



Mécanismes de l'immunothérapie épicutanée des allergies alimentaires

Léo Laoubi

► To cite this version:

Léo Laoubi. Mécanismes de l'immunothérapie épicutanée des allergies alimentaires. Immunologie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1229 . tel-03405381

HAL Id: tel-03405381

<https://theses.hal.science/tel-03405381v1>

Submitted on 27 Oct 2021

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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1229

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Biologie cellulaire
Discipline : Immunologie

Soutenue publiquement le 27/11/2020, par :

Léo LAOUBI

Mécanismes de l'immunothérapie épicutanée des allergies alimentaires

Devant le jury composé de :

FAURE Mathias	Professeur, Université Lyon 1	Président
BELLIER Bertrand LI Mei	Professeur, Université Paris Sorbonnes Directrice de Recherche, CNRS	Rapporteur Rapporteuse
HENRI Sandrine HAMMAD Hamida	Directrice de Recherche, INSERM Directrice de Recherche, Univ.Ghent	Examinatrice Examinatrice
NICOLAS Jean-François VOCANSON Marc	Professeur, Université Lyon 1 Chargé de Recherche, INSERM	Directeur de thèse Membre invité

Université Claude Bernard - LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme. Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directeur : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique des Procédés (GEP)	Directrice: Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education (EPSE)	Administrateur provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Résumé en Français

L'allergie alimentaire est un problème majeur de santé publique qui affecte grandement la qualité de vie des patients, principalement des enfants, et peut causer des symptômes sévères voire mortels, lors de l'ingestion de faibles quantités d'un allergène. A l'heure actuelle, la seule recommandation efficace est l'éviction de l'allergène. Dans ce contexte, l'immunothérapie allergénique épicutanée (EPIT) est un traitement potentiel qui vise à réinduire une tolérance (désensibilisation) chez les patients allergiques via l'administration répétée sur la peau de l'allergène responsable. Les mécanismes immunitaires sous-jacents à l'efficacité de l'EPIT restent mal compris mais dépendent notamment de l'induction de lymphocytes T régulateurs (LT_{REG}) et d'une déviation immunitaire. Ainsi, mon projet de thèse avait pour objectif d'identifier (1) les populations de cellules dendritiques (DC) cutanées responsables de l'efficacité du traitement, et (2) déterminer les mécanismes associés aux DC qui participent à la désensibilisation. A l'aide de modèles pré-cliniques d'allergie, mes travaux de recherche ont permis d'identifier les cellules de Langerhans (LC) épidermiques comme essentielles à l'efficacité du traitement, contrairement aux cellules dendritiques conventionnelles de type 1 (cDC1) dermiques. En outre, l'étude longitudinale du phénotype et des fonctions des DC a mis en évidence que leur état d'activation était modulé avec EPIT. Fonctionnellement, après EPIT, les LC activent préférentiellement des LT_{REG} au détriment des LT_{EFF.}, tandis que les cDC2 réorientent la réponse lymphocytaire de type 2 (Th2) vers une réponse type 1 et type 17, limitant la réactivation des cellules effectrices (mastocytes) de l'anaphylaxie. Ces résultats ouvrent la voie au développement de biomarqueurs d'efficacité et à des stratégies d'amélioration du traitement pour une médecine personnalisée et plus efficace.

Mots clés : allergie alimentaire, immunothérapie allergénique, peau, cellule dendritique

Résumé en anglais (abstract)

Food allergy is a major public health which impacts patients' quality of life and can cause life-threatening allergic symptoms upon allergen ingestion. Currently, there is no efficacious treatment apart from allergen evicition. In that context, epicutaneous allergen immunotherapy (EPIT) is a potential treatment still in development which aims at re-inducing tolerance (desensitization) in allergic patients through repeated epicutaneous allergen application. Immune mechanisms underlying EPIT efficacy are poorly understood but imply the induction of regulatory T lymphocytes (T_{REG}) and an immune deviation. Thus, my thesis project aimed at (1) identifying the skin dendritic cell (skDC) subsets responsible for EPIT efficacy, and (2) determining the mechanisms associated with DC leading to desensitization. Taking advantage of preclinical mouse models, we demonstrated the requirement of epidermal Langerhans cells (LC) for EPIT efficacy contrary to conventional dermal type 1 DC (cDC1). Besides, the longitudinal monitoring of DC subsets revealed a modulation of their activation status with EPIT. Functionally, after EPIT, LC activated more preferentially T_{REG} at the detriment of T_{EFF}, while cDC2 skewed type 2 T cell response toward type 1 and type 17 profile, thus limiting mast cell degranulation. Those results open new avenues for the development of predictive biomarkers, strategies for improvement and future efficacious personalized medicine.

Keywords: food allergy, allergen immunotherapy, skin, dendritic cell

Intitulé et adresse de l'unité ou du laboratoire où la thèse a été préparée :

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

21 Avenue Tony Garnier

69007 LYON

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse, et en particulier je remercie les rapporteurs pour la lecture critique et approfondie de mon manuscrit de thèse. Je remercie Mathias Faure pour avoir accepté de présider ce jury pour ma soutenance de thèse.

Au Professeur Jean-François NICOLAS,

Après toutes ces années dans votre équipe (6 ans déjà), je vous remercie du temps et de l'investissement que vous avez consacré pour mon aventure de doctorant. Grâce à vous, j'ai pu améliorer mon raisonnement scientifique et mon esprit de synthèse au fil des années. Votre passion pour la recherche et la science ont été une source de motivation et d'inspiration à chacun de nos échanges. Enfin, je vous remercie pour votre soutien constant, votre dynamisme et votre exigence qui m'ont aidé dans mon développement personnel. J'espère que nous pourrons reparler de science autour d'un bon sabodet !

Au Docteur Marc VOCANSON,

Marc, je n'en serais pas là sans toi aujourd'hui : je te remercie de m'avoir fait confiance dès le premier jour en me permettant d'intégrer l'équipe JFN pour mon stage de Master 2. Pendant toutes ces années, tu auras été mon mentor scientifique, grâce à qui j'ai développé une rigueur scientifique et de nombreuses compétences, qui seront essentielles pour la suite de ma carrière. Tu auras également été une grande source d'inspiration sur le plan humain avec un équilibre permanent entre patience, exigence, rigueur, bonne humeur, compréhension, et positivité. Enfin, je te remercie pour tout le temps que tu as investi dans ma formation doctorale, toute la patience et le savoir-être que tu as déployé afin de me faire progresser quotidiennement, toute l'ingéniosité et la persévérance aussi, pour pallier aux verrous techniques auxquels nous avons pu faire face sur nos différents projets. Mon bagage scientifique et humain acquis grâce à toi me sera d'une grande aide pour la suite ! Vive l'ASSE !

Aux docteur.es Lucie Mondoulet et Vincent Dioszeghy,

Lucie et Vincent, je vous remercie de m'avoir fait confiance dès le début du projet de collaboration et d'avoir mis tout en œuvre pour que le partenariat se passe au mieux que ce soit sur le plan logistique et scientifique. Je n'oublierai jamais cette période de ma vie entre Montrouge et Lyon qui a été une expérience très riche pour moi, à tout point de vue.

Lucie, je n'oublierai jamais ton dynamisme, ta rigueur et ton engagement pour la réussite du projet et le bon déroulement de ma thèse. J'espère que nos chemins se recroiseront à Paris ou ailleurs!

Vincent, je te remercie pour ta disponibilité, ta positivité et ta sérénité qui ont été des atouts précieux pour l'avancée de mes idées, de mes travaux de recherche et de ma compréhension de l'EPIT.

J'ai développé grâce à toi des compétences essentielles pour réussir mes prochains projets scientifiques !

Aux membres de mon comité de suivi de thèse,

Je remercie Sandrine HENRI et Nathalie BENDRISS-VERMARE d'avoir été présente chaque année pour mon comité de suivi de thèse. Vous m'avez apporté un regard extérieur et nous avons eu des discussions très constructives et enrichissantes pour l'avancement de mon projet.

A l'équipe JFN-MV,

Je remercie tous les membres de l'équipe JFN présents ou passés qui ont pu m'aider à un moment ou un autre de mes projets. Je retiens la bonne humeur et le bon esprit d'équipe qui n'a cessé d'exister grâce à vous : Vanina, Aurélie, Amandine, Olivier, Floriane, Virginie, Audrey, Vijay, Peter, Emi, Pia, Pauline, Maxence.

Également, j'ai eu la chance de collaborer avec d'excellentes stagiaires au cours de ma thèse qui ont contribué à l'avancée du projet : Laurine, Anna, Gwendoline, et bien sûr Morgane la reine des masto !

Une thèse est un long périple semé de joies et de déceptions et cette aventure ne serait pas aussi facile si elle n'était pas partagée avec d'autres doctorant.es au sein de l'équipe : je remercie donc Camille, Johanna et Marine pour le partage de cette épopée ! Bien sûr, je n'oublie pas Axel qui a déjà eu le temps de soutenir sa thèse et de faire l'aller-retour transatlantique avant même que je me retourne. Est-ce bien possible ? Est-il humain ? Serait-ce due à une consommation intense de thé ? Ces questions existentielles feront l'objet d'un futur projet de thèse.

A mes collègues du CIRI,

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger et discuter pendant ces 6 ans au CIRI, du 4^{ème} étage de la Tour Cervi, jusqu'aux recoins des bâtiments Monod : doctorants, ITA, post-doc, chercheurs, gestionnaires administratifs : merci ! Une pensée particulière pour celles et ceux qui m'ont aidé à percer les mystères de la biologie moléculaire ou de l'immunologie : Sophia, Thierry(s), Anne-Laure, Séverine, Daphné, Margaux, Jacqueline, Annabelle, Aurore, Bariza, Thibault S., Emmanuel L., Emiliano R.

Bien sûr, je remercie les excellents membres de la plateforme de cytométrie qui ont vu passer bons nombres de mes cellules sur les trieurs et analyseurs. Grâce à vous, j'ai récolté de précieux conseils et partagé de bons moments devant le trieur dans une pièce à 4°C: Thibault et Sébastien, merci !

Je n'oublie bien évidemment pas les membres du PBES avec qui j'ai partagé la zone A1 de manière quasi quotidienne pendant 6 ans. Je vous remercie pour votre aide, votre gentillesse, votre bonne humeur : Tiphaine, Pierre, Myriam, Marie, Agnès, Farida, David, Nadine, Sophie, Claudine, Julie,

Jean-Louis. Plus particulièrement, je tiens à remercier Marianna, qui m'a été d'un soutien et d'une aide précieuse pour l'expérimentation animale, et dont je n'oublierai pas la bonne humeur, le dynamisme et la gentillesse !

A mes collègues de DBV,

Je n'oublierai jamais les membres de l'équipe R&I avec qui j'ai eu la chance de collaborer ou d'échanger lors de mes passages à Montrouge. Grâce à vous, ce fut toujours un grand plaisir de venir à DBV et vous m'avez permis de vivre pleinement et sereinement cette collaboration scientifique et humaine : Benjamin, Pierre-Louis, Sophie, Mathieu, Jean-Louis, Mélanie, Camille, Laetitia, Priscilla, Véronique, Nathalie, Noémie, Audrey, Fabien, Olivier, Katie, Fabrice ! Également, je remercie le Professeur Hugh Sampson pour son soutien, sa confiance et les discussions scientifiques enrichissantes.

A mes ami.es,

Merci de participer à mon développement personnel (ou intellectuel ?) : les GammaBetaKhi, la team suprême, mes co-thésards CIRIens, le Banc, la Meute, Huma-nation, PacificDiversClub, les Motterains, les Lyonnais, le Royaume de Die, Aurore et BorVici.

A ma famille,

Je dédie cette thèse à mon père qui aurait aimé voir l'accomplissement de ces travaux de recherche, merci pour ton parcours et ta persévérance. Je remercie ma mère pour m'avoir montré depuis 29 ans le chemin vers le courage, la générosité, l'ouverture d'esprit, la curiosité et le savoir. Je remercie mon frère pour son soutien et j'espère que tu rentreras en France un jour ! Je vous remercie pour vos encouragements indéfectibles sans qui rien de tout cela ne serait possible.

A Elodie,

Pour tout le chemin parcouru ensemble et celui qu'il nous reste à écrire.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	13
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1 ALLERGIE ALIMENTAIRE	17
1.1 HISTORIQUE.....	17
1.2 DEFINITION.....	19
1.3 PREVALENCE	21
1.4 ALLERGENES RESPONSABLES.....	24
1.5 EVOLUTION DE LA MALADIE.....	26
1.6 CLASSIFICATION PAR ENDOTYPE	27
1.7 ETIOLOGIE	28
1.7.1 Facteurs de risque intrinsèques.....	29
1.7.2 Facteurs de risque extrinsèques	32
1.8 IMPACT SOCIO-ECONOMIQUE	36
1.9 SYMPTOMES	37
1.10 PHYSIOPATHOLOGIE.....	39
1.10.1 Tolérance naturelle.....	39
1.10.2 Rupture de tolérance : Sensibilisation	48
1.10.3 Réponse/Réaction allergique.....	51
1.11 DIAGNOSTIC.....	53
1.12 PRISE EN CHARGE	57
2 IMMUNOTHERAPIES ALLERGENIQUES (ITA)	59
2.1 HISTORIQUE, PRINCIPE DES ITA	59
2.2 DIFFERENTS PROTOCOLES EXISTANTS (VOIES D'ADMINISTRATION).....	60
2.2.1 Préparation de l'allergène pour les ITA	61
2.2.2 Immunothérapie orale (OIT).....	61
2.2.3 Immunothérapie sublinguale (SLIT).....	67
2.2.4 Immunothérapie allergénique épicutanée (EPIT).....	69
2.2.5 Comparaison des différentes voies de désensibilisation	77
2.3 MECANISMES IMMUNITAIRES DE L'IMMUNOTHERAPIE ALLERGENIQUE (ITA).....	78

2.3.1	<i>Lymphocytes T régulateurs</i>	79
2.3.2	<i>Lymphocytes T effecteurs: anergie et déviation du profil cytokinique</i>	83
2.3.3	<i>Lymphocytes T folliculaires régulateurs (LT_{FR})</i>	86
2.3.4	<i>Lymphocytes B régulateurs (LB_{REG})</i>	86
2.3.5	<i>Déviation isotypique des anticorps (IgE / IgG)</i>	87
2.3.6	<i>Désactivation des mastocytes, basophiles</i>	89
2.3.7	<i>Cellules lymphoïdes innées</i>	90
2.3.8	<i>Impact sur les monocytes, macrophages et cellules dendritiques</i>	91
2.3.9	<i>Mécanismes d'action associés à EPIT</i>	93
3	LES CELLULES DENDRITQUES CUTANÉES : INTERFACE ENTRE L'ALLERGENE ET LA REPONSE ADAPTATIVE	97
3.1	GENERALITES SUR LES DC	97
3.2	CLASSIFICATION DES CELLULES DENDRITQUES	100
3.2.1	<i>Cellules de Langerhans</i>	101
3.2.2	<i>Cellules dendritiques conventionnelles</i>	105
3.2.3	<i>Autres types de cellules dendritiques cutanées</i>	109
3.3	FONCTIONS DES DC CUTANÉES	112
3.3.1	<i>Réponse immunitaire de type-1 (Th1)</i>	112
3.3.2	<i>Réponse immunitaire de type-2 (Th2)</i>	114
3.3.3	<i>Réponse immunitaire de type-17 (Th17)</i>	115
3.3.4	<i>Réponse anticorps</i>	116
3.3.5	<i>Réponse immunitaire tolérogène</i>	118
	DEUXIEME PARTIE : PROJET DE RECHERCHE	121
1	CONTEXTE ET OBJECTIFS DU PROJET	121
2	RESULTATS	122
	ARTICLE N°1 : CONTRIBUTION DES CELLULES DE LANGERHANS A L'EFFICACITE DE L'IMMUNOTHERAPIE EPICUTANEE	122
	ARTICLE N°2 : SPECIALISATION FONCTIONNELLE DES CDC2 ET DES LC AU COURS D'EPIT	133
3	DISCUSSION	180
3.1	SYNTHESE DES RESULTATS.....	180
3.2	LIMITES DE L'ETUDE.....	181
3.3	MECANISMES ASSOCIES A LA DESENSIBILISATION	184
3.3.1	<i>Quel est le lien entre LT_{REG}, LTh1, LTh17 et efficacité de désensibilisation ?</i>	184
3.3.2	<i>Quelle est la place des anticorps dans la désensibilisation ?</i>	190
3.3.3	<i>Quels mécanismes modulent le phénotype et la fonction des cellules dendritiques au cours d'EPIT?</i>	195

3.4	STRATEGIES D'AMELIORATION DU TRAITEMENT	206
3.4.1	<i>Modification de l'allergène et utilisation d'adjuvants</i>	206
3.4.2	<i>Co-administration de biologiques</i>	210
3.4.3	<i>Méthode de délivrance de l'allergène</i>	211
4	CONCLUSIONS	214
5	PROJETS DE RECHERCHE ANNEXES	216
6	REFERENCES	247

LISTE DES TABLEAUX

TABEAU 1 : CLASSIFICATION HISTORIQUE (GELL AND COOMBS, 1963).....	19
TABEAU 2 EPIDEMIOLOGIE DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE IGE-DEPENDANTE CHEZ L'ENFANT ET L'ADULTE (ADAPTE DE MONERET-VAUTRIN, 2008).....	22
TABEAU 3 : FACTEURS HETEROGENES DES ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE.....	23
TABEAU 4 ALLERGENES ALIMENTAIRES LES PLUS FREQUENTS CHEZ L'ENFANT ET L'ADULTE (MONERET-VAUTRIN, 2008)	24
TABEAU 5 ALLERGIE PAR REACTION CROISEE DES PNEUMALLERGENES (POLLENS) ET TROPHALLERGENES POUVANT CONDUIRE A UN SYNDROME ORAL ALLERGIQUE (ADAPTE DE (SUSSMAN ET AL., 2010).....	26
TABEAU 6 ENDOTYPES DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE DEPENDANTE DE L'IGE (ADAPTE DE BAKER & SAMPSON, 2018).....	28
TABEAU 7 : SYSTEME DE CLASSIFICATION DES REACTIONS ALLERGIQUES IMMEDIATES (ADAPTE DE SANCHEZ-BORGES ET AL., 2019)	38
TABEAU 8 : SEUILS PREDICTIFS D'IGE SERIQUE POUR LA REACTIVITE A UN ALLERGENE DONNE (ADAPTE DE (RENTZ ET AL., 2018))	56
TABEAU 9 SURETE ET EFFICACITE DU TRAITEMENT OIT	66
TABEAU 10 : ESSAIS CLINIQUES RANDOMISES D'IMMUNOTHERAPIE SUBLINGUALE POUR LES ALLERGIES ALIMENTAIRES.....	69
TABEAU 11 SURETE ET EFFICACITE DU TRAITEMENT EPIT.....	75
TABEAU 12 COMPARAISON DES PROTOCOLES D'OIT, SLIT ET EPIT POUR L'ALLERGIE ALIMENTAIRE	77
TABEAU 13 FONCTIONS DE L'IL-10 ET DU TGF-B	82
TABEAU 14 : RECEPTEURS DE DANGER EXPRIMES PAR LES DC.....	98
TABEAU 15 : PHENOTYPE ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION DES DC CUTANES.....	111

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : L'HOMEOSTASIE, LA PHYSIOPATHOLOGIE ET LA DESENSIBILISATION DES PATIENTS ALLERGIQUES	15
FIGURE 2 : CLASSIFICATION CENTREE SUR L'HYPERSENSIBILITE ALIMENTAIRE EN UTILISANT LES CRITERES DE JOHANNSON ET AL., 2001.	21
FIGURE 3 : FACTEURS CONCOURANT AU DEVELOPPEMENT DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE.....	29
FIGURE 4 TOLERANCE NATURELLE FACE AUX ALLERGENES DE L'ENVIRONNEMENT	40
FIGURE 5 : TOLERANCE IMMUNITAIRE FACE AUX ANTIGENES DANS L'INTESTIN (ADAPTE DE YU ET AL., 2016)	41
FIGURE 6 LES TROIS CATEGORIES PRINCIPALES DE LT REGULATEURS ET LEURS MECANISMES D'ACTION.	43
FIGURE 7 STRUCTURE ET IMMUNITE DE LA PEAU (ADAPTE DE GUTTMAN-YASSKY ET AL., 2019)	47
FIGURE 8 PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE	50
FIGURE 9 : MECANISME D'ACTIVATION DU MASTOCYTE PAR LA VOIE IGE-FcεRI.	51
FIGURE 10 : ILLUSTRATION DU PRICK-TEST.	54
FIGURE 11 : PRINCIPALES DATES CLES DE L'ITA POUR L'ALLERGIE ALIMENTAIRE (ADAPTE DE FEUILLE & NOWAK-WĘGRZYN, 2016).	61
FIGURE 12 : ILLUSTRATION DU PATCH VIASKIN POUR L'EPIT	70
FIGURE 13 : TECHNOLOGIE POUR DEPOSER L'ALLERGENE SUR LE PATCH.	71
FIGURE 14 SCHEMA DU FONCTIONNEMENT DU PATCH VIASKIN® AU COURS D'EPIT	71

FIGURE 15 : PRISE EN CHARGE DES MOLECULES D'ARACHIDE PAR LES CELLULES DE LANGHERANS SUR UN MODELE DE PEAU RECONSTRUITE HUMAINE	72
FIGURE 16 : PENETRATION DE L'ARACHIDE SUR UN MODELE D'EXPLANT CUTANE	72
FIGURE 17 MECANISMES IMMUNITAIRES ASSOCIES A L'ITA.....	79
FIGURE 18 : MODULATION DES LYMPHOCYTES T AU COURS DE L'ITA.....	86
FIGURE 19 : PROFIL TOLEROGENE D'UNE CELLULE DENDRITIQUE (ADAPTE DE GUTTMAN-YASSKY ET AL., 2019).....	99
FIGURE 20 HETEROGENEITE DES CELLULES DENDRITQUES CUTANEEES : DEVELOPPEMENT, PHENOTYPE ET LOCALISATION	101
FIGURE 21 FONCTIONS DES DC DANS LA POLARISATION DE LA REPOSE ADAPTATIVE.....	119
FIGURE 22 : ACTIVATION DE MASTOCYTES <i>IN VITRO</i> APRES COCULTURE AVEC DES CELLULES GANGLIONNAIRES PROVENANT DE SOURIS ALLERGIQUES OU EPIT.....	186
FIGURE 23 : ROLE DES CYTOKINES LORS D'UN TEST DE PROVOCATION INTRA-PERITONEALE	189
FIGURE 24 CINETIQUE DES IGE, IgG1 ET IgG2A SPECIFIQUES AU COURS D'EPIT.....	191
FIGURE 25 PHENOTYPE DES MASTOCYTES DANS L'INTESTIN APRES EPIT (HERVE <i>ET AL.</i>).....	194
FIGURE 26 MECANISMES D'INHIBITION OU D'ACTIVATION DES MASTOCYTES POUVANT PRENDRE PLACE AU COURS D'EPIT.....	195
FIGURE 27 : PRISE EN CHARGE DE L'ALLERGENE ET EXPRESSION DES FcR SUR LES DC CUTANEEES.	198
FIGURE 28 CYTOKINES ET CHIMIOKINES PRODUITES DANS LA PEAU 6H APRES APPLICATION D'UN PATCH VIASKIN® SANS ALLERGENE (PATCH VIDE).....	203
FIGURE 29 MECANISMES POSSIBLES DE REGULATION DES CELLULES DENDRITQUES AU COURS D'EPIT	205
FIGURE 30 STRATEGIES POUR OPTIMISER L'IMMUNOTHERAPIE ALLERGENIQUE (BENITO-VILLALVILLA ET AL., 2018)	206

LISTE DES ABREVIATIONS

ALDH1A2:	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2 or retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2) (aldéhyde déshydrogénase 1, membre A2)
AREG:	amphiréguline
BLP:	B cell-biased lymphoid progenitor
BMDC:	Bone marrow derived dendritic cells (cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse)
BMMC:	Bone marrow derived mast cells (mastocytes dérivés de moelle osseuse)
BMP7:	Bone morphogenic protein
CD :	Cluster de différenciation
cDC:	Cellule dendritique conventionnelle
CGRPR:	Calcitonin gene-related peptide receptor
CLP:	Common lymphoid progenitor (progéniteur lymphoïde commun)
CLR :	C-type lectin receptor (récepteur lectine de type C)
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
cMoP:	Common monocyte progenitor (progéniteur monocytaire commun)
CSF 1 :	Colony Stimulating Factor 1 (= Macrophage Stimulating Factor)
CTLA-4 :	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique)
DC :	Cellule dendritique
DP1:	Prostaglandin D2 receptor 1
ECR :	Essai clinique randomisé
EPIT :	Immunothérapie épicutanée
FAP:	facilitated antigen presentation
FcR:	Récepteurs des fractions Fc des immunoglobulines
FcRn:	Récepteur néonatal aux Fc
FDA :	Food drug administration
GM-CSF:	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
hCR:	Human complement receptor (récepteur du complément humain)
HMGB1:	High-mobility group box 1
HSC:	Hematopoietic stem cell (cellule souche hématopoïétique)
Id2:	Inhibitor Of DNA Binding 2
Id2:	Inhibitor of DNA binding 2
IDO:	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IFN:	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
IL:	Interleukine
ILT:	Immunoglobulin-like transcript
ITA :	Immunothérapie allergénique
LAG-3 :	Lymphocyte-activation gene 3 (gène d'activation des lymphocytes 3)
LAP :	Latent associated peptide
LB :	Lymphocyte B
LGP	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58
LT :	Lymphocyte T
LT _{EFF} :	Lymphocyte T effecteur
LT _{REG} – Lr :	Lymphocyte T régulateur

MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MDP:	Macrophage and DC progenitor (progéniteur des DC et macrophages)
moDC	DC dérivées de monocytes
MPP:	HSC-derived multipotent progenitor (progéniteur multipotent)
NOD :	Nucleotide-binding oligomerization domain
NOD :	Nucleotide-binding oligomerization domain
OIT :	Immunothérapie orale
PC:	Présentation croisée
PD-1:	Programmed cell death 1
PLC:	phospholipase C gamma
PR:	Protease-activated receptor (récepteur activé par la protéase)
pré-DC	Précurseur de DC
Runx3:	Runt-related transcription factor 3
SCIT :	Immunothérapie sous-cutanée
SIRP α :	Signal regulatory protein α
SLIT :	Immunothérapie sublinguale
TGF- β :	Transforming Growth Factor β
Th:	Helper T cell (LT auxiliaire)
TLR :	Toll-like receptor
TLR :	Toll-like receptor
TPODACP :	Test de provocation oral en double aveugle avec contrôle placebo
TSLP:	Thymic stromal lymphopoietin (lymphopoïétine stromale thymique)
VLP:	Virus-like particle (particule pseudo-virale)

INTRODUCTION

L'allergie alimentaire est une pathologie inflammatoire causée par une réponse immunitaire spécifique inappropriée vis-à-vis de certains les aliments, normalement absente chez un individu sain. L'ingestion de l'aliment par les patients allergiques, même en très petites quantités, déclenche des symptômes, dont l'anaphylaxie est la forme la plus sévère, pouvant engager le pronostic vital. De ce fait, l'allergie alimentaire affecte grandement la qualité de vie des patients qui doivent éviter la moindre ingestion de traces de l'allergène en cause. De plus, ces allergies se développent dès les premières années de vie et impliquent la surveillance et l'inquiétude des parents.

