated towards the
171 keratinocyte lineage.
172
173

174 **1. The skin cells ensure tissue protection and homeostasis**

175 The skin represents 15% of the body weight, provides an exchange surface between the
176 organism and its environment, and protects internal organs. It also helps to maintain
177 homeostasis by preventing water loss and regulating body temperature. Epidermis, the
178 outermost layer of skin, is composed of keratinocytes (90% of cells). It also contains
179 melanocytes (5%) and rare Merkel cells. This barrier protects the underlying skin layers from
180 injury, UV damage, harmful chemicals, and infections by pathogens. The dermis, separated
181 from epidermis by the dermo-epidermal junction, is composed of extracellular matrix secreted
182 by fibroblasts. It contains blood vessels, glands and nerve cells. Its main functions are to deliver
183 oxygen and nutrients to the epidermis and to regulate body temperature.

184 Adult skin contains resident immune cells and recruits immune cells from the periphery
185 in case of infection, burns, or exposure to chemicals or radiation. Resident immune cells are
186 found in all layers of the tissue, which therefore constitutes a reservoir of immune cells [1]
187 (Figure 1), notably of T cells. It was estimated that the adult skin contains 20 billion T cells,
188 nearly twice the number present in the blood [2]. In addition, resident non-hematopoietic skin
189 cells have immune functions, which are not fully elucidated.



190

191 **Figure 1: Cellular components of the skin immune system**

192 The skin is a barrier that protects from injury, pathogens, chemicals, and radiation. The local
 193 immune system includes resident immune cells and cells recruited from the periphery.

194 The epidermis hosts effector cells, such as CD8+ T cells and Langerhans cells, that migrate to
 195 lymph nodes to perform antigen presentation. In the dermis, Treg cells, NK, CD4+ T cells, mast
 196 cells, ILCs, macrophages and dendritic cells participate to immune activities. In addition,
 197 resident non-hematopoietic skin cells have immune functions, which are not fully elucidated.

198

199 **2. The epidermis is the seat of immune activities**

200 **2.1 Immune cells reside in epidermis**

201 As a direct interface with the environment, the epidermis hosts different immune cell, and
 202 notably tissue-resident memory $\alpha\beta$ CD8+ memory T cells, dendritic epidermal gamma delta T-
 203 lymphocytes ($\gamma\delta$ T cells), and Langerhans cells (LCs, 5% of epidermal cells). LCs originate
 204 prenatally from erythro-myeloid progenitors and permit antigen presentation to T cells [3].
 205 They are in contact with keratinocytes via their dendrites and with dendritic cells located below
 206 the dermo-epidermal junction. LCs produce inflammatory mediators such as interferons (IFNs),
 207 and enable presentation of antigens to other immune actors such as T cells [4]. LCs express
 208 CD1a [5], CD207 and MHC class II (MHC2), and have cytoplasmic Birbeck granules. In
 209 immune reactions, they express MMP proteases, translocate to the dermis, and migrate to lymph
 210 nodes, promoting T-cell recruitment [1], activation of CD8+ T cells, and differentiation of type
 211 2 T-helper lymphocytes (Th2) [6]. In summary, LCs exert a regulatory role in the lymphocyte
 212 activation cascade. In case of tissue destruction, LCs are renewed by differentiation of
 213 monocytes recruited at the lesion site [7]. LCs are able to divide and self-maintain, like
 214 macrophages, and to migrate to lymph nodes and stimulate T cells, as do dendritic cells (DCs),
 215 thus sharing both macrophage and DC properties.

216 Within the skin reservoir of resident T cells, the most frequent subtype is $\alpha\beta$ CD8+
 217 memory T cells, which are localized in the basal and supra-basal layers next to LCs [8]. These
 218 cells express the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), a skin-homing receptor [2],
 219 and different chemokine receptors (CCR4, CCR8 and CCR10) [9]. They also express the IL2
 220 receptor (CD25) and HLA-DR [10]. Tissue-resident innate lymphoid cells (ILCs) have been
 221 recently described in epidermis, predominantly expressing ILC3/LTi-related genes or genes
 222 associated with ILC2s, but their role remains to be investigated [11].

223

224 **2.2 Molecular effectors related to immune functions are expressed by keratinocytes**

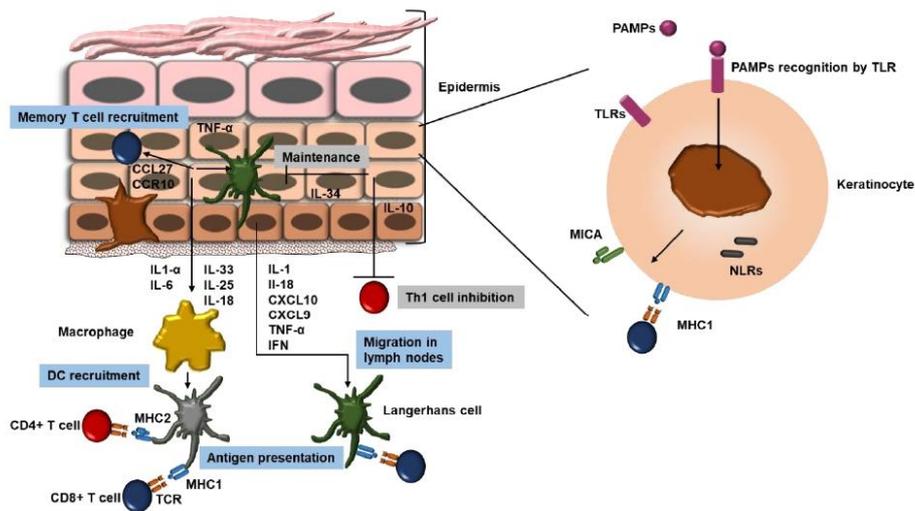
225 *Membrane markers*

226 Pathogens are identified *via* pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are
 227 recognized by the pattern recognition receptors (PRRs) [12]. Major PRRs are toll-like receptors
 228 (TLRs), which are expressed as eight isoforms in keratinocytes [13] (Figure 2). Keratinocytes
 229 also express nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs). NLRs
 230 signaling leads to activation of the inflammasome via NLRP3, an intracellular sensor that
 231 detects microbial motifs, and the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and
 232 IL-18. NOD1 and NOD2 are expressed by keratinocytes, and drive inflammatory signals via

233 the NF- κ B and MAPK pathways [8]. TLRs and NLRs promote detection of alarmins released
234 from or exposed at the surface of damaged cells [9]. The binding of PAMP to TLRs leads to
235 the production of cytokines (IL-1 β , IL-18, CXCL9 and CXCL10), and the recruitment of
236 immune cells.

237 TLRs recognize different ligands, enabling efficient pathogen detection. TLR1, 2, 6 and
238 10 recognize lipoproteins, while TLR3, TLR4, and TLR5 respectively recognize RNA,
239 bacterial LPS, and flagellin. TLR7, 8 and 9 recognize RNA and DNA. Most TLRs have a pro-
240 inflammatory function except TLR10 [14]. NF- κ B signaling is the major pathway driving TLR-
241 mediated cellular response, leading to the production of IFNs [15]. This cascade triggers LC
242 migration to the lymph nodes, inducing recruitment of T cells expressing the skin diapedesis
243 marker CLA [16]. IFN- γ up-modulate TLR3 expression in keratinocytes, which in turn increase
244 their secretion of IL-6 and IL-8 and defensins, in the presence of the immune stimulant molecule
245 polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) [17]. Binding of poly I:C to TLR3 has been reported
246 to stimulate keratinocyte production of IL-1 β and IL-18, promoting DC activation and T cells
247 differentiation into Th1 [9]. The complex signaling network of TLR3 in keratinocytes involves
248 the production of the chemokines CXCL9 and CXCL10, and of the cytokines CCL20 and
249 CCL27, which respectively promote the recruitment of Th1 and memory T cells [9].

250 Keratinocytes express MHC components, allowing antigen recognition, and notably
251 MHC1-related cell-surface molecules (MICA, MICB and ULBP) that mediate their interactions
252 with CD8⁺ T and $\gamma\delta$ T lymphocytes through the natural killer group 2D receptor (NKG2D).
253 NKG2D is an immune reaction promoter expressed by resident or infiltrating immune cells in
254 the skin [18]. A key functional link is that ligand binding to TLRs induces the expression of
255 some HLA molecules [13]. For example, poly I:C, a TLR3 ligand, induces the expression of
256 HLA-ABC and HLA-DR. Similarly, flagellin, a TLR5 ligand, induces the expression of HLA-
257 ABC, and LPS, ligands of TLR4, induce the expression of HLA-DR. MHC components are not
258 present in all keratinocytes, as a basal sub-population expresses neither MHC1 nor MHC2 [19].
259



260

261 **Figure 2: Keratinocyte interactions with immune cells**

262 Keratinocytes recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through TLRs and
 263 NLRs receptors and stimulate the recruitment of resident memory T cells, dendritic cells and
 264 circulating T cells through pro-inflammatory cytokine secretion. On the counterpart, they are
 265 able to promote tissue homeostasis through anti-inflammatory cytokine secretion (IL-34, IL-
 266 10).

267

268 *Secreted factors*

269 Keratinocytes secrete antimicrobial peptides (AMPs), damage-associated molecular
 270 patterns (DAMPs), and the defensin peptides that ensure direct antimicrobial functions.
 271 Keratinocytes secrete antimicrobial proteins (S100) and peptides (cathelicidins) [9]. Secretion
 272 of AMPs by keratinocytes during infection increases following the production of IL-17A and
 273 IL-22 by Th17 cells [20] and in response to IFN- γ [21], which amplifies the inflammatory
 274 response.

275 Secreted mediators (*Table 1*) include pro or anti-inflammatory cytokines, CXC and CC
 276 type chemokines and growth factors [22]. These mediators constitute the signaling network that
 277 links epidermal and dermal cells together with resident immune cells to maintain skin
 278 homeostasis and the defenses against environment insults.

279

280

281

| Pro-inflammatory | Anti-inflammatory | CXC | CC | Growth factors |
|------------------|-------------------|--------|-------|----------------|
| IL-1 α | IL-1Ra | CXCL8 | CCL2 | TGFA |
| IL-1 β | TGFB | CXCL2 | CCL13 | PDGF |
| TNF- α | IL-10 | CXCL3 | CCL5 | VEGF |
| IFN- γ | | CXCL10 | CCL20 | CSF |
| IL-12 | | | | CSF2 |
| IL-18 | | | | CSF3 |
| IL-6 | | | | |
| IL-7 | | | | |
| IL-15 | | | | |

282

283 **Table 1. Keratinocytes secrete immune factors.**

284

285 **2.3 Keratinocytes and immune cells directly communicate**286 *Via cell-cell contact*

287 Keratinocytes have the capacity through MHC1 molecules to present antigens to memory
 288 CD4+ and CD8+ T cells, inducing cytotoxic defenses and the production of inflammatory
 289 cytokines [23], notably following stimulation by IFN- γ . Antigen presentation via MHC2
 290 molecules was documented in a mouse skin model where the MHC2 of interfollicular
 291 keratinocytes drives the formation of Th1 cell clusters [24]. Keratinocytes express adhesion
 292 molecules such as ICAM-1, which, with its B7 costimulatory molecules, promotes the
 293 recruitment of lymphocytes [25].

294 Keratinocytes exert a role in the coordination of differentiation and functions of effector
 295 T cells, natural killer T (NKT) cells [26] and $\gamma\delta$ T cells [27]. The detection of target cells by
 296 NKT and $\gamma\delta$ T cells involves the NKG2D receptor, which recognizes the MICA and MICB
 297 proteins. NKG2D-mediated signaling leads to the target cell lysis [28]. Overexpression of
 298 MICA and MICB in damaged keratinocytes drives a recognition signal by NKT and $\gamma\delta$ T cells,
 299 and their lysis [9]. A major role of NKT cells is protection against microbial infection, through
 300 recognition of bacterial glycolipids [26].

301

302 *Via secretion of cytokines and chemokines*

303 Primary cytokines (IL-1, TNF- α) are secreted by keratinocytes in the initial stage of
 304 inflammatory reactions. Interleukin-1 exists in three different isoforms (IL-1 α , IL-1 β and IL-
 305 1Ra), which bind to the same receptors (IL-1R1 and IL-1R2). Keratinocytes produce and store

12

306 active IL-1 α [29], while they produce an inactive pro-IL-1 β form that is cleaved and activated
307 by caspase-1 synthesized by LCs, mast cells, monocytes, macrophages and neutrophils. IL-1 α
308 promotes its own expression as well as that of other pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8,
309 TNF- α). It induces expression of adhesion molecules promoting tissue infiltration by immune
310 cells. Dysregulations of IL-1 signaling in keratinocytes were associated with mutations in the
311 *NLRP1* inflammasome sensor gene in patients with inflammatory skin syndromes [30].
312 Secretion of IL-1 β induced via the TLR4-MAPK pathway in keratinocytes promotes early skin
313 wound healing [31]. Production of IL-1 and IL-18 by keratinocytes following exposure to UV
314 promotes recruitment of Th1 and Th2 cells, which themselves produce interleukins, TNF- α and
315 CSF2 [32]. IL-18 is produced by keratinocytes in an inactive form [33]. Following UV
316 exposure, inflammasome activation is driven by the stress sensor NLRP3, leading to pro-IL-18
317 cleavage by caspase-1 [34]. Moreover, keratinocytes production of IL-6 promotes the
318 proliferation and differentiation of B-cells and cytotoxic T cells [35].

319

320 Transforming growth factor beta (TGFB) is produced by epidermal keratinocytes, and
321 plays an important role in skin remodeling after damage [36]. TGFB inhibits macrophage
322 differentiation, monocyte and CD8+ T-cell activity, and presentation of antigens by LCs [37].
323 In keratinocytes, TGFB inhibits proliferation of CD4+ T cells through Smad3 signaling [38].
324 In inflammatory contexts, TGFB promotes leukocyte adhesion and chemotaxis, and activate
325 DC migration into lymph nodes, promoting recruitment of T cells in the skin [36].

326 IL-33 may either increase or inhibit inflammation. The inactive form, pro-IL-33, is
327 located in the cell nucleus where it suppresses the transcription of pro-inflammatory cytokines
328 [39]. In keratinocytes, nuclear IL-33 inhibits epidermis differentiation genes in atopic dermatitis
329 lesions, which exacerbates skin barrier dysfunction [40]. The active form after cleavage allows
330 TH2 cytokines signaling via the IL-1 receptor ST2. In keratinocytes, IL-33 secretion is induced
331 by cytokines and by pathogens such as *S aureus* [41]. IL-25, like IL-33 and IL-1 α , is stored in
332 keratinocytes and secreted under the action of proteases during damage, contributing to
333 activation of the immune response [42]. Keratinocytes also produce the anti-inflammatory
334 cytokine IL-10 [43], which may reduce the formation of large scars [44].

335 Chemokines are of great importance for the recruitment and mobility of immune cells
336 within tissue [45]. They contribute to the regulation of immune cell activation and
337 differentiation [46]. Keratinocytes express chemokines of both the CC and CXC families. CXC
338 chemokines attract neutrophils during healing, while CC chemokines attract a wider range of
339 leukocytes: basophils, eosinophils, T cells and DCs [47].

13

340 In the context of tissue injury, cytokines and chemokines contribute to skin repair through
341 interaction with keratinocyte stem cells. In mouse skin, resident Tregs activate hair-follicle stem
342 cells (HFSCs) by secreting the CXCL5-IL-17- IFN- γ signal. In response, HFSCs are recruited
343 and migrate to the interfollicular epidermis, and contribute to epithelial-barrier repair at the
344 injury site [48]. Interactions between keratinocytes and effector T cells have reciprocal impacts:
345 keratinocytes promote the recruitment of effector T cells within the skin, and these in turn
346 produce growth factors such as CTGF, FGF9, KGF and IGF1, that promote healing [49].

347

348 *Other communication mechanisms*

349 Keratinocytes are able to communicate with other cells via the secretion of extracellular
350 vesicles containing cargoes of different types of molecules, including lipids, proteins and
351 nucleic acids [50]. Epigenetic mechanisms are also emerging, as illustrated by the study of the
352 Mi-2 β chromatin remodeler. In mouse skin, this factor exerts a direct control of regulatory T
353 cells by inhibiting the pro-inflammatory TSLP secretion by keratinocytes [51].

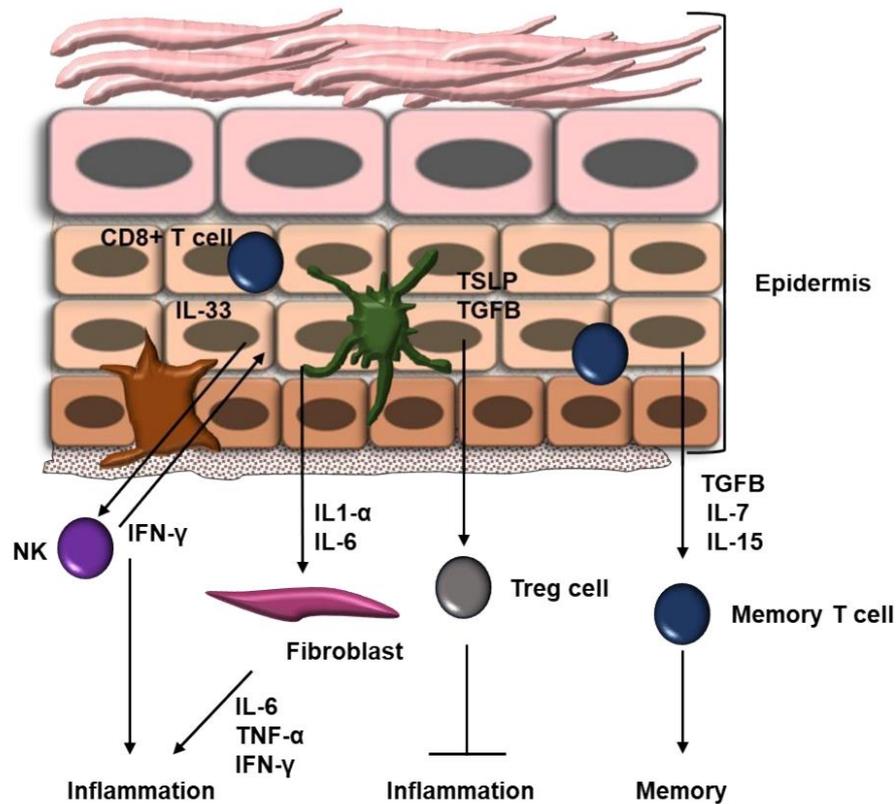
354

355 **2.4 Keratinocytes mediate inflammation**

356 Keratinocytes are involved in the initiation of the inflammatory processes, through the
357 release of soluble mediators, including IFN- γ (Figure 3). Keratinocytes are activated before
358 ‘true’ immune cells at the onset of inflammation [25]. IFN- γ has a central pro-inflammatory
359 function in the skin, and a single intradermal injection of IFN- γ is sufficient to induce an
360 inflammatory state, driven by a cascade of cytokine production [52]. Keratinocytes are the
361 primary cellular actors in a positive loop, as following exposure to IFN- γ , these cells increase
362 their secretion of IL-33, which in turn increases their production of IFN- γ [53].

363 Studies in a mouse model showed that a subpopulation of keratinocytes that expresses
364 PD-L1 also favors the control of the extent of inflammation [54]. Human keratinocytes promote
365 local but not systemic inflammation, through the expression of thymic stromal lymphopoietin
366 (TSLP), a factor involved in the coordination of Treg immune functions. By binding to its
367 receptor on Tregs, TSLP maintain local inflammation while inhibiting lethal systemic
368 inflammation [9]. In addition, presentation of autoantigens by keratinocytes induce T-cell
369 tolerance, and is a means of avoiding, rather than stimulating, autoimmune reactions in contexts
370 of local inflammation [51].

371



372

373 **Figure 3 : Keratinocytes participate to the regulation of inflammation and the**
 374 **maintenance of skin immune memory**

375 Keratinocytes promote inflammation through IL-1, IL-3 and IL-6 secretion, but also participate
 376 to its limitation through TSLP and TGFB secretion. Keratinocytes can promote the maintenance
 377 of an immune memory through various mechanisms, including TGFB, IL-7 and IL-15
 378 secretion.

379

380 **2.5 Keratinocytes promote immune memory**

381 The skin hosts resident memory T cells that favor rapid response to infection by a
 382 pathogen to which the individual has already been exposed [55]. A cutaneous immune response
 383 model in three successive stages was proposed (Figure 3) [56]. First, following pathogen entry
 384 into tissue, resident specific memory T cells resulting from a previous exposure react by
 385 transcriptional changes and secretion of activating factors. Second, circulating memory T cells

15

386 are recruited. And third, skin DCs presenting antigens of the pathogen migrate to lymph nodes,
 387 where they drive neo-production of specifically targeted effector T cells, which are recruited in
 388 the infection site in the skin, within 24 to 72 hours [57]. Keratinocytes promote the long-term
 389 maintenance of a memory T-cell pool within the skin, through secretion of IL-7, IL-15 and
 390 TGFB, favoring a rapid defense response in case of a new aggression by a previously
 391 encountered pathogen [9]. A memory mechanism has been identified in murine epidermal stem
 392 cells after acute inflammation, that does not require skin-resident macrophages or T cells [58].
 393 Stem cells maintain a prolonged epigenetic memory to acute inflammation by maintaining
 394 chromosomal accessibility to stress response genes, which, in case of secondary stress, enables
 395 specific inflammasome genes fast transcription, including the *Aim2* gene, which activates
 396 caspase-1 and IL-1 β .

397

398 **3. The regulation of immunity and tolerance are key points to implement skin cell and** 399 **gene therapy**

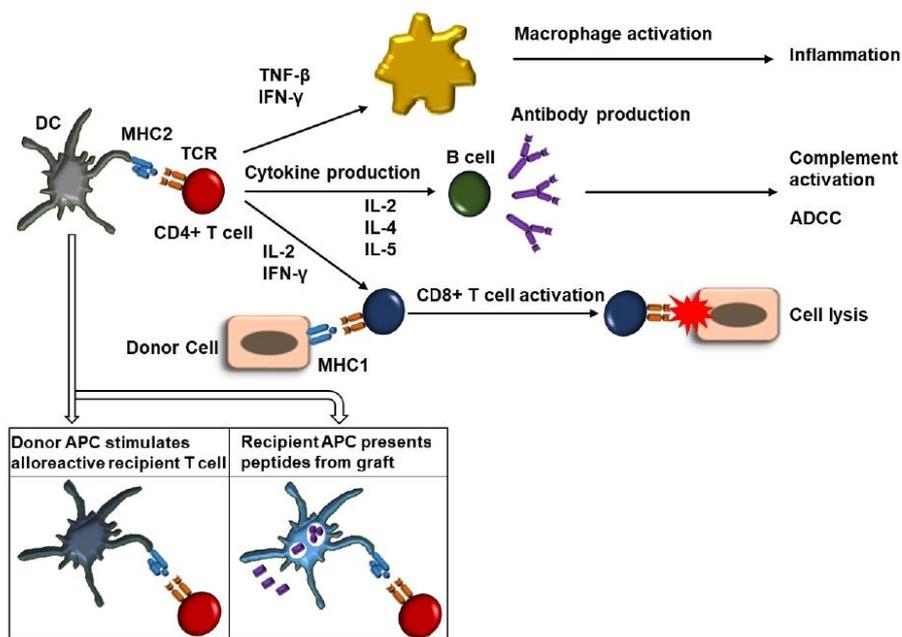
400 The high regenerative potential that characterizes adult keratinocyte stem cells has
 401 enabled the development of skin replacement strategies based on autologous skin substitute
 402 grafting, which permits the permanent skin reconstitution in patients with third-degree burns
 403 affecting up to 90% of the body surface [59]. Notably, a clinical trial using keratinocyte stem
 404 cells and gene therapy succeeded in regenerating the entire epidermis of a child suffering from
 405 epidermolysis bullosa [60]. Preservation of functional keratinocyte stem cells during the
 406 successive steps of the process is a prerequisite for the long-term lifespan of the graft, a point
 407 that still requires intensive investigation [61], including the immune properties of stem cells.

408 Alternatively, allogenic keratinocytes may constitute frozen cell banks for the
 409 development of standardized skin substitute production, available immediately if needed.
 410 Currently, allogenic keratinocytes are only suited for the bioengineering of temporary
 411 cutaneous bio-dressings, the problem of immune rejection limiting any long-term
 412 reconstitution. Such temporary dressings are an option for the treatment of chronic venous leg
 413 ulcers and diabetic foot ulcers, where the living cells of the allogenic graft stimulate
 414 regenerative mechanisms and contribute to restoring the patient's skin healing functions [62].
 415 In addition to native keratinocytes obtained from skin biopsies, keratinocytes generated by
 416 differentiation of pluripotent embryonic stem cell (ESC) lines have been investigated as a
 417 source of allogenic cells for skin-substitute bioengineering [63].

418 Transplant rejection is explained by the allelic differences between donor and recipient at
 419 the level of the polymorphic loci of three classes of histocompatibility antigens: the ABO blood

420 group, and the major (MHC) and minor (mHA) histocompatibility complexes [64]. In this
 421 regard, the recognition of allo-HLA antigens by recipient T cells is the central event initiating
 422 allograft rejection. This alloantigen recognition occurs via two mechanisms: the direct and the
 423 indirect allorecognition pathways. Direct recognition refers to recognition by T cells of
 424 determinant peptides on intact donor MHC molecules displayed on the surface of the donor
 425 antigen-presenting cell (APC), while indirect recognition refers to recognition of determinant
 426 allo-peptides presented by the self MHC on the recipient APC. Secretion of anti-HLA
 427 antibodies directed against the HLA donor system lead to graft rejection via recruitment of
 428 phagocytes or activation of the complement system [65] (Figure 4). Experimental approaches
 429 have been developed to prevent allogeneic skin graft rejection. Rapamycin, an inhibitor of T-
 430 cell proliferation, inhibited rejection in a mouse model [66] in association to IL-2, which
 431 controls Treg activity and promotes immune tolerance. There have been a few studies, in a
 432 small number of burn patients, using immunosuppressants (methylprednisolone, cyclosporine,
 433 prednisone, anti-thymocyte globulin and azathioprine), but this approach is still very limited
 434 [67].

435



436

437 **Figure 4: Immune mechanisms implicated in allograft rejection**

438 Transplant rejection is mainly explained by the allelic differences between donor and recipient
439 major (MHC) histocompatibility complexes. The alloantigen recognition by recipient T cells
440 occurs via two mechanisms: the direct and the indirect allorecognition pathways. Direct
441 recognition refers to recognition by T cells of determinant peptides on intact donor MHC
442 molecules displayed on the surface of the donor antigen-presenting cell (APC), while indirect
443 recognition refers to recognition of determinant allo-peptides presented by the self MHC on the
444 recipient APC. Secretion of anti-HLA antibodies directed against the HLA donor system lead
445 to graft rejection via recruitment of phagocytes or activation of the complement system.

446

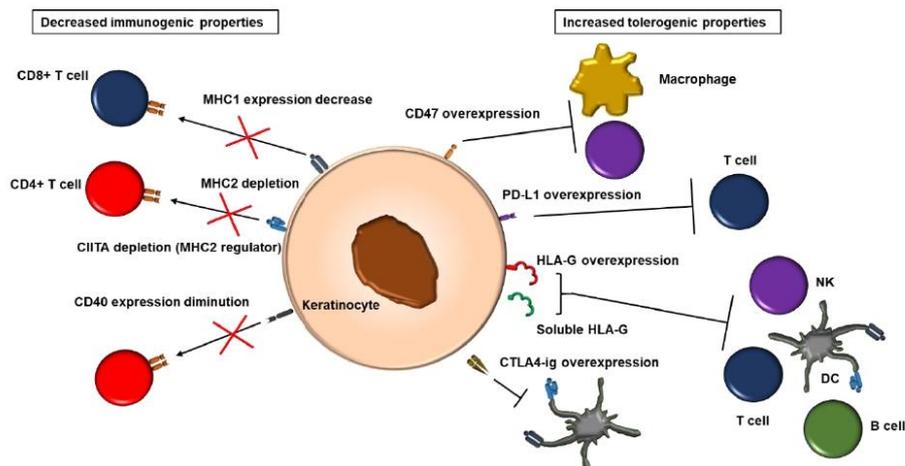
447 **4. New strategies to promote tolerance for skin cell and gene therapy are required**

448 *Reducing antigen presentation*

449 HLA gene genome-editing has been implemented in induced pluripotent stem cells
450 (iPSCs) to generate universal donor stem cell [68]. One strategy consisted in producing pseudo-
451 homozygous cells for the HLA class I genes, from heterozygous donors, by editing the targeted
452 allele. A second approach, taking account of the pivotal role of HLA-C in the suppression of
453 NK cells, consisted in suppressing HLA-A and HLA-B while retaining the HLA-C haplotype,
454 increasing compatibility. In both cases, genome-edited cells are able to suppress T-cell and NK
455 activity, while preserving HLA expression and antigen presentation. This strategy can be
456 combined to MHC2 reduction by depletion of CIITA (Figure 5-Key Figure).

457 Alternatively, iPSC lines overexpressing the immune-suppressive molecule CD47
458 together with decreased MHC1 and MHC2 expression have been bioengineered to generate
459 hypo-immunogenic derivatives that attenuate rejection [69]. In this strategy, genome-editing
460 comprises overexpression of *CD47* cDNA, which inhibits phagocytosis and NK activity. It is
461 combined with CRISPR directed against B2M to decrease MHC1 expression, and CRISPR
462 directed against the CIITA regulator to decrease MHC2 expression.

463



464

465 **Figure 5-Key Figure: Candidate immunomodulatory strategies in epidermis**

466 There are two main strategies to reduce keratinocyte immunogenicity for epidermis grafting.
 467 The first is to decrease MHC1, MHC2 and co-stimulatory molecules such as CD40, which
 468 limits the ability of keratinocytes to present antigens to T cells. The second is to overexpress
 469 immune checkpoints molecules (CD47, PD-L1, CTLA4 and HLA-G) to increase tolerance.

470

471 *Expression of immunosuppressive or immune checkpoint molecules*

472 The programmed death-ligand 1 (PD-L1) immune checkpoint molecule is known to bind
 473 to the PD-1 receptor expressed at the surface of T cells, inhibiting their activity [70] and
 474 autoimmune reactions [71]. PD-L1 promotes tolerance when expressed on the keratinocyte cell
 475 surface, by activating IL-10-secreting T cells [72] and limiting CD4+ T cell proliferation [73].

476 Bioengineering ESC lines expressing immunosuppressive molecules is an alternative
 477 approach for generating universal donor pluripotent stem cell sources. One approach was based
 478 on the immunosuppressive properties of CTLA4-Ig, a fusion protein between the extracellular
 479 domain of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and an immunoglobulin Fc portion that
 480 disrupts T-cell costimulatory pathways, combined to inhibition of T-cell activation via PD-L1
 481 [74]. High constitutive expression of both CTLA4-Ig and PD-L1 are needed to confer immune
 482 protection to hESCs and their derivatives, as these molecules are not sufficient individually.

483 HLA-G molecules are candidates for immunosuppression strategies. Inhibition of
 484 immune rejection via HLA-G was discovered as enabling maternal-fetal tolerance [75]. In order
 485 to generate a universal donor pluripotent stem cell source, human ESCs have been
 486 bioengineered to express a mutated form of HLA-G (mHLA-G) exhibiting enhanced mRNA

19

487 expression and stability, and increased level of cell-surface HLA-G protein [76]. Expression of
488 mHLA-G did not alter the capacity of ESCs to acquire keratinocyte markers in a culture
489 condition directing epithelial orientation. ESCs and their keratinocyte derivatives expressing
490 mHLA-G restrained lysis by allogeneic NK and proliferation of T cells in a mixed lymphocyte
491 reaction assay, demonstrating decreased immunogenicity.

492 The use of HLA-G tolerogenic properties was demonstrated in murine models of
493 allogeneic tissue transplantation and is supported by clinical data from transplanted patients [77].
494 HLA-G was identified as a predictive marker of low chronic rejection risk in lung transplant
495 recipients [77]. Detection of HLA-G expression in endomyocardial biopsies and sera of heart-
496 transplant recipients was associated with fewer rejection episodes and suppression of the
497 allogeneic T-cell proliferation response [78].

498 Concerning the skin, a transgenic mouse model expressing HLA-G was designed to
499 investigate immunosuppression in allogeneic skin transplantation. The survival of skin allografts
500 was increased, associated with attenuated T-cell activity [79]. HLA-G-mediated promotion of
501 immune-tolerance was explored using HLA-G-derived synthetic polypeptides as a coating on
502 microbeads suitable for intraperitoneal injection. Recipient mice that received polypeptide-
503 coated beads acquired tolerance to skin allografts, with prolonged graft survival [80]. In human
504 skin keratinocytes, overexpression of HLA-G by an inducible vector promoted inhibition of
505 CD4+ T cell proliferation, as recently described [73]. Thus, modulation of HLA-G expression
506 and function constitutes a promising research field for designing tools controlling
507 immunogenicity and immunosuppressive properties of human keratinocytes.

508

509 **Concluding remarks**

510 The role of epidermal cells in skin regeneration is well known, however their functions in
511 immunity and tolerance mechanisms are under-estimated. Keratinocytes are not merely a
512 structural barrier against environment insults, they are an active member of the sophisticated
513 immune ecosystem in the skin. They actively participate to protective immunity, are involved
514 in the initiation of the inflammatory processes, promote the long-term maintenance of a memory
515 T-cell pool and develop their own epigenetic stress memory. As keratinocytes are key players
516 in immune tolerance, they are major targets to overcome graft rejection for the various
517 approaches that aim at generating bioengineered banks of cells that could be used as universal
518 donor cell sources.