Aujourd'hui, l'éviction de l'allergène est la seule stratégie recommandée pour éviter tout symptôme. Néanmoins, de nombreux protocoles d'immunothérapies spécifiques de l'allergène, aussi appelées « désensibilisations », visent à réintroduire une tolérance vis-à-vis de l'allergène en cause. Le principe est d'administrer régulièrement l'allergène par voie orale, sublinguale ou épicutanée à dose constante ou croissante afin d'éduquer le système immunitaire et induire des cellules régulatrices. L'objectif clinique est d'augmenter le seuil de tolérance des patients afin d'éviter tout accident anaphylactique.

Au cours de mon projet de thèse, je me suis en particulier intéressé à l'immunothérapie spécifique par voie épicutanée (EPIT) utilisant les patchs Viaskin®. Ces patchs contiennent une faible dose d'allergène (arachide, ou œuf, ou lait...) et sont appliqués de manière répétée sur la peau des patients allergiques. Des études cliniques de phase II et III utilisant ces patchs ont montré des résultats intéressants après 1 à 2 ans de traitement chez des patients allergiques à l'arachide. Cependant, comme tout protocole de désensibilisation, ils ont une efficacité limitée et seulement dans une proportion modérée de patients. Ils ne permettent pas d'induire une tolérance complète et permanente vis-à-vis l'allergène. Ainsi, il est aujourd'hui encore nécessaire de mieux comprendre les mécanismes immunitaires impliqués dans la désensibilisation, afin d'en améliorer l'efficacité et de définir des biomarqueurs de prédiction de la réponse au traitement. L'EPIT délivre l'allergène au niveau de la peau et implique donc en premier lieu les cellules cutanées, à l'interface entre l'allergène du patch et la réponse immunitaire spécifique. Les cellules dendritiques (DC) cutanées en particulier sont capables de capter l'allergène et de migrer dans les ganglions lymphatiques drainants

(GLD) pour présenter l'allergène aux lymphocytes T naïfs ou mémoires et ainsi impacter la réponse immunitaire en place.

Dans ce contexte, **mes travaux de thèse ont eu pour objectif** de mieux comprendre la contribution des sous-populations de cellules dendritiques cutanées au cours de l'EPIT chez la souris, afin d'explorer deux questions majeures concernant la désensibilisation par EPIT :

1. Quelles populations de cellules dendritiques sont responsables de l'efficacité du traitement ?
2. Quels mécanismes associés aux DC participent à la désensibilisation ?

Les réponses à ces questions ouvriront la voie pour cibler une population de DC particulière afin d'améliorer le traitement, ou pour utiliser un biomarqueur cellulaire ou soluble corrélé à l'efficacité d'EPIT.

Pour résumer, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel d'une sous-population de DC cutanées, appelée cellules de Langerhans, dans l'efficacité de l'EPIT. En outre, l'étude longitudinale du phénotype et des fonctions des DC cutanées révèle que les cellules de Langerhans se spécialisent au fur et à mesure du traitement dans l'activation de lymphocytes T régulateurs (LT_{REG}) au détriment des LT effecteurs (LT_{EFF}). En parallèle, les cellules dendritiques conventionnelles de type 2 (cDC2) qui activent de manière robuste les LT_{REG}, vont plus particulièrement dévier la réponse lymphocytaire T pathogénique, d'un profil Th2 vers un profil Th1/Th17 ce qui limite la réactivation des cellules effectrices de l'anaphylaxie, en particulier les mastocytes. Ainsi, les fonctions des LC et cDC2 semblent se compléter pour l'efficacité du traitement.

SCHEMA GENERAL : Tolérance, Allergie, Désensibilisation

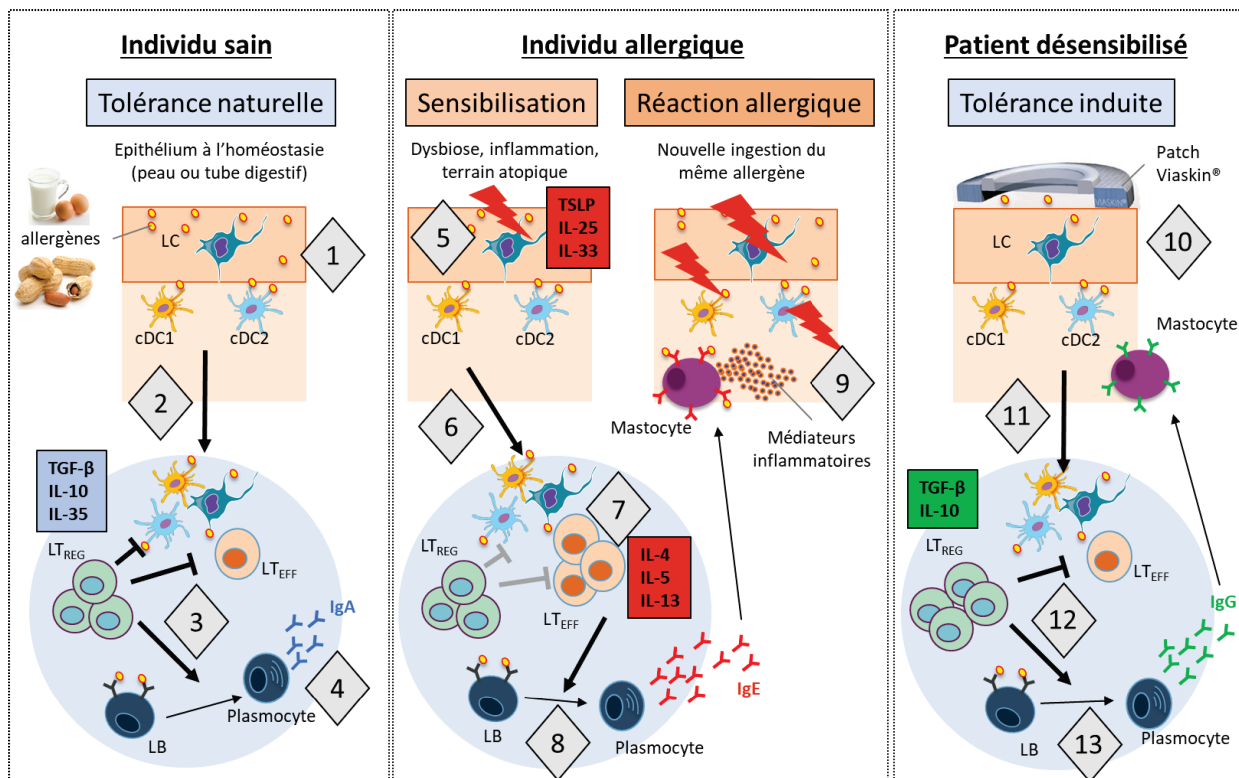


Figure 1 : L'homéostasie, la physiopathologie et la désensibilisation des patients allergiques

- 1** : L'allergène pénètre l'épithélium et est pris en charge par les cellules dendritiques du tissu (à savoir dans la peau: LC épidermiques, cDC1 et cDC2 dermiques; dans le tube digestif: CD103+ DC)
- 2** : Les DC qui ont capté l'allergène migrent avec un état d'activation immature ou semi-mature dans les ganglions lymphatiques drainants (GLD). En absence de signaux de costimulation forts, ils activent des LT_{REG} spécifiques d'une part, et induisent l'anergie ou la délétion des LT naïfs spécifiques d'autre part.
- 3** : En retour, les LT_{REG} activés inhibent i) les DC via l'interaction de CTLA-4 avec CD80/CD86, ii) les LT naïfs ou effecteurs via la production d'adénosine et de TGF-β, et iii) promeuvent une commutation isotypique IgA des LB via la sécrétion de TGF-β et d'IL10
- 4** : Les plasmocytes produisent des IgA spécifiques qui participent en particulier à la tolérance immunitaire du tube digestif
- 5** : Chez un sujet prédisposé aux allergies ou en raison de stimuli particuliers, l'allergène pénètre l'épithélium dans un contexte inflammatoire favorable au développement de la pathologie (présence d'IL-25, IL-33, TSLP produits par les cellules épithéliales notamment)
- 6** : Les DC migrent, mûrent et expriment fortement leurs récepteurs de costimulation (CD80, CD86, ...) et le CMH-II à leur surface
- 7** : Activation de LT naïfs spécifiques par les DC et relargage de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5, IL-13)
- 8** : L'IL-4 stimule la commutation isotype IgE par les LB. Les IgE spécifiques produits recirculent dans l'organisme et se fixent sur les mastocytes tissulaires et les basophiles du sang
- 9** : Lors d'un nouveau contact ou d'une nouvelle ingestion de l'allergène, celui-ci se fixe sur les IgE à la surface des mastocytes et basophiles induisant la dégranulation de médiateurs inflammatoires conduisant aux symptômes allergiques (œdème, vasodilatation des vaisseaux sanguins, broncho-constriction...)
- 10** : L'application quotidienne sur la peau d'une dose contrôlée d'allergène pendant 1-3 ans permet de réinduire une tolérance (immunothérapie allergénique épicutanée). L'allergène (délivré par un patch épicutané) est pris en charge par les cellules dendritiques cutanées qui mûrent et acquièrent un phénotype particulier
- 11** : Les DC migrent dans les GLD avec l'allergène et le présentent aux LT_{REG} et LT conventionnels spécifiques. L'absence de costimulation forte et de signaux inflammatoires permet une forte activation des LT_{REG}, et une inhibition des DC. Les LT conventionnels peuvent éventuellement se différencier en LTeff ou LT_{REG}, devenir anergique ou rentrer en apoptose (délétion)
- 12** : Les LT_{REG} activés inhibent les LT conventionnels via la sécrétion de TGF-β, IL-10 et en déprivant le milieu en IL-2 via leur récepteur CD25
- 13** : Sous l'influence des LT_{REG}, les LB se transforment en plasmocytes producteurs d'IgG4 (chez l'homme) ou d'IgG2A et IgG1 (chez la souris). Ces IgG vont circuler et se fixer sur les FcγR des mastocytes et basophiles afin de participer à leur désactivation au long terme. Les IgG circulants peuvent également capter l'allergène avant que celui-ci ne soit capté par les IgE pathogéniques.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Allergie alimentaire

1.1 Historique

L'existence de l'allergie alimentaire semble remonter avant Jésus-Christ, bien qu'à cette époque la notion d'allergie n'était pas définie.

Des écrits décrivent des symptômes évoquant une sensibilité anormale de certains individus vis-à-vis d'aliments. L'ouvrage des empereurs chinois Shen Nong (2735 av. J.-C) et Huang Di (2698-2598 av J.-C), intitulé *Shi Jin-Jing* (« *Interdictions Alimentaires* »), stipule qu'il était interdit aux femmes enceintes de manger certains aliments tels que des crevettes et de la viande afin de ne pas développer de lésions cutanées, qui pourraient correspondre aux lésions d'urticaires aiguës retrouvées dans l'allergie alimentaire (Cohen, 2008).

De manière encore plus formelle, Hippocrate (460-377 av J.-C), raconte que certains individus ne pouvaient pas manger de fromage. Il déclare que cela tient à la différence de leur constitution et notamment à la richesse d'un fluide corporel (« humorale ») particulier qui serait hostile à cet aliment et déclencherait les symptômes.

Au cours de l'ère romaine, des médecins, comme Aretaeus de Cappadoce (120-180 ap J.-C.) et Claudius Galenus (130-200 ap J.-C.) de Pergame et Rome, rapportent également des effets indésirables suite à l'ingestion de lait ou de fromage chez leurs patients.

C'est en 1902, lors d'une expédition dans les Açores, que Paul Portier et Charles Richet décrivent l'anaphylaxie, découverte récompensée par le prix Nobel en 1913. Leur étude s'intéressait à la toxine d'un cnidaire marin, la Physalie. Alors que l'injection d'une première dose de la toxine à des chiens était inoffensive, une seconde injection de cette toxine 14 jours plus tard entraînait la mort en quelques dizaines de minutes. Le terme d'anaphylaxie, dérivé d'*ana* (en sens contraire) et *phulaxis* (protection), est né (Richet and Portier, 1902). Le lien avec l'immunité restait à démontrer.

Quelques années plus tard, en 1906, le pédiatre autrichien Clemens Peter von Pirquet introduit le terme « allergie » pour décrire une « réactivité altérée » lors d'un nouveau

contact avec une substance extérieure et qui pourrait être causée par des anticorps présents dans le sérum du patient immunisé. Par exemple, il observe qu'après injection chez des patients, d'un anti-sérum d'origine animale (porteur d'anticorps spécifiques contre un agent pathogène voulu), des symptômes inflammatoires peuvent se déclarer, et ceci plus rapidement et sévèrement lors d'une seconde injection. Il parle alors de maladie du sérum et en déduit une réactivité augmentée contre une molécule exogène. Il englobe alors sous ce terme les réponses immunitaires protectrices (contre un pathogène) et les réponses anormales qui déclenchent des symptômes (au sens d'hypersensibilité) (Huber, 2006; Igea, 2013).

En 1921, Carl Prausnitz s'injecta dans l'hypoderme du bras, le sérum d'un patient allergique au poisson. Le lendemain il s'inocula un extrait de poisson au même endroit. Une réaction inflammatoire cutanée se développa. Il démontra ainsi formellement que les médiateurs responsables de l'allergie contre une protéine alimentaire se trouvaient dans le sérum. Ces médiateurs alors appelés « réagines », furent caractérisés des décennies plus tard comme étant les immunoglobulines de type E (IgE) (Bennich et al., 1968; Ishizaka et al., 1966; Johansson et al., 1968) Parmi toutes les allergies, l'allergie alimentaire fut définie comme une hypersensibilité de type I en 1963 (Gell and Coombs, 1963), du fait de la rapidité d'apparition des symptômes et du mécanisme dépendant des IgE. Elle se différencie des allergies dépendantes des IgG (type II et III) ou à médiation cellulaire (type IV) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Classification historique (Gell and Coombs, 1963)

Classification	Nom commun de l'hypersensibilité	Antigène	Mécanisme immunitaire	Pathologies associées	Temps d'apparition des symptômes
Type I	Immédiate à médiation IgE	Soluble	Dégranulation des mastocytes et basophiles après fixation des allergènes sur les complexes de surface IgE-FcεRI	Allergie alimentaire, asthme allergique, rhinoconjonctivite allergique	Immédiat (<1 heure)
Type II	Cytotoxique à médiation IgG	Cellulaire ou matriciel	Cytotoxicité à médiation cellulaire (phagocyte, NK) dépendante des anticorps	Anémie hémolytique autoimmune, réaction contre les protéines labiles du sang après transfusion	Quelques heures ou jours
Type III	Dépendant des complexes immuns	Soluble	Accumulation de complexes immuns induisant une inflammation médiée par les neutrophiles et dépendante du complément	Maladie sérique	7 à 21 jours
Type IV	Retardée à médiation cellulaire	Soluble ou cellulaire	Reconnaissance antigénique par des lymphocytes T et activation de LT CD8+ cytotoxiques, macrophages, éosinophiles, neutrophiles selon l'allergène	Eczéma allergique de contact, Nécrolyse épidermique toxique	Retardée (24-72h)

1.2 Définition

L'allergie alimentaire se définit aujourd'hui comme un effet indésirable dû à une réponse immunitaire spécifique qui se déclenche de manière reproductible lors de l'exposition à un aliment donné (NIAID-Sponsored Expert Panel et al., 2010). Cela exclut donc les réactions aux aliments qui ne sont pas dépendantes de l'immunité spécifique, et qui doivent pour leur part être appelées « hypersensibilités alimentaires non allergiques ». Il peut s'agir d'intoxication due à la contamination en bactéries des aliments, ou d'intolérance alimentaire avec par exemple un défaut en lactase pour digérer le lactose. Les symptômes généralement cutanées ou digestifs peuvent ressembler à une réaction allergique (Johansson et al., 2001).

L'allergie alimentaire se classe donc comme une « hypersensibilité allergique » (Johansson et al., 2001) et peut dépendre ou non des IgE (Figure 2). Les allergies alimentaires IgE-dépendantes sont les plus fréquentes et les mieux caractérisées. Elles prennent place préférentiellement chez des sujets avec un terrain atopique.

L'atopie est classiquement définie par la prédisposition individuelle ou familiale à produire des IgE en réponse à des antigènes exogènes, généralement protéiques, et à développer des symptômes typiques (asthme, rhinoconjonctivite, eczéma/dermatite).

A noter qu'il existe une catégorie d'hypersensibilité (HS) non dépendante des IgE dont la prévalence reste difficile à estimer mais qui paraît assez rare (Ruffner and Spergel, 2016). Ces HS peuvent être non allergiques en impliquant des cellules immunitaires innées (neutrophiles, monocytes, éosinophiles) ou allergiques et impliquer, des Immunoglobulines G (IgG) ou des lymphocytes T spécifiques d'allergène. Bien que moins fréquente et avec une physiopathologie méconnue, cette catégorie comprend un ensemble de maladies problématiques pour les patients (Biermé et al., 2017; Ruffner and Spergel, 2016) :

- Syndrome d'entéocolite aux protéines alimentaires (SEIPA)
- Proctocolite induite par les protéines alimentaires
- Entéropathie induite par les protéines alimentaires (ex : maladie cœliaque causé par le gluten)
- Gastroentéropathie à éosinophiles (ex : Œsophagite à éosinophiles)
- Dermatite allergique de contact aux protéines (ex : dermatite à la farine de blé)
- Dermatite phototoxique (ex : causée par des aliments contenant de la bergamote ou du 5-methoxypsoralène)

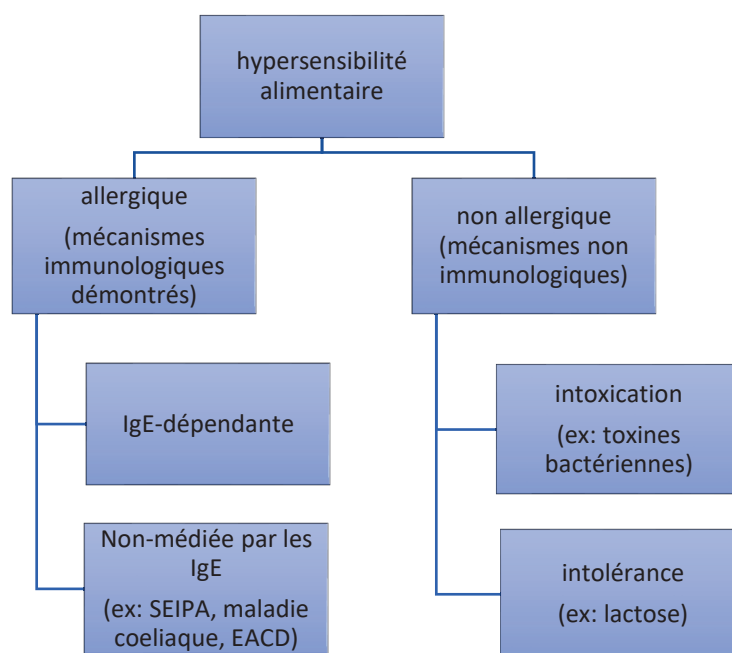


Figure 2 : Classification centrée sur l'hypersensibilité alimentaire en utilisant les critères de Johansson et al., 2001. SEIPA : Syndrome d'entérocite aux protéines alimentaires ; EACD : Eczémas allergiques de contact aux protéines

Pour la suite de cette étude bibliographique, nous nous intéresserons uniquement à l'allergie alimentaire IgE-dépendante, historiquement caractérisée comme hypersensibilité de type I selon la classification de Gell et Coombs.

1.3 Prévalence

L'allergie alimentaire IgE-dépendante est un problème de santé publique qui touche de 1 à 10% des individus dans les pays industrialisés et dont la prévalence semble augmenter ces dernières décennies (Osborne et al., 2011; Savage and Johns, 2015). En France, elle concernerait 3,2% de la population générale comme indiqué par l'étude de Kanny et al., 2001 (**Tableau 2**).

Ces mesures de prévalence souffrent en fait d'une forte disparité en fonction des allergènes et de la population étudiée. En effet, l'allergie est principalement une maladie de l'enfant qui peut se résoudre avec l'âge, plus ou moins fréquemment selon l'allergène en cause (Savage et al., 2016). De plus, elle touche préférentiellement les pays industrialisés (Sicherer and Sampson, 2017) et dépend de la consommation du pays considéré : incidence plus élevée d'allergies au riz au Japon ou d'arachide grillée aux Etats-Unis (Bandelier et al., 2008).

Tableau 2 Epidémiologie de l'allergie alimentaire IgE-dépendante chez l'enfant et l'adulte (adapté de Moneret-Vautrin, 2008).