519

520 **References**

521

- 522 1 Tsepikolenko, A. *et al.* (2019) The regenerative potential of skin and the immune system. *Clin.*
523 *Cosmet. Investig. Dermatol.* 12, 519–532
- 524 2 Clark, R.A. *et al.* (2006) The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J. Immunol.*
525 *Baltim. Md 1950* 176, 4431–4439
- 526 3 Collin, M. and Milne, P. (2016) Langerhans cell origin and regulation. *Curr. Opin. Hematol.* 23,
527 28–35
- 528 4 Merad, M. *et al.* (2008) Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other
529 langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 935–947
- 530 5 Romani, N. *et al.* (2006) Epidermal Langerhans cells--changing views on their function in vivo.
531 *Immunol. Lett.* 106, 119–125
- 532 6 Klechevsky, E. *et al.* (2008) Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and
533 CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 29, 497–510
- 534 7 Ferrer, I.R. *et al.* (2019) A wave of monocytes is recruited to replenish the long-term
535 Langerhans cell network after immune injury. *Sci. Immunol.* 4,
- 536 8 Foster, C.A. *et al.* (1990) Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage
537 expressing alpha/beta T cell receptor. *J. Exp. Med.* 171, 997–1013
- 538 9 Klicznik, M.M. *et al.* (2018) Taking the lead – how keratinocytes orchestrate skin T cell
539 immunity. *Immunol. Lett.* 200, 43–51
- 540 10 Davis, A.L. *et al.* (1988) HLA-DR-positive leucocyte subpopulations in human skin include
541 dendritic cells, macrophages, and CD7-negative T cells. *Immunology* 65, 573–581
- 542 11 Kobayashi, T. *et al.* (2020) Skin-Resident Innate Lymphoid Cells - Cutaneous Innate Guardians
543 and Regulators. *Trends Immunol.* 41, 100–112
- 544 12 Janeway, C.A. (1989) Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology.
545 *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54, 1–13
- 546 13 Lebre, M.C. *et al.* (2007) Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and
547 9. *J. Invest. Dermatol.* 127, 331–341
- 548 14 Stappers, M.H.T. *et al.* (2015) Genetic Variation in TLR10, an Inhibitory Toll-Like Receptor,
549 Influences Susceptibility to Complicated Skin and Skin Structure Infections. *J. Infect. Dis.* 212,
550 1491–1499
- 551 15 Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511
- 552 16 Fuhlbrigge, R.C. *et al.* (1997) Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1
553 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 389, 978–981
- 554 17 Kajita, A. i. *et al.* (2015) Interferon-Gamma Enhances TLR3 Expression and Anti-Viral Activity in
555 Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 135, 2005–2011
- 556 18 Raulet, D.H. (2003) Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* 3,
557 781–790
- 558 19 Matic, M. (2005) A Subpopulation of Human Basal Keratinocytes Has a Low/Negative MHC Class
559 I Expression. *Hum. Immunol.* 66, 962–968
- 560 20 Liang, S.C. *et al.* (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and
561 cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203, 2271–2279
- 562 21 Moafi, M. *et al.* (2017) Comparison of pro-inflammatory cytokines of non-healing and healing
563 cutaneous leishmaniasis. *Scand. J. Immunol.* 85, 291–299
- 564 22 Albanesi, C. *et al.* (2005) Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr. Drug Targets*
565 *Inflamm. Allergy* 4, 329–334
- 566 23 Black, A.P.B. *et al.* (2007) Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-
567 specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 1485–1493
- 568 24 Tamoutounour, S. *et al.* (2019) Keratinocyte-intrinsic MHCII expression controls microbiota-
569 induced Th1 cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* DOI: 10.1073/pnas.1912432116

- 570 25 Griffiths, C.E. and Nickoloff, B.J. (1989) Keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)
571 expression precedes dermal T lymphocytic infiltration in allergic contact dermatitis (Rhus
572 dermatitis). *Am. J. Pathol.* 135, 1045–1053
- 573 26 Kronenberg, M. (2005) Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes.
574 *Annu. Rev. Immunol.* 23, 877–900
- 575 27 Hayday, A. and Tigelaar, R. (2003) Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat.*
576 *Rev. Immunol.* 3, 233–242
- 577 28 Strid, J. *et al.* (2009) Skin immune surveillance by T cells--a new order? *Semin. Immunol.* 21,
578 110–120
- 579 29 Corradi, A. *et al.* (1995) Synthesis and secretion of interleukin-1 alpha and interleukin-1
580 receptor antagonist during differentiation of cultured keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 217, 355–362
- 581 30 Zhong, F.L. *et al.* (2016) Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer
582 Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell* 167, 187-202.e17
- 583 31 Chen, L. *et al.* (2013) Toll-Like Receptor 4 Has an Essential Role in Early Skin Wound Healing. *J.*
584 *Invest. Dermatol.* 133, 258–267
- 585 32 Quist, S.R. *et al.* (2016) Kinetic Profile of Inflammation Markers in Human Skin In vivo Following
586 Exposure to Ultraviolet B Indicates Synchronic Release of Cytokines and Prostanoids. *Acta*
587 *Derm. Venereol.* 96, 910–916
- 588 33 Mee, J.B. *et al.* (2000) Human keratinocytes constitutively produce but do not process
589 interleukin-18. *Br. J. Dermatol.* 143, 330–336
- 590 34 Broz, P. and Dixit, V.M. (2016) Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and
591 signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 407–420
- 592 35 Akira, S. *et al.* (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 54, 1–78
- 593 36 Mohammed, J. *et al.* (2013) TGFβ1 Overexpression by Keratinocytes Alters Skin Dendritic Cell
594 Homeostasis and Enhances Contact Hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 133, 135–143
- 595 37 Hemmi, H. *et al.* (2001) Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes
596 by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int. Immunol.* 13, 695–704
- 597 38 Delisle, J.-S. *et al.* (2013) The TGF-β-Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and
598 proliferation of CD4 T cells. *Genes Immun.* 14, 115–126
- 599 39 Carriere, V. *et al.* (2007) IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-
600 associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 282–287
- 601 40 Dai, X. *et al.* (2021) Nuclear IL-33 Plays an Important Role in the Suppression of FLG, LOR,
602 Keratin 1, and Keratin 10 by IL-4 and IL-13 in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* DOI:
603 10.1016/j.jid.2021.04.002
- 604 41 Al Kindi, A. *et al.* (2021) Staphylococcus aureus second immunoglobulin-binding protein drives
605 atopic dermatitis via IL-33. *J. Allergy Clin. Immunol.* 147, 1354-1368.e3
- 606 42 Borowczyk, J. *et al.* (2021) IL-25 (IL-17E) in epithelial immunology and pathophysiology. *J.*
607 *Allergy Clin. Immunol.* DOI: 10.1016/j.jaci.2020.12.628
- 608 43 Moore, K.W. *et al.* (1993) Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165–190
- 609 44 Kieran, I. *et al.* (2013) Interleukin-10 reduces scar formation in both animal and human
610 cutaneous wounds: Results of two preclinical and phase II randomized control studies. *Wound*
611 *Repair Regen.* 21, 428–436
- 612 45 Moser, B. *et al.* (2004) Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends*
613 *Immunol.* 25, 75–84
- 614 46 Luther, S.A. and Cyster, J.G. (2001) Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat.*
615 *Immunol.* 2, 102–107
- 616 47 Lundahl, J. *et al.* (2012) IL-8 from Local Subcutaneous Wounds Regulates CD11b Activation.
617 *Scand. J. Immunol.* 75, 419–425
- 618 48 Mathur, A.N. *et al.* (2019) Treg-Cell Control of a CXCL5-IL-17 Inflammatory Axis Promotes Hair-
619 Follicle-Stem-Cell Differentiation During Skin-Barrier Repair. *Immunity* 50, 655-667.e4
- 620 49 Toulon, A. *et al.* (2009) A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J. Exp. Med.*
621 206, 743–750

- 622 50 Than, U.T.T. *et al.* (2019) Characteristics and roles of extracellular vesicles released by
623 epidermal keratinocytes. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* DOI: 10.1111/jdv.15859
- 624 51 Kashiwagi, M. *et al.* (2017) Direct control of regulatory T cells by keratinocytes. *Nat. Immunol.*
625 18, 334–343
- 626 52 Johnson-Huang, L.M. *et al.* (2012) A Single Intradermal Injection of IFN- γ Induces an
627 Inflammatory State in Both Non-Lesional Psoriatic and Healthy Skin. *J. Invest. Dermatol.* 132,
628 1177–1187
- 629 53 Seltmann, J. *et al.* (2013) Evidence for a regulatory loop between IFN- γ and IL-33 in skin
630 inflammation. *Exp. Dermatol.* 22, 102–107
- 631 54 Ritprajak, P. *et al.* (2010) Keratinocyte-Associated B7-H1 Directly Regulates Cutaneous Effector
632 CD8⁺ T Cell Responses. *J. Immunol.* 184, 4918–4925
- 633 55 Jiang, X. *et al.* (2012) Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ T(RM) cells
634 providing global skin immunity. *Nature* 483, 227–231
- 635 56 Nestle, F.O. *et al.* (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9,
636 679–691
- 637 57 Woodland, D.L. and Kohlmeier, J.E. (2009) Migration, maintenance and recall of memory T cells
638 in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 153–161
- 639 58 Naik, S. *et al.* (2017) Inflammatory memory sensitizes skin epithelial stem cells to tissue
640 damage. *Nature* 550, 475–480
- 641 59 Ronfard, V. *et al.* (2000) Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns
642 transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation* 70,
643 1588–1598
- 644 60 Hirsch, T. *et al.* (2017) Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells.
645 *Nature* 551, 327–332
- 646 61 Fortunel, N.O. *et al.* (2019) KLF4 inhibition promotes the expansion of keratinocyte precursors
647 from adult human skin and of embryonic-stem-cell-derived keratinocytes. *Nat. Biomed. Eng.*
648 DOI: 10.1038/s41551-019-0464-6
- 649 62 Stone, R.C. *et al.* (2017) A bioengineered living cell construct activates an acute wound healing
650 response in venous leg ulcers. *Sci. Transl. Med.* 9,
- 651 63 Guenou, H. *et al.* (2009) Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the
652 pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet Lond. Engl.* 374, 1745–1753
- 653 64 Bradley, J.A. *et al.* (2002) Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat. Rev.*
654 *Immunol.* 2, 859
- 655 65 Halloran, P.F. (2003) The clinical importance of alloantibody-mediated rejection. *Am. J.*
656 *Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 3, 639–640
- 657 66 Pilon, C.B. *et al.* (2014) Administration of Low Doses of IL-2 Combined to Rapamycin Promotes
658 Allogeneic Skin Graft Survival in Mice. *Am. J. Transplant.* 14, 2874–2882
- 659 67 Wendt, J.R. *et al.* (2004) Long-term survival of human skin allografts in patients with
660 immunosuppression. *Plast. Reconstr. Surg.* 113, 1347–1354
- 661 68 Xu, H. *et al.* (2019) Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with
662 Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell* DOI: 10.1016/j.stem.2019.02.005
- 663 69 Deuse, T. *et al.* (2019) Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade
664 immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat. Biotechnol.* DOI:
665 10.1038/s41587-019-0016-3
- 666 70 Fife, B.T. and Bluestone, J.A. (2008) Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via
667 the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol. Rev.* 224, 166–182
- 668 71 Keir, M.E. *et al.* (2008) PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26,
669 677–704
- 670 72 Cao, Y. *et al.* (2003) Keratinocytes induce local tolerance to skin graft by activating interleukin-
671 10-secreting T cells in the context of costimulation molecule B7-H1. *Transplantation* 75, 1390–
672 1396

- 673 73 Mestrallet, G. *et al.* (2021) Human Keratinocytes Inhibit CD4+ T-Cell Proliferation through
 674 TGFβ1 Secretion and Surface Expression of HLA-G1 and PD-L1 Immune Checkpoints. *Cells* 10,
 675 1438
- 676 74 Rong, Z. *et al.* (2014) An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived
 677 allografts. *Cell Stem Cell* 14, 121–130
- 678 75 Rouas-Freiss, N. *et al.* (1997) Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the
 679 fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11520–
 680 11525
- 681 76 Zhao, L. *et al.* (2014) Heterologous expression of mutated HLA-G decreases immunogenicity of
 682 human embryonic stem cells and their epidermal derivatives. *Stem Cell Res.* 13, 342–354
- 683 77 Brugière, O. *et al.* (2015) Role of HLA-G as a predictive marker of low risk of chronic rejection in
 684 lung transplant recipients: a clinical prospective study. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc.*
 685 *Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 15, 461–471
- 686 78 Lila, N. *et al.* (2001) Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the
 687 allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
 688 98, 12150–12155
- 689 79 Horuzsko, A. *et al.* (2001) Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G
 690 transgenic mice. *Int. Immunol.* 13, 385–394
- 691 80 LeMaout, J. *et al.* (2013) Synthetic HLA-G proteins for therapeutic use in transplantation. *FASEB*
 692 *J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 3643–3651
- 693

II. Cartes des vecteurs

Expression ectopique inductible de HLA-G.

Expression inductible de HLA-G, en utilisant le système Tet-on de 3^{ème} génération, via un seul vecteur lentiviral (vecteur 1) + le contrôle négatif (vecteur 2) :

- Vecteur 1 : **TRE3G-HLA-G-IRES-GFP-EF1-Tet-On3G**
- Vecteur 2 : **TRE3G-TurboRFP-IRES-GFP-EF1-Tet-On3G**

Méthode d'obtention de l'ADNc HLA-G (1017 pb) : **synthèse.**

Identifiant du Gène HLA-G : ENSG00000204632

Identifiant de l'isoforme d'intérêt HLA-G1 (référéncée sous l'alias HLA-G-205) : ENST00000428701.5

Pour visualiser la séquence d'intérêt : CCDS4668

Project reference: V19100189

Client: Nicolas Fortunel

Date: 2019-11-05

Sequence to be cloned in the pLV.TRE3G.HLA-G.IRES2.TurboGFP.EF1.Tet-On@3G

```
tttactccctatcagtgatagagaacgtatgaagagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgcagactttactccctatcagtgata
gagaacgtataaggagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgaccagtttactccctatcagtgatagagaacgtatctacagttta
ctccctatcagtgatagagaacgtatatccagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgtcgaggtaggcgtgtacgggtggcgcc
tataaaagcagagctcgtttagtagaacgtcagatgcctggagcaattccacaacacttttgtcttatacttgatccgtttaaacttgctg
cgacgcgtgccaccatggtggtcatggcgcgccgaacctcttctctgctctcgggggcccctgaccctgaccgagacctggggcg
ggctcccactccatgaggtatttcagcgcgccgctgtcccggccccggcgcggggagccccgcttcatcgccatgggctacgtgga
cgacacgcagttcgtgcggttcgacagcgactcggcgtgtccgaggatggagccgcgggcgccgtgggtggagcaggagggggcc
```

ggagtattgggaagaggagacacggaacaccaaggcccacgcacagactgacagaatgaacctgcagacctgcgcggctacta
caaccagagcggagccagttctcacacctccagtgatgattggctgcgacctgggggtccgacggacgcctcctccgcggtatg
aacagtatgcctacgatggcaaggattacctgcctgaacgaggacctgcgctcctggaccgcagcggacactgcggctcagatct
ccaagcgcaagtgtgagggcgccaatgtggctgaacaaaggagagcctacctggagggcacgtgcgtggagtggctccacagata
cctggagaacgggaaggagatgctgcagcgcgggaccccccaagacacacgtgaccaccacctgtctttgactatgagggc
acctgaggtgctgggacctgggcttctacctgcggagatcatactgacctggcagcgggatggggaggaccagaccaggacgt
ggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatggaacctccagaagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagaga
tacacgtgcatgtgcagcatgaggggctgccggagcccctcatgctgagatggaagcagcttccctgccaccatccccatcatgg
gtatcgttgctggcctggtgtcctgcagctgtagtcactggagctgcggctcgtctgtctgtggagaaagaagagctcagattgaa
tgcatctaggggcgccaattccgcccttccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggataaggccggtgtgcgtt
tgtctatatgtatttccaccatattgccgtctttggcaatgtgagggcccggaaacctggcctgtcttctgacgagcattcctagggg
tcttccccctcgcgcaaaaggaatgcaaggtctgttgaatgctgtaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtct
gtagcgacctttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctgcggcaaaagccacgtgtataagatacacctgc
aaaggcggcacaaccccagtgccacgtgtgagttggatagttgtgaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaagggg
ctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtaacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaa
aaacgtctaggcccccgaaaccaggggacgtggtttctttgaaaaacacgatgataatatggccacaacctggagagcgacga
gagcggcctgcccgcctagagatcagtgccgcacaccggcacctgaacggcgtggagttcagctggtggcggcgggaga
gggcacccccgagcagggccgatgaccaacaagatgaagagcaccaaaggcgcctgacctcagcccctacctgctgagcca
cgtgatgggctacggcttctaccactcggcacctaccccagcggctacgagaacccccctcctgcagccatcaacaacggcggcta
caccacacccgcacgagaagtacgaggacggcggcgtgctgcacgtgagctttagctaccgctacgagggccggcgcgtgatc
ggcgacttcaaggtgatgggacccggctccccgaggacagcgtgatcttaccgacaagatcatccgcagcaacgccaccgtgga
gcacctgcacccatgggcgataacgatctggatggcagcttaccggcacctttagcctgcgcgacggcggctactacagctcctg
ggtggacagccacatgacttcaagagcgcctaccacccagcatcctgcagaacgggggccccatgttcgcttccgccgctgg
aggaggatcacagcaaacaggagctgggcatcgtggagtaccgacgccttcaagacccggatgcagatgccggtgaagaata
agtcgaccgtgaggtccgatgcccgtcagtgggcagagcgcacatgcccacagtcctccgagaagttggggggaggggtcggc
aattgaaccgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaactgggaaagtgatgctggtactggctccgcttttccgaggggtggg
ggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggttgcggcagaacacaggatccgccaccatgtct
agactggacaagagcaaaagtataaactctgctctggaattactcaatggagtcggtatcgaagcctgacgacaaggaaactcgtc
aaaagctgggagttgagcagcctacctgtactggcacgtgaagaacaagcgggcccctgctcgtatgccctgccaatcgagatgctg
gacagggcatataccactcctgccccctggaaggcgagtcaggaagacttctgcggaacaacccaagtcataccgctgtgctc
tctctcacatcgcgacgggggctaaagtgcactcggcaccggcccaacagagaaacagtagaaacctggaaaatcagctcgcgt
tctgtgacgcaaggcttctcctggagaacgcactgtacgctctgtccgctggggccactttactgggctcgtattggaggaa
caggagcatcaagtagcaaaagaggaaagagagacacctaccaccgattctatgccccacttctgaaacaagcaattgagctgttc
gaccggcagggagccgaacctgccttctttcggcctggaactaatcatatgtggcctggagaacagctaaagtgcgaaagcggc

gggccgaccgacgcccttgacgatttgacttagacatgctcccagccgatgcccttgacgactttgaccttgatatgctgcctgctgac
gctcttgacgattttgaccttgacatgctccccgggtaagtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattctt
aactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgatcatgctattgctcccgtatggctttcattttctcctccttgat
aaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgtttgctgacgcaaccccca
ctggttggggcattgccaccacctgcagctcctttccgggactttcgtttccccctcctattgccacggcggaactcatgccgctg
cctgccccgtgctggacaggggctcggctgttgggactgacaattccgtggtgttgcggggaagctgacgtcctttccatggctgc
tcgctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgggcc
tctgcccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctccctttgggccgctccccgctg

TRE3G promoter

KOZAK sequence

HLA-G coding sequence

IRES2 sequence

TurboGFP coding sequence

EF1 promoter

KOZAK sequence

Tet-On®3G coding sequence

WPRE

Sequence to be cloned in the pLV.TRE3G.TurboRFP.IRES2.TurboGFP.EF1.Tet-On®3G

ttactccctatcagtgatagagaacgtatgaagagttactccctatcagtgatagagaacgtatgcagactttactccctatcagtgata
gagaacgtataaggagttactccctatcagtgatagagaacgtatgaccagttactccctatcagtgatagagaacgtatctacagttta
ctccctatcagtgatagagaacgtatatccagttactccctatcagtgatagagaacgtatgtaggtaggcgtgtacggtggggcgc
tataaaagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatgcctggagcaattccacaacactttgtcttatactggatccgtttaaactgtg
cgacgcgtgccaccatgagcgagctgatcaaggagaacatgacatgaagctgtacatggagggcaccgtgaacaaccaccacttc
aagtgcacatccgagggcgaaggcaagcctacgagggcaccagaccatgaagatcaaggtgctgagggcggccctctccct
tcgcttcgacatcctggctaccagcttcatgtacggcagcaaaagccttcatcaaccacaccagggcatccccgacttcttaagcagt
cctccctgagggctcacatgggagagaatcaccacatacgaagacggggcgtgctgaccgctaccaggacaccagcttcag
aacggctgcatcatctacaacgtcaagatcaacgggggtaactcccatccaacggccctgtgatgcagaagaaaacacgggctgg
gagggcaaacaccgagatgctgtaccccgtgacggcggcctgagagggccacagccagatggccctgaagctcgtgggcgggggc
tacctgactgctcctcaagaccacatacagatccaagaaaccgctaagaacctcaagatgcccggcttccactcgtggaccaca
gactggaaagaatcaaggaggccgacaaagagacctacgtcagcagcacgagatggctgtggccaagtactgcgacctccctag
caactggggcacagatgaatgcatctagggcggccaattccgccctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgctt
ggaataaggccggtgtgctttgtctatatgtattttccacatattgccgtcttttgcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtctt
cttgacgagcattcctaggggtcttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaaagcagttcctctggaagc
ttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcagcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctcgcccaaaaagcc
acgtgtataagatacacctgcaaaagcggcacaaccccagtgccacgttgtagttggatgattgtggaaagagtcaaatggctctct
caagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtacacatgctttaca
tgtgttagtcgaggttaaaaaacgtctagggccccgaaccacggggacgtggtttccttgaaaaacacgatgataatggccac
aacatggagagcgacgagagcggcctgcccgccatggagatcgagtccgcatcaccggcaccctgaacggcgtggagttcga
gctggtggggcggcgagagggcaccgccagcagggccatgaccaacaagatgaagagcaccaaagcgcacctgacctca
gcccctacctgctgagccacgtgatgggctacggcttctaccactcggcacctacccagcggctacgagaacccctctgcacgc
catcaacaacggcggctacaccaacaccgcacgagaagtacgaggacggcggcgtgctgacgtgagcttcagctaccgctac
gagggccggcgcgtgatcggcgactcaaggtgatgggcaccggctccccgaggacagcgtgatcttaccgacaagatcatccg
cagcaacgccaccgtggagcacctgcacccatgggcgataacgatctggatggcagcttaccgcaccttcagcctgcgcgacg
gcggtactacagctccgtggtggacagccacatgacttcaagagcgcctaccaccagcatcctgcagaacgggggccccatg
ttccttccgcccgtggaggaggatcacagcaacaccgagctgggcacgtggagtaccagcacgcttcaagaccccgatgc
agatgccggtgaagaataagtcgaccgtgaggtccgatgcccgtcagtgggcagagcgcacatgccacagtccccgagaagtt
ggggggaggggtggcaattgaaccggtgcttagagaaggtggcgcggggtaactgggaaagtgatgctgtgtactggctccgc
cttttccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggttgcgcccagaacaca
ggatccgccaccatgtctagactggacaagagcaaaactctgctctggaattactcaatggagtcggatcgaaggcctgac

gacaaggaaactcgtcaaaaagctgggagttgagcagcctaccctgtactggcacgtgaagaacaagcgggacctgctcgatgcc
tgccaatcgagatgctggacagggcatataccactctgccccctggaaggcgagtcattggcaagactttctcggaacaacgcca
agtcataaccgctgtgctctcctctcacatcgcgacggggctaaagtgcattcggcaccgccccaacagagaaacagtacgaaacc
tggaaaatcagctcgcgttctgtgtcagcaaggcttccctggagaacgcactgtacgctctgtccgccgtgggccactttactg
ggctgcgtattggaggaacaggagcatcaagtagcaaaagaggaaagagagacacctaccaccgattctatgccccacttctgaaa
caagcaattgagctgttcgaccggcaggagccgaacctgccttctttcggcctggaactaatcatatgtggcctggagaacagct
aaagtgcgaaagcggcgggcccaccgacgcccttgacgattttgacttagacatgctcccagccgatgcccttgacgactttgacctt
gatatgctgctgctgacgctcttgacgattttgaccttgacatgctccccgggtaagtcgacaatcaacctctggattacaaaattgtga
aagattgactggtattcttaactatgtgtcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgctcccgtatggct
ttcattttctcctctgtataaatcctggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgtt
tgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgtttccccctcctattgccacggc
ggaactcatcgcgcctgcttcccgtgctggacaggggctcggctgttggcactgacaattccggtgtgtcggggaagctg
acgtcctttccatggctgctcgcctgtgttccacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtccctcggccctcaatccagcgg
accttcttcccggcctgctgccggctctgcggccttccgcgtcttcgcttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccc
cctccccgcctg

TRE3G promoter

KOZAK sequence

TurboRFP coding sequence

IRES2 sequence

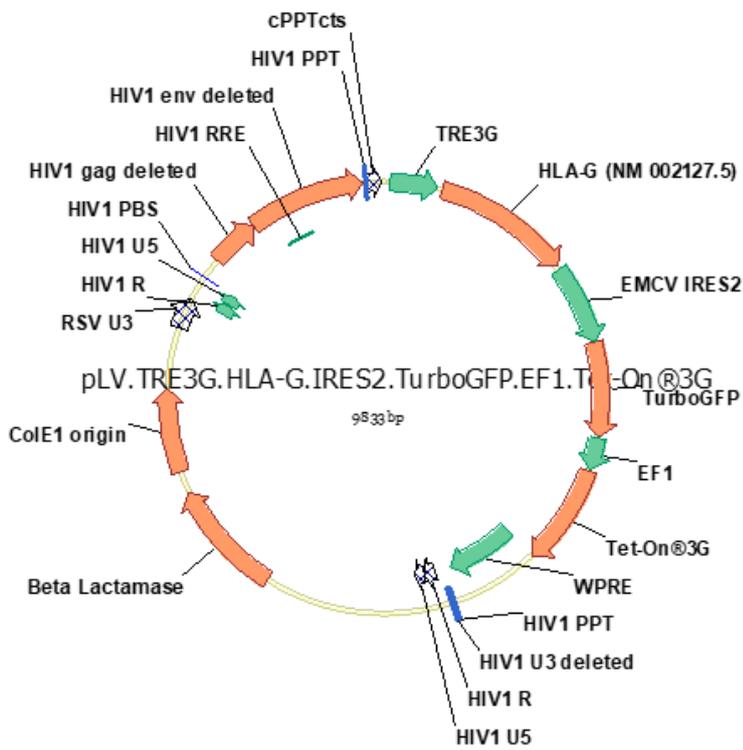
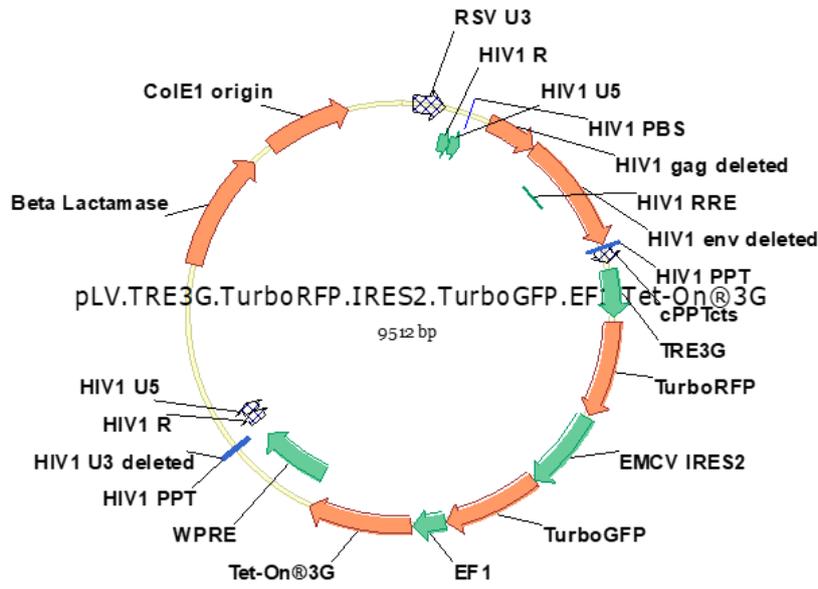
TurboGFP coding sequence

EF1 promoter

KOZAK sequence

Tet-On®3G coding sequence

WPRE



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Moore, K. & Dalley, A. Anatomie médicale. in 12 (2001).
2. Gardner, Martin & Jessell. The bodily senses. in *The bodily senses*. 430–450 (McGraw-Hill, 2000).
3. Yu, J. R. *et al.* Current and Future Perspectives on Skin Tissue Engineering: Key Features of Biomedical Research, Translational Assessment, and Clinical Application. *Adv. Healthc. Mater.* 1801471 (2019) doi:10.1002/adhm.201801471.
4. Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J.-C. & Wong, J. K. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp. Dermatol.* **25**, 92–98 (2016).
5. Shpichka, A. *et al.* Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 94 (2019).
6. Breikreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K. & Nischt, R. Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. *BioMed Res. Int.* **2013**, 179784 (2013).
7. Méliopoulos, A. & Levacher, C. La peau. in *La peau* 3 (2012).
8. Whitton, J. T. & Everall, J. D. The thickness of the epidermis. *Br. J. Dermatol.* **89**, 467–476 (1973).
9. Baroni, A. *et al.* Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin. Dermatol.* **30**, 257–262 (2012).
10. Fortunel, N. O. & Martin, M. T. [Stem cells from human interfollicular epidermis: phenotypes and potentialities]. *J. Soc. Biol.* **202**, 55–65 (2008).
11. Proksch, E., Brandner, J. M. & Jensen, J.-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **17**, 1063–1072 (2008).

12. Smalls, L. K. *et al.* Effect of weight loss on cellulite: gynoid lypodystrophy. *Plast. Reconstr. Surg.* **118**, 510–516 (2006).
13. Lawton, S. *Skin 1: the structure and functions of the skin.* (2019).
14. Maksimovic, S. *et al.* Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* **509**, 617–621 (2014).
15. Cotsarelis, G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1459–1468 (2006).
16. Ito, M. *et al.* Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.* **11**, 1351–1354 (2005).
17. Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A. & Goodwin, C. Anatomy and Physiology of the Skin. *J. Dermatol. Nurses Assoc.* **3**, 203–213 (2011).
18. Schneider, M. R., Schmidt-Ullrich, R. & Paus, R. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Curr. Biol.* **19**, R132–R142 (2009).
19. Ohyama, M. Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J. Dermatol. Sci.* **46**, 81–89 (2007).
20. Rheinwald, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331–343 (1975).
21. Barrandon, Y. & Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2302–2306 (1987).
22. Green, H., Kehinde, O. & Thomas, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 5665–5668 (1979).

23. Gallico, G. G., O'connor, N. E., Compton, C. C., Kehinde, O. & Green, H. Permanent Coverage of Large Burn Wounds with Autologous Cultured Human Epithelium. *N. Engl. J. Med.* **311**, 448–451 (1984).
24. Ghadially, R. 25 Years of Epidermal Stem Cell Research. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 797–810 (2012).
25. Blanpain, C. & Fuchs, E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 339–373 (2006).
26. Braun, K. M. *et al.* Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounds of mouse epidermis. *Dev. Camb. Engl.* **130**, 5241–5255 (2003).
27. Ghazizadeh, S. & Taichman, L. B. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J.* **20**, 1215–1222 (2001).
28. Langton, A. K., Herrick, S. E. & Headon, D. J. An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1311–1318 (2008).
29. Levy, V., Lindon, C., Harfe, B. D. & Morgan, B. A. Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev. Cell* **9**, 855–861 (2005).
30. Levy, V., Lindon, C., Zheng, Y., Harfe, B. D. & Morgan, B. A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 1358–1366 (2007).
31. Fortunel, N. O. *et al.* Exploration of the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis at the single-cell level using parallel clonal microcultures of keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **19**, 387–392 (2010).

32. Adams, J. C. & Watt, F. M. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. *Cell* **63**, 425–435 (1990).
33. Watt, F. M. & Jones, P. H. Expression and function of the keratinocyte integrins. *Dev. Camb. Engl. Suppl.* 185–192 (1993).
34. Fortunel, N. O. *et al.* Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations. *J. Cell Sci.* **116**, 4043–4052 (2003).
35. Muraguchi, T., Nanba, D., Nishimura, E. K. & Tashiro, T. IGF-1R deficiency in human keratinocytes disrupts epidermal homeostasis and stem cell maintenance. *J. Dermatol. Sci.* S0923181119301161 (2019) doi:10.1016/j.jdermsci.2019.05.001.
36. Fortunel, N. O. *et al.* KLF4 inhibition promotes the expansion of keratinocyte precursors from adult human skin and of embryonic-stem-cell-derived keratinocytes. *Nat. Biomed. Eng.* 1–13 (2019) doi:10.1038/s41551-019-0464-6.
37. Li, J. *et al.* HNRNPK maintains epidermal progenitor function through transcription of proliferation genes and degrading differentiation promoting mRNAs. *Nat. Commun.* **10**, 4198 (2019).
38. Shrestha, R., Wen, Y.-T. & Tsai, R.-K. Generation of hiPSC line TCIERi001-A from normal human epidermal keratinocytes. *Stem Cell Res.* **41**, 101590 (2019).
39. Mercado, N. *et al.* IRF2 is a master regulator of human keratinocyte stem cell fate. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
40. Li, A., Simmons, P. J. & Kaur, P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3902–3907 (1998).

41. Trowbridge, I. S. & Omary, M. B. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 3039–3043 (1981).
42. Kaur, P. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1450–1458 (2006).
43. Schlüter, H., Paquet-Fifield, S., Gangatirkar, P., Li, J. & Kaur, P. Functional characterization of quiescent keratinocyte stem cells and their progeny reveals a hierarchical organization in human skin epidermis. *Stem Cells Dayt. Ohio* **29**, 1256–1268 (2011).
44. Webb, A., Li, A. & Kaur, P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differ. Res. Biol. Divers.* **72**, 387–395 (2004).
45. Peus, D., Hamacher, L. & Pittelkow, M. R. EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **109**, 751–756 (1997).
46. Fuchs, E. & Green, H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**, 1033–1042 (1980).
47. Alam, S. *et al.* Galectin-9 protein expression in endothelial cells is positively regulated by histone deacetylase 3. *J. Biol. Chem.* **286**, 44211–44217 (2011).
48. Paramio, J. M. *et al.* Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3086–3094 (1999).
49. Paramio, J. M., Segrelles, C., Ruiz, S. & Jorcano, J. L. Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7449–7459 (2001).

50. Wan, H. *et al.* Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *J. Cell Sci.* **116**, 4239–4248 (2003).
51. Wan, H. *et al.* Stem/progenitor cell-like properties of desmoglein 3dim cells in primary and immortalized keratinocyte lines. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 1286–1297 (2007).
52. Pellegrini, G. *et al.* p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3156–3161 (2001).
53. Ekman, A.-K., Bivik Eding, C., Rundquist, I. & Enerbäck, C. IL-17 and IL-22 promote keratinocyte stemness in the germinative compartment in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* (2019) doi:10.1016/j.jid.2019.01.014.
54. DasGupta, R. & Fuchs, E. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 4557–4568 (1999).
55. Molès, J. P. & Watt, F. M. The epidermal stem cell compartment: variation in expression levels of E-cadherin and catenins within the basal layer of human epidermis. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **45**, 867–874 (1997).
56. Pammer, J. *et al.* PIWIL-2 and piRNAs are regularly expressed in epithelia of the skin and their expression is related to differentiation. *Arch. Dermatol. Res.* (2020) doi:10.1007/s00403-020-02052-7.
57. Horsley, V. Lifting Each Other Up: Epidermal Stem Cells in Tissue Homeostasis. *Dev. Cell* **51**, 296–298 (2019).
58. Nanba, D. Human keratinocyte stem cells: From cell biology to cell therapy. *J. Dermatol. Sci.* (2019) doi:10.1016/j.jdermsci.2019.10.002.
59. Kinoshita, K. *et al.* Automated collective motion analysis validates human keratinocyte stem cell cultures. *Sci. Rep.* **9**, 18725 (2019).

60. Cable, J. *et al.* Adult stem cells and regenerative medicine—a symposium report. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **n/a**, (2019).
61. Liu, N. *et al.* Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. *Nature* (2019) doi:10.1038/s41586-019-1085-7.
62. Haensel, D. *et al.* Defining Epidermal Basal Cell States during Skin Homeostasis and Wound Healing Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep.* **30**, 3932-3947.e6 (2020).
63. Ge, Y. *et al.* The aging skin microenvironment dictates stem cell behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2020) doi:10.1073/pnas.1901720117.
64. Limat, A. *et al.* Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**, 207–214 (2003).
65. Wang, S. *et al.* Single cell transcriptomics of human epidermis identifies basal stem cell transition states. *Nat. Commun.* **11**, 4239 (2020).
66. Ghazizadeh, S. & Taichman, L. B. Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 367–372 (2005).
67. Dekoninck, S. *et al.* Defining the Design Principles of Skin Epidermis Postnatal Growth. *Cell* (2020) doi:10.1016/j.cell.2020.03.015.
68. Aragona, M. *et al.* Mechanisms of stretch-mediated skin expansion at single-cell resolution. *Nature* (2020) doi:10.1038/s41586-020-2555-7.
69. Pupovac, A. *et al.* Toward Immunocompetent 3D Skin Models. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1701405 (2018).
70. Lee, J. *et al.* Hair-bearing human skin generated entirely from pluripotent stem cells. *Nature* (2020) doi:10.1038/s41586-020-2352-3.
71. Greenwood, J. E. Function of the panniculus carnosus—a hypothesis. *Vet. Rec.* **167**, 760 (2010).

72. Khavari, P. A. Modelling cancer in human skin tissue. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 270–280 (2006).
73. Anisimov, V. N. Biological interactions of aging and carcinogenesis. *Cancer Treat. Res.* **124**, 17–50 (2005).
74. Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z. & Nickoloff, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 679–691 (2009).
75. Larsen, S. B., Cowley, C. J. & Fuchs, E. Epithelial cells: liaisons of immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **62**, 45–53 (2020).
76. Williams, I. R. & Kupper, T. S. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci.* **58**, 1485–1507 (1996).
77. Janeway, C. A. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54**, 1–13 (1989).
78. Kalali, B. N. *et al.* Double-Stranded RNA Induces an Antiviral Defense Status in Epidermal Keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-Mediated Differential Signaling. *J. Immunol.* **181**, 2694–2704 (2008).
79. Lebre, M. C. *et al.* Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 331–341 (2007).
80. Miller, L. S. & Modlin, R. L. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 262–263 (2007).
81. Griffiths, C. E. & Nickoloff, B. J. Keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression precedes dermal T lymphocytic infiltration in allergic contact dermatitis (Rhus dermatitis). *Am. J. Pathol.* **135**, 1045–1053 (1989).
82. Noske, K. Secreted immunoregulatory proteins in the skin. *J. Dermatol. Sci.* **89**, 3–10 (2018).

83. Wysocki, C. A., Panoskaltzis-Mortari, A., Blazar, B. R. & Serody, J. S. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* **105**, 4191–4199 (2005).
84. Cao, Y. *et al.* Keratinocytes induce local tolerance to skin graft by activating interleukin-10-secreting T cells in the context of costimulation molecule B7-H1. *Transplantation* **75**, 1390–1396 (2003).
85. Than, U. T. T., Leavesley, D. I. & Parker, T. J. Characteristics and roles of extracellular vesicles released by epidermal keratinocytes. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* (2019) doi:10.1111/jdv.15859.
86. Lampert, I. A. Expression of HLA-DR (Ia like) antigen on epidermal keratinocytes in human dermatoses. *Clin. Exp. Immunol.* **57**, 93–100 (1984).
87. Matic, M. A Subpopulation of Human Basal Keratinocytes Has a Low/Negative MHC Class I Expression. *Hum. Immunol.* **66**, 962–968 (2005).
88. Revillard. Immunologie. in vol. 7 (2001).
89. Nickoloff, B. J. & Turka, L. A. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol. Today* **15**, 464–469 (1994).
90. Black, A. P. B. *et al.* Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1485–1493 (2007).
91. Banerjee, G., Damodaran, A., Devi, N., Dharmalingam, K. & Raman, G. Role of Keratinocytes in Antigen Presentation and Polarization of Human T Lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **59**, 385–394 (2004).
92. Klicznik, M. M., Szenes-Nagy, A. B., Campbell, D. J. & Gratz, I. K. Taking the lead – how keratinocytes orchestrate skin T cell immunity. *Immunol. Lett.* **200**, 43–51 (2018).

93. Wakem, P. *et al.* Allergens and Irritants Transcriptionally Upregulate CD80 Gene Expression in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 1085–1092 (2000).
94. Tamoutounour, S. *et al.* Keratinocyte-intrinsic MHCII expression controls microbiota-induced Th1 cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2019)
doi:10.1073/pnas.1912432116.
95. Denfeld, R. W. *et al.* CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2329–2334 (1996).
96. Péguet-Navarro, J. *et al.* CD40 ligation of human keratinocytes inhibits their proliferation and induces their differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **158**, 144–152 (1997).
97. Gilliet, M. & Lande, R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 401–407 (2008).
98. Lai, Y. & Gallo, R. L. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* **30**, 131–141 (2009).
99. Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* **203**, 2271–2279 (2006).
100. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. & Harrington, L. E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 821–852 (2007).
101. Moafi, M. *et al.* Comparison of pro-inflammatory cytokines of non-healing and healing cutaneous leishmaniasis. *Scand. J. Immunol.* **85**, 291–299 (2017).
102. Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. L. & Girolomoni, G. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **4**, 329–334 (2005).

103. Tsepkolenko, A. *et al.* The regenerative potential of skin and the immune system. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **12**, 519–532 (2019).
104. Arend, W. P., Palmer, G. & Gabay, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol. Rev.* **223**, 20–38 (2008).
105. Feldmeyer, L. *et al.* The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr. Biol. CB* **17**, 1140–1145 (2007).
106. Keller, M., Rüegg, A., Werner, S. & Beer, H.-D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818–831 (2008).
107. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 229–265 (2009).
108. Dieu-Nosjean, M.-C. *et al.* Macrophage Inflammatory Protein 3 α Is Expressed at Inflamed Epithelial Surfaces and Is the Most Potent Chemokine Known in Attracting Langerhans Cell Precursors. *J. Exp. Med.* **192**, 705–718 (2000).
109. Scharschmidt, T. C. *et al.* Commensal Microbes and Hair Follicle Morphogenesis Coordinately Drive Treg Migration into Neonatal Skin. *Cell Host Microbe* **21**, 467-477.e5 (2017).
110. Kobayashi, T. *et al.* Homeostatic Control of Sebaceous Glands by Innate Lymphoid Cells Regulates Commensal Bacteria Equilibrium. *Cell* **176**, 982-997.e16 (2019).
111. Barker, J. N., Mitra, R. S., Griffiths, C. E., Dixit, V. M. & Nickoloff, B. J. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet Lond. Engl.* **337**, 211–214 (1991).
112. Kupper, T. S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J. Clin. Invest.* **86**, 1783–1789 (1990).
113. Luger, T. A. & Schwarz, T. Evidence for an epidermal cytokine network. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 100S-104S (1990).

114. Gauglitz, G. G. *et al.* Functional characterization of cultured keratinocytes after acute cutaneous burn injury. *PLoS One* **7**, e29942 (2012).
115. Nickoloff, B. J., Turka, L. A., Mitra, R. S. & Nestle, F. O. Direct and indirect control of T-cell activation by keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 25S-29S (1995).
116. Otten, H. G. *et al.* Alloantigen-specific T-cell anergy induced by human keratinocytes is abrogated upon loss of cell-cell contact. *Immunology* **88**, 214–219 (1996).
117. Bal, V. *et al.* Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1893–1897 (1990).
118. Naik, S. *et al.* Inflammatory memory sensitizes skin epithelial stem cells to tissue damage. *Nature* **550**, 475–480 (2017).
119. Corsini, E. & Galli, C. L. Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. *Toxicology* **142**, 203–211 (2000).
120. Campione, E. *et al.* Skin immunity and its dysregulation in atopic dermatitis, hidradenitis suppurativa and vitiligo. *Cell Cycle* **0**, 1–11 (2020).
121. Jacquemin, C. *et al.* NKG2D Defines a Subset of Skin Effector Memory CD8 T Cells with Proinflammatory Functions in Vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* (2019)
doi:10.1016/j.jid.2019.11.013.
122. Boxman, I. L., Ruwihof, C., Boerman, O. C., Löwik, C. W. & Ponc, M. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Arch. Dermatol. Res.* **288**, 391–398 (1996).
123. Waelti, E. R. *et al.* Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells: production of large amounts of interleukin 6. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 805–808 (1992).

124. de Kossodo, S. *et al.* Expression of the tumor necrosis factor gene by dermal fibroblasts in response to ultraviolet irradiation or lipopolysaccharide. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 318–322 (1995).
125. Kurashima, Y. *et al.* The Enzyme Cyp26b1 Mediates Inhibition of Mast Cell Activation by Fibroblasts to Maintain Skin-Barrier Homeostasis. *Immunity* **40**, 530–541 (2014).
126. Wojtowicz, A. M. *et al.* The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. *Wound Repair Regen.* **22**, 246–255 (2014).
127. Duijvestijn, A. M. *et al.* High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal antibody HECA-452. *Am. J. Pathol.* **130**, 147–155 (1988).
128. Blatt, N., Khaiboullin, T., Lombardi, V., Rizvanov, A. & Khaiboullina, S. The Skin–Brain Connection Hypothesis, Bringing Together CCL27-Mediated T-Cell Activation in the Skin and Neural Cell Damage in the Adult Brain. *Front. Immunol.* **7**, (2017).
129. McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L. & Bainton, D. F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* **84**, 92–99 (1989).
130. Fitzner, N., Clauberg, S., Essmann, F., Liebmann, J. & Kolb-Bachofen, V. Human Skin Endothelial Cells Can Express All 10 TLR Genes and Respond to Respective Ligands. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 138–146 (2008).
131. Pober, J. S. & Sessa, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 803–815 (2007).

132. Merad, M., Ginhoux, F. & Collin, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 935–947 (2008).
133. Romani, N. *et al.* Epidermal Langerhans cells--changing views on their function in vivo. *Immunol. Lett.* **106**, 119–125 (2006).
134. Bauer, J. *et al.* A strikingly constant ratio exists between Langerhans cells and other epidermal cells in human skin. A stereologic study using the optical disector method and the confocal laser scanning microscope. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 313–318 (2001).
135. Collin, M. & Milne, P. Langerhans cell origin and regulation. *Curr. Opin. Hematol.* **23**, 28–35 (2016).
136. Hunger, R. E. *et al.* Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J. Clin. Invest.* **113**, 701–708 (2004).
137. Klechevsky, E. *et al.* Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* **29**, 497–510 (2008).
138. Ferrer, I. R. *et al.* A wave of monocytes is recruited to replenish the long-term Langerhans cell network after immune injury. *Sci. Immunol.* **4**, (2019).
139. Doebel, T., Voisin, B. & Nagao, K. Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol.* **38**, 817–828 (2017).
140. Lenz, A., Heine, M., Schuler, G. & Romani, N. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J. Clin. Invest.* **92**, 2587–2596 (1993).
141. Nestle, F. O., Zheng, X. G., Thompson, C. B., Turka, L. A. & Nickoloff, B. J. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol.* **151**, 6535–6545 (1993).

142. Zaba, L. C., Fuentes-Duculan, J., Steinman, R. M., Krueger, J. G. & Lowes, M. A. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J. Clin. Invest.* **117**, 2517–2525 (2007).
143. Angel, C. E. *et al.* CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. *Int. Immunol.* **19**, 1271–1279 (2007).
144. Guttman-Yassky, E. *et al.* Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1210–1217 (2007).
145. Clark, R. A. *et al.* The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 4431–4439 (2006).
146. Bos, J. D. *et al.* The Skin Immune System (SIS): Distribution and Immunophenotype of Lymphocyte Subpopulations in Normal Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* **88**, 569–573 (1987).
147. Foster, C. A. *et al.* Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J. Exp. Med.* **171**, 997–1013 (1990).
148. Bos, J. D., de Boer, O. J., Tibosch, E., Das, P. K. & Pals, S. T. Skin-homing T lymphocytes: detection of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) by HECA-452 in normal human skin. *Arch. Dermatol. Res.* **285**, 179–183 (1993).
149. Davis, A. L., McKenzie, J. L. & Hart, D. N. HLA-DR-positive leucocyte subpopulations in human skin include dendritic cells, macrophages, and CD7-negative T cells. *Immunology* **65**, 573–581 (1988).
150. Edele, F. *et al.* Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 3745–3749 (2008).

151. Mora, J. R. *et al.* Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* **201**, 303–316 (2005).
152. Sigmundsdottir, H. & Butcher, E. C. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat. Immunol.* **9**, 981–987 (2008).
153. Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 857–863 (2009).
154. Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K. & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* **10**, 864–871 (2009).
155. Jiang, X. *et al.* Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* **483**, 227–231 (2012).
156. Kupper, T. S. & Fuhlbrigge, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 211–222 (2004).
157. Luster, A. D., Alon, R. & von Andrian, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* **6**, 1182–1190 (2005).
158. Streilein, J. W. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* **80 Suppl**, 12s–16s (1983).
159. Woodland, D. L. & Kohlmeier, J. E. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 153–161 (2009).
160. Mathur, A. N. *et al.* Treg-Cell Control of a CXCL5-IL-17 Inflammatory Axis Promotes Hair-Follicle-Stem-Cell Differentiation During Skin-Barrier Repair. *Immunity* **50**, 655-667.e4 (2019).

161. Kronenberg, M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 877–900 (2005).
162. Hayday, A. & Tigelaar, R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 233–242 (2003).
163. Strid, J., Tigelaar, R. E. & Hayday, A. C. Skin immune surveillance by T cells--a new order? *Semin. Immunol.* **21**, 110–120 (2009).
164. Girardi, M. *et al.* Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* **294**, 605–609 (2001).
165. Toulon, A. *et al.* A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J. Exp. Med.* **206**, 743–750 (2009).
166. Agerberth, B. *et al.* The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* **96**, 3086–3093 (2000).
167. Nickoloff, B. J. Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe? *J. Clin. Invest.* **104**, 1161–1164 (1999).
168. Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G. & Deniz, G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell. Immunol.* **254**, 149–154 (2009).
169. Gordon, J. R. & Galli, S. J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature* **346**, 274–276 (1990).
170. Wang, H. W., Tedla, N., Lloyd, A. R., Wakefield, D. & McNeil, P. H. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J. Clin. Invest.* **102**, 1617–1626 (1998).
171. Olingy, C. E. *et al.* Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury. *Sci. Rep.* **7**, (2017).