Pays	Auteur	Année de publication	Méthode de l'étude et allergène testé	Taille de la population et catégorie : enfants (E) ou adultes (A)	Prévalence (%)
France	Kanny	2001	Questionnaire	32 000 (A+E)	3,24
Israël	Dalal	2002	Clinique, PT, IgE	9070 (A+E)	1,2
Australie	Woods	2002	Clinique, PT (5 allergènes)	1041 (A)	1,3
Allemagne	Zuberbier	2004	Questionnaire, clinique Sous-groupe : PT, TPO	4093 (A) 814	2,5
Etats-Unis	Vierk	2007	Questionnaire	4482 (A)	5,3
	Sicherer	2003	Questionnaire (arachide)	13 493 (A+E)	1,1
Danemark	Osterballe	2005	PT, IgE, TPO	111 <3ans,	2,3
				301 >3ans,	1
				936 (A)	3,2
Royaume-Uni	Pereira	2005	Clinique, PT, TPO	1532 (11-15ans)	2,3
	Venter	2006	PT, IgE, TPO	798 (6 ans)	1,6
	Hourihane	2007	Clinique, PT (arachide)	1072 (4-5ans)	1,8
France	Rancé	2005	Questionnaire	2716 (E)	
				2-5ans	4
				6-10 ans	6,8
				11-14 ans	3,4
Europe	Steinke	2007	Questionnaire	8825 (E)	4,7

PT :prick-test ; TPO :test de provocation oral

La mesure exacte de la prévalence reste donc difficile due aux nombreux facteurs qui rentrent en jeu et à l'hétérogénéité des études épidémiologiques réalisées (**Tableau 3**). De ce fait, les méta-analyses et les revues systématiques faites sur le sujet ont rapporté une prévalence en Europe et aux Etats-Unis de 13% lors d'auto-déclaration, mais seulement de 3% après confirmation par des tests de laboratoire et un test de provocation oral en double aveugle contrôlé par placebo (TPODACP – double-blind placebo-controlled food challenge) (Savage and Johns, 2015).

Tableau 3 : Facteurs hétérogènes des études épidémiologiques de l'allergie alimentaire

Facteurs d'influence	Paramètres associés
Population étudiée	• Lieu géographique et environnement • Cohorte sélectionnée (consultations médicales, sélection à la naissance en fonction de l'historique familiale) ou non sélectionnée • Sexe, âge, phénotype des individus
Méthodologie utilisée	• Questionnaire téléphonique • Historique du patient • Diagnostic par un médecin, dosage des IgE (seuil variable), prick-test, test de provocation oral (ouvert ou double aveugle versus placebo)
Allergène	• Aliment brut ou cuit/préparé • Allergène fréquemment associé à une résolution naturelle (ex : lait de vache, œuf)

De nombreux aliments peuvent causer une allergie alimentaire, mais une dizaine d'entre eux seulement représentent 90% des allergies alimentaires détectées : l'œuf, le lait de vache, l'arachide, les fruits à coque (noisette, noix, pistache, amande), le soja, le blé, le poisson et les crustacés (Bandelier et al., 2008).

Le Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (CICBAA) a recensé les allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfant et l'adulte (Moneret-Vautrin, 2008) (**Tableau 4**). On note ainsi que de 0 à 3 ans les principales allergies sont dues à l'œuf, au lait et à l'arachide. Puis, jusqu'à l'adolescence (3-15ans), l'arachide (49,3%) et l'œuf (24,3%) restent majoritaires suivis des fruits à coque (10,2%), légumineuses (13,4%) et poisson (10%). Enfin, à l'âge adulte, seuls les fruits à coque restent à un niveau élevé comparable (15,7%), alors que les allergies aux prunoïdées (ex : prune, abricot, pêche... ; 31,3%), apiacées (ex : carotte, céleri... ; 16,4%), blé (13,2%), avocats, banane, kiwi (22,6%) deviennent majoritaires.

Tableau 4 Allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfant et l'adulte (Moneret-Vautrin, 2008)

Allergènes	0–1 an 147 enfants (%)	1–3 ans 359 enfants (%)	3–15 ans 468 enfants (%)	Adultes 287 (%)
Œuf	77,5	69,6	24,3	6,3
Lait	29,2	25,6	7	3,5
Arachide	19,7	37,6	49,3	10,1
Fruits à coque	2,7	4,4	10,2	15,7
Légumineuses	0,6	4,4	13,4	5,9
Poisson	0,6	5	10	3,1
Prunoidées	0	0	0	31,3
Avocat, banane, châtaigne, kiwi	0,6	1,3	5,3	22,6
Apiacées	0	0	1,7	16,4
Blé, céréales	6,1	6,4	2,7	13,2

Les observations enregistrées dans la base de données du CICBAA correspondent aux critères diagnostiques établis par le groupe de travail de l'Académie européenne d'allergologie et d'immunologie clinique.

Sur 974 observations pédiatriques, 898 sont fondées sur le résultat de tests de provocation orale en simple ou double insu, 20 sur guérison totale après éviction, 23 sur la constatation d'un choc anaphylactique, huit correspondent à un syndrome oral (dans ces deux derniers cas un test de provocation orale n'est pas nécessaire). Vingt-cinq observations correspondent à des cas retenus sur valeur prédictive positive 95 % du taux des IgE spécifiques.

Sur 287 observations chez l'adulte, 169 sont fondées sur le résultat de tests de provocation orale en simple ou double insu, cinq sur guérison totale après éviction, 63 sur la constatation d'un choc anaphylactique, 44 correspondent à un syndrome oral (dans ces deux derniers cas un test de provocation orale n'est pas nécessaire). Six observations correspondent à des cas retenus sur valeur prédictive positive 95 % du taux des IgE spécifiques.

La variabilité de la prévalence de l'allergie alimentaire observée en fonction des allergènes révèle en fait des particularités structurales et immunogéniques propres à chaque allergène. Il convient donc de préciser la nature et les caractéristiques des allergènes pour comprendre les mécanismes qui rentrent en jeu.

1.4 Allergènes responsables

Un allergène est un antigène de l'environnement, reconnu par le système immunitaire, qui peut causer une allergie chez certains individus. Les allergènes alimentaires, aussi appelés trophallergènes, sont généralement des molécules de nature protéique, glycoprotéique ou lipoprotéique, issues d'un aliment (lait, arachide...), et de taille globalement comprise entre 5kDa et 50kDa. Néanmoins, des allergènes glucidiques peuvent aussi déclencher des allergies, c'est le cas notamment de l'oligosaccharide galactose alpha-1, 3- galactose (ou alpha-gal) responsable de certaines allergies à la viande (Woodfolk et al., 2015).

L'aliment est donc la source de l'allergène, et non pas un allergène en soi. En réalité, un aliment contient de nombreuses protéines ou glycoprotéines qui sont autant d'allergènes potentiels, reconnus par le système immunitaire, en particulier par les IgE, responsables des symptômes allergiques. Un allergène alimentaire dit « majeur » déclenche une réaction allergique chez >50% des patients diagnostiqués allergiques pour l'aliment, et s'oppose à un « allergène mineur » qui induit une réaction dans <50% de ces mêmes patients.

Ces protéines peuvent être allergéniques du fait de certaines séquences linéaires d'acides aminés (structure primaire), ou de par leur conformation structurale en 3D

(structure tertiaire, quaternaire) qui crée des épitopes conformationnels. Les épitopes linéaires apprêtés sur les molécules de CMH-I ou CMH-II des cellules dendritiques sont présentés aux lymphocytes T. En revanche, les immunoglobulines de surface (BCR) des lymphocytes B peuvent directement reconnaître un ensemble d'épitopes linéaires ou conformationnels (Forsström et al., 2015). Un allergène peut donc contenir plusieurs déterminants antigéniques (épitopes) qui lui confèrent son pouvoir allergisant.

En raison de la grande diversité d'allergènes parmi les aliments, une nomenclature spécifique a été établie pour nommer un allergène. Elle comprend les trois lettres du genre (ex : *Ara* pour *Arachis*), un espace, la première lettre de l'espèce (ex : *h* pour *hypogaea*), un espace et un nombre. Sur ce principe, l'allergène de cacahuète, Ara h 1, qui est une protéine de type viciline 7S, peut être différencié d'Ara h 3, protéine de type légumine 11S. Ainsi, il est possible et utile pour le diagnostic de comparer la fixation des IgE des patients sur chaque allergène caractérisé afin d'associer un profil clinique avec la réactivité vis-à-vis d'un allergène particulier. On parle alors de « diagnostic par analyse des composants allergéniques ». Également, de nombreux algorithmes ont été développés pour prédire les allergènes potentiels des aliments et leur réactivité avec des IgE (Dall'Antonia et al., 2014).

En outre, il est à noter que l'allergénicité d'un aliment et de ses constituants varie en fonction de sa préparation (Liu et al., 2013a; Zhang et al., 2019). Par exemple, comparativement à une cacahuète bouillie, une cacahuète grillée contient plus d'Ara h 1 et 3, qui sont des allergènes majeurs de la cacahuète. De plus, les allergènes d'une cacahuète grillée se fixent de manière plus importante aux IgE du sérum de patients allergiques (Beyer et al., 2001) et sont plus rapidement internalisés par les cellules dendritiques dérivées de monocytes (Cabanillas et al., 2018). De la même manière, chauffer du lait ou cuire des œufs diminuent leur pouvoir allergénique (Leonard et al., 2015).

Enfin, certains trophallergènes possèdent une forte homologie avec des allergènes respiratoires (pneumallergènes) tels que les pollens (de bouleau, d'ambroisie) et partagent des épitopes, appelés « déterminants carbohydrates à réaction croisée ». De ce fait, une réaction allergique croisée est possible lorsqu'un individu déjà sensibilisé à un pollen ingère un trophallergène homologue (Tableau 5). En général,

le patient déclare alors un syndrome oral allergique (prurit buco-pharyngé, asthme induit par l'effort, œdème des lèvres) sans évolution vers un choc anaphylactique.

Tableau 5 Allergie par réaction croisée des pneumallergènes (pollens) et trophallergènes pouvant conduire à un syndrome oral allergique (adapté de (Sussman et al., 2010)

Pollen	Fruit	Légumes/Epices	Noix, Graines, Légumineuse
Aulne	Pomme, cerise, pêche, poire	Persil, céleri	Amande, noisette
Bouleau	Kiwi, pomme, poire, prune, pêche, abricot ; cerise, tomate	Céleri, carotte, patate, cumin, panais, poivron vert, aneth, pois, coriandre, fenouil	Noisette, noix de cajou, amande, cacahuète, lentille, haricot
Graminée	Melon, pastèque, orange, tomate	Patate	Cacahuète
Armoise	-	Céleri, carotte, aneth, persil, fenouil, coriandre, cumin	Graine de tournesol
Ambroisie	Pastèque, banane, melon	Concombre, courgette, courge	-

1.5 Evolution de la maladie

Les mesures de prévalence montrent que l'allergie alimentaire évolue avec l'âge des individus et que les allergènes majoritairement en cause à la petite enfance ne sont plus les mêmes à l'âge adulte. Ceci est très clair pour les patients allergiques au lait et à l'œuf, dont 60-80% résolvent leur allergie après l'âge de 6 ans (Baker and Sampson, 2018; Savage and Johns, 2015), contrairement à l'arachide, les fruits à coque, et les fruits de mer, où l'on observe seulement 20% des patients qui acquièrent une tolérance naturelle (Savage et al., 2016; Sicherer et al., 2004; Skolnick et al., 2001).

L'évolution de la maladie dépend de plusieurs facteurs mesurables. En effet, une allergie persistante est associée à une apparition plus précoce et/ou plus sévère des symptômes (Elizur et al., 2012), à la présence de comorbidités (rhinite, asthme, eczéma, dermatite atopique) (Halken, 2004; Skripak et al., 2007), à un taux d'IgE spécifiques plus élevé (Fleischer et al., 2005; Saarinen et al., 2005; Skripak et al., 2007; Vazquez-Ortiz et al., 2015), à des prick-tests (tests allergiques cutanés) positifs et plus larges (Ho et al., 2008; Peters et al., 2013, 2015). Également, l'analyse de spécificité des IgE aux épitopes (« epitope-mapping ») semble associer la persistance de l'allergie avec une plus forte reconnaissance par les IgE spécifiques des épitopes linéaires, en comparaison des épitopes conformationnels. La persistance de l'allergie s'expliquerait alors par le fait que les épitopes linéaires sont intacts et accessibles

même après cuisson des allergènes, et que les IgE spécifiques associées entraînent une plus grande réactivité des basophiles, conduisant aux symptômes allergiques (Flinterman et al., 2008; Shreffler et al., 2005).

Enfin, il est à noter que l'évolution des allergies alimentaire, respiratoire et de la dermatite atopique (inflammation cutanée chronique), au cours de la vie d'un patient a fait naître le concept de « marche atopique » ou « marche allergique ». En effet, dans la première année de la vie, les enfants ont souvent les symptômes d'une dermatite atopique (eczéma) qui précèdent ou co-existent avec une allergie alimentaire. Puis, la dermatite atopique a tendance à se résoudre avec l'âge, au même titre que de nombreuses allergies alimentaires, laissant place à un asthme allergique puis une rhinite allergique qui peut persister à l'âge adulte (Hill and Spergel, 2018; Utsch et al., 2017; Wang et al., 2020a).

1.6 Classification par endotype

Face à l'hétérogénéité des cas d'allergie alimentaire, des sous-groupes ont été définis afin de classer plus précisément les patients en fonction des mécanismes immunitaires, des symptômes et de l'évolution de la maladie. Ceci doit permettre d'affiner le diagnostic et la prise en charge des patients. On peut ainsi séparer l'allergie alimentaire en 3 catégories principales : allergie classique, allergie par réaction croisée, syndrome α -gal (Baker and Sampson, 2018).

Allergie classique

L'allergie alimentaire classique se définit par une phase asymptomatique de sensibilisation à un allergène alimentaire donné, qui précède la phase de révélation où l'individu déclare des symptômes (urticaire, angio-oedème, choc anaphylactique...) dans l'heure suivant une nouvelle ingestion de ce même aliment (voir physiopathologie détaillée dans le chapitre 1.10). Parmi l'allergie classique, Baker & Sampson, 2018 ont décrit 5 endotypes dont les caractéristiques sont précisées dans le **Tableau 6** : persistante, temporaire, induite par l'effort, induite par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou l'aspirine, et enfin induite par l'alcool. L'allergie alimentaire classique se différencie de l'allergie par réaction croisée et du syndrome α -Gal au niveau de la source ou de la nature des allergènes impliqués et des symptômes induits (durée ou sévérité).

Allergie par réaction croisée

L'allergie par réaction croisée implique des IgE spécifiques de pneumallergènes qui reconnaissent des allergènes alimentaires homologues, et conduit majoritairement au syndrome oral croisé, aussi appelé syndrome d'allergie oral (gonflement des lèvres, prurit oral et pharyngé, sans critères de gravité).

Syndrome α -gal

Le syndrome α -Gal est dû à des anticorps spécifiques du carbohydrate Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (α -Gal) et est associé à des symptômes d'anaphylaxie retardés (3-6 heures) suite à l'ingestion de viande de bœuf. Dans ce cas précis, la sensibilisation semble être causée par les piqûres de tique qui contiennent dans leur salive des molécules inflammatoires et des glycoprotéines porteurs du carbohydrate α -Gal (Cabezas-Cruz et al., 2019).

Tableau 6 Endotypes de l'allergie alimentaire dépendante de l'IgE (adapté de Baker & Sampson, 2018)

Allergie dépendante de l'IgE	Endotype	Allergène	IgE spécifique	Prick-test	Symptômes
Classique	Persistant	Trophallergène	++ à +++	++ à ++++	Anaphylaxie immédiate plus ou moins sévère
	Temporaire		+ à ++	+ à ++	
	Induit par l'effort		+ à ++	+ à ++	
	Induit par les AINS ou aspirine		+ à ++	+ à ++	
	Induit par l'alcool		+ à ++	+ à ++	
Réaction croisée (avec un pollen ou entre aliment)	N/A	Trophallergène et pneumallergène	+ à +++	+ à +++	Syndrome allergique oral (prurit oral, œdème cutané)
Syndrome α -Gal (Sensibilisation à la salive de tique suite à une morsure)	N/A	Carbohydrete (α -Gal)	++ à +++	++ à +++	Anaphylaxie plus ou moins sévère, retardée (3-6h)

N/A : non applicable

1.7 Etiologie

Le développement d'une allergie alimentaire est associé à de nombreux facteurs de risque qui varient pour chaque individu. Ceux-ci peuvent être de nature intrinsèque (génétique, épigénétique, phénotypique, immunitaire) ou extrinsèque (environnement,

microbiote, nature et fréquence de contact avec l'allergène) (**Figure 3**). Seuls les facteurs extrinsèques peuvent être modifiés afin de limiter le développement ou l'expression de l'allergie.

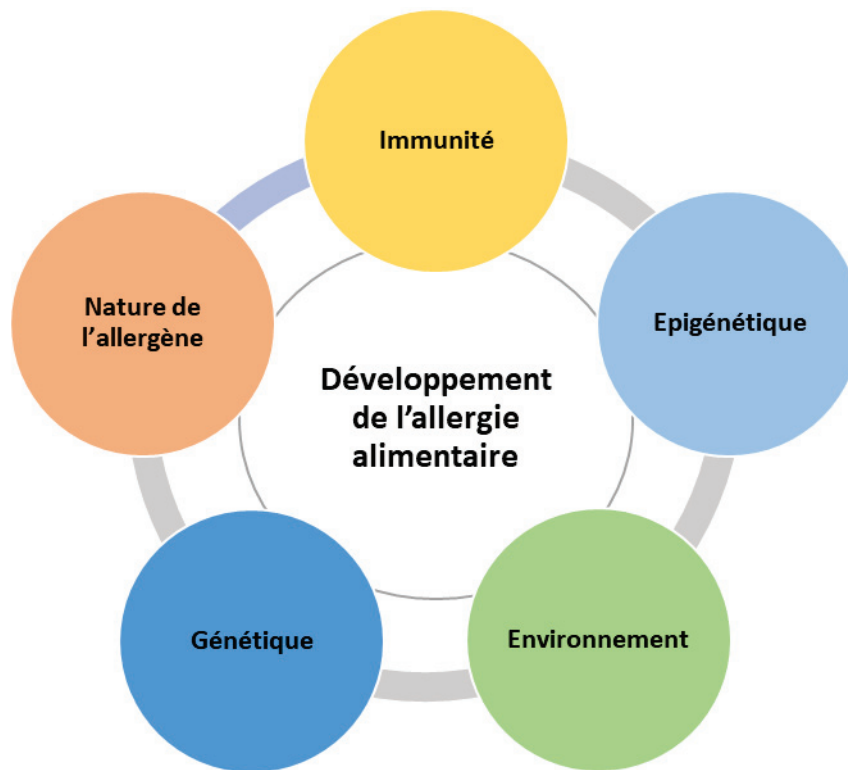


Figure 3 : Facteurs concourant au développement de l'allergie alimentaire

1.7.1 Facteurs de risque intrinsèques

1.7.1.1 Génétique

Parmi les facteurs de risque intrinsèques, les prédispositions génétiques constituent le socle de base au développement de l'allergie alimentaire. On parle alors de terrain « atopique », qui est par définition la plus grande propension à produire des anticorps IgE en réponse à des allergènes (Johansson et al., 2001), mais qui de manière plus large englobe toute particularité génétique et phénotypique qui favorise le développement des allergies.

Ainsi, une histoire familiale d'allergie alimentaire constitue déjà un facteur de risque. En effet, un enfant avec un parent souffrant d'allergie à l'arachide a 7 fois plus de risque de développer cette allergie (Hourihane et al., 1996). De plus, la comparaison de jumeaux a montré une héritabilité de l'allergie à l'arachide dans 82 à 87% des cas (Sicherer et al., 2000). Une première explication de ce phénomène se trouve dans la dizaine de polymorphismes qui sont associés aux individus souffrant d'allergie

alimentaire et qui dérèglent entre autres l'expression de gènes de l'immunité tels que *TSLP*, *STAT6*, *IL2/IL21*, *IL13*, *CLEC16A* (Hirota et al., 2017). Également, certains polymorphismes des antigènes des leucocytes humains (HLA) de classe II tels que HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPB1 montrent une association aux allergies à l'arachide (Howell et al., 1998), à la pomme (Sénéchal et al., 1999) ou aux noix (Hand et al., 2004). En outre, de nombreuses études se sont intéressées aux mutations nulles du gène de la filaggrine. Ce gène participe au fonctionnement normal de la barrière cutanée. Sa mutation constitue un facteur de risque de dermatite atopique (eczéma chronique) mais également d'allergie alimentaire (Brough et al., 2014; Venkataraman et al., 2014). Ceci est particulièrement vrai si l'individu présente une dermatite atopique (Thyssen et al., 2015). Cela s'explique du fait que la peau peut constituer une voie de sensibilisation. En effet, les lésions d'eczéma atopique permettent une plus grande pénétration des allergènes, notamment alimentaires, présents dans l'environnement de l'enfant, dans un contexte inflammatoire. (Brough et al., 2013a, 2014; Foong and Brough, 2017; Greenhawt, 2018; Savage and Johns, 2015). L'arachide, par exemple, peut être retrouvée dans les poussières de maison (Brough et al. 2013). La sensibilisation aux allergènes alimentaires par la peau a depuis été corroborée par des études épidémiologiques chez l'enfant (Brough et al., 2015; Lack et al., 2003; Mäkinen-Kiljunen and Mussalo-Rauhamaa, 2002; Renz et al., 2018) et démontré dans des modèles expérimentaux chez la souris (Bartnikas et al., 2013; Kulis et al., 2020; Ohsaki A1, Venturelli N1, Buccigrosso TM2, Osganian SK2, Lee J1,3, Blumberg RS4,5,6, Oyoshi MK7, 2018; Strid et al., 2005).

1.7.1.2 Epigénétique

L'épigénétique fait référence à toute modification chimique ou structurale de l'ADN qui impacte la transcription des gènes. Spécifiquement, la méthylation de l'ADN (effet inhibiteur), l'acétylation des histones (effet activateur), ou la fixation de micro-ARN sur l'ADN, sont autant de mécanismes qui modulent la transcription des gènes (Bar-El Dadon and Reifen, 2020). Il a été montré que les enfants allergiques présentent des dérégulations de la méthylation de l'ADN associée à la voie des MAP Kinases dans les lymphocytes T CD4⁺ (Martino et al., 2014). Ceci corrèle avec une activation altérée de ces cellules au stade néonatal (Martino et al., 2012). Les modifications épigénétiques ont la particularité de se transmettre de génération en génération et peuvent donc constituer un facteur de risque héréditaire transgénérationnel pour

l'allergie (Skinner and Guerrero-Bosagna, 2009; Tost, 2020). Chez la souris, une étude a montré qu'avoir une mère allergique augmentait le risque de développement d'une allergie à l'arachide dans sa descendance, ceci en association avec une réduction de la méthylation du promoteur du gène de l'IL-4 (Song et al., 2014).

1.7.1.3 Ethnie

Une étude par sondage téléphonique a révélé un risque plus élevé d'allergie aux fruits de mer chez les personnes d'origine africaine (phénotypiquement catégorisé à la peau « noire ») comparativement aux caucasiens (Sicherer et al., 2004). De même, l'étude « SchoolNuts » a montré que les enfants de parents asiatiques avaient un risque accru de développer une allergie alimentaire (Sasaki et al., 2018). Néanmoins, ces résultats sont à relativiser car d'autres études n'ont pas pu confirmer une association entre l'ethnie et l'allergie alimentaire (Dang et al., 2020; Joseph et al., 2016).

1.7.1.4 Genre

Les données disponibles concernant un biais des allergies alimentaires dû au genre masculin ou féminin sont hétérogènes. Une analyse systématique a néanmoins démontré qu'avant 18 ans, les garçons (64,35%) représentent la majorité des enfants allergiques comparativement aux filles (35,65%). Ceci est particulièrement vrai avant l'âge de 15 ans et indépendant du type d'aliment. De manière intéressante, ce biais est inversé à l'âge adulte en faveur des femmes (Kelly and Gangur, 2009). Cette inversion est corroborée par des sondages épidémiologiques sur les allergies aux fruits de mer, à l'arachide et aux fruits à coque (Sicherer et al., 2003, 2004). Ce biais dû au genre trouve en partie son explication dans la production d'hormones sexuelles qui varie en fonction du sexe et de l'âge. En effet, contrairement aux androgènes, les œstrogènes semblent augmenter la production d'immunoglobulines (Naoko Kanda, 1999) et la réactivité des mastocytes (Zaitso et al., 2007). Ainsi, une augmentation du taux d'œstrogènes après la puberté chez la femme pourrait augmenter la production d'IgE et diminuer le seuil d'activation des mastocytes responsables de symptômes allergiques. Néanmoins, de nouvelles études seront nécessaires pour démontrer ces effets dans le cadre de l'allergie alimentaire.

1.7.2 Facteurs de risque extrinsèques

1.7.2.1 Environnement prénatal

Comme dit précédemment, l'allergie alimentaire d'une mère est un facteur de risque pour sa descendance. Des études se sont donc intéressées à l'impact du régime alimentaire et de l'environnement d'une mère enceinte sur la propension de ses enfants à développer une allergie (Sausenthaler et al., 2007). L'idée serait alors d'établir des recommandations pour limiter les risques pour les enfants. De nombreuses études rapportent que la consommation d'un aliment (lait, arachide) par la mère a un effet protecteur pour la descendance et leur risque de développer une allergie aux aliments concernés. Néanmoins, ceci est vrai uniquement dans le cas où la mère n'est pas elle-même allergique (Bunyavanich et al., 2014; Frazier et al., 2014; Tuokkola et al., 2016). L'arrêt de consommation d'arachide par la mère serait au contraire associé à une augmentation de la prévalence de cette allergie (Hourihane et al., 2007). De plus, cela peut dépendre du moment de consommation au cours de la grossesse : une consommation d'arachide par la mère au 3^{ème} trimestre de grossesse semble associée au développement de cette même allergie chez des enfants atopiques (Sicherer et al., 2010). En revanche, en prenant une large population sans discrimination du statut allergique de la mère, l'étude de Gideon Lack de 2003, a démontré qu'il n'y avait pas d'association entre la consommation d'arachide par la mère et le développement d'allergie chez l'enfant. Seul l'environnement postnatal, dans ce cas précis, la présence d'arachide dans les poussières de maison, était un facteur de risque (Fox et al., 2009; Lack et al., 2003).

Au-delà du régime alimentaire, les anticorps maternels, en particulier les IgG1, IgG4, et non pas les IgE, peuvent traverser le cordon ombilical grâce au récepteur néonatal à Fc (FcRn) (Flicker et al., 2009). Ces anticorps pourraient alors apporter une protection aux enfants face au développement de maladies atopiques (Glovsky et al., 1991; Jenmalm and Björkstén, 2000; Lupinek et al., 2019). Néanmoins, des études supplémentaires restent nécessaires pour confirmer cet effet (Fujimura et al., 2019).

De surcroît, le stress de la mère pendant sa grossesse peut influencer sur l'immunité intestinale de l'enfant et notamment diminuer ses taux d'IgA. Ceci pourrait donc constituer un risque de développer une maladie atopique (Kang et al., 2020).

L'environnement de la femme pendant sa grossesse est également à prendre en compte. En effet, un environnement avec un chien de compagnie, diminue le risque d'allergie alimentaire pour ses enfants à 1 an (Smejda et al., 2020). Également, l'exposition prénatale avec un environnement rural, permet un contact accru avec une variété de microbes, une surexpression des récepteurs de l'immunité innée et pourrait protéger le fœtus d'une future allergie (Ege et al., 2006). Au contraire, la pollution dans l'environnement d'une femme enceinte peut augmenter le risque de développer de l'asthme chez l'enfant par une voie impliquant les cellules tueuses naturelles (cellules NK) comme démontré chez la souris (Qian et al., 2020).

1.7.2.2 Environnement postnatal

Au-delà des facteurs qui peuvent agir sur le fœtus, de nombreux stimuli postnatals vont modeler le système immunitaire du nouveau-né et influencer sur une potentielle réponse allergique.

Microbiote

En premier lieu, lors de la naissance, il a été montré qu'un accouchement par césarienne (et donc éliminant une exposition à la flore vaginale maternelle) augmente les risques de l'enfant de développer une allergie alimentaire. (Eggesbø et al., 2003; Liao et al., 2017; Papathoma et al., 2016). Cet effet peut dépendre de la région géographique concernée et de la réalisation de la césarienne avant initiation du « travail » ou en urgence (Koplin et al., 2019; Loo et al., 2017). Au contraire, une naissance par voie vaginale diminue le risque d'allergie pour l'enfant. En effet, cette voie offre un contact privilégié de l'enfant avec le microbiote vaginale, proche du microbiote intestinal maternel, permettant une colonisation protectrice. Celle-ci stimule les récepteurs de l'immunité innée (« Toll-like receptors », TLR) et induit une réponse immunitaire régulatrice (TGF- β) et de type 1 (IFN- γ) (Balossini et al., 2009; Cuppari et al., 2015). Le microbiote dans les premières années de vie est en constante évolution, il reste donc difficile de déterminer sa contribution exacte au développement des allergies alimentaires. Néanmoins, des études ont pu associer une présence élevée de certains *Clostridium* ou *Anaerobacter* avec l'allergie alimentaire chez l'enfant, contrairement aux *Clostridium* XVII, *Bacteroides fragilis*, *Prevotella*, *Ruminococcaceae*, *Bifidobacterium* qui sont négativement corrélés (Blázquez and Berin, 2017; Plunkett and Nagler, 2017). L'importance du microbiote est également

relatée dans une étude comprenant 30 060 enfants qui a montré un lien entre la prise d'antibiotiques et le développement d'allergie alimentaire dans les 7 premières années de vie de l'enfant (Hirsch et al., 2017).

Du fait de la difficulté d'établir un lien de causalité chez l'enfant, des études chez la souris ont été réalisées. Tout d'abord, des expériences de transfert de microbiote de souris allergiques à des souris exemptes de microbiote (« germ-free ») rendaient les souris receveuses allergiques, comparativement à un transfert de microbiote de souris non allergiques (Faith et al., 2014; Noval Rivas et al., 2013). Aussi, il a été montré qu'un traitement par antibiotiques ou l'absence de microbiote entraînaient une augmentation du risque de sensibilisation à un allergène alimentaire. L'effet protecteur de la flore commensale, en particulier leur capacité à réguler des cellules lymphoïdes innées (Noval Rivas et al., 2016) et la perméabilité de l'épithélium intestinale, semblait être conféré par des bactéries du genre *Clostridium* (Stefka et al., 2014) et. En effet, ces bactéries stimulaient la production de mucus et de peptides antimicrobiens par l'épithélium. Pour conclure, bien que le rôle du microbiote soit évident pour le bon fonctionnement de la barrière épithéliale et la protection face aux allergies (Luu et al., 2020), sa complexité et sa diversité rendent encore difficile une potentielle action préventive ou protectrice.

Allaitement

En lien avec le microbiote, le régime alimentaire de l'enfant après sa naissance est un facteur de risque qui est depuis longtemps un centre d'intérêt en raison de la possibilité de le modifier afin de prévenir le développement d'une allergie. En particulier, l'allaitement maternel du fait de sa composition riche en probiotiques (bactéries vivantes) et prébiotiques (nucléotides, oligosaccharides), continue de faire évoluer le microbiote de l'enfant. Le lait maternel est également riche en facteurs de croissance, cytokines, immunoglobulines, enzymes de digestion qui participent à la maturation du système immunitaire de l'enfant (Guaraldi and Salvatori, 2012). Les substituts au lait maternel ont été grandement améliorés depuis des années, ils sont enrichis en prébiotiques, probiotiques, fibres, cytokines afin de mimer au mieux l'apport d'un lait maternel et conduisent à une évolution du microbiote similaire à l'allaitement maternel (Guaraldi and Salvatori, 2012). La différence notable réside dans la présence d'allergènes dans le lait maternel qui dépend de l'alimentation de la mère. Il a été montré que la consommation d'arachide par la mère durant la période d'allaitement,

diminue le risque d'allergie à l'arachide chez l'enfant (López-Expósito et al., 2009). A noter que cette association n'a pas toujours été observée (Gerrard and Perelmutter L, 1986; Jelding-Dannemand et al., 2015) et qu'elle semble dépendante de la dose consommée par la mère (Lack et al., 2003; Du Toit et al., 2016). Néanmoins, cette observation est à relier à un autre fait établi chez les enfants à risque : l'introduction précoce d'un aliment, dès la première année, limite le risque de développement d'une allergie contre cet aliment (Fleischer et al., 2015; Du Toit et al., 2015). Cet effet ne se retrouve pas si la cohorte est issue de la population générale non à risque (sans antécédents familiaux d'allergie). Enfin, une étude récente réalisée chez la souris, a démontré que le récepteur TLR-2 exprimé sur les cellules présentes dans le lait maternel était associé à une meilleure tolérance orale des nouveaux nés (Dawod et al., 2020).

Alimentation

En outre, la fréquence, la nature, la glycation, les doses, et le mode de cuisson des d'aliments ingérés peuvent influencer sur la sensibilisation de l'individu (Beyer et al., 2001; Leonard et al., 2015; Smith et al., 2017; Tanaka et al., 2020). De plus, une altération de la digestion des aliments, et de la barrière intestinale s'ajoutent à ces facteurs de risque et peuvent empêcher une réponse tolérogène naturelle de prendre place (Kim et al., 2016b; Nowak-Wegrzyn et al., 2017; Nutsch et al., 2016; Schöll et al., 2005; Untersmayr, 2015; Untersmayr and Jensen-Jarolim, 2008).

Barrière cutanée

Mis à part l'alimentation, un facteur de risque qui apparaît comme majeur est la qualité de la barrière cutanée et l'exposition aux allergènes de l'environnement. En effet, comme dit précédemment, une affection de la peau telle que la dermatite atopique (et la dysbiose cutanée associée) peut faciliter une sensibilisation à un allergène alimentaire présent dans l'environnement (Brough et al., 2014, 2015; Foong and Brough, 2017; Mäkinen-Kiljunen and Mussalo-Rauhamaa, 2002; Peters et al., 2015). Ces observations épidémiologiques et expérimentales ont fait naître l'hypothèse de la « double exposition » qui postule que la peau serait la voie de sensibilisation aux allergènes alimentaires tandis que la voie orale induirait préférentiellement une tolérance (Lack, 2012).

Ceci est également à mettre en lien direct avec une dysbiose du microbiote cutané qui peut conduire à une inflammation et une sensibilisation de l'individu. L'hypothèse bien connue dite « hypothèse hygiéniste » relate en effet que notre mode de vie dans nos sociétés modernes perturbe notamment notre microbiote cutané (douches fréquentes avec des produits irritants voire allergéniques) et diminue notre contact régulier avec des bactéries de l'environnement. Cette absence de contact régulier dès le plus jeune âge avec les microorganismes de l'environnement, empêche le développement d'une réponse immunitaire tolérogène périphérique. Ainsi, lorsqu'un individu, rentre en contact avec un allergène associé à un microbiote ou un épithélium altéré, une réponse inflammatoire forte et pathogénique peut se mettre en place (Diesner et al., 2016; Stefka et al., 2014).

Pollution

La pollution ou la fumée de tabac ont montré des effets négatifs sur la santé de l'enfant et en particulier le développement des maladies allergiques (Feldman et al., 2017; Saulyte et al., 2014). Les perturbateurs endocriniens très présents dans l'environnement peuvent également augmenter la réactivité des mastocytes et donc le risque allergique (Narita et al., 2007; O'Brien et al., 2014; Robinson and Miller, 2015; Zaitso et al., 2007).

Pour conclure, le risque d'allergie découle d'un ensemble d'interactions entre facteurs intrinsèques et facteurs environnementaux (**Figure 3**) (Eder et al., 2005; Ege et al., 2006; Gern et al., 2004; Lau et al., 2017; Melén et al., 2008; Simpson et al., 2006). Il a par exemple été montré que le polymorphisme de la glutathione transférase (GSTP1 Ile105Val) couplé à la pollution aggravait le risque de sensibilisation d'enfants à des allergènes alimentaires. L'exploration plus approfondie de ces facteurs doit permettre dans le futur d'apporter des recommandations et des interventions personnalisées aux patients afin de prévenir le développement d'une allergie.

1.8 Impact socio-économique

L'allergie alimentaire a un fort impact socio-économique sur les patients et leurs familles. En effet, elle touche majoritairement les enfants et nécessite donc, dans ce cas, une attention particulière des parents. Les allergènes responsables de la maladie sont présents dans de nombreux aliments et nécessitent une attention quotidienne pour éviter tout accident. Le choc anaphylactique, potentiellement fatal, est une

expérience redoutée et qui affecte grandement les patients. L'appréhension de celui-ci est un des facteurs qui conduisent certains patients à arrêter les études cliniques nécessitant un test de provocation oral. L'allergie alimentaire affecte donc la qualité de vie du patient et celle de son entourage (Greenhawt et al., 2019). Un sondage parmi des enfants allergiques à l'arachide âgés de 7-11 ans révèle que 62% n'ont pas pu participer à des fêtes entre amis et 77% ont déjà dû utiliser de l'épinéphrine (traitement symptomatique d'urgence). De plus, cette maladie crée de l'anxiété chez l'enfant, avec plus de 96% des enfants interrogés craignant de développer des symptômes ou de devoir aller aux urgences, lors d'un contact accidentel avec l'arachide (Greenhawt et al., 2019).

L'allergie alimentaire a également un fort coût pour les patients et la société. Aux Etats-Unis, le coût global a été évalué à 24,8 milliards de dollars, soit 4184\$ par enfant malade (Gupta et al., 2013). Ce coût comprend les coûts médicaux directs incluant les visites chez le médecin, les visites aux urgences et les hospitalisations, auxquels s'ajoute le coût au niveau familial. Le coût global inclut également i) la perte de productivité au travail, notamment les congés pris par les parents pour amener leurs enfants chez le médecin, ii) les dépenses non remboursées, telles que le surcoût lié à l'achat de produits spéciaux sans allergènes, ou encore iii) les coûts d'opportunité incluant la nécessité des parents d'abandonner ou de changer de métier pour s'adapter à la situation de leur enfant. En outre, le coût par famille aux Etats-Unis souffre de disparités en fonction de leur statut socio-économique. Les familles avec les plus hauts revenus peuvent accéder plus facilement à des allergologues spécialisés, aux traitements symptomatiques, aux aliments exempts d'allergènes et sont donc associés à un moindre risque pour les patients de développer des symptômes et d'être pris en charge aux urgences (Bilaver et al., 2016).

1.9 Symptômes

Chez les patients allergiques, l'ingestion d'un aliment peut rapidement (en quelques minutes, généralement moins d'une heure) entraîner des symptômes qui vont généralement aller en s'aggravant. Ces symptômes peuvent atteindre les systèmes cutané, digestif, respiratoire, cardiovasculaire ou être systémiques. De nombreuses propositions de grille de score ont été publiées ces dernières années afin d'homogénéiser le système de classification des réactions allergiques immédiates au

niveau mondial (Cox et al., 2010, 2017; Muraro et al., 2018; Niggemann and Beyer, 2016). Dernièrement, Sánchez-Borges *et al.*, ont proposé une version adaptée du système de classification en 5 grades initialement proposé par l'organisation mondiale de l'allergie (Sánchez-Borges et al., 2019). Cette classification dépend du nombre d'organes impactés et de la gravité des symptômes (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Système de classification des réactions allergiques immédiates (adapté de Sánchez-Borges et al., 2019)

			Anaphylaxie	
Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Symptômes affectant 1 organe :	Symptômes listés pour le grade 1 et affectant ≥2 organes	Voies respiratoires inférieures : - Bronchospasmes modérés (toux, difficultés respiratoires) qui répondent au traitement	Voies respiratoires inférieures : - Bronchospasmes sévères ne répondant pas au traitement	Voies respiratoires : - Détresse respiratoire Cardiovasculaire : - Hypotension, malaise - Perte de conscience (hors malaise vagal) - Tout symptôme de grade 1 à 4
Cutanée : - Urticaire, érythème, démangeaisons - Picotement des lèvres ou démangeaisons - Angio-œdème		Gastro-intestinal : - Crampes abdominales, vomissement, diarrhée Autre : - Crampes utérines - Tout symptôme de grade 1	Voies respiratoires supérieures : - Œdème laryngée avec stridor - Tout symptôme du grade 1 au 3	
Voies respiratoires supérieures : - Nasal : rhinorrhée, démangeaisons, congestion - Gorge irritée, toux				
Conjonctive : - Erythème, démangeaisons				
Autre : - Nausée - Goût métallique				

Le grade 1 équivaut à des symptômes locaux affectant un seul organe. Il peut s'agir de la peau (urticaire, érythème, angio-œdème, démangeaisons), des voies respiratoires supérieures (rhinorrhée, congestion nasale, gorge irritée), de la conjonctive (érythème, démangeaisons). Le grade 2 est déclaré lorsqu'au moins deux organes sont atteints par des symptômes du grade 1. Le grade 3 englobe les symptômes précédents auxquels s'ajoutent une atteinte des voies respiratoires basses (bronchospasmes modérés : toux, difficultés à respirer) et/ou gastro-intestinales (crampes abdominales, vomissement, diarrhée).

Si les symptômes s'aggravent encore, on parle d'anaphylaxie qui se définit comme étant une réaction allergique sévère systémique. Elle peut se discriminer en deux

grades. Le grade 4 qui correspond à des atteintes des voies respiratoires plus sévères que précédemment (bronchospasmes sévères, œdème laryngée avec stridor) associé à tout symptôme cité dans les grades inférieurs. Enfin, le grade 5 correspond à des atteintes graves systémiques pouvant inclure une détresse respiratoire, une hypotension, une perte de conscience, qui conduisent à l'arrêt cardio-respiratoire si l'anaphylaxie n'est pas prise en charge.

1.10 Physiopathologie

1.10.1 Tolérance naturelle

Chez un individu sain (non allergique), la tolérance naturelle est la réponse du système immunitaire vis-à-vis des allergènes de l'environnement. Dès les premières années de vie, un mécanisme actif de tolérance se met en place. Il peut prendre place au niveau du tube digestif lors de l'ingestion d'aliments, ou de la peau lors de contacts cutanés ou plus rarement des voies respiratoires lors d'inhalation d'allergènes alimentaires disséminés dans l'air, ou de pollens homologues à certains allergènes alimentaires (Brough et al., 2015; Chinthrajah et al., 2016; Mäkinen-Kiljunen and Mussalo-Rauhamaa, 2002; Sussman et al., 2010). Ce mécanisme de tolérance est possible grâce aux caractéristiques de ces interfaces épithéliales qui sont composées 1) d'une structure anatomique permettant une entrée contrôlée des allergènes extérieurs (barrière épithéliale), 2) d'un microbiote spécifique, 3) d'un ensemble de cellules immunitaires qui sondent en permanence les molécules de l'environnement pour maintenir une tolérance ou au contraire activer une réponse effectrice en cas de danger. Les allergènes alimentaires, principalement des glycoprotéines, ne présentent pas de motifs assimilés à des signaux de danger, à la différence des pathogènes. En conséquence, une réponse adaptatrice régulatrice prédominante se met en place (**Figure 4**).

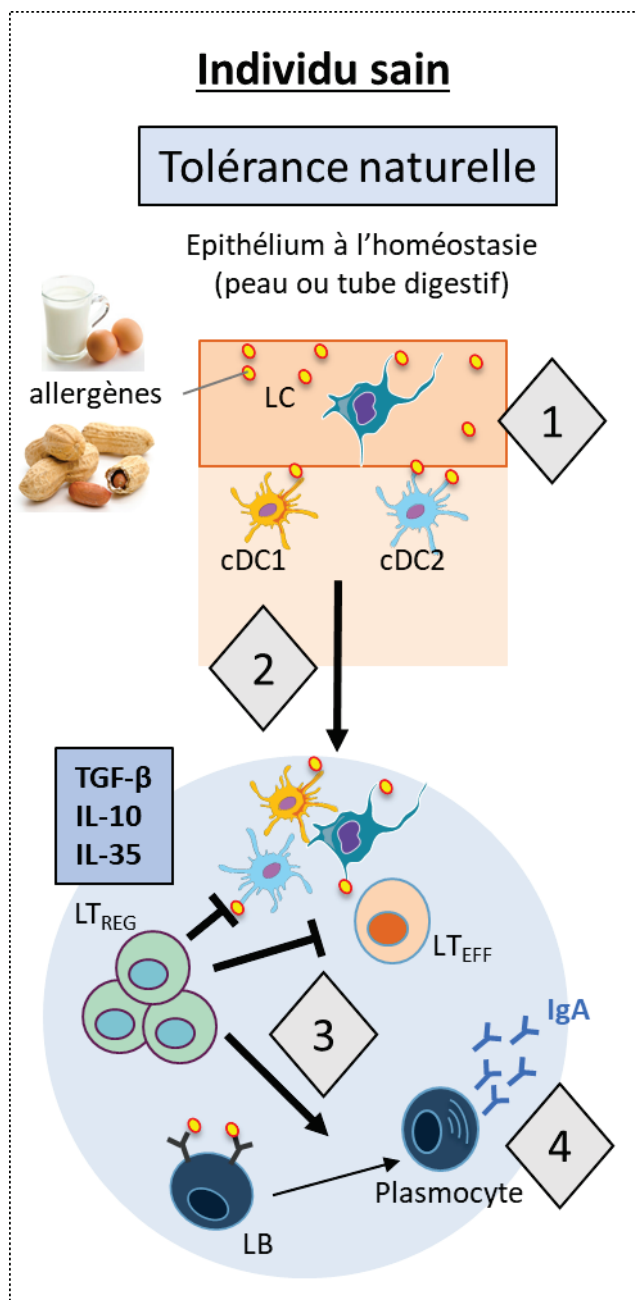


Figure 4 Tolérance naturelle face aux allergènes de l'environnement

1: L'allergène pénètre l'épithélium et est pris en charge par les cellules dendritiques du tissu (à savoir dans la peau: LC épidermiques, cDC1 et cDC2 dermiques; dans le tube digestif: CD103+ DC)

2: Les DC qui ont capté l'allergène migrent avec un état d'activation immature ou semi-mature dans les GLD. En absence de signaux de costimulation forts, ils activent des LT_{REG} spécifiques d'une part, et induisent l'anergie ou la délétion des LT naïfs spécifiques d'autre part.

3: En retour, les LT_{REG} activés inhibent i) les DC via l'interaction de CTLA-4 avec CD80/CD86, ii) les LT naïfs ou effecteurs via la production d'adénosine et de TGF-β, et iii) promeuvent une commutation isotypique IgA des LB via la sécrétion de TGF-β et d'IL-10

4: Les LB produisent des IgA spécifiques qui participent en particulier à la tolérance immunitaire du tube digestif

Tolérance orale

La tolérance orale est rendue possible par la structure particulière de l'épithélium digestif. En effet, elle comprend un revêtement de cellules épithéliales liées par des jonctions serrées (=épithélium), en contact direct avec la lumière du tractus digestif (**Figure 5**). Les cellules épithéliales sont principalement des entérocytes associés à des cellules en gobelet et des cellules à plis microscopiques

(appelées cellules M). Les cellules en gobelet permettent la production de mucus qui limite la pénétration du microbiote et des allergènes à travers l'épithélium. L'absence de mucus empêche la tolérance orale. Les cellules M possèdent des récepteurs spécifiques d'antigènes bactériens de la lumière intestinale afin de les présenter aux cellules dendritiques ou lymphocytes B locaux. Elles participent à l'homéostasie entre le microbiote intestinal et le système immunitaire.