172. Gay, D. *et al.* Phagocytosis of Wnt inhibitor SFRP4 by late wound macrophages drives chronic Wnt activity for fibrotic skin healing. *Sci. Adv.* **6**, eaay3704 (2020).
173. Eberl, G., Colonna, M., Santo, J. P. D. & McKenzie, A. N. J. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science* **348**, aaa6566 (2015).
174. Kim, B. S. Innate Lymphoid Cells in the Skin. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 673–678 (2015).
175. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
176. Kaisho, T. & Akira, S. Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect.* **6**, 1388–1394 (2004).
177. Stappers, M. H. T. *et al.* Genetic Variation in TLR10, an Inhibitory Toll-Like Receptor, Influences Susceptibility to Complicated Skin and Skin Structure Infections. *J. Infect. Dis.* **212**, 1491–1499 (2015).
178. Baker, B. S., Ovigne, J.-M., Powles, A. V., Corcoran, S. & Fry, L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* **148**, 670–679 (2003).
179. Köllisch, G. *et al.* Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* **114**, 531–541 (2005).
180. Song, P. I. *et al.* Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 424–432 (2002).
181. Takeuchi, J. *et al.* Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 674–679 (2003).

182. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987–995 (2004).
183. Kajita, A. i. *et al.* Interferon-Gamma Enhances TLR3 Expression and Anti-Viral Activity in Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2005–2011 (2015).
184. Yamamura, Y., Morizane, S., Yamamoto, T., Wada, J. & Iwatsuki, K. High calcium enhances the expression of double-stranded RNA sensors and antiviral activity in epidermal keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **27**, 129–134 (2018).
185. Dausset, J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* **20**, 156–166 (1958).
186. Garboczi, D. N. *et al.* Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* **384**, 134 (1996).
187. Mason, D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today* **19**, 395–404 (1998).
188. Terasaki, P. I. Humoral Theory of Transplantation. *Am. J. Transplant.* **3**, 665–673 (2003).
189. Halloran, P. F. The clinical importance of alloantibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **3**, 639–640 (2003).
190. Dinarello, C. A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.* **16**, 457–499 (1998).
191. Corradi, A., Franzi, A. T. & Rubartelli, A. Synthesis and secretion of interleukin-1 alpha and interleukin-1 receptor antagonist during differentiation of cultured keratinocytes. *Exp. Cell Res.* **217**, 355–362 (1995).
192. Mizutani, H., Black, R. & Kupper, T. S. Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. *J. Clin. Invest.* **87**, 1066–1071 (1991).

193. Zhong, F. L. *et al.* Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell* **167**, 187-202.e17 (2016).
194. Köck, A. *et al.* Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp. Med.* **172**, 1609–1614 (1990).
195. Larrick, J. W., Morhenn, V., Chiang, Y. L. & Shi, T. Activated Langerhans cells release tumor necrosis factor. *J. Leukoc. Biol.* **45**, 429–433 (1989).
196. Lisby, S., Hansen, L. H., Menn, T. & Baadsgaard, O. Nickel-induced proliferation of both memory and naive T cells in patch test-negative individuals. *Clin. Exp. Immunol.* **117**, 217–222 (1999).
197. Guilloteau, K. *et al.* Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 α , and TNF- α Recapitulates Some Features of Psoriasis. *J. Immunol.* **184**, 5263–5270 (2010).
198. Chen, L., Guo, S., Ranzer, M. J. & DiPietro, L. A. Toll-Like Receptor 4 Has an Essential Role in Early Skin Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 258–267 (2013).
199. Buerger, C. *et al.* Interleukin-1 β Interferes with Epidermal Homeostasis through Induction of Insulin Resistance: Implications for Psoriasis Pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2206–2214 (2012).
200. Salgado, R. M. *et al.* Post-burn hypertrophic scars are characterized by high levels of IL-1 β mRNA and protein and TNF- α type I receptors. *Burns* **38**, 668–676 (2012).
201. Qin, Z., Okubo, T., Voorhees, J. J., Fisher, G. J. & Quan, T. Elevated cysteine-rich protein 61 (CCN1) promotes skin aging via upregulation of IL-1 β in chronically sun-exposed human skin. *AGE* **36**, 353–364 (2014).
202. Quist, S. R., Wiswedel, I., Quist, J. & Gollnick, H. P. Kinetic Profile of Inflammation Markers in Human Skin In vivo Following Exposure to Ultraviolet B Indicates

- Synchronic Release of Cytokines and Prostanoids. *Acta Derm. Venereol.* **96**, 910–916 (2016).
203. Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* **54**, 1–78 (1993).
204. O'Reilly, S., Ciechomska, M., Cant, R., Hügle, T. & van Laar, J. M. Interleukin-6, its role in fibrosing conditions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **23**, 99–107 (2012).
205. Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P. & Mosmann, T. R. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 165–190 (1993).
206. Gordon, A. *et al.* Permissive environment in postnatal wounds induced by adenoviral-mediated overexpression of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 prevents scar formation. *Wound Repair Regen.* **16**, 70–79 (2008).
207. Kieran, I. *et al.* Interleukin-10 reduces scar formation in both animal and human cutaneous wounds: Results of two preclinical and phase II randomized control studies. *Wound Repair Regen.* **21**, 428–436 (2013).
208. Hemmi, H. *et al.* Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int. Immunol.* **13**, 695–704 (2001).
209. Bos. Skin immune system. in (Cutaneous immunology and clinical immunodermatology, 2004).
210. Wahl, S. M., McCartney-Francis, N. & Mergenhagen, S. E. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-beta. *Immunol. Today* **10**, 258–261 (1989).
211. Mee, J. B., Alam, Y. & Groves, R. W. Human keratinocytes constitutively produce but do not process interleukin-18. *Br. J. Dermatol.* **143**, 330–336 (2000).
212. Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 407–420 (2016).

213. Greter, M. *et al.* Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* **37**, 1050–1060 (2012).
214. Johnson-Huang, L. M. *et al.* A Single Intradermal Injection of IFN- γ Induces an Inflammatory State in Both Non-Lesional Psoriatic and Healthy Skin. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1177–1187 (2012).
215. Seltmann, J., Werfel, T. & Wittmann, M. Evidence for a regulatory loop between IFN- γ and IL-33 in skin inflammation. *Exp. Dermatol.* **22**, 102–107 (2013).
216. Carriere, V. *et al.* IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 282–287 (2007).
217. Schmitz, J. *et al.* IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity* **23**, 479–490 (2005).
218. Meephansan, J. *et al.* Expression of IL-33 in the epidermis: The mechanism of induction by IL-17. *J. Dermatol. Sci.* **71**, 107–114 (2013).
219. Moser, B., Wolf, M., Walz, A. & Loetscher, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* **25**, 75–84 (2004).
220. Luther, S. A. & Cyster, J. G. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **2**, 102–107 (2001).
221. Lundahl, J., Jacobson, S. H. & Paulsson, J. M. IL-8 from Local Subcutaneous Wounds Regulates CD11b Activation. *Scand. J. Immunol.* **75**, 419–425 (2012).
222. Gragnani, A., Müller, B. R., Silva, I. D. C. G. da, Noronha, S. M. R. de & Ferreira, L. M. Keratinocyte growth factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta gene expression in cultured fibroblasts and keratinocytes from burned patients. *Acta Cir. Bras.* **28**, 551–558 (2013).

223. Gragnani, A. *et al.* Gene expression profile of cytokines and receptors of inflammation from cultured keratinocytes of burned patients. *Burns* **40**, 947–956 (2014).
224. Rossi, D. & Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 217–242 (2000).
225. Kaplan, D. H., Jenison, M. C., Saeland, S., Shlomchik, W. D. & Shlomchik, M. J. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* **23**, 611–620 (2005).
226. Dufloo, J. *et al.* Anti-HIV-1 antibodies trigger non-lytic complement deposition on infected cells. *EMBO Rep.* **21**, e49351 (2020).
227. Cook, E. M. *et al.* Antibodies That Efficiently Form Hexamers upon Antigen Binding Can Induce Complement-Dependent Cytotoxicity under Complement-Limiting Conditions. *J. Immunol. Author Choice* **197**, 1762–1775 (2016).
228. Diebolder, C. A. *et al.* Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* **343**, 1260–1263 (2014).
229. Bohana-Kashtan, O., Ziporen, L., Donin, N., Kraus, S. & Fishelson, Z. Cell signals transduced by complement. *Mol. Immunol.* **41**, 583–597 (2004).
230. Lindorfer, M. A. *et al.* Real-time analysis of the detailed sequence of cellular events in mAb-mediated complement-dependent cytotoxicity of B-cell lines and of chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Mol. Immunol.* **70**, 13–23 (2016).
231. Riley-Vargas, R. C., Gill, D. B., Kemper, C., Liszewski, M. K. & Atkinson, J. P. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* **25**, 496–503 (2004).
232. Brodbeck, W. G., Kuttner-Kondo, L., Mold, C. & Medof, M. E. Structure/function studies of human decay-accelerating factor. *Immunology* **101**, 104–111 (2000).
233. Huang, Y., Qiao, F., Abagyan, R., Hazard, S. & Tomlinson, S. Defining the CD59-C9 Binding Interaction. *J. Biol. Chem.* **281**, 27398–404 (2006).

234. Reynolds, G. *et al.* Developmental cell programs are co-opted in inflammatory skin disease. *Science* **371**, (2021).
235. Spits, H. & Cupedo, T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 647–675 (2012).
236. Salimi, M. *et al.* A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* **210**, 2939–2950 (2013).
237. Lernia, V. D. Therapeutic strategies in extrinsic atopic dermatitis: focus on inhibition of IL-4 as a new pharmacological approach. *Expert Opin. Ther. Targets* **19**, 87–96 (2015).
238. Fyhrquist, N. *et al.* Microbe-host interplay in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat. Commun.* **10**, 4703 (2019).
239. Gilhar, A., Etzioni, A. & Paus, R. Alopecia Areata. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1515–1525 (2012).
240. Rajabi, F., Drake, L. A., Senna, M. M. & Rezaei, N. Alopecia areata: a review of disease pathogenesis. *Br. J. Dermatol.* **179**, 1033–1048 (2018).
241. Paus, R. & Bertolini, M. The role of hair follicle immune privilege collapse in alopecia areata: status and perspectives. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **16**, S25-27 (2013).
242. Boehncke, W.-H. & Schön, M. P. Psoriasis. *The Lancet* **386**, 983–994 (2015).
243. Baliwag, J., Barnes, D. H. & Johnston, A. Cytokines in psoriasis. *Cytokine* **73**, 342–350 (2015).
244. Giang, J. *et al.* Complement Activation in Inflammatory Skin Diseases. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
245. Rothhammer, V. & Quintana, F. J. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 184–197 (2019).

246. Di Meglio, P. *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity* **40**, 989–1001 (2014).
247. Miao, X. *et al.* PD-L1 reverses depigmentation in Pmel-1 vitiligo mice by increasing the abundance of Tregs in the skin. *Sci. Rep.* **8**, 1–6 (2018).
248. Biswas, K. B. *et al.* GPNMB is expressed in human epidermal keratinocytes but disappears in the vitiligo lesional skin. *Sci. Rep.* **10**, 4930 (2020).
249. Zhang, P. *et al.* Silencing of GPNMB by siRNA inhibits the formation of melanosomes in melanocytes in a MITF-independent fashion. *PloS One* **7**, e42955 (2012).
250. Strong Rodrigues, K., Oliveira-Ribeiro, C., de Abreu Fiuza Gomes, S. & Knobler, R. Cutaneous Graft-Versus-Host Disease: Diagnosis and Treatment. *Am. J. Clin. Dermatol.* **19**, 33–50 (2018).
251. Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *The Lancet* **373**, 1550–1561 (2009).
252. Kordelas, L. *et al.* Decreased Soluble Human Leukocyte Antigen E Levels in Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Are Associated With Severe Acute and Extended Chronic Graft-versus-Host Disease and Inferior Overall Survival. *Front. Immunol.* **10**, 3027 (2019).
253. Maux, A. L. *et al.* Soluble human leucocyte antigen-G molecules in peripheral blood haematopoietic stem cell transplantation: a specific role to prevent acute graft-versus-host disease and a link with regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **152**, 50–56 (2008).
254. Kordelas, L. *et al.* Elevated soluble human leukocyte antigen G levels in patients after allogeneic stem cell transplantation are associated with less severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* **53**, 1149–1156 (2018).
255. Debureaux, P.-E. *et al.* Chronic graft-versus-host disease and inhibition of interleukin-17: proof of concept in humans. *Br. J. Dermatol.* **182**, 1038–1041 (2020).

256. Paczesny, S. *et al.* Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Sci. Transl. Med.* **2**, 13ra2 (2010).
257. Shin, J. U. *et al.* Effect of recombinant human epidermal growth factor on cutaneous scar quality in thyroidectomy patients. *J. Dermatol. Treat.* **26**, 159–164 (2015).
258. Yang, S., Geng, Z., Ma, K., Sun, X. & Fu, X. Efficacy of Topical Recombinant Human Epidermal Growth Factor for Treatment of Diabetic Foot Ulcer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **15**, 120–125 (2016).
259. Lay, K. *et al.* Stem cells repurpose proliferation to contain a breach in their niche barrier. *eLife* **7**, e41661 (2018).
260. Harrison, O. J. *et al.* Commensal-specific T cell plasticity promotes rapid tissue adaptation to injury. *Science* **363**, (2019).
261. Sun, B. K., Siprashvili, Z. & Khavari, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science* **346**, 941–945 (2014).
262. De Luca, M. *et al.* Advances in stem cell research and therapeutic development. *Nat. Cell Biol.* **21**, 801–811 (2019).
263. World Health Organization. Brûlures. in (2008).
264. World Health Organization. Brûlures, principaux faits. (2018).
265. Herndon, david. Total Burn Care. in (2012).
266. Forjuoh, S. N. The mechanisms, intensity of treatment, and outcomes of hospitalized burns: issues for prevention. *J. Burn Care Rehabil.* **19**, 456–460 (1998).
267. Barret, J. P., Gomez, P., Solano, I., Gonzalez-Dorrego, M. & Crisol, F. J. Epidemiology and mortality of adult burns in Catalonia. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* **25**, 325–329 (1999).

268. Onarheim, H., Jensen, S. A., Rosenberg, B. E. & Guttormsen, A. B. The epidemiology of patients with burn injuries admitted to Norwegian hospitals in 2007. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* **35**, 1142–1146 (2009).
269. Alvo, R. *et al.* Alternative a la greffe de peau pour la couverture des brûlures profondes de la face dorsale de la main en aigu: revue de la littérature. *Ann. Burns Fire Disasters* **30**, 296–302 (2017).
270. World Health Organization. TRAITEMENT DE L'INFECTION À MYCOBACTERIUM ULCERANS (ULCÈRE DE BURULI). (2012).
271. World Health Organization. Ulcère de Buruli, principaux faits. (2019).
272. Hirsch, T. *et al.* Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* **551**, 327–332 (2017).
273. Pellegrini, G. *et al.* The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation* **68**, 868–879 (1999).
274. Ronfard, V., Rives, J. M., Neveux, Y., Carsin, H. & Barrandon, Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation* **70**, 1588–1598 (2000).
275. Mavilio, F. *et al.* Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.* **12**, 1397–1402 (2006).
276. Cortez Ghio, S., Le-Bel, G., Lavoie, A., Larouche, D. & Germain, L. Isolation and Culture of Human Keratinocytes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1993**, 3–13 (2019).
277. Todaro, G. J. & Green, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* **17**, 299–313 (1963).

278. Masson-Gadais, B. *et al.* The feeder layer-mediated extended lifetime of cultured human skin keratinocytes is associated with altered levels of the transcription factors Sp1 and Sp3. *J. Cell. Physiol.* **206**, 831–842 (2006).
279. Vaughan, F. L., Kass, L. L. & Uzman, J. A. Requirement of hydrocortisone and insulin for extended proliferation and passage of rat keratinocytes. *In Vitro* **17**, 941–946 (1981).
280. Green, H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. *Cell* **15**, 801–811 (1978).
281. Suzuki, D., Pinto, F. & Senoo, M. Promotion of Human Epidermal Keratinocyte Expansion in Feeder Cell Co-culture. in *Skin Tissue Engineering: Methods and Protocols* (eds. Böttcher-Haberzeth, S. & Biedermann, T.) 15–31 (Springer New York, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-9473-1_2.
282. Agrawal, N. A., Zavlin, D., Louis, M. R. & Reece, E. M. Stem Cells and Plastic Surgery. *Semin. Plast. Surg.* **33**, 162–166 (2019).
283. Bisson, F. *et al.* Irradiated human dermal fibroblasts are as efficient as mouse fibroblasts as a feeder layer to improve human epidermal cell culture lifespan. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 4684–4704 (2013).
284. Coolen, N. A. *et al.* Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells. *Cell Transplant.* **16**, 649–661 (2007).
285. Lamb, R. & Ambler, C. A. Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model. *PloS One* **8**, e52494 (2013).
286. Zuliani, T., Saiagh, S., Knol, A.-C., Esbelin, J. & Dréno, B. Fetal fibroblasts and keratinocytes with immunosuppressive properties for allogeneic cell-based wound therapy. *PloS One* **8**, e70408 (2013).