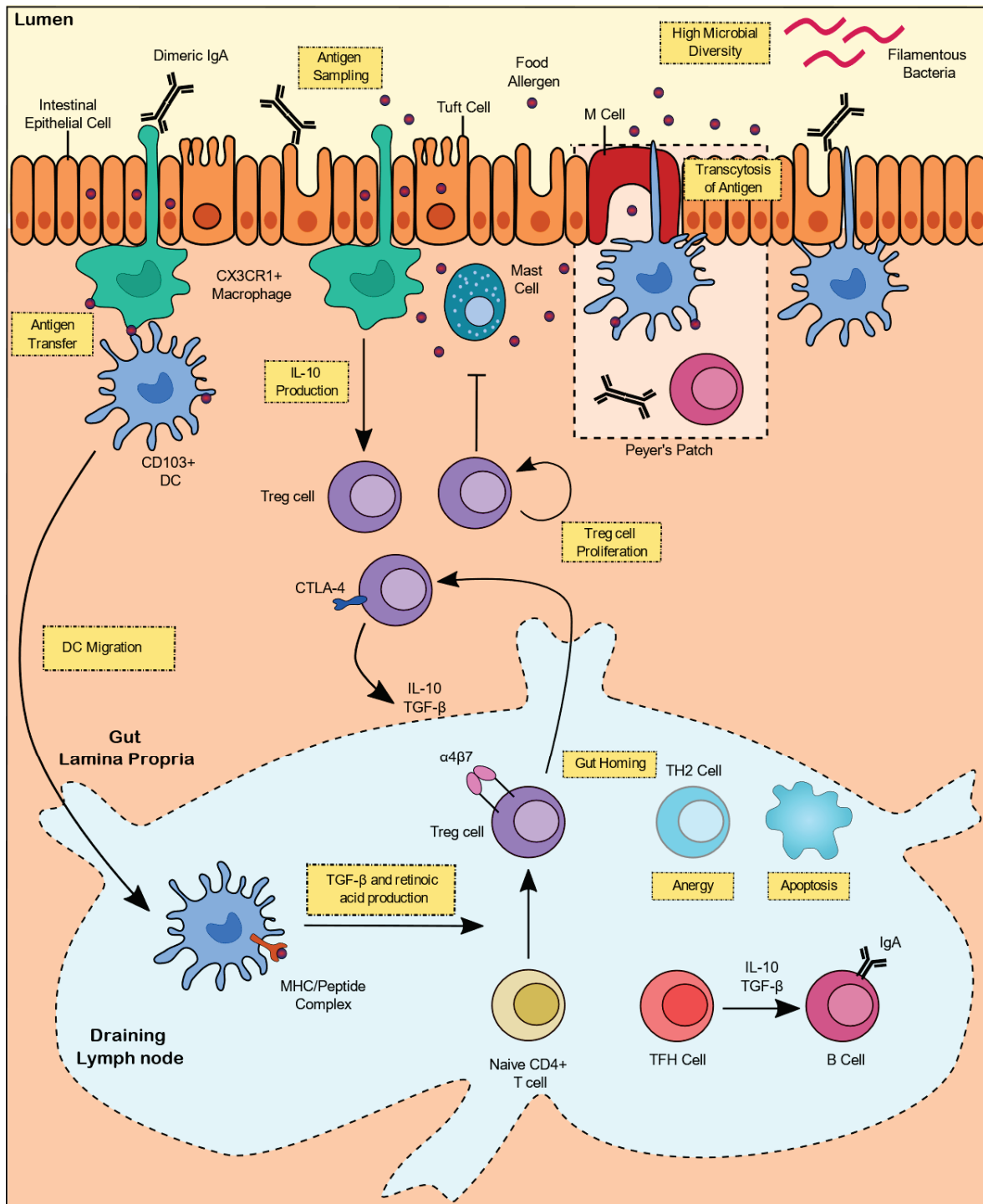


Figure 5 : Tolérance immunitaire face aux antigènes dans l'intestin (adapté de Yu et al., 2016)

Lors d'ingestion d'allergènes, ces derniers pénètrent l'épithélium intestinal et sont pris en charge par les macrophages CX3CR1+ ou les DC sous-épithéliales. Les macrophages sont capables de transférer l'antigène aux DC. A l'homéostasie, en absence de signaux de danger, les DC CD103+ migrent dans les ganglions lymphatiques drainants, produisent du TGF-β et de l'acide rétinoïque et présentent l'antigène aux LT naïfs. Cette activation à bas bruit induit préférentiellement des LT_{REG} et entraîne au contraire l'anergie ou la délétion des LTh2. Les LT_{FH} activés par les DC induisent principalement des LB producteurs d'IgA.

En effet, l'épithélium est associé à un tissu conjonctif de support, la lamina propria (LP), et au « tissu lymphoïde associé au tube digestif » (GALT, Gut Associated Lymphoid Tissue) qui est distribué tout au long du tube digestif. La LP et le GALT sont

tous deux riches en cellules immunitaires. Le GALT est un lieu d'activation et de différenciation de lymphocytes T et B naïfs. En revanche, la lamina propria correspond davantage à une zone où des lymphocytes T déjà activés s'accumulent. Le GALT est matérialisé par les plaques de Peyer (PP) au niveau du petit intestin (iléon en particulier), ainsi que des tissus lymphoïdes solitaires isolés (SILTs, solitary isolated lymphoid tissues) distribués dans le petit et grand intestin (Fenton et al., 2020). Ces GALT représentent un organe lymphoïde tertiaire où de nombreux lymphocytes T et B, ainsi que des macrophages et cellules dendritiques, sont localisés, facilitant la mise en place d'une réponse adaptative.

Plus spécifiquement, les plaques de Peyer forment un dôme sous-épithélial constitué de follicules lymphocytaires B, de zones interfolliculaires riches en lymphocytes T, surmonté d'un épithélium intestinal enrichi en cellules M (« microfold cells »).

Les antigènes et allergènes de la lumière intestinale arrivant au contact de l'épithélium intestinal peuvent être capturés par différentes voies pour être rapidement pris en charge par le système immunitaire :

- Paracytose (passage entre les cellules épithéliales)
- Transcytose (passage dans les entérocytes ou cellules en gobelet)
- Endocytose par les cellules M des plaques de Peyer
- Capture directe par un macrophage ou une cellule dendritique, par extension d'une dendrite entre les cellules épithéliales ou au travers d'une cellule M via un pore (Lelouard et al., 2012)

Lors de l'ingestion d'aliments, les potentiels allergènes sont capturés au niveau de l'épithélium intestinal et pris en charge par principalement deux types de cellules immunitaires : les macrophages CX₃CR₁⁺ et les cellules dendritiques résidentes CX₃CR₁⁻ CD103⁺ (CD11b⁺ ou CD11b⁻) situés dans la lamina propria et le GALT. A noter que les macrophages peuvent directement transférer l'antigène aux cellules dendritiques (Mazzini et al., 2014). Chez un individu sain, ces macrophages vont produire de l'IL-10, tandis que les cellules dendritiques après maturation et activation, sécrètent de l'acide rétinoïque et du TGF-β, et présentent l'allergène aux lymphocytes T du GALT/LP ou des ganglions lymphatiques drainants après migration. Cet ensemble de cytokines anti-inflammatoires permet une activation majeure de

lymphocytes LT CD4⁺ régulateurs (LT_{REG}). Les LT_{REG} induits peuvent être de nature différente (**Figure 6**) (Roncarolo et al., 2018):

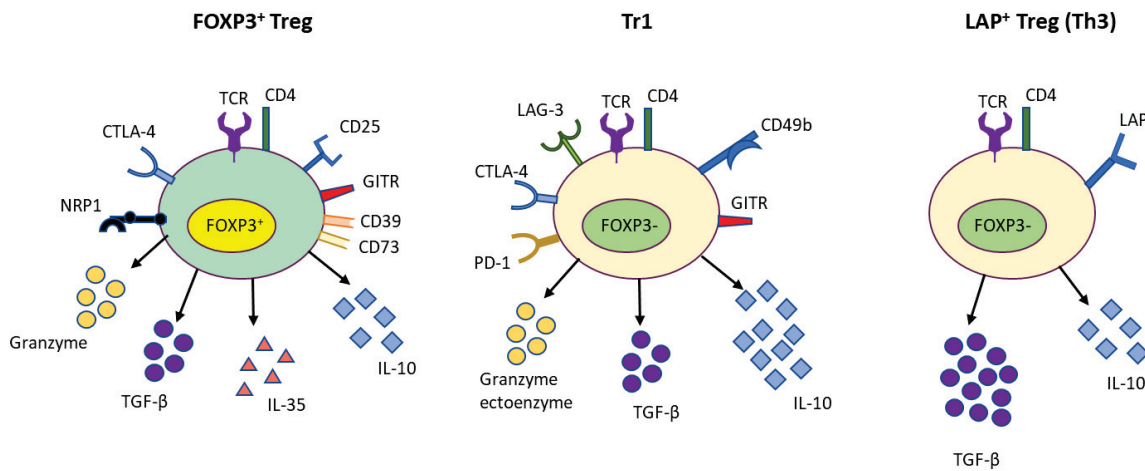


Figure 6 Les trois catégories principales de LT régulateurs et leurs mécanismes d'action.

Les LT_{REG} FoxP3⁺ naturels (thymiques ou périphériques) peuvent inhiber une réponse immunitaire via la production de cytokines (TGF-β, IL-35, IL-10), de molécules cytotoxiques (granzyme B), d'adénosine (via CD39 et CD73). Également, ils peuvent capter l'IL-2 du milieu environnant ou inhiber par contact direct via CTLA-4 (se fixant sur CD80/86). Les LT_{REG} non conventionnels n'expriment pas le facteur de transcription FoxP3 : les LTr1 sécrètent une forte quantité d'IL-10 régulatrice tandis que les LT_{REG} LAP⁺ sécrètent majoritairement du TGF-β.

- 1) Les LT_{REG} naturels (nLT_{REG}) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, qui exercent leur action via le TGF-β, l'IL-10, et un ensemble de récepteurs inhibiteurs de surface (CD25, CTLA-4, LAG-3, CD39, CD73, PD-1, ...) et se divisent en deux sous-groupes (Sakaguchi et al., 2020):
 - a. Les LT_{REG} thymiques (tLT_{REG}) qui acquièrent l'expression de FoxP3 dans le thymus.
 - b. Les LT_{REG} périphériques (pLT_{REG}) qui dérivent de LTconv FoxP3⁻ et qui acquièrent l'expression du Foxp3 en périphérie (organes lymphoïdes secondaires). Ils ont un répertoire distinct de celui des tLT_{REG} leur permettant de jouer un rôle complémentaire.
- 2) Les LT_{REG} non conventionnels FoxP3⁻ (sous-populations de LT auxiliaires) qui se différencient à partir de lymphocytes T naïfs périphériques et acquièrent leur fonction régulatrice dans les organes lymphoïdes secondaires ; ils ont également un répertoire TCR distinct de celui des tLT_{REG}. On distingue:
 - a. Les LT_{REG} de type 1 (Tr1) CD4⁺CD45RA⁻CD25⁻FoxP3⁻LAG3⁺CD49b⁺, qui produisent principalement de l'IL-10, mais également du TGF-β (Groux et al., 1997). Comme les nLT_{REG}, ils peuvent produire de l'adénosine anti-inflammatoire grâce aux ectonucléotidases membranaires CD39 et CD73 qui catabolisent l'ATP extracellulaire.

- b. Les LT_{REG} de type 3 (Th3): $CD4+CD25-FoxP3-LAP+$ (LAP, latent associated peptide) dont le mécanisme de suppression dépend principalement du TGF- β . Le TGF- β (homodimère) produit par ces cellules forme un complexe avec le LAP qui empêche son activité (forme inactive du TGF- β , appelée TGF- β latent). Pour que le TGF- β joue son rôle et puisse se fixer sur son récepteur à la surface d'autres cellules, il doit être libéré du LAP. Cette libération/activation peut notamment se faire par l'action de protéases de la matrice extracellulaire ou d'intégrines contenant les chaînes α_v (Robertson and Rifkin, 2016). Une fois libéré le TGF- β pourra se fixer sur son récepteur activant la voie canonique des protéines Smad dans la cellule cible.

Les LT_{REG} ont pour fonction première de supprimer les mécanismes effecteurs des cellules activées (Vignali et al., 2008). De par leur action, ils peuvent également induire l'anergie ou l'apoptose (délétion) de LT naïfs spécifiques ou de LT conventionnels spécifiques déjà activés (LT mémoires), et inhiber des cellules dendritiques directement dans les ganglions lymphatiques.

En plus de réguler la réponse immunitaire au niveau des organes lymphoïdes, ils peuvent recirculer dans l'organisme via la lymphe et le sang, et ainsi avoir une action dans les tissus périphériques où ils sont recrutés, empêchant le développement de réactions immunitaires contre un allergène inoffensif ou un antigène du soi.

En outre, la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β favorise la production d'immunoglobulines A (IgA) par les lymphocytes B spécifiques de l'allergène. Les IgA sont connues pour leur rôle protecteur et tolérogène (Corthsy, 2009). En effet, elles se fixent sur des antigènes circulants pour former des complexes immuns qui seront à leur tour pris en charge par les DC. De cette manière, certains épitopes immunogéniques restent masqués et ne peuvent pas induire une réponse immunitaire forte. Ce mécanisme est appelé exclusion immunitaire. Tous ces mécanismes (LT_{REG} + IgA + cytokines anti-inflammatoires) contribuent à la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de l'allergène ingéré (Tordesillas and Berin, 2018). De plus, le microbiote intestinal concourt à la réponse tolérogène, notamment en interagissant avec les lymphocytes T (Wang et al., 2015) ou les macrophages. Ces derniers, en réponse aux signaux microbiens produisent de l'interleukine 1 β (IL-1 β) qui active la sécrétion de GM-CSF

(« Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ») par les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3). Le GM-CSF permet *in fine* l'activation des LT_{REG} et participe donc au maintien de l'homéostasie (Mortha et al., 2014). Certains signaux de l'immunité innée dépendant des récepteurs TLR-2, TLR-4 et TLR-9 semblent aussi participer à la tolérance (Berin and Wang, 2013; Berin et al., 2006). Cela a notamment été démontré par des expériences *in vitro* de réactivation de LT par des DC déficientes pour certains TLR et stimulées à l'arachide (Pochard et al., 2010). Également, la stimulation du TLR-2 exprimé sur les LT favorise une réponse cytokinique IL-10 (Jun et al., 2017).

Tolérance cutanée

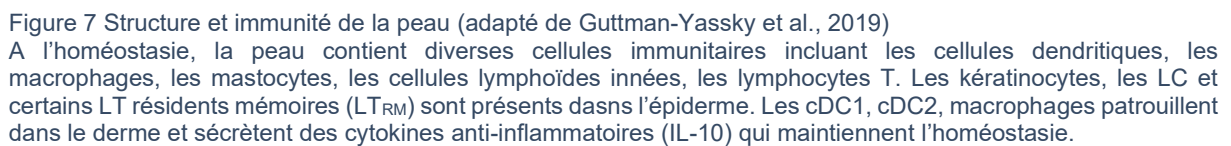
Les allergènes alimentaires ne sont pas uniquement ingérés, ils pénètrent également la peau. A ce titre, ils engendrent une réponse immunitaire tolérogène naturelle ou, au contraire, ils peuvent induire un phénomène de sensibilisation (Du Toit et al., 2016). La peau est considérée aujourd'hui comme un organe immunitaire à part entière du fait de la présence de nombreuses cellules immunitaires (**Figure 7**) (Bird et al., 2018a; Guttman-Yassky et al., 2019). De plus, elle présente une très grande surface épithéliale (~30m²) en interaction avec le microbiote cutané (Gallo, 2017). Ainsi, le système immunitaire est constamment stimulé par les antigènes de l'environnement et délivre une réponse tolérogène en absence de danger.

La peau possède une structure constituée de l'extérieur vers l'intérieur de trois principales couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

L'épiderme non vascularisé est majoritairement formé de kératinocytes qui ont un rôle essentiel de structure et de barrière physique (Goleva et al., 2019). Ces cellules se différencient de l'intérieur (couche basale) vers l'extérieur (couche cornée) pour former une couche de cellules mortes kératinisées très denses qui limitent la pénétration d'agents extérieurs (physique, chimique, microbien). Les kératinocytes vivants des couches intermédiaires sont capables de présenter des antigènes sur leurs complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (et II dans des conditions inflammatoires), de sécréter des cytokines et chimiokines pour maintenir une homéostasie tissulaire (Kim et al., 2009; Tamoutounour et al., 2019). En outre, l'épiderme contient des cellules immunitaires essentielles pour l'homéostasie : cellules de Langerhans (LC), lymphocytes T résidents mémoires (T_{RM}). Les LC qui sont des cellules présentatrices

d'antigène représentent 2-5% des cellules épidermiques : elles patrouillent et captent en permanence les antigènes de l'environnement. Elles possèdent un fort pouvoir tolérogène qui permet de maintenir l'intégrité du tissu et d'activer principalement des LT_{REG} en l'absence de signaux de danger (Mercedes Gomez de Agüero et al., 2012; Seneschal et al., 2012). L'épiderme contient de nombreux follicules pileux qui forment des invaginations. Ces follicules pileux sont des lieux de contact et d'entrée privilégié pour le microbiote et les antigènes extérieurs.

En dessous de l'épiderme se situe le derme, majoritairement constitué de fibroblastes producteurs de la matrice extracellulaire. Le derme contient également de nombreuses cellules immunitaires résidentes : des cellules dendritiques conventionnelles de type 1 et 2 (cDC1, cDC2), des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), des macrophages, des mastocytes, des cellules lymphoïdes innées, des lymphocytes T, des lymphocytes B (Egbuniwe et al., 2015). L'ensemble de ces cellules immunitaires associés au tissu cutané forme une structure intégrée appelée « tissu lymphoïde associé à la peau » qui de par son organisation peut répondre rapidement à un pathogène ou un stimulus local (Streilein, 1983). Ce concept a plus récemment été adapté aux conditions inflammatoires, où il a été observé que les cellules immunitaires cutanées s'organisent pour former des groupes périvasculaires, alors appelés tissus lymphoïdes inductibles associés à la peau (iSALT, « inducible skin associated lymphoid tissue »). Cette structure favorise l'interaction entre DC et LT CD4⁺ ou LT CD8⁺. De plus, les iSALT sont formés autour des capillaires sanguins et favorisent donc les échanges et le recrutement de monocytes, neutrophiles depuis la circulation. Ainsi, en prévenant la formation de ces structures, il est possible de limiter l'intensité des réponses d'eczéma allergique de contact (Honda et al. 2016; Natsuaki et al. 2014).



47

(IDO). Une fois dans les ganglions lymphatiques, elles présentent l'allergène aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs spécifiques. L'ensemble des cytokines anti-inflammatoires qu'elles produisent et l'absence de forts signaux de costimulation (CD80, CD86, CD40...) conduisent à la différenciation préférentielle de lymphocytes T régulateurs ou l'anergie des lymphocytes T spécifiques (Guttman-Yassky et al., 2019; Mercedes Gomez de Agüero et al., 2012).

Cette tolérance naturelle qui prend place chez des patients sains peut être rompue chez les patients atopiques qui sont plus susceptibles de générer une réponse effectrice pathologique. Une phase de sensibilisation prend alors place.

1.10.2 Rupture de tolérance : Sensibilisation

La sensibilisation correspond à la première phase de développement de l'allergie alimentaire et est asymptomatique. Elle commence avec l'entrée de l'allergène dans l'organisme au niveau du tube digestif ou de la peau comme précédemment décrit. Cependant, dans ce cas précis, en raison d'un ensemble de prédispositions génétiques, environnementales (voir chapitre Etiologie 1.7), et de stimuli inflammatoires concomitants à la pénétration de l'allergène, tels qu'un eczéma cutané ou une dysbiose intestinale, une réponse immunitaire effectrice pro-inflammatoire est induite (**Figure 8, étape 1**).

L'hypothèse actuelle d' « exposition double » suppose que la sensibilisation se développerait préférentiellement par la voie cutanée tandis que la voie orale serait la voie de tolérance. Cette exclusivité reste encore à démontrer et il est possible que les deux voies puissent être une voie de sensibilisation (Berin, 2015). La majorité des mécanismes connus de sensibilisation découlent de modèles expérimentaux murins sensibilisés par voie orale ou cutanée (Dunkin et al., 2011). Ils impliquent une rupture de tolérance qui se définit par une moindre activation des LT_{REG} au profit de T_{EFF} de type 2 (Th2) qui participent à la commutation de classe des lymphocytes B vers une production d'IgE spécifiques.

Que ce soit par la voie orale ou cutanée, les cellules dendritiques épithéliales captent l'allergène et mûrissent en surexprimant le CMH-II, CCR7 et un ensemble de marqueurs d'activation tels que CD86, CD80, CD40, OX40L, TIM-4 (Blázquez and Berin, 2008; Yang et al., 2007). Ce phénotype de maturation est conditionné par la nature de l'allergène et leur capacité à se fixer sur les récepteurs TLR (Hammad et al.,

2009). En particulier, les allergènes lipopeptidiques ou l'interaction d'un allergène glycoprotéique avec un lipide/lipopeptide (ex : LPS) permet la fixation à certains TLRs (Jappe et al., 2019; Jin et al., 2007; Palladino et al., 2018; Satitsuksanoa et al., 2016). Les lipides présents dans les aliments (noix, cacahuète...) peuvent aussi se fixer sur les récepteurs CD1d des lymphocytes iNKT (« invariant natural killer T ») et stimuler la production d'IL-4 (Mirotti et al., 2013). De plus, la maturation des DC est renforcée par les signaux environnants tels que les dérivés bactériens (entérotoxine B de *Staphylococcus* (SEB), Lipopolysaccharide, etc.) et les cytokines inflammatoires produites par les cellules épithéliales telles que l'IL-33, IL-25 et le TSLP (Han et al., 2014; Lee et al., 2016; Noti et al., 2014; Oyoshi et al., 2010; Soumelis et al., 2002; Tordesillas et al., 2014). Également, les cellules lymphoïdes innées (ILC) en réponse au danger, produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 qui participent à la boucle inflammatoire. Une fois activées, les DC migrent vers les ganglions lymphatiques drainants pour présenter l'allergène aux lymphocytes T spécifiques (**Figure 8, étape 2**). Les signaux de costimulation OX40L, TIM-4, jagged (ligands de Notch) fournis par les DC participent à l'activation des LT CD4⁺ spécifiques et favorisent leur différenciation en cellules effectrices de type 2 (Th2, « type 2 helper T cells ») (Chu et al., 2014). Ces T_{EFF} vont produire principalement de l'IL-4, IL-5, IL-13 (**Figure 8, étape 3**). Les LT CD4⁺ produisent également de l'IL-3 qui recrute des basophiles dans les ganglions lymphatiques qui à leur tour produisent de l'IL-4 (Leyva-Castillo et al., 2013). En parallèle, les lymphocytes B spécifiques qui reconnaissent directement l'allergène vont s'activer et produire des IgE sous l'influence de l'IL-4, et de l'IL-21 produites par les LB et les LT_{FH} (Bélanger and Crotty, 2016; Jandl et al., 2017; Linterman et al., 2010)(**Figure 8, étape 4**). Néanmoins, il convient de noter que la réponse IgG1⁺ précède la réponse IgE (Hoof et al., 2020; Jiménez-Saiz et al., 2018; Looney et al., 2016). Également, le maintien de la production d'IgE spécifiques chez la souris dépend non pas de plasmocytes IgE⁺ à longue durée de vie mais de LB mémoires qui se redifférencient en plasmocytes à chaque nouveau contact avec l'allergène (He et al., 2017; Jiménez-Saiz et al., 2017). Les IgE spécifiques ainsi produits vont circuler dans l'organisme et se fixer sur toute cellule qui possède le récepteur de haute affinité (FcεRI) en particulier les mastocytes tissulaires et les basophiles présents dans le sang. En outre, l'IL-4 circulant augmente l'expression du récepteur FcεRI sur les mastocytes (Toru et al., 1996). Les IgE peuvent également se fixer sur leur récepteur de faible affinité (CD23) exprimé à la surface des lymphocytes B, monocytes,

macrophages, éosinophiles, cellules dendritiques folliculaires et plaquettes (Engeroff and Vogel, 2019). La fixation des complexes allergène-IgE sur le récepteur CD23 des lymphocytes B permet une présentation facilitée de l'allergène (FAP) aux lymphocytes T, stimulant la production de cytokines de type 2 (Eckl-Dorna et al., 2019; Selb et al., 2017).

La sensibilisation peut prendre plusieurs jours, mois ou années.

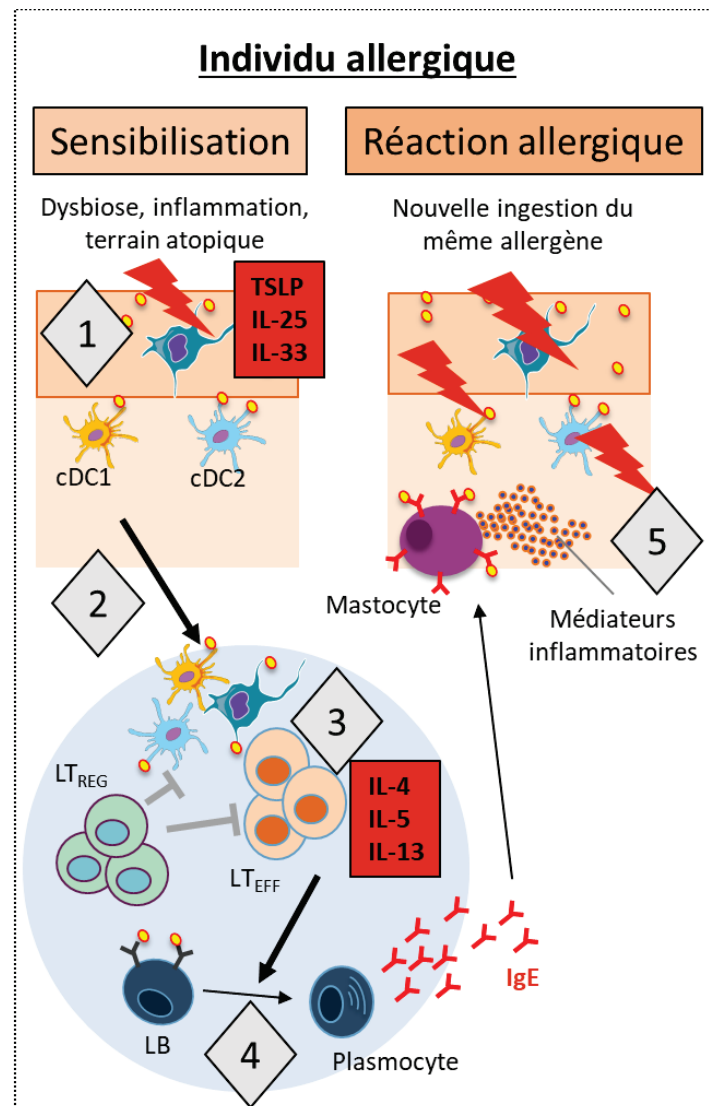


Figure 8 Physiopathologie de l'allergie alimentaire

- 1: Chez un sujet prédisposé aux allergies ou en raison de stimuli particuliers, l'allergène pénètre l'épithélium dans un contexte inflammatoire favorable au développement de la pathologie (présence d'IL-25, IL-33, TSLP produits par les cellules épithéliales notamment)
- 2: Les DC mûrissent et surexpriment fortement leurs récepteurs de costimulation (CD80, CD86, ...) et le CMH-II à leur surface
- 3: Activation de LT naïfs spécifiques par les DC et relargage de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13)
- 4: L'IL-4 stimule la commutation isotype IgE par les LB. Les IgE spécifiques produits recirculent dans l'organisme et se fixent sur les mastocytes tissulaires et les basophiles du sang
- 5: Lors d'une nouvelle ingestion de l'allergène, celui-ci se fixe sur les IgE à la surface des mastocytes et basophiles induisant la dégranulation de médiateurs inflammatoires conduisant aux symptômes allergiques (œdème, vasodilatation des vaisseaux sanguins, broncho-constriction...)

1.10.3 Réponse/Réaction allergique

Dès lors que l'individu est sensibilisé, une nouvelle ingestion du même allergène déclenche une réaction allergique qui est généralement biphasique : une réaction immédiate (<1h) après l'exposition à l'allergène, suivie d'une réaction tardive quelques heures plus tard. La réaction immédiate est causée par la dégranulation de cellules effectrices (mastocytes, basophiles) tandis que la phase tardive implique à la fois une dégranulation retardée des mastocytes et le recrutement de cellules inflammatoires dans le tissu (éosinophiles, neutrophiles...). (Johnston et al., 2014).

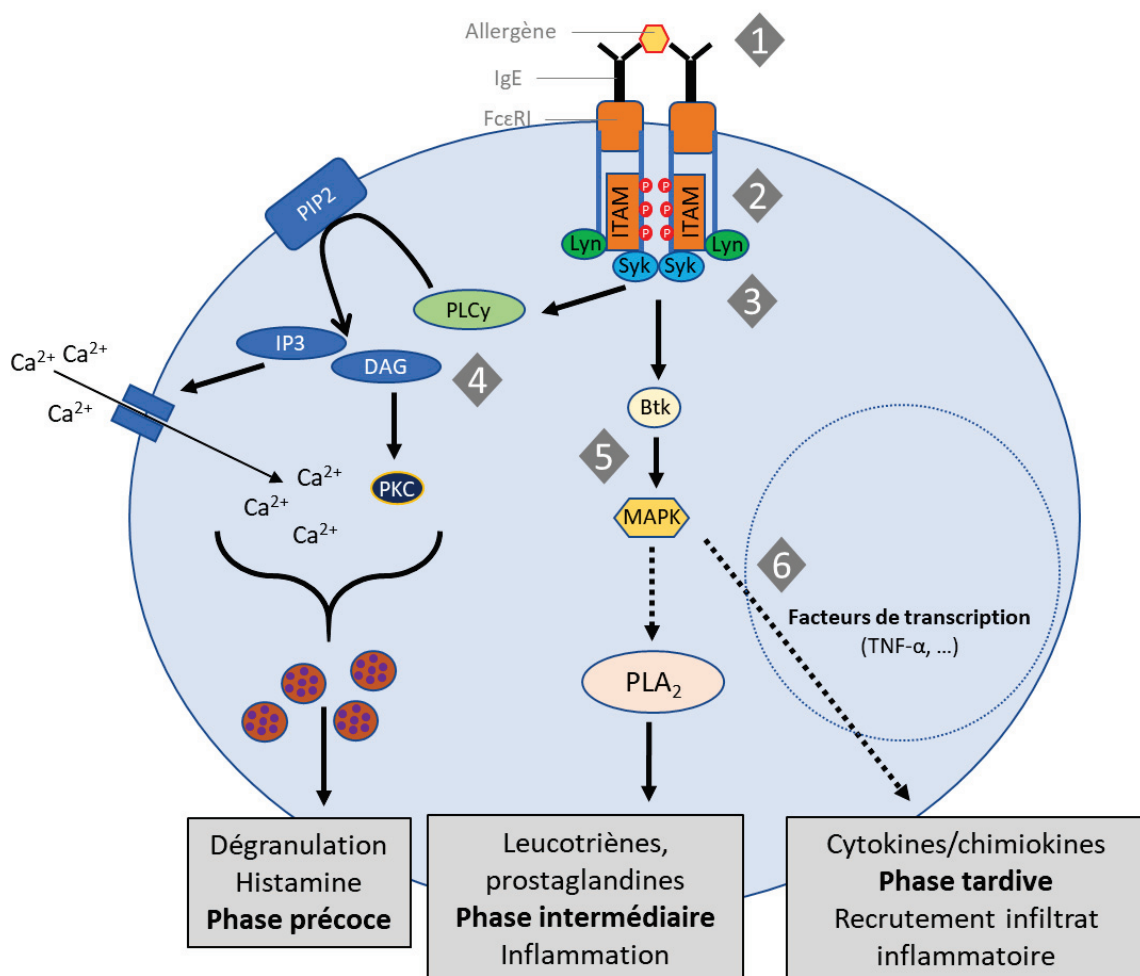


Figure 9 : Mécanisme d'activation du mastocyte par la voie IgE-FcεRI.

1 : Fixation de l'allergène sur les complexes FcεRI-IgE spécifiques et dimérisation des récepteurs. 2 : transphosphorylation des domaines ITAM par la kinase Lyn. 3 : recrutement de la tyrosine kinase Syk. 4 : Syk active la voie PLCγ qui augmente le calcium intracellulaire et déclenche le relargage de granules préformés contenant de l'histamine. 5 : Syk active la voie Btk, MAPK, PLA₂ aboutissant au relargage de leucotriènes et prostaglandines inflammatoires. 6 : la voie des MAPK active la transcription de gènes inflammatoires (cytokines, chimiokines) dont les protéines seront relarguées participant à une inflammation tardive.

1.10.3.1 Phase immédiate

L'allergène ingéré se fixe directement sur les IgE spécifiques à la surface des mastocytes et basophiles. Également, l'allergène peut se fixer sur des IgE libres pour former un complexe immun qui peut ensuite se lier aux récepteurs FcεRI membranaires (Engeroff and Vogel, 2019). La fixation de l'allergène sur le complexe IgE-FcεRI induit une dimérisation des récepteurs de surface FcεRI (**Figure 9, étape 1**). FcεRI est constitué d'une chaîne α nécessaire à la fixation de l'IgE, et de chaînes β et γ impliquées dans la signalisation intracellulaire (Furumoto et al., 2004; Hakimi et al., 1990). La dimérisation des FcεRI entraîne la transphosphorylation des régions intracellulaires ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ») par la tyrosine kinase Lyn qui est constitutivement associée à la chaîne β (**Figure 9, étape 2**). La phosphorylation des régions ITAM de la chaîne γ permet le recrutement de la kinase Syk (« spleen tyrosine kinase ») qui est nécessaire pour l'activation du mastocyte (**Figure 9, étape 3**) (Sakurai et al., 2004; Zhang et al., 1996). En effet, la protéine kinase Syk phosphoryle de nombreuses molécules adaptatrices (SLP-76, LAT) et de tyrosine kinases telles que Vav, Nck, Btk, PLCγ. Une fois activée, la phospholipase Cγ (PLCγ) convertit le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG), qui conduisent à l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et provoquent la sécrétion de granules préformés pouvant contenir de l'histamine, des leucotriènes, des prostaglandines, des protéases, des facteurs d'activation plaquettaire (PAF), des cytokines et chimiokines (**Figure 9, étape 4**) (Hoth and Penner, 1992). A noter que cette élévation de Ca²⁺ suffit à faire dégranuler le mastocyte puisque l'utilisation de ionophores au calcium (ex : ionomycine) est suffisante pour induire leur dégranulation indépendamment de la dimérisation du complexe IgE-FcεRI (Kambayashi and Koretzky, 2007). En outre, la protéine Syk active Btk et la voie des MAPK qui entraînent l'activation de la phospholipase A2 (PLA₂) impliquée dans la libération de leucotriènes dérivés de l'acide arachidonique membranaire (**Figure 9, étape 5**).

L'histamine et l'ensemble des médiateurs inflammatoires relargués ont des effets biologiques variés et systémiques.

L'histamine

L'histamine interagit avec des récepteurs (H1, H2, H3 et H4) situés sur diverses cellules : musculaires, endothéliales, neuronales, intestinales, ou encore les cellules de l'immunité (éosinophiles, monocytes, DC, lymphocytes). La fixation de l'histamine sur ses récepteurs va conduire à la vasodilatation des artères (hypotension, malaise), l'augmentation de la perméabilité des capillaires (œdèmes), la constriction des muscles lisses bronchiques et intestinale (difficultés respiratoires et diarrhée), l'activation des nerfs périphériques (démangeaison, douleur) (Jamet et al., 2006). Les leucotriènes et prostaglandines amplifient également ces effets en se fixant sur leurs récepteurs présents dans de nombreux organes et sur de nombreuses cellules (Ogawa and Grant, 2007).

La voie MAPK activée entraîne également la transcription de cytokines et chimiokines dont l'effet sera visible plus tardivement (**Figure 9, étape 6**).

1.10.3.2 Phase retardée

Après le pic de la réaction immédiate, une phase retardée (après quelques heures) peut se déclarer en raison du relargage tardif de granules de leucotriènes et prostaglandines (**Figure 9, étape 5**).

De nombreuses cytokines et molécules inflammatoires sont aussi produites par les mastocytes (et basophiles). Celles-ci peuvent entraîner l'apparition d'une seconde phase inflammatoire. Elle est due au recrutement et/ou à l'activation retardée (après plusieurs heures) de cellules inflammatoires. Par exemple, le TNF- α produit initialement, entraîne le recrutement de neutrophiles et l'élévation retardée de PAF dans le sérum (Choi et al., 2003; Wershil et al., 1991). De plus, des éosinophiles sont recrutés dans les tissus sous l'influence de l'IL-5. Ils relarguent alors des granules contenant des protéoglycanes 2 qui endommagent les cellules épithéliales et contribuent à l'inflammation tardive (Kucuksezer et al., 2020).

1.11 Diagnostic

Le diagnostic de l'allergie alimentaire est primordial car il implique une prise en charge particulière, notamment l'éviction des allergènes. Il s'agit donc de ne pas confondre l'allergie avec des symptômes similaires causés par des réactions non spécifiques ou non immunologiques.

Histoire clinique

L'étape la plus importante est de définir l'historique du patient afin d'évaluer le risque que le patient soit effectivement atteint d'allergie alimentaire. Cela implique d'évaluer le terrain atopique du patient : allergie chez d'autres membres de la famille, comorbidités atopiques (dermatite atopique). Également, il convient d'avoir une description précise du type de symptômes, de leur délai d'apparition, des facteurs aggravant (exercice physique, alcool), du type d'aliment (arachide grillée ou crue par exemple). Une fois que l'histoire clinique du patient est établie, des tests complémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer le diagnostic d'allergie alimentaire (Oriol and Wang, 2019).

Test cutané (« skin prick test »)

Le test cutané (aussi appelé « prick test ») permet d'évaluer la présence d'anticorps spécifiques IgE chez le patient.

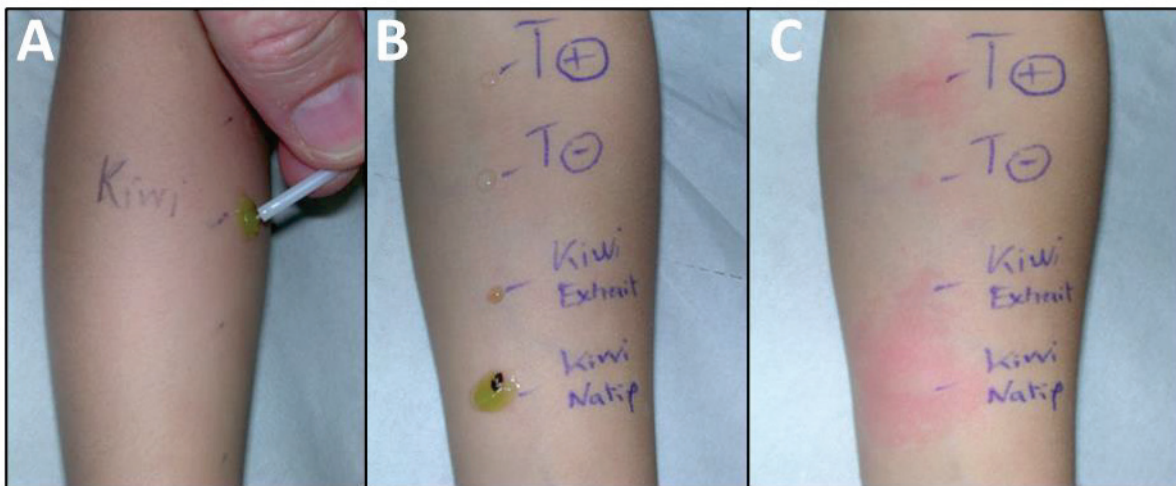


Figure 10 : Illustration du prick-test.

Une goutte d'allergène est déposée sur la peau du patient et l'épiderme est percé avec une aiguille (A,B). Après 10-15 minutes, l'inflammation locale cutanée est observée et mesurée (C). Photographies fournies par Dr F. Payot.

Il consiste à piquer la peau avec une lancette en passant à travers une goutte contenant l'allergène (sous forme natif ou sous forme d'extrait standardisé). Chez les personnes sensibilisées ou allergiques, le test déclenche une réaction cutanée résultant de la dégranulation IgE-dépendante des mastocytes (**Figure 10**). La réaction apparaît en 10 à 15 minutes. Elle associe un érythème et une papule et les deux axes (longueur et largeur) de ces deux lésions élémentaires sont mesurés en millimètres. Ce test permet donc de déterminer la présence d'IgE spécifiques contre l'allergène injecté. Une réaction négative (papule <3mm) exclut l'allergie alimentaire avec une forte valeur prédictive (Sampson, 2005). Au contraire, une papule inflammatoire

supérieure à 3mm est considérée comme une réaction positive. En outre, plus la papule est large plus le risque d'allergie est élevé (Peters et al., 2012). En revanche, il n'y a pas de corrélation entre la réaction du test et la sévérité des symptômes (Hourihane et al., 1997). Néanmoins, cette méthode souffre du manque de standardisation des extraits d'allergènes commercialisés et de la méthode de prick (Oriol and Wang, 2019). Elle peut donc être couplée avec un dosage sanguin des IgE spécifiques.

Dosage sanguin des IgE spécifiques

Le dosage des IgE spécifiques dans le sérum des patients est un test classiquement réalisé par ELISA lorsqu'une allergie alimentaire est soupçonnée. Il peut être réalisé en utilisant un extrait total d'aliment ou un allergène recombinant (ex : Ara h 2). Au même titre que le test cutané, la présence d'IgE dans le sérum permet d'établir la sensibilisation de l'individu contre un allergène donné, mais ne détermine pas forcément un statut allergique (déclenchement de symptômes lors de l'ingestion de l'allergène). En revanche, une forte concentration d'IgE spécifiques dans le sérum corrèle avec un risque accru d'allergie. Néanmoins, le taux d'IgE ne prédit pas efficacement la sévérité des symptômes (NIAID-Sponsored Expert Panel et al., 2010). Les taux d'IgE se quantifient en kilo unités d'allergène spécifique, noté kU_A, par litre. Pour certains aliments, des niveaux seuils d'IgE permettant de prédire une réaction allergique probable lors de l'ingestion d'un allergène ont été déterminés (Clark and Ewan, 2003; Perry et al., 2004). Ces valeurs prédictives varient néanmoins selon l'âge de l'individu et la population étudiée (Komata et al., 2007; Maloney et al., 2008).

Tableau 8 : Seuils prédictifs d'IgE sérique pour la réactivité à un allergène donné (adapté de (Renz et al., 2018))

Aliment ou allergène	Taux sérique d'IgE spécifiques (kUA/L)	Valeur prédictive de positivité (%)
Enfants (2-18 ans)		
Œuf de poule	7	98
Lait de vache	15	95
Arachide (total)	14	100
Arachide Ara h 2	5	96
Poisson	20	100
Fruits à coque	~15	~95
Noisette Cor a 9	1	90
Noisette Cor a 14	5	90
Soja	30	73
Blé	26	74
Enfants (≤ 2ans)		
Œuf de poule	2	95
Lait de vache	5	95

Le dosage des IgE contre des allergènes recombinants (Ara h 2, Ara h 6, ...) peut permettre une prédiction plus précise. La présence d'IgE contre Ara h 2 et Ara h 6 a une très forte valeur prédictive positive d'une allergie et peut même aider à estimer la sévérité des symptômes lors d'un test de provocation (**Tableau 8**) (Kukkonen et al., 2015). Au contraire, la présence seule d'IgE spécifiques d'Ara h 8 est majoritairement associée à une tolérance, une réaction croisée aux pollens (Bet v 1) ou une faible réactivité contre l'arachide (Asarnoj et al., 2012; Martinet et al., 2016; Mittag et al., 2004).

Test de provocation oral (TPO)

Finalement, le test de référence qui permet d'évaluer le statut allergique d'un patient vis-à-vis d'un allergène alimentaire est le test de provocation oral (TPO). Il permet d'enlever tout doute suite au dosage des IgE ou au prick-test. Celui-ci se fait sous le contrôle d'un médecin et en milieu hospitalier. Il consiste en l'administration orale d'un

extrait d'aliment jusqu'à une dose pour laquelle tout patient allergique déclencherait des symptômes. Ce test permet donc de confirmer l'allergie du patient mais également de déterminer le seuil de réactivité à un instant t .

Test d'activation des basophiles

Le test d'activation des basophiles (BAT, « basophil activation test ») doit être mentionné ici bien qu'il soit encore en développement pour l'allergie alimentaire. Il est plutôt utilisé pour l'allergie aux médicaments. Dans le cadre des allergies alimentaires, ce test pourrait aider à confirmer ou affiner le diagnostic avant un TPO. Le BAT consiste à déposer du sérum du patient sur des basophiles *in vitro* afin de suivre leur activation après stimulation allergénique, via l'expression membranaire de CD203 et CD63, analysé par cytométrie en flux. Ce test n'est encore pas standardisé mais pourrait permettre de prédire la sévérité et le seuil des réactions allergiques du patient (Santos and Shreffler, 2017; Santos et al., 2014). Dans un article publié en 2020, le BAT a permis de diagnostiquer avec une très forte spécificité l'allergie à l'arachide, de prédire les réactions sévères ou les seuils bas de réactivité au TPO avec une forte spécificité et sensibilité. Le BAT était le meilleur biomarqueur de sévérité, surpassé par le test cutané seulement pour la prédiction du seuil de réactivité. (Santos et al., 2020).

1.12 Prise en charge

La prise en charge des patients après diagnostic d'une allergie alimentaire comprend :

1. L'éviction de l'allergène
2. La prescription de traitements symptomatiques (antihistaminiques, corticoïdes, bronchodilatateurs, et une seringue d'auto-injection d'épinéphrine pour les réactions sévères)
3. L'induction de tolérance (immunothérapie allergénique)

Eviction de l'allergène

L'éviction de l'allergène doit permettre d'éviter toute réaction allergique qui peut aboutir à l'anaphylaxie potentiellement mortelle. Néanmoins, des accidents sont possibles du fait de la présence d'allergènes dans de nombreux produits alimentaires et la grande prévalence de cette maladie chez les jeunes enfants.

Traitements symptomatiques

Ainsi, lors de l'apparition de symptômes suite à l'ingestion ou à un contact avec un allergène alimentaire, le patient doit observer ses symptômes et rester très vigilant. Il doit contacter un numéro de secours dès que des symptômes de grade II apparaissent. De plus, le patient doit avoir à sa disposition une seringue auto-injectable d'épinéphrine à utiliser dès que ses symptômes atteignent le grade III (fébrilité, endormissement et/ou douleurs abdominale, vomissements). Il est possible d'utiliser un antihistaminique pour calmer les symptômes (Oriel and Wang, 2019; Scurlock and Jones, 2017).

Induction de tolérance

Au-delà de ces médicaments de première ligne qui visent à diminuer les symptômes, de nombreux protocoles de désensibilisation sont développés et testés en clinique. Ils ont pour objectif de réinduire une tolérance à long terme chez le patient et prévenir l'apparition future de symptômes lors d'un nouveau contact avec l'allergène. Le principe repose sur l'administration répétée de doses contrôlées de l'allergène en cause, de manière croissante ou continue sur plusieurs mois/années, par voie orale, sublinguale ou encore épicutanée. Ces protocoles de désensibilisation sont appelés immunothérapies spécifiques de l'allergène et sont expliqués en détail dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

Des protocoles de désensibilisation par voie orale peuvent être proposés aux patients en clinique lorsqu'il s'agit d'allergènes très courants (lait, œuf, fruits à coque par exemple) et impliquant des réactions sévères. Ceci ne rentre pas dans les recommandations officielles et reste une prescription au cas par cas (NIAID-Sponsored Expert Panel et al., 2010). En effet, la désensibilisation nécessite une surveillance forte du médecin. Le taux d'amélioration dû au traitement reste mal évalué. La désensibilisation implique de nombreuses variables non standardisées qui doivent être adaptées et réévaluées pour chaque patient: durée du traitement, augmentation des doses, dose d'allergène administré.