287. Moriyama, M. *et al.* Adipose-derived stromal/stem cells improve epidermal homeostasis. *Sci. Rep.* **9**, 18371 (2019).
288. Wong, C.-W. *et al.* In Vitro Expansion of Keratinocytes on Human Dermal Fibroblast-Derived Matrix Retains Their Stem-Like Characteristics. *Sci. Rep.* **9**, 18561 (2019).
289. Cirodde, A. *et al.* Cultured epithelial autografts in massive burns: A single-center retrospective study with 63 patients. *Burns* **37**, 964–972 (2011).
290. Sood, R. *et al.* Cultured Epithelial Autografts for Coverage of Large Burn Wounds in Eighty-Eight Patients: The Indiana University Experience. *J. Burn Care Res.* **31**, 559–568 (2010).
291. Alexaline, M. M. *et al.* Bioengineering a Human Plasma-Based Epidermal Substitute With Efficient Grafting Capacity and High Content in Clonogenic Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **4**, 643–654 (2015).
292. Blais, M., Lévesque, P., Bellenfant, S. & Berthod, F. Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3 and Glial-Derived Neurotrophic Factor Enhance Angiogenesis in a Tissue-Engineered In Vitro Model. *Tissue Eng. Part A* **19**, 1655–1664 (2013).
293. Larcher, F. *et al.* Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **15**, 1670–1676 (2007).
294. Li, H. *et al.* IL1 α , IL6 and GMCSF, are Downstream Mediators of IL17A that Promote Asymmetric Stem Cell Self-Renewal in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* (2020) doi:10.1016/j.jid.2020.05.112.
295. Sevilla, L. M. *et al.* Glucocorticoid receptor and Klf4 co-regulate anti-inflammatory genes in keratinocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **412**, 281–289 (2015).

296. Bradley, J. A., Bolton, E. M. & Pedersen, R. A. Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 859 (2002).
297. Guenou, H. *et al.* Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet Lond. Engl.* **374**, 1745–1753 (2009).
298. Malik, N. N., Jenkins, A. M., Mellon, J. & Bailey, G. Engineering strategies for generating hypoimmunogenic cells with high clinical and commercial value. *Regen. Med.* (2019) doi:10.2217/rme-2019-0117.
299. Lanza, R., Russell, D. W. & Nagy, A. Engineering universal cells that evade immune detection. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 723–733 (2019).
300. Pilon, C. B. *et al.* Administration of Low Doses of IL-2 Combined to Rapamycin Promotes Allogeneic Skin Graft Survival in Mice. *Am. J. Transplant.* **14**, 2874–2882 (2014).
301. Deuse, T. *et al.* Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat. Biotechnol.* (2019) doi:10.1038/s41587-019-0016-3.
302. Xu, H. *et al.* Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell* (2019) doi:10.1016/j.stem.2019.02.005.
303. Rong, Z. *et al.* An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell Stem Cell* **14**, 121–130 (2014).
304. Fife, B. T. & Bluestone, J. A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol. Rev.* **224**, 166–182 (2008).
305. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).

306. Castro-Manrreza, M. E. & Montesinos, J. J. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J. Immunol. Res.* **2015**, 394917 (2015).
307. Ma, O. K.-F. & Chan, K. H. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. *World J. Stem Cells* **8**, 268–278 (2016).
308. Du, W.-J. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow and Adipose Tissue Maintain Their Immunosuppressive Properties After Chondrogenic Differentiation: Role of HLA-G. *Stem Cells Dev.* **25**, 1454–1469 (2016).
309. Ma, S. *et al.* Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* **21**, 216–225 (2014).
310. Ritprajak, P. & Azuma, M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **51**, 221–228 (2015).
311. Ritprajak, P., Hashiguchi, M., Tsushima, F., Chalermarp, N. & Azuma, M. Keratinocyte-Associated B7-H1 Directly Regulates Cutaneous Effector CD8⁺ T Cell Responses. *J. Immunol.* **184**, 4918–4925 (2010).
312. Sun, C., Mezzadra, R. & Schumacher, T. N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* **48**, 434–452 (2018).
313. Kim, D. S. *et al.* Programmed death-ligand 1, 2 expressions are decreased in the psoriatic epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* **307**, 531–538 (2015).
314. Baumeister, S. H., Freeman, G. J., Dranoff, G. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 539–573 (2016).

315. Rouas-Freiss, N., Gonçalves, R. M., Menier, C., Dausset, J. & Carosella, E. D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11520–11525 (1997).
316. Ponte, M. *et al.* Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5674–5679 (1999).
317. González, Ñ. *et al.* The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **49**, 63–84 (2012).
318. Gonzalez, Á., Alegre, E., Arroyo, A., LeMaout, J. & Echeveste, J. I. Identification of Circulating Nonclassic Human Leukocyte Antigen G (HLA-G)–Like Molecules in Exudates. *Clin. Chem.* **57**, 1013–1022 (2011).
319. Davis, D. M. *et al.* Impaired spontaneous endocytosis of HLA-G. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2714–2719 (1997).
320. Carosella, E. D. *et al.* HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv. Immunol.* **81**, 199–252 (2003).
321. Ishitani, A. & Geraghty, D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3947–3951 (1992).
322. Kirszenbaum, M., Moreau, P., Gluckman, E., Dausset, J. & Carosella, E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4209–4213 (1994).
323. Moreau, P. *et al.* HLA-G mRNA forms in human trophoblasts and peripheral blood lymphocytes: potential use in prenatal diagnosis. *Folia Biol. (Praha)* **40**, 431–438 (1994).

324. Fujii, T., Ishitani, A. & Geraghty, D. E. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **153**, 5516–5524 (1994).
325. Moreau, P. *et al.* Soluble HLA-G molecule: An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts. *Hum. Immunol.* **43**, 231–236 (1995).
326. Paul, P. *et al.* Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum. Immunol.* **61**, 1138–1149 (2000).
327. Münz, C., Stevanović, S. & Rammensee, H.-G. Peptide presentation and NK inhibition by HLA-G. *J. Reprod. Immunol.* **43**, 139–155 (1999).
328. Tronik-Le Roux, D. *et al.* Novel landscape of HLA-G isoforms expressed in clear cell renal cell carcinoma patients. *Mol. Oncol.* **11**, 1561–1578 (2017).
329. Boyson, J. E. *et al.* Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 16180–16185 (2002).
330. Shiroishi, M. *et al.* Efficient Leukocyte Ig-like Receptor Signaling and Crystal Structure of Disulfide-linked HLA-G Dimer. *J. Biol. Chem.* **281**, 10439–10447 (2006).
331. Shiroishi, M. *et al.* Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 16412–16417 (2006).
332. Kuroki, K. & Maenaka, K. Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1727–1729 (2007).
333. Tilburgs, T. *et al.* Human HLA-G⁺ extravillous trophoblasts: Immune-activating cells that interact with decidual leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 7219–7224 (2015).

334. Zhong, M. *et al.* Dimerization of Soluble HLA-G by IgG-Fc Fragment Augments ILT2-Mediated Inhibition of T-Cell Alloresponse: *Transplantation* **87**, 8–15 (2009).
335. Park, G. M. *et al.* Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 606–611 (2004).
336. HoWangYin, K.-Y. *et al.* MULTIMERIC STRUCTURES OF HLA-G ISOFORMS FUNCTION THROUGH DIFFERENTIAL BINDING TO LILRB RECEPTORS. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **69**, 4041–4049 (2012).
337. Díaz-Lagares, A., Alegre, E., LeMaoult, J., Carosella, E. D. & González, Á. Nitric oxide produces HLA-G nitration and induces metalloprotease-dependent shedding creating a tolerogenic milieu. *Immunology* **126**, 436–445 (2009).
338. Díaz-Lagares, Á., Alegre, E. & Gonzalez, Á. Detection of 3-nitrotyrosine-modified human leukocyte antigen–G in biological fluids. *Hum. Immunol.* **70**, 976–980 (2009).
339. Furukawa, A. *et al.* Evaluation of the Reactivity and Receptor Competition of HLA-G Isoforms toward Available Antibodies: Implications of Structural Characteristics of HLA-G Isoforms. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
340. Lin, A. *et al.* Clinical Significance of Potential Unidentified HLA-G Isoforms Without $\alpha 1$ Domain but Containing Intron 4 in Colorectal Cancer Patients. *Front. Oncol.* **8**, (2018).
341. Menier, C. *et al.* Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum. Immunol.* **64**, 315–326 (2003).
342. Blaschitz, A., Hutter, H. & Dohr, G. HLA Class I protein expression in the human placenta. *Early Pregnancy Online* **5**, 67–69 (2001).
343. Giacomini, E. *et al.* Embryonic extracellular vesicles as informers to the immune cells at the maternal-fetal interface. *Clin. Exp. Immunol.* **198**, 15–23 (2019).

344. Crisa, L., McMaster, M. T., Ishii, J. K., Fisher, S. J. & Salomon, D. R. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J. Exp. Med.* **186**, 289–298 (1997).
345. Cirulli, V. *et al.* The Class I HLA Repertoire of Pancreatic Islets Comprises the Nonclassical Class Ib Antigen HLA-G. *Diabetes* **55**, 1214 (2006).
346. Le Discorde, M., Moreau, P., Sabatier, P., Legeais, J.-M. & Carosella, E. D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum. Immunol.* **64**, 1039–1044 (2003).
347. Selmani, Z. *et al.* HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation* **87**, S62-66 (2009).
348. Alegre, E. *et al.* Some Basic Aspects of HLA-G Biology. *Journal of Immunology Research* <https://www.hindawi.com/journals/jir/2014/657625/> (2014)
doi:10.1155/2014/657625.
349. LeMaout, J. *et al.* Synthetic HLA-G proteins for therapeutic use in transplantation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **27**, 3643–3651 (2013).
350. Moreau, P. *et al.* IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int. Immunol.* **11**, 803–811 (1999).
351. Cismaru, C. A. *et al.* Isolation and Characterization of a Fetal-Maternal Microchimeric Stem Cell Population in Maternal Hair Follicles Long after Parturition. *Stem Cell Rev. Rep.* (2019) doi:10.1007/s12015-019-09885-4.
352. Yang, Y., Chu, W., Geraghty, D. E. & Hunt, J. S. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156**, 4224–4231 (1996).
353. Aractingi, S. *et al.* HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? *Am. J. Pathol.* **159**, 71–77 (2001).

354. Onno, M. *et al.* Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 6426–6434 (2000).
355. Carosella, E. D., Paul, P., Moreau, P. & Rouas-Freiss, N. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunol. Today* **21**, 532–534 (2000).
356. Morandi, F., Rizzo, R., Fainardi, E., Rouas-Freiss, N. & Pistoia, V. Recent Advances in Our Understanding of HLA-G Biology: Lessons from a Wide Spectrum of Human Diseases. *J. Immunol. Res.* **2016**, 1–14 (2016).
357. Lila, N. *et al.* Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet Lond. Engl.* **355**, 2138 (2000).
358. Bertol, B. C. *et al.* HLA-G liver expression and HLA-G extended haplotypes are associated with chronic hepatitis C in HIV-negative and HIV-coinfected patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 108482 (2020) doi:10.1016/j.clim.2020.108482.
359. da Silva, C. R. *et al.* Analysis of HLA-G protein expression in leprosy. *Immunogenetics* **72**, 333–337 (2020).
360. Lin, A. & Yan, W. Intercellular transfer of HLA-G: its potential in cancer immunology. *Clin. Transl. Immunol.* **8**, (2019).
361. Deschaseaux, F. *et al.* HLA-G in organ transplantation: towards clinical applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 397–404 (2011).
362. Rizzo, R. *et al.* The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs. *Immunogenetics* **57**, 172–181 (2005).
363. Brugière, O. *et al.* Immunohistochemical Study of HLA-G Expression in Lung Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* **9**, 1427–1438 (2009).

364. Lefebvre, S. *et al.* A Specific Interferon (IFN)-stimulated Response Element of the Distal HLA-G Promoter Binds IFN-regulatory Factor 1 and Mediates Enhancement of This Nonclassical Class I Gene by IFN- β . *J. Biol. Chem.* **276**, 6133–6139 (2001).
365. Rebmann, V., Regel, J., Stolke, D. & Grosse-Wilde, H. Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 371–377 (2003).
366. Svendsen, S. G. *et al.* Expression and differential regulation of HLA-G isoforms in the retinal pigment epithelial cell line, ARPE-19. *Hum. Immunol.* **78**, 414–420 (2017).
367. Moreau, P. *et al.* HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 1191–1196 (2003).
368. Poláková, K., Bandžuchová, E., Kuba, D. & Russ, G. Demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates HLA-G expression in human leukemia cell lines. *Leuk. Res.* **33**, 518–524 (2009).
369. Dunker, K. *et al.* Expression and regulation of non-classical HLA-G in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* **72**, 137–148 (2008).
370. Miguel Real, L. *et al.* Expression of HLA G in human tumors is not a frequent event. *Int. J. Cancer* **81**, 512–518 (1999).
371. Jasinski-Bergner, S. *et al.* Clinical relevance of miR-mediated HLA-G regulation and the associated immune cell infiltration in renal cell carcinoma. *OncoImmunology* **4**, e1008805 (2015).
372. Flajollet, S., Poras, I., Carosella, E. D. & Moreau, P. RREB-1 Is a Transcriptional Repressor of HLA-G. *J. Immunol.* **183**, 6948–6959 (2009).
373. Yie, S. -m., Xiao, R. & Librach, C. L. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum. Reprod.* **21**, 2538–2544 (2006).
374. Sheshgiri, R. *et al.* Progesterone induces human leukocyte antigen-g expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation* **118**, S58-64 (2008).

375. Hviid, T. V. F. *et al.* HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* **56**, 135–141 (2004).
376. Tan, Z., Shon, A. M. & Ober, C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3619–3628 (2005).
377. Melo-Lima, B. L. *et al.* The Autoimmune Regulator (Aire) transactivates HLA-G gene expression in thymic epithelial cells. *Immunology* **158**, 121–135 (2019).
378. Deschaseaux, F. *et al.* Regulation and function of immunosuppressive molecule human leukocyte antigen G5 in human bone tissue. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **27**, (2013).
379. LeMaout, J., Zafaranloo, K., Le Danff, C. & Carosella, E. D. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 662–664 (2005).
380. Rouas-Freiss, N., Naji, A., Durrbach, A. & Carosella, E. D. Tolerogenic Functions of Human Leukocyte Antigen G: From Pregnancy to Organ and Cell Transplantation. *Transplantation* **84**, S21 (2007).
381. Colonna, M. *et al.* A Common Inhibitory Receptor for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on Human Lymphoid and Myelomonocytic Cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1809–1818 (1997).
382. Cosman, D. *et al.* A Novel Immunoglobulin Superfamily Receptor for Cellular and Viral MHC Class I Molecules. *Immunity* **7**, 273–282 (1997).
383. Colonna, M. *et al.* Cutting Edge: Human Myelomonocytic Cells Express an Inhibitory Receptor for Classical and Nonclassical MHC Class I Molecules. *J. Immunol.* **160**, 3096–3100 (1998).

384. Rajagopalan, S. & Long, E. O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* **189**, 1093–1100 (1999).
385. Hò, G.-G. T. *et al.* NKG2A/CD94 Is a New Immune Receptor for HLA-G and Distinguishes Amino Acid Differences in the HLA-G Heavy Chain. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4362 (2020).
386. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **22**, 633–640 (2001).
387. Rajagopalan, S. *et al.* Activation of NK Cells by an Endocytosed Receptor for Soluble HLA-G. *PLoS Biol.* **4**, e9 (2005).
388. Shiroishi, M. *et al.* Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8856–8861 (2003).
389. Nguyen-Lefebvre, A. T. *et al.* Mouse models for studies of HLA-G functions in basic science and pre-clinical research. *Hum. Immunol.* **77**, 711–719 (2016).
390. Carosella, E. D., Favier, B., Rouas-Freiss, N., Moreau, P. & LeMaoult, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* **111**, 4862–4870 (2008).
391. Gonen-Gross, T. *et al.* The CD85J/Leukocyte Inhibitory Receptor-1 Distinguishes between Conformed and 2-Microglobulin-Free HLA-G Molecules. *J. Immunol.* **175**, 4866–4874 (2005).
392. Kuroki, K. *et al.* Structural and Functional Basis for LILRB Immune Checkpoint Receptor Recognition of HLA-G Isoforms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* (2019) doi:10.4049/jimmunol.1900562.