2 Immunothérapies allergéniques (ITA)

2.1 Historique, principe des ITA

Le premier cas d'immunothérapie allergénique d'une allergie alimentaire a été rapporté en 1908 dans le journal Lancet (Schofield, 1908). Un garçon allergique de 13 ans développait des symptômes à chaque fois qu'il ingérait des aliments contenant ou ayant été en contact avec de l'œuf. Du fait de la difficulté d'éviter l'œuf dans un régime alimentaire, son médecin essaya d'induire une tolérance par voie orale. Pour ce faire, il prescrivit l'ingestion journalière d'un cachet contenant l'équivalent d'1/10000^{ème} d'œuf cru, en évitant strictement toute autre consommation d'œuf. L'enfant n'avait connaissance à aucun moment de la présence d'œuf dans le cachet. Cette dose a été conservée le premier mois, puis graduellement augmentée jusqu'à atteindre 1/33^{ème} d'œuf 6 mois plus tard. L'enfant arrêta la médication et a pu dès lors consommer 1/6^{ème} d'œuf par jour sans développer de symptômes (Schofield, 1908).

L'immunothérapie allergénique (ITA), aussi appelée immunothérapie spécifique de l'allergène ou désensibilisation, a donc pour objectif d'induire une tolérance vis-à-vis d'un allergène chez un patient allergique. Le protocole consiste en l'administration répétée, pendant plusieurs mois à plusieurs années, d'une dose croissante ou constante d'allergène, par voie orale, sublinguale, sous-cutanée ou épicutanée. L'efficacité de l'ITA repose sur un ensemble de mécanismes immunitaires qui seront explicités en détail dans le *chapitre 2.3* :

- Induction d'une tolérance lymphocytaire T périphérique (induction de LT_{REG}, anergie et/ou délétion de LT pathogéniques),
- Déviation immunitaire des réponses anticorps (augmentation d'IgG spécifiques au détriment des IgE) et du profil cytokinique lymphocytaire (diminution de la réponse Th2),
- Modulation du seuil d'activation des mastocytes et basophiles.

Plus de 100 ans après le premier cas publié par le Dr. Alfred Schofield, l'immunothérapie allergénique a démontré des effets bénéfiques pour de nombreux patients souffrant d'allergie alimentaire. Néanmoins, bien qu'elle soit utilisée en routine pour traiter les allergies respiratoires ou aux venins d'hyménoptères, son utilisation pour les allergies alimentaires reste limitée en raison du risque de déclenchement

d'une anaphylaxie. Elle fait toujours l'objet d'intenses investigations afin d'en comprendre précisément les mécanismes, d'améliorer son efficacité, limiter ses effets secondaires, et ainsi faciliter son utilisation en cas de besoin.

L'ITA a initialement apporté l'espoir de guérir les allergies alimentaires, c'est-à-dire d'induire une tolérance continue vis-à-vis d'un allergène initialement non toléré. Pourtant, la pratique a mis en évidence que la tolérance, acquise en cours de traitement, disparaissait fréquemment après quelques temps sans aucune ingestion d'allergène. Ainsi, deux manières d'appréhender l'efficacité de l'ITA dans les études cliniques ont vu le jour : la « désensibilisation » correspond à la capacité d'un patient à ingérer une dose prédéfinie (généralement équivalente à une dose « normale » d'allergène pour un repas), sans réaction allergique, en cours de traitement ; la « réponse persistante » (« sustained unresponsiveness ») correspond quant à elle à cette même capacité après l'arrêt total du traitement (généralement 4 à 6 semaines sans aucune ingestion). En pratique, la désensibilisation est l'objectif à atteindre pour une ITA : elle permet à un enfant allergique, dans sa vie quotidienne, d'ingérer « accidentellement » l'allergène sans réaction allergique, voire même de le consommer volontairement. Ainsi, l'ITA améliore la qualité de vie.

Tout d'abord, il s'agit de présenter les protocoles de désensibilisation décrits dans la littérature qui ont été testés en essais cliniques ou utilisés ponctuellement à l'hôpital. Ils impliquent différents paramètres d'intérêt : la posologie (doses, fréquence, durée), la préparation de l'allergène, la sécurité et l'efficacité du traitement.

2.2 Différents protocoles existants (voies d'administration)

Parmi les protocoles d'ITA pour l'allergie alimentaire rapportés dans la littérature (souvent réalisés dans le cadre d'études cliniques), les principales voies d'administration décrites sont la voie orale (OIT), sublinguale (SLIT) et épicutanée (EPIT) (**Figure 11**). Historiquement, la voie sous-cutanée a été testée mais a montré des effets secondaires incompatibles avec son utilisation en pratique (Nelson et al., 1997). En outre, les voies intradermique, intranasale ou intralymphatique existent mais sont peu étudiées ou montrent trop de limites.

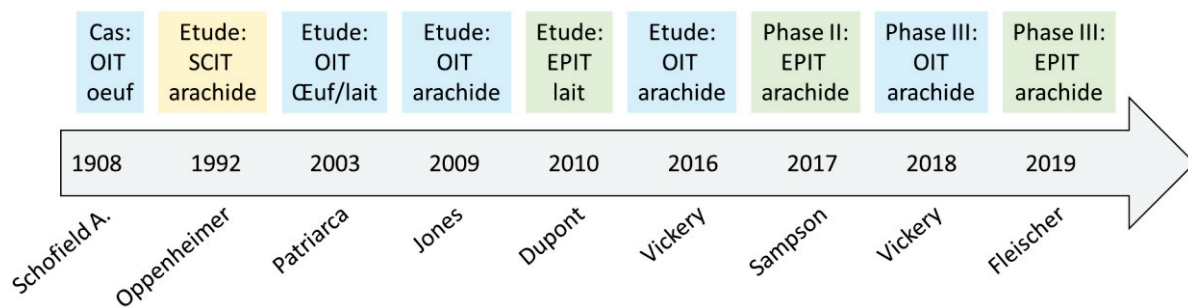


Figure 11 : Principales dates clés de l'ITA pour l'allergie alimentaire (adapté de Feuille & Nowak-Węgrzyn, 2016).

Il s'agit donc de comprendre l'efficacité, les limites et les risques des trois principaux protocoles de l'ITA, à travers les données cliniques disponibles (Pajno et al., 2018).

2.2.1 Préparation de l'allergène pour les ITA

La majorité des ITA réalisées jusqu'à aujourd'hui ont utilisé des aliments crus, des aliments cuits (moins allergéniques), des extraits d'allergène ou des allergènes recombinants. De nombreuses études ne précisent pas le processus utilisé pour extraire, purifier, quantifier et transformer l'allergène. Or, les propriétés d'immunogénicité de l'allergène peuvent être modifiées selon les procédures appliquées. Il sera donc nécessaire à l'avenir de standardiser les protocoles afin d'homogénéiser les essais cliniques (Yee and Rachid, 2016).

Toutefois, les extraits d'allergène sont les plus utilisés dans les essais cliniques. Ils sont issus d'un aliment brut qui a subi un processus physique ou chimique afin d'enlever les molécules non-allergéniques non voulues telles que les lipides, les sucres, les phénols. L'extrait peut ensuite être purifié par chromatographie (Larsen et al., 2020).

2.2.2 Immunothérapie orale (OIT)

L'immunothérapie allergénique orale est le protocole de désensibilisation le plus connu et qui a fait l'objet du plus grand nombre d'essais cliniques. Il peut également être mis en place de manière individuelle pour certains patients dans les services d'allergologie suivant les recommandations propres à chaque pays (Bégin et al., 2020; Pajno et al., 2018; Pepper et al., 2020). Classiquement, l'OIT consiste à administrer par voie orale une dose graduellement croissante d'allergène naturelle ou transformée aux patients allergiques. Elle comprend trois étapes :

1. Phase initiale de définition de la dose tolérée (en quelques heures)
2. Phase d'accumulation/d'augmentation de la dose (semaines à mois)

3. Phase d'entretien (mois à années)

La phase initiale consiste à définir la dose maximale tolérée par le patient au cours d'un test de provocation oral (TPO). Pour ce faire, l'allergène est administré sous contrôle médical par doses croissantes, toutes les 30 minutes, jusqu'à la dose qui déclenche des symptômes (dose réactogène).

La phase d'accumulation correspond à une prise quotidienne d'allergène dont la dose est augmentée toutes les semaines ou mois jusqu'à atteindre une dose cible, en général la dose maximale tolérée définie au TPO. Cette période dure plusieurs semaines ou mois et permet d'atteindre la dose d'entretien. A la fin de la phase d'augmentation de la dose, le patient est donc désensibilisé. Néanmoins, cet état de désensibilisation doit être maintenue par une prise régulière de l'allergène. C'est alors la phase d'entretien.

Durant la phase d'entretien le patient doit ingérer la dose d'entretien 2 à 3 fois par semaine afin de maintenir la désensibilisation. Cette phase dure quelques mois à plusieurs années. Cela permet d'éviter tout accident symptomatique lors d'ingestions accidentelles de faibles doses d'allergènes dans l'alimentation quotidienne. En général, la dose d'entretien varie de 300 à 4000mg d'allergène par jour.

2.2.2.1 Etudes cliniques OIT : efficacité, effets indésirables

L'OIT a principalement été testée en clinique pour les allergies à l'œuf, au lait ou à l'arachide, et pour un seul allergène à la fois.

Œuf

Une étude multicentrique du consortium pour la recherche sur les allergies alimentaires (CoFAR) américain, incluant 55 enfants de 5 à 11 ans allergiques à l'œuf démontra l'efficacité du traitement à une dose d'entretien de 2g (~1/3 d'un œuf) (Burks et al., 2012). 55% des enfants traités pouvait tolérer 5g après 10 mois contre 0% dans le groupe placebo. Après 24 mois, 75% des sujets pouvaient désormais tolérer 10g de blanc d'œuf lors d'un TPODACP (~8g de protéine). Après 4-6 semaines d'arrêt du traitement et d'éviction de l'allergène, 28% des enfants traités pouvait passer le TPODACP sans symptômes, montrant la possibilité d'une désensibilisation persistante. En comparaison, une étude japonaise utilisa une dose d'entretien plus faible, à savoir 194 mg (1/32^{ème} d'œuf) sous forme d'œufs brouillés (Yanagida et al.,

2016). Elle dura 12 mois et testa la persistance de la désensibilisation 2 semaines après arrêt du traitement : 71,4% des patients tolérait toujours 194 mg et 33,3% tolérait 3g, comparativement à 0% dans le groupe placebo.

L'OIT pour l'œuf offre donc une désensibilisation pour une majorité des patients traités, avec des symptômes/effets secondaires majoritairement oropharyngés. La persistance de la désensibilisation après arrêt du traitement reste à démontrer.

Lait

Au même titre que l'allergie à l'œuf, l'allergie au lait a tendance à disparaître chez la majorité des patients (80%) avec l'âge. Néanmoins, pour ceux qui ont une allergie persistante, elle impacte fortement leur qualité de vie du fait de la présence abondante de ces allergènes dans l'alimentation classique, suscitant un vif intérêt pour la mise en place d'essais cliniques.

Le premier essai clinique en double aveugle avec contrôle placebo fut publié en 2008 (Skripak et al., 2008). Il comprenait 20 enfants allergiques âgés de 6 à 17ans et traités ou non avec une dose d'entretien de 500mg de poudre de lait dégraissé. Après 3-4 mois, les patients traités pouvaient tolérer 5140mg en dose cumulative lors d'un TPODACP. Comparativement, le groupe placebo réagissait à une dose médiane de 40mg. 35% des patients traités ont développé des effets secondaires incluant majoritairement des démangeaisons oropharyngées, et seulement 2% présentaient des symptômes gastro-intestinaux.

La question de la persistance de la désensibilisation reste une question de grand intérêt pour les patients. En ce sens, une étude publiée par Narisety *et al.* a montré que les patients traités par OIT, tolérant plus de 2540mg après TPODACP pouvaient réintroduire des produits alimentaires (lait, yaourt, fromage), en commençant par une dose de 500mg, puis en augmentant graduellement toutes les deux semaines jusqu'à 16g. Les effets secondaires, bien que fréquents, décroissaient avec le temps (Narisety et al., 2009).

L'ensemble de ces essais cliniques encourageants a favorisé le développement de l'OIT, au détriment de la SLIT pour l'allergie à l'arachide. (Keet et al., 2012)

Cacahuète (arachide)

L'allergie à l'arachide est très fréquente aux Etats-Unis et a tendance à persister avec l'âge (80% des patients). Ainsi, elle fait l'objet d'intenses recherches et dénombre le plus d'essais cliniques réalisés (**Tableau 9**).

Une méta-analyse incluant 12 essais (1041 patients avec un âge médian de 8,7 ans) sur l'efficacité et la sureté des protocoles d'OIT pour l'allergie à l'arachide publiée en 2019 permet d'apprécier les deux grandes caractéristiques générales de ce traitement (Chu et al., 2019) :

- Le traitement démontre une bonne efficacité. Les patients traités ont 12 fois plus de chance de passer un TPO standardisé comparativement au groupe placebo. C'est-à-dire qu'ils ne font pas de réactions allergiques à la plus forte dose testée.
- Le traitement est associé à une fréquence élevée d'effets indésirables : par rapport à un traitement placebo, au cours du traitement, les patients traités ont 151 fois plus de risque de déclencher une anaphylaxie, 45 fois plus d'utiliser de l'épinéphrine/adrénaline, 147 fois plus de risques de souffrir de réactions gastro-intestinales (vomissements).

Le premier essai clinique randomisé en double aveugle avec contrôle placebo a été publié en 2011 (Varshney et al., 2011). Il comprenait 28 enfants de 2 à 10 ans diagnostiqués par un prick-test positif et un taux IgE spécifiques $>15\text{kU}_A/\text{L}$. Les patients augmentaient graduellement leur dose d'arachide jusqu'à atteindre la dose d'entretien de 4000mg après 11 mois. Après 1 mois supplémentaire à la dose d'entretien, les patients ont été soumis à un TPODACP. Les 16 enfants traités toléraient alors une dose médiane de 5000mg comparativement à une dose médiane de 280mg pour le groupe placebo. La majorité des patients traités par OIT ont rapporté des effets indésirables.

De la même manière que pour l'OIT à l'œuf, une étude a évalué la persistance de la désensibilisation à l'arachide. Treize enfants de 1 à 9 ans traités avec une dose d'entretien de 4000mg pendant 5 ans maximum, ont passé un TPODACP, puis fait l'éviction de l'allergène pendant 1 mois avant un second TPODACP. 12 de ces enfants ont toléré les deux TPODACP démontrant une persistance de la désensibilisation.

Par la suite, l'étude DEVIL ("Determining the Efficacy and Value of Immunotherapy on the Likelihood of Peanut Tolerance") démontra qu'une forte dose d'entretien (3000mg)

ou une faible dose (300mg) ne différaient pas significativement en termes d'efficacité, mais que la faible dose offrait plus de sécurité avec notamment moins d'effets indésirables (Vickery et al., 2017).

Ainsi, ces dernières années, des essais cliniques de phase II et III ont été réalisés avec des gélules standardisées contenant 300mg d'arachide en se basant sur les résultats précédents (Bird et al., 2018b; Investigators, 2018). L'étude de phase III multinationale "Peanut Allergy Oral Immunotherapy Study of AR101 for Desensitization in Children and Adults" (PALISADE) démontra qu'après 12 mois de traitement, 67% des patients (4-17ans) toléraient une dose au moins >600mg, contre 4% dans le groupe placebo. Néanmoins, au cours du traitement, le groupe traité déclara deux fois plus de douleurs abdominales (52,2% vs 24,2%), de vomissements (41,4% vs 24,2%) et cinq fois plus de réactions allergiques systémiques (14,2% vs 3,2%) comparativement au groupe placebo. En outre, chez des patients de 18 à 55 ans, le traitement n'était pas significativement efficace.

En janvier 2020, la commercialisation de ce traitement (Palforzia®) a été approuvée par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour limiter les réactions allergiques qui peuvent apparaître après une exposition accidentelle à l'arachide, chez des enfants de 4 à 17 ans dont le diagnostic d'allergie a été confirmé. L'éviction de l'allergène en dehors du traitement doit être maintenue.

Tableau 9 Sûreté et efficacité du traitement OIT
(adapté de E. H. Kim & Burks, 2020)

Auteurs (années)	Allergène	Nombre (taux actif)	Sujets avec AEs	Sujets avec SAEs	Sujets avec epi	Total des abandons	Abandons dues aux AEs	AE les plus communs
Buchanan (2007)	Œuf	7	7	0	0	0	0	Erythème de la peau
Burks (2012)	Œuf	40	31	0	n/d	6	5	Symptômes oropharyngés
Yanagida (2016)	Œuf	21	n/d	0	0	3	2	Symptômes gastrointestinaux
Longo (2008)	Lait	30	30	0	5	0	0	Prurit oral
Skripak (2008)	Lait	13	19	0	4	1	n/d	Prurit oral
Narisety (2009)	Lait	15	n/d	n/d	4	2	2	Symptômes locaux
Jones (2009)	Cacahuète	39	39	0	2	10	4	Symptômes des voies respiratoires hautes
Varshney (2011)	Cacahuète	19	9	0	2	3	1	n/d
Anagnostou (2014)	Cacahuète	49	n/d	0	1	6	4	Démangeaisons orales
Vickery (2014)	Cacahuète	39	n/d	n/d	n/d	15	6	n/d
Vickery (2017)	Cacahuète	37	35	0	1	5	2	Symptômes gastrointestinaux
Bird (2018)	Cacahuète	29	28	1	1	6	4	Symptômes gastrointestinaux
Vickery (2018)	Cacahuète	372	367	8	52	80	43	Symptômes gastrointestinaux

Auteurs (années)	Allergène	Nombre (taux actif)	Age médian	Placebo? (taux ratio)	Dose de maintenance	temps de traitement	Répondeurs	Persistance de la désensibilisation	Commentaires
Buchanan (2007)	Œuf	7	4 ans	N	300 mg	2 ans	4/7	2/7(3-4 mois)	Preuve de concept œuf OIT
Burks (2012)	Œuf	40	7 ans	O (8:3)	2000 mg	22 mois	30/40	11/40 (4-6 semaines)	Œuf double aveugle OIT, CoFAR
Yanagida (2016)	Œuf	21	~8 ans	N	194 mg	12 mois	16/21	7/21 (2 semaines)	Œuf brouillé OIT
Longo (2008)	Lait	30	8 ans (moy)	N	150mL	12 mois	11/30	n/d	Lait de vache OIT
Skripak (2008)	Lait	13	9,5 ans	O (2:1)	500 mg	23 semaines	4/13	n/d	Lait double-aveugle OIT
Narisety (2009)	Lait	15	8 ans	N	16 000 mg	3-17 mois	6/15	n/d	Ingestion de lait diététique
Jones (2009)	Cacahuète	39	4,8 ans	N	300 mg	3 ans	27/39	n/d	Preuve de concept cacahuète OIT
Varshney (2011)	Cacahuète	19	5,8 ans	O (2:1)	4000 mg	12 mois	16/19	n/d	Première cacahuète double-aveugle OIT
Anagnostou (2014)	Cacahuète	49	12,4 ans	N	800 mg	26 semaines	24/49	n/d	OIT vs évitement
Vickery (2014)	Cacahuète	39	4,8 ans	N	4000 mg	3-5 ans	27/39	12/39 (4 semaines)	Premier SU avec cacahuète OIT
Vickery (2017)	Cacahuète	37	2,4 ans	N	300, 3000 mg	25-47 mois	30/37	29/37 (4 semaines)	Premier OIT nouveau né, recherche de dose
Bird (2018)	Cacahuète	29	7,5 ans	O (1:1)	300 mg	12 mois	23/29	n/d	Etude de phase 2
Vickery (2018)	Cacahuète	372	11,3 ans	O (3:1)	300 mg	12 mois	250/372	n/d	Etude de phase 3

AE: effet secondaire ("adverse event")

SAE: effet secondaire sévère ("severe adverse event")

n/d.: non disponible

S.U.: persistance de désensibilisation ("sustained unresponsiveness")

moy: moyenne

L'OIT semble donc être prometteur en termes d'efficacité et apparait déjà utile pour réduire les risques d'accident de nombreux patients allergiques au lait, à l'œuf ou à l'arachide. Néanmoins, le fort taux d'effets secondaires, l'aversion des patients pour le goût de l'aliment, et l'incertitude quant à la persistance de désensibilisation après arrêt du traitement, limitent son usage et sa généralisation.

2.2.3 Immunothérapie sublinguale (SLIT)

L'immunothérapie allergénique par voie sublinguale a également fait l'objet d'essais cliniques et présente des résultats encourageants. Cette méthode est très utilisée contre des pneumallergènes dans le cadre des asthmes et rhinites allergiques. L'allergène est déposé sous forme liquide glycinée sous la langue, sans ingestion. Son principe a donc été transposé aux allergies alimentaires pour s'affranchir des effets secondaires observés dans l'OIT (Schworer and Kim, 2020).

2.2.3.1 Etudes cliniques SLIT : efficacité, effets indésirables

Le premier cas de SLIT a été rapporté en 2003 pour traiter une allergie au kiwi (Mempel et al., 2003). Après désensibilisation le patient était capable d'ingérer 1cm³ de kiwi sans développer de symptômes, et présentait une modification des paramètres allergiques (diminution de la taille du prick-test et du taux d'IgE, augmentation des IgG4). 4 mois après l'arrêt du traitement, le patient tolérait toujours la dose de maintenance (Kerzl et al., 2007).

Deux essais cliniques randomisés (ECR) pour des allergies à la pêche ou la pomme, incluant chacune 56 adultes pendant 6 ou 4 mois de traitement ont montré qu'un traitement par SLIT pouvait induire une tolérance de 3 à 9 fois supérieure à la dose initiale pour l'étude avec la pêche, tandis que 70% des patients ont vu leur seuil de tolérance augmenté dans l'étude de patients allergiques à la pomme (Fernández-Rivas et al., 2009; Kinaciyan et al., 2018; Sánchez Acosta et al., 2020). Les principaux effets secondaires étaient des démangeaisons oropharyngées.

Un ECR incluant 30 enfants (6-17ans) allergiques au lait pendant 15 mois de traitement SLIT, avec une dose de maintenance de 7mg, permit à 60% des patients d'augmenter 10 fois leur dose tolérée initiale lors d'un TPODACP (Keet et al., 2012). Les effets secondaires comprenaient 28% de démangeaisons oropharyngées, 0,38% de symptômes gastrointestinaux. Un seul patient a nécessité l'usage d'épinéphrine due à l'aspiration accidentelle du traitement sublingual. A noter qu'en comparaison directe dans cette étude, des groupes ont été traités avec un double traitement SLIT et OIT. Dans ces groupes, 90% des patients ont vu leur seuil de tolérance augmenté avec 60-80% qui ont passé un TPODACP avec une dose de 8g de lait. Néanmoins, plus d'effets indésirables ont été induits : 3-8% des patients traités ont développé des

effets secondaires gastro-intestinaux, et quatre recours à l'épinéphrine ont été nécessaires.

Également, trois ECR portant sur un traitement SLIT, chez des enfants et des adultes allergiques à l'arachide ont montré des effets bénéfiques (**Tableau 10**).

Dans une première étude (âge médian de 15ans), 70% des patients traités pendant 11 mois ont répondu au traitement (TPODACP > 5 g ou dose tolérée multipliée par un facteur 10) contre 15% dans le groupe placebo. La dose tolérée médiane passa de 3,5 à 466 mg (> 1 cacahuète). 63% des patients n'ont pas développé de symptômes ; en excluant les symptômes oropharyngés, 95% des patients n'ont pas développé de symptômes (Burks et al., 2015; Fleischer et al., 2013).

La deuxième étude analysa l'effet d'un traitement SLIT pendant 1-5 ans sur des enfants allergiques (âge médian 6,5ans). Après 12 mois, les patients traités ont pu ingérer une dose médiane de 1710mg contre 85mg pour le groupe contrôle lors d'un TPODACP. Pendant le traitement, seulement 4,8% des patients traités ont développé des effets secondaires (dont 75% de démangeaisons oropharyngées) (Kim et al., 2011). Après 3-5 ans de SLIT, 75% des patients ont pu ingérer plus de 750mg lors d'un TPODACP, et 25% n'ont pas développé de symptômes à 5g (Kim et al., 2019).