393. Rouas-Freiss, N., LeMaoult, J., Moreau, P., Dausset, J. & Carosella, E. D. HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **3**, 11–16 (2003).
394. Horuzsko, A., Lenfant, F., Munn, D. H. & Mellor, A. L. Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice. *Int. Immunol.* **13**, 385–394 (2001).
395. Gregori, S. *et al.* Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* **116**, 935–944 (2010).
396. Grazia Roncarolo, M. *et al.* Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* **212**, 28–50 (2006).
397. Groux, H. *et al.* A CD4⁺T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737 (1997).
398. Rossetti, M., Gregori, S. & Roncarolo, M. G. Granulocyte-colony stimulating factor drives the in vitro differentiation of human dendritic cells that induce anergy in naïve T cells. *Eur. J. Immunol.* **40**, 3097–3106 (2010).
399. Khalil-Daher, I. *et al.* Role of HLA-G versus HLA-E on NK function: HLA-G is able to inhibit NK cytotoxicity by itself. *J. Reprod. Immunol.* **43**, 175–182 (1999).
400. Marchal-Bras-Goncalves, R. *et al.* A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant. Proc.* **33**, 2355–2359 (2001).
401. Navarro, F. *et al.* The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 277–283 (1999).
402. Rouas-Freiss, N., Marchal, R. E., Kirszenbaum, M., Dausset, J. & Carosella, E. D. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer

- cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5249–5254 (1997).
403. Forte, P. *et al.* HLA-G inhibits rolling adhesion of activated human NK cells on porcine endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 6002–6008 (2001).
404. Forte, P., Matter-Reissmann, U. B., Strasser, M., Schneider, M. K. & Seebach, J. D. Porcine aortic endothelial cells transfected with HLA-G are partially protected from xenogeneic human NK cytotoxicity. *Hum. Immunol.* **61**, 1066–1073 (2000).
405. Matsunami, K., Miyagawa, S., Nakai, R., Murase, A. & Shirakura, R. The possible use of HLA-G1 and G3 in the inhibition of NK cell-mediated swine endothelial cell lysis. *Clin. Exp. Immunol.* **126**, 165–172 (2001).
406. Sasaki, H., Xu, X. C. & Mohanakumar, T. HLA-E and HLA-G expression on porcine endothelial cells inhibit xenoreactive human NK cells through CD94/NKG2-dependent and -independent pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**, 6301–6305 (1999).
407. Sasaki, H., Xu, X. C., Smith, D. M., Howard, T. & Mohanakumar, T. HLA-G expression protects porcine endothelial cells against natural killer cell-mediated xenogeneic cytotoxicity. *Transplantation* **67**, 31–37 (1999).
408. Fournel, S. *et al.* Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8⁺ cells by interacting with CD8. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 6100–6104 (2000).
409. van der Meer, A. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-production by uterine natural killer cells. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 189–195 (2004).
410. van der Meer, A. *et al.* Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* **13**, 123–133 (2007).

411. Jacquier, A., Dumont, C., Carosella, E. D., Rouas-Freiss, N. & LeMaout, J. Cytometry-based analysis of HLA-G functions according to ILT2 expression. *Hum. Immunol.* (2020) doi:10.1016/j.humimm.2020.02.001.
412. Naji, A. *et al.* Binding of HLA-G to ITIM-Bearing Ig-like Transcript 2 Receptor Suppresses B Cell Responses. *J. Immunol.* **192**, 1536–1546 (2014).
413. Lombard, C. A. *et al.* Human Hepatocytes and Differentiated Adult-Derived Human Liver Stem/Progenitor Cells Display In Vitro Immunosuppressive Properties Mediated, at Least in Part, through the Nonclassical HLA Class I Molecule HLA-G. *J. Immunol. Res.* **2019**, (2019).
414. Bainbridge, D. R., Ellis, S. A. & Sargent, I. L. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J. Reprod. Immunol.* **48**, 17–26 (2000).
415. Lila, N., Rouas-Freiss, N., Dausset, J., Carpentier, A. & Carosella, E. D. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12150–12155 (2001).
416. Riteau, B. *et al.* HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J. Reprod. Immunol.* **43**, 203–211 (1999).
417. Kapasi, K., Albert, S. E., Yie, S., Zavazava, N. & Librach, C. L. HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology* **101**, 191–200 (2000).
418. Le Gal, F. A. *et al.* HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* **11**, 1351–1356 (1999).
419. Riteau, B. *et al.* HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 5018–5026 (2001).

420. Dumont, C. *et al.* CD8+PD-1-ILT2+ T cells are an intratumoral cytotoxic population selectively inhibited by the immune checkpoint HLA-G. *Cancer Immunol. Res.* (2019) doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0764.
421. Bahri, R. *et al.* Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 1331–1339 (2006).
422. Le Rond, S. *et al.* Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 3266–3276 (2006).
423. LeMaoult, J., Krawice-Radanne, I., Dausset, J. & Carosella, E. D. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7064–7069 (2004).
424. Pankratz, S. *et al.* Human CD4⁺ HLA-G⁺ regulatory T cells are potent suppressors of graft-versus-host disease *in vivo*. *FASEB J.* **28**, 3435–3445 (2014).
425. Morandi, F., Rouas-Freiss, N. & Pistoia, V. The emerging role of soluble HLA-G in the control of chemotaxis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 327–335 (2014).
426. Morandi, F. *et al.* A Novel Mechanism of Soluble HLA-G Mediated Immune Modulation: Downregulation of T Cell Chemokine Receptor Expression and Impairment of Chemotaxis. *PLoS ONE* **5**, e11763 (2010).
427. Morandi, F. *et al.* Soluble HLA-G dampens CD94/NKG2A expression and function and differentially modulates chemotaxis and cytokine and chemokine secretion in CD56bright and CD56dim NK cells. *Blood* **118**, 5840–5850 (2011).
428. Baudhuin, J. *et al.* Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 17957–17962 (2013).

429. Fons, P. *et al.* Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* **108**, 2608–2615 (2006).
430. Mociornita, A. G. *et al.* Effects of everolimus and HLA-G on cellular proliferation and neutrophil adhesion in an in vitro model of cardiac allograft vasculopathy. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **18**, 3038–3044 (2018).
431. Paul, P. *et al.* Heterogeneity of HLA-G gene transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies. *Cancer Res.* **59**, 1954–1960 (1999).
432. Ugurel, S. *et al.* Soluble human leukocyte antigen--G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer* **92**, 369–376 (2001).
433. Wagner, S. N., Rebmann, V., Willers, C. P., Grosse-Wilde, H. & Goos, M. Expression analysis of classic and non-classic HLA molecules before interferon alfa-2b treatment of melanoma. *Lancet Lond. Engl.* **356**, 220–221 (2000).
434. Tronik-Le Roux, D. *et al.* Comprehensive landscape of immune-checkpoints uncovered in clear cell renal cell carcinoma reveals new and emerging therapeutic targets. *Cancer Immunol. Immunother. CII* (2020) doi:10.1007/s00262-020-02530-x.
435. Sheshgiri, R., Rao, V., Mociornita, A., Ross, H. J. & Delgado, D. H. Association Between HLA-G Expression and C4d Staining in Cardiac Transplantation. *Transplantation* **89**, 480 (2010).
436. Adamson, M. B. *et al.* HLA-G 14BP Polymorphism Matching Protects against Development of Post-Transplant Malignancy Following Heart Transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **38**, S142–S143 (2019).

437. Adamson, M. B. *et al.* HLA-G +3196 polymorphism as a risk factor for cell mediated rejection following heart transplant. *Hum. Immunol.* (2020)
doi:10.1016/j.humimm.2020.01.002.
438. Piancatelli, D. *et al.* Evaluation of Plasma Levels of Soluble HLA-G and HLA-G Genotypes in Kidney Transplant Recipients. *Transplant. Proc.* (2020)
doi:10.1016/j.transproceed.2020.02.044.
439. Piancatelli, D. *et al.* HLA-G14bp ins/del polymorphism and post-transplant weight gain in kidney transplantation: potential implications beyond tolerance. *BMC Nephrol.* **21**, 109 (2020).
440. Ajith, A. *et al.* HLA-G and humanized mouse models as a novel therapeutic approach in transplantation. *Hum. Immunol.* (2020) doi:10.1016/j.humimm.2020.02.006.
441. Li, C. *et al.* Exosome-based targeted RNA delivery for immune tolerance induction in skin transplantation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **108**, 1493–1500 (2020).
442. Proust, R. *et al.* Cord blood-endothelial colony forming cells are immunotolerated and participate at post-ischemic angiogenesis in an original dorsal chamber immunocompetent mouse model. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 172 (2020).
443. Tsuji, H. *et al.* Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ. Res.* **106**, 1613–1623 (2010).
444. Cai, Y.-J., Huang, L., Leung, T.-Y. & Burd, A. A study of the immune properties of human umbilical cord lining epithelial cells. *Cytotherapy* **16**, 631–639 (2014).
445. Zhao, L., Teklemariam, T. & Hantash, B. M. Heterologous expression of mutated HLA-G decreases immunogenicity of human embryonic stem cells and their epidermal derivatives. *Stem Cell Res.* **13**, 342–354 (2014).

446. Teklemariam, T., Zhao, L. & Hantash, B. M. Heterologous expression of mutated *HLA-G1* reduces alloreactivity of human dermal fibroblasts. *Regen. Med.* **9**, 775–784 (2014).
447. O Fortunel, N. *et al.* Cellular adhesion on collagen: A simple method to select human basal keratinocytes which preserves their high growth capacity. *Eur. J. Dermatol. EJD* **21 Suppl 2**, 12–20 (2011).
448. Zaritskaya, L., Shurin, M. R., Sayers, T. J. & Malyguine, A. M. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Rev. Vaccines* **9**, 601–616 (2010).
449. Brunner, K. T., Mauel, J., Cerottini, J. C. & Chapuis, B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**, 181–196 (1968).
450. Delisle, J.-S. *et al.* The TGF- β -Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells. *Genes Immun.* **14**, 115–126 (2013).
451. Mestrallet, G. *et al.* Human Keratinocytes Inhibit CD4+ T-Cell Proliferation through TGFB1 Secretion and Surface Expression of HLA-G1 and PD-L1 Immune Checkpoints. *Cells* **10**, 1438 (2021).
452. McIntire, R. H., Morales, P. J., Petroff, M. G., Colonna, M. & Hunt, J. S. Recombinant HLA-G5 and -G6 drive U937 myelomonocytic cell production of TGF-beta1. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 1220–1228 (2004).
453. Guan, Z. *et al.* TGF- β induces HLA-G expression through inhibiting miR-152 in gastric cancer cells. *J. Biomed. Sci.* **22**, 107 (2015).
454. Dahmani, A. & Delisle, J.-S. TGF- β in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers* **10**, (2018).
455. Oh, S. A. & Li, M. O. TGF- β : Guardian of T Cell Function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 3973 (2013).

456. Dupin, C. *et al.* Inhibition of T Cell Alloreactivity by Bronchial Epithelium Is Impaired in Lung Transplant Recipients, Through Pathways Involving TGF- β , IL-10 and HLA-G. *Transplantation* **101**, 2192–2199 (2017).
457. Yi, M., Niu, M., Xu, L., Luo, S. & Wu, K. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* **14**, 10 (2021).
458. Urosevic, M. HLA-G in the skin—Friend or foe? *Semin. Cancer Biol.* **17**, 480–484 (2007).
459. Ulbrecht, M. *et al.* HLA-G: expression in human keratinocytes in vitro and in human skin in vivo. *Eur. J. Immunol.* **24**, 176–180 (1994).
460. Khosrotehrani, K. *et al.* HLA-G Expression in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 750–752 (2001).
461. Gazit, E., Slomov, Y., Goldberg, I., Brenner, S. & Loewenthal, R. HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. *Hum. Immunol.* **65**, 39–46 (2004).
462. Gazit, E. & Loewenthal, R. The immunogenetics of pemphigus vulgaris. *Autoimmun. Rev.* **4**, 16–20 (2005).
463. Bae, S.-C. & Lee, Y. H. Association of HLA-G polymorphisms with systemic lupus erythematosus and correlation between soluble HLA-G levels and the disease: a meta-analysis. *Z. Rheumatol.* (2020) doi:10.1007/s00393-020-00783-6.
464. Aractingi, S., Kanitakis, J., Euvrard, S., Danff, C. L. & Carosella, E. D. Selective expression of HLA-G in malignant and premalignant skin specimens in kidney transplant recipients. *Int. J. Cancer* **106**, 232–235 (2003).
465. Urosevic, M., Kamarashev, J., Burg, G. & Dummer, R. Primary cutaneous CD8⁺ and CD56⁺ T-cell lymphomas express HLA-G and killer-cell inhibitory ligand, ILT2. *Blood* **103**, 1796–1798 (2004).

466. Urosevic, M. *et al.* HLA-G expression in basal cell carcinomas of the skin recurring after radiotherapy. *Clin. Exp. Dermatol.* **30**, 422–425 (2005).
467. Geertsen, R. C. *et al.* Higher Frequency of Selective Losses of HLA-A and -B Allospecificities in Metastasis Than in Primary Melanoma Lesions. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 497–502 (1998).
468. Ferrone, S. & Marincola, F. M. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol. Today* **16**, 487–494 (1995).
469. Ljunggren, H. G. & Kärre, K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* **11**, 237–244 (1990).
470. Paul, P. *et al.* HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4510–4515 (1998).
471. Anna, F. *et al.* First immunotherapeutic CAR-T cells against the immune checkpoint protein HLA-G. *J. Immunother. Cancer* **9**, (2021).
472. Blanpain, C. & Fuchs, E. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science* **344**, (2014).
473. Carosella, E. D., Rouas-Freiss, N., Tronik-Le Roux, D., Moreau, P. & LeMaoult, J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv. Immunol.* **127**, 33–144 (2015).
474. Barker, N. *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **457**, 608–611 (2009).
475. Rosenberg, S. A. & Restifo, N. P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* **348**, 62–68 (2015).
476. Agudo, J. *et al.* Quiescent Tissue Stem Cells Evade Immune Surveillance. *Immunity* **48**, 271-285.e5 (2018).

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs et les examinateurs qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci à mes encadrants, à mes collègues et aux étudiants du CEA à Evry et au SRHI à Saint Louis de m'avoir accueilli pendant ma thèse. Je remercie également le CEA pour m'avoir accordé un financement de thèse. Merci aussi aux cliniciens de l'HEGP pour les prélèvements qui ont permis de faire ce travail. Merci aux membres de mon comité de thèse pour leurs conseils. Enfin, merci à ma famille et à mes proches.

RÉSUMÉ

Titre : Propriétés immunitaires des kératinocytes humains et de leurs précurseurs

Mots clés : Immunologie, kératinocytes, cellules souches, HLA-G, PD-L1

Résumé : La peau humaine protège le corps des infections et des blessures. Cela implique des cellules immunitaires et des cellules épithéliales, mais leurs interactions sont encore peu caractérisées. Mon travail montre que les kératinocytes inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4 +, et ce même dans des conditions inflammatoires. Cela se fait par la sécrétion de facteurs solubles tels que le TGF- β ainsi que par l'expression à la surface cellulaire de points de contrôle immunitaires tels que HLA-G et PD-L1. À cet égard, je décris pour la première fois l'expression de la protéine HLA-G dans la peau humaine saine et son rôle dans l'immunomodulation tissulaire médiée par les kératinocytes. La surexpression de HLA-G avec un vecteur inductible augmente les propriétés immunosuppressives des kératinocytes, ouvrant des perspectives pour leur utilisation en thérapie cellulaire dans des contextes allogéniques. Les cellules souches sont essentielles pour le maintien et le renouvellement des tissus, mais leur capacité à se protéger des réactions immunitaires n'est pas encore bien caractérisée. Mon travail montre que les précurseurs de kératinocytes de l'épiderme interfolliculaire sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 +. L'échappement immunitaire des précurseurs de kératinocytes peut être expliquée par une surexpression des points de contrôle immunitaires HLA-G et PD-L1. Étant donné que les cellules initiateurs du cancer ont les caractéristiques de cellules souches, ces résultats indiquent des perspectives pour étudier l'échappement immunitaire dans le cancer de la peau et les pathologies auto-immunes.

Title : Immune properties of human keratinocytes and their precursors

Keywords : Immunology, keratinocytes, stem cells, HLA-G, PD-L1

Abstract : Human skin protects the body from infection and injury. It involves immune cells and epithelial cells, but their interactions remain to be explored. Here, we address this point showing that keratinocytes inhibit CD4+ T cell proliferation even under inflammatory conditions. This is done through secretion of soluble factors such as TGF- β as well as cell-surface expression of immune checkpoints such as HLA-G and PD-L1. In this regard, we describe for the first time the expression of HLA-G protein in healthy human skin and its role in tissue keratinocyte-driven immunomodulation. Overexpression of HLA-G with an inducible vector increases the immunosuppressive properties of keratinocytes, opening perspectives for their use in cell therapy in allogeneic settings. Stem cells are essential for the maintenance and renewal of tissues, but their ability to be protected from immune reactions remains unclear. Here, we show that keratinocyte precursors of the interfollicular epidermis are able to inhibit CD4+ T cell proliferation. The immune escape of keratinocyte precursors may be explained by an overexpression of HLA-G and PD-L1 immune checkpoints. Since cancer initiator cells have characteristics of stem cells, these results indicate prospects for investigating immune escape in skin cancer and autoimmune pathologies.