La troisième étude a directement comparé les approches SLIT et OIT chez des enfants de 7 à 13 ans durant 1 an (Narisety et al., 2015). Le traitement SLIT augmentait la dose maximale tolérée de 21 à 496mg contre 21 à 7246mg pour les patients traités par OIT. Ce bénéfice clinique était associé à une augmentation des IgG4 spécifiques de l'arachide. De plus, 9% des patients traités par SLIT contre 43% des patients traités par OIT développèrent des effets désirables au cours du traitement, principalement oropharyngés et gastro-intestinaux, à l'exception de cinq cas où l'utilisation d'épinéphrine était nécessaire, tous dans le groupe traité par OIT.

Enfin, chez des patients allergiques à la noisette, la dose moyenne tolérée lors d'un TPODACP est passée de 2,29g à 11,56g (dont 50% à 20g) après le traitement SLIT, contre 3,49g à 4,14g dans le groupe placebo. Ce bénéfice clinique corrèle avec l'augmentation des IgG4 spécifiques et les taux d'IL-10 dans le groupe traité (Enrique et al., 2005).

Tableau 10 : Essais cliniques randomisés d'immunothérapie sublinguale pour les allergies alimentaires (adapté de Schworer & Kim, 2020)

Etude (année)	Allergène	Nombre de participants (traités)	Age médian (années)	Dose de maintenance (mg)	Durée du traitement	Répondeurs (désensibilisés)	Dose cumulative tolérée lors du TPO (mg)	% doses avec effets indésirables	Nombre d'abandons en cours de traitement	Abandons dus aux effets indésirables
Enrique (2005)	Noisette [£]	12	29,2 ^{\$}	13,25	8-12 semaines	Non rapporté [¥]	Augmentation d'un facteur 5	7,6	1	0
Fernandez-Rivas (2009)	Pêche	37	29,1 ^{\$}	0,01	6 mois	Non rapporté [¥]	Augmentation d'un facteur de 3 à 9	39,8	4	1
Fleischer (2013)	Arachide	20	15	1,386	44 semaines	14/20 (70%) [#]	371	37	5	1
Narisety (2015)	Arachide	10	11	3,7	12 mois	7/10 (70%) [#]	496	9	1	1
Kim (2011)	Arachide	11	5,8	2	6 mois	Non rapporté [¥]	1710	11,5	0	0
Kim (2019)	Arachide	48	6,5	2	3-5 ans	32/48 (67%) [¤]	1750	4,8	11	2

[£] inclut les patients avec un syndrome oral allergique

^{\$} Age moyen

[¥] Aucun seuil de réponse défini au début de l'étude

[#] Répondeurs: dose tolérée égale à 10 fois la dose initiale ou une dose de 5g

[¤] Répondeurs: tolère un TPO de 750mg

2.2.4 Immunothérapie allergénique épicutanée (EPIT)

2.2.4.1 Historique de l'EPIT

Historiquement, le premier cas réussi d'immunothérapie allergénique épicutanée (EPIT) a été rapporté en 1921 par Vallery-Radot P. L'objectif était de désensibiliser un patient souffrant d'asthme causé par des allergènes d'origine équine. Le traitement a consisté à appliquer de manière répétée un allergène de cheval sur la peau scarifiée du patient (Vallery-Radot and Hangenau, 1921). Au cours des dernières décennies, différents protocoles d'EPIT ont montré des résultats intéressants pour désensibiliser des allergies aux pneumallergènes (Blamoutier et al., 1959; Eichenberger and Storck, 1966; Palma-Carlos, 1967; Pautrizel et al., 1957; Senti et al., 2009a). En raison de l'augmentation des allergies alimentaires et des résultats imparfaits des traitements par OIT et SLIT, le principe de l'EPIT a été transposé aux allergies alimentaires afin de tirer avantage de ses atouts. En effet, l'épiderme étant non vascularisé, il limite la dissémination systémique de l'allergène et donc le risque de réactions allergiques généralisées.

2.2.4.2 EPIT et allergie alimentaire

Ainsi, la première preuve de concept de l'efficacité de l'EPIT pour traiter l'allergie alimentaire a été réalisée dans un modèle murin d'allergie à l'ovalbumine et l'arachide (Mondoulet et al., 2009). L'allergène était administré par l'intermédiaire d'un patch Viaskin® développé par la société DBV Technologies (Montrouge, France). Le traitement consistait en l'application répétée sur une peau intacte d'un patch Viaskin®

contenant 100µg d'allergène, pendant 48h, hebdomadairement, pendant 8 semaines. Ce traitement EPIT entraîna une chute du taux d'IgE spécifiques, une augmentation des IgG2a, une baisse des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5, IL-13) et une amélioration des symptômes cliniques, lors d'un test d'hyper-réactivité bronchique. Le protocole d'EPIT se montra aussi efficace que l'immunothérapie allergénique par voie sous-cutanée (SCIT) pour les allergènes alimentaires testés, ainsi que pour deux pneumallergènes contrôles (pollen et acarien).

Ces expériences précliniques ont donc démontré la capacité d'EPIT à moduler la réponse immunitaire et clinique face à des allergènes alimentaires.

2.2.4.3 Principe de l'EPIT utilisant la technologie Viaskin®

Le patch Viaskin® avait initialement été développé comme outil de diagnostic de l'allergie au lait (Diallertest®). Le principe étant que l'application de l'allergène sur la peau induit une réaction inflammatoire locale retardée en 48-72h chez les patients allergiques (De Boissieu et al., 2003; Nicolas Kalach, MD et al., 2005; Roehr et al., 2001; Soury et al., 2005). Rapidement, l'idée d'appliquer de manière répétée le patch Viaskin® pour désensibiliser les patients allergiques a été mise en œuvre. Le patch est appliqué sur la zone interscapulaire chez l'enfant, et sur le bras chez l'adulte.

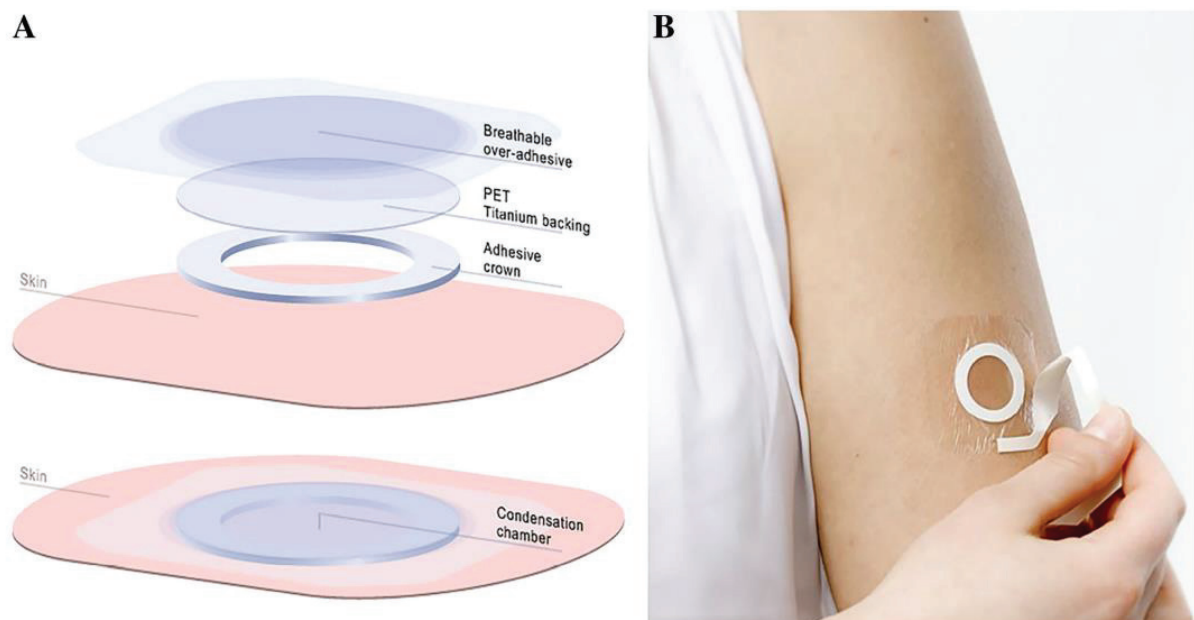


Figure 12 : Illustration du patch Viaskin pour l'EPIT

A) Schéma du patch constitué d'une chambre de condensation, d'une couronne adhésive, d'une membrane en polyéthylène et d'un film respirant. B) Photo du patch appliqué sur le bras d'un individu.

Le patch Viaskin® est constitué d'une membrane de polyéthylène de 11 mm de diamètre entourée d'une couronne adhésive et recouvert par un film respirant, transparent et adhésif (**Figure 12**). L'allergène est déposé sur la membrane de polyéthylène par un électrospray qui pulvérise des couches de protéines homogènes, fines et sèches (**Figure 13**).

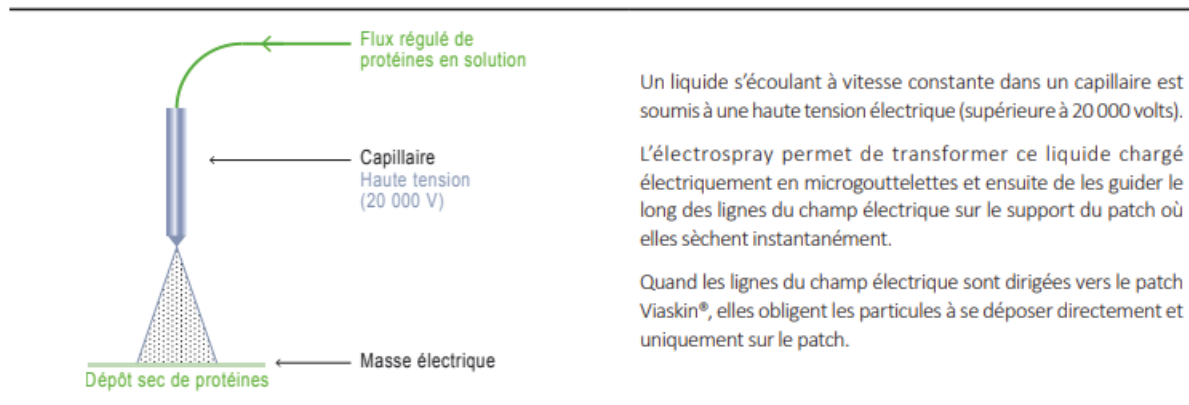


Figure 13 : Technologie pour déposer l'allergène sur le patch.

Source : https://www.dbv-technologies.com/wp-content/uploads/2018/03/dbv_ddr_2017_complet_visaamf-1.pdf

Lorsque le patch est appliqué sur la peau, il forme une chambre de condensation entre la peau et la membrane de polyéthylène où l'allergène est déposé. En raison de la perspiration naturelle de la peau, de l'eau s'accumule alors dans la chambre de condensation et induit la solubilisation de l'allergène (**Figure 14**).

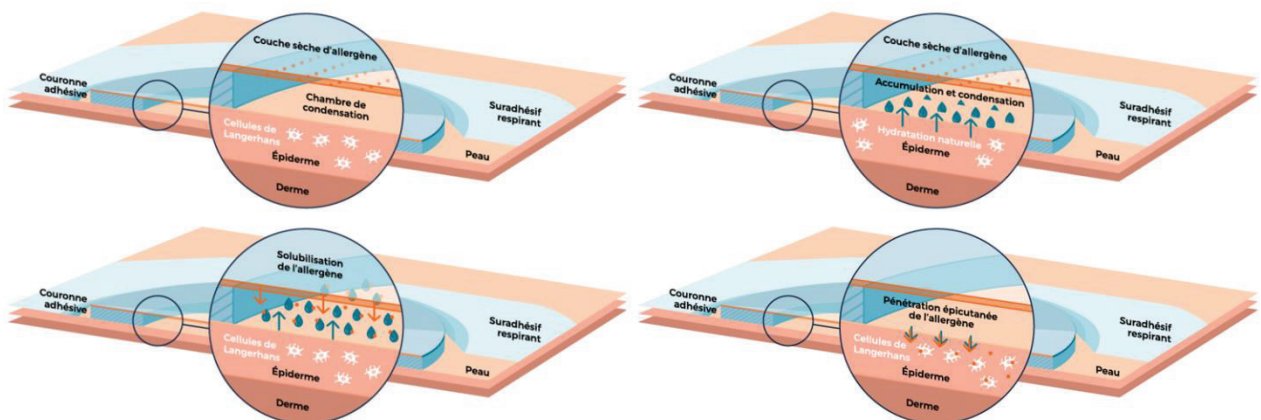


Figure 14 Schéma du fonctionnement du patch Viaskin® au cours d'EPIT

Source : <https://www.dbv-technologies.com/fr/viaskin-platform/>

L'allergène solubilisé entre alors en contact avec la peau et pénètre dans l'épiderme, et dans une moindre mesure dans le derme, où il peut être pris en charge par les cellules dendritiques (**Figure 15 et Figure 16**) (Dioszeghy et al., 2011).

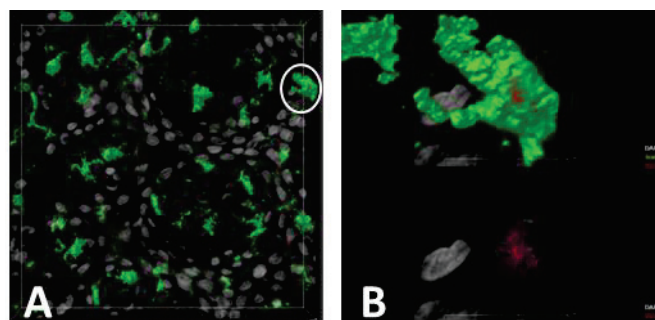


Figure 15 : Prise en charge des molécules d'arachide par les cellules de Langherans sur un modèle de peau reconstruite humaine

Photo représentative de la prise en charge de la protéine d'arachide fluorescente (rouge) par les cellules Langérine+ (vertes) de l'épiderme d'un explant cutané humain (NativeSkin®) sur lequel a été appliqué un patch Viaskin® contenant 250µg d'arachide pendant 24 heures. La couleur grise correspond au marquage DAPI des noyaux cellulaires. (A) Vue globale de la reconstruction 3D. Le cercle blanc permet d'identifier une cellule qui co-localise le marquage Langérine et l'arachide fluorescente. (B) Vue détaillée de cette cellule avec le marquage Langérine (partie haute) ou le noyau (partie basse) colocalisée avec le marquage arachide (Source : www.genoskin.com)

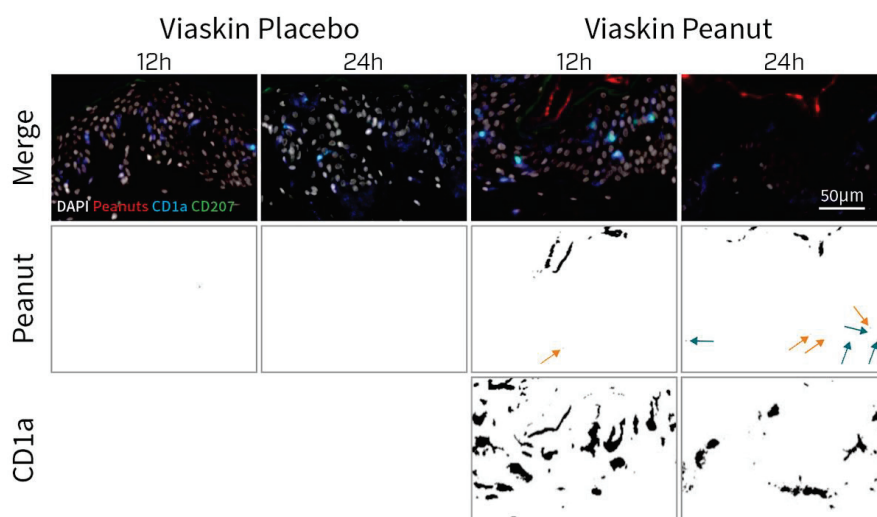


Figure 16 : Pénétration de l'arachide sur un modèle d'explant cutané

Image représentative d'explants cutanés avec les images fusionnées (première ligne) des marquages DAPI (gris), CD1a (bleu), CD207 (vert) et arachide (rouge). La deuxième ligne représente l'arachide (en noir). Les flèches bleues ciblent l'arachide dans l'épiderme, les flèches oranges désignent l'allergène colocalisé avec les cellules CD1a+ (visible en noir sur la dernière ligne).

2.2.4.4 Etudes cliniques EPIT : efficacité, effets indésirables

Basé sur les résultats précliniques encourageants, le premier essai clinique en double aveugle avec contrôle placebo pour désensibiliser des enfants souffrant d'allergie au lait a été réalisé en 2010 (Dupont et al., 2010). L'étude incluait 18 patients âgés de 3 mois à 15 ans. Le traitement durait 3 mois et consistait en l'application d'un patch Viaskin® contenant 1mg de poudre de lait écrémé, pendant 48h, trois fois par semaine, sur la zone interscapulaire, sans préparation particulière de la peau. Après traitement, la dose cumulative tolérée lors du TPODACP était en moyenne 12 fois supérieure comparativement au groupe placebo ($1,77\text{mL} \pm 2,98\text{mL}$ à jour 0 versus $23,61\text{mL} \pm$

28,61mL à jour 90 ($p=0,18$). Les principaux effets indésirables étaient des démangeaisons ou des eczémas au niveau du site d'application du patch : 19% et 15% des patchs appliqués dans le groupe traité et placebo, respectivement, ont déclenché une réaction locale indésirable. Des symptômes gastro-intestinaux n'ont été rapporté que pour 3% de l'ensemble des patchs appliqués (cumulés) dans le groupe traité contre 0% dans le groupe placebo. Cette première étude clinique a donc montré une amélioration clinique conférée par l'EPIT, et une très faible incidence d'effets secondaires systémiques.

Suite aux premiers essais cliniques d'EPIT pour l'allergie au lait indiquant une bonne observance et tolérance au traitement des patients (Dupont et al., 2010; Rutault et al., 2016; Spergel et al., 2020), des études cliniques pour l'allergie à l'arachide, connue comme étant une allergie persistante, ont été mises en place.

Une étude de phase I incluant 100 patients âgés de 6 à 50 ans démontra une bonne tolérance et observance au traitement, avec une incidence similaire des effets secondaires, principalement des érythèmes ou démangeaisons cutanés dues au patch, entre le groupe traité et placebo (Jones et al., 2016). Parmi les doses d'arachide testées (20, 100, 250, 500 μ g) et le temps d'application du patch sur une même zone (24 ou 48h), les auteurs recommandèrent une application de 24H à 250 μ g pour les enfants (6-11 ans), 500 μ g pour les adolescents (12-17 ans) et 500 μ g pour les adultes (≥ 18 ans).

Par la suite, deux études cliniques de phase II visant à montrer l'efficacité du traitement et la dose optimale d'arachide ont été mises en place.

L'étude VIPES ("Viaskin® Peanut's Efficacy and Safety") incluait 221 sujets (âge médian de 11 ans) pendant 12 mois, et comparait des doses d'arachide de 50, 100, 250 μ g par patch (Sampson et al., 2017). Le paramètre principal de l'étude était le pourcentage de répondeurs à 12 mois : un sujet répondeur est un patient qui passe un TPODACP avec une dose 10 fois supérieure à la dose de réactivité initiale, ou dépassant 1000 mg de protéine d'arachide. Cette étude démontra un taux de répondeurs (50%) dans le groupe traité significativement plus élevé que dans le groupe placebo (25%), mais uniquement avec la dose 250 μ g par patch. Ce taux de répondeurs était d'autant plus distinct dans le sous-groupe d'âge 6-11ans (53,6% traités versus 19,4% placebo). A noter que le sous-groupe adolescent/adulte ne

présentait pas de différence significative. Aucun effet indésirable sévère n'a été observé. Les effets indésirables fréquents étaient des réactions cutanées locales. L'observance du traitement après 12 mois était de 97,6%.

En parallèle, l'étude CoFAR6 incluait 74 sujets sur 12 mois et compara les doses 100 et 250µg (Jones et al., 2017). Ici, un sujet était considéré répondeur au traitement s'il ne développait pas de symptômes lors d'un TPODACP avec une dose 10 fois supérieure à la dose initiale ou une dose de 5044 mg. Après 52 semaines, 79,8% des patients traités (les doses 100 µg et 250 µg ont eu le même effet) contre 14,4% du groupe placebo ont répondu au traitement. Cet effet était également plus fort dans le groupe 4-11ans versus >11 ans. Comme l'étude VIPES, les effets indésirables majoritaires étaient des réactions locales cutanées. Le traitement corrélait avec une augmentation des taux d'IgG4 spécifiques, du ratio IgG4/IgE et une tendance à la baisse de l'activation des basophiles et des cytokines de type 2.

Tableau 11 Sûreté et efficacité du traitement EPIT
(adapté de E. H. Kim & Burks, 2020)

Auteurs (années)	Modalité	Allergène	Nombre (taux actif)	Sujets avec AEs	Sujets avec SAEs	Sujets avec epi	Total des abandons	Abandons dues aux AEs	AE les plus communs
Jones (2016)	EPIT	Cacahuète	80	75	0	0	3	3	Symptômes du site d'application local
Jones (2017)	EPIT	Cacahuète	49	49	10	0	3	2	Symptômes du site d'application local
Sampson (2017)	EPIT	Cacahuète	165	165	5	Indisponible	12	3	Symptômes du site d'application local
Fleischer (2019)	EPIT	Cacahuète	238	227	10	22	25	4	Symptômes du site d'application local

Auteurs (années)	Modalité	Allergène	Nombre (taux actif)	Moyenne d'âges	Placebo? (taux ratio)	Dose d'entretien	temps de traitement	Répondeurs	Persistance de la désensibilisation	Commentaires
Jones (2016)	EPIT	Cacahuète	100	22 ans	O (1:1:1:1)	25, 100, 250, 500 µg	2 semaines	n/d	n/d	Etude de phase 1b
Jones (2017)	EPIT	Cacahuète	49	8,2 ans	O (1:1:1)	100, 250 µg	12 mois	11/24, 12/25	n/d	Collaboration CoFAR
Sampson (2017)	EPIT	Cacahuète	165	11 ans	O (1:1:1:1)	50, 100, 250 µg	12 mois	24/53, 23/56, 28/56	n/d	Etude de phase 2b
Fleischer (2019)	EPIT	Cacahuète	238	7 ans	O (2:1)	250 µg	12 mois	84/238	n/d	Etude de phase 3

AE: effet secondaire ("adverse event")

SAE: effet secondaire sévère ("severe adverse event")

N.D.: non disponible

S.U.: persistance de désensibilisation ("sustained unresponsiveness")

moy: moyenne

épi: épinephrine

O: Oui

Au vu de la sûreté et de l'efficacité du traitement, un essai clinique de phase III (PEPITES, Peanut EPIT Efficacy and Safety) a été réalisé et publié en 2019. Il incluait 356 enfants allergiques à l'arachide et fixa comme paramètre de réussite le taux de répondeurs après 12 mois de traitement par EPIT. Un patient étant considéré répondeur lorsqu'il passait d'un seuil de tolérance de <10 mg à 300 mg, ou de 10-300mg à >1000 mg. L'étude a montré un taux de répondeurs au traitement significativement plus élevé (35,3%) comparativement au groupe placebo (13,6%) (Fleischer et al., 2019). Néanmoins, cette différence de 21,7% [95% CI, 12,4%-29,8% ; $p < .001$] entre les deux groupes n'a pas atteint les exigences de l'intervalle de confiance (CI, >15%), déterminé au début de l'étude clinique comme critère de réussite.

A la suite de ces 12 mois de traitement, 141 patients ont poursuivi l'étude pendant deux ans supplémentaires de manière ouverte (levée du « double aveugle ») jusqu'à un TPODACP (étude PEOPLE, « PEPITES Open-Label Extension ») (Fleischer et al., 2020). Au 36^{ème} mois, 51,8% (73 sur 141) ont atteint une dose de réactivité ≥ 1000 mg comparativement à 40,4% (57 de 141) au 12^{ème} mois. 75,9% (107 de 141) ont montré une augmentation de leur dose tolérée comparativement à la période pré-traitement. 13,5% (19 de 141) ont toléré la dose maximale de 5444mg. La médiane de la dose cumulée tolérée augmenta de 144 à 944mg. 18 patients ont réalisé un test de persistance de la désensibilisation : au 38^{ème} mois, après 2 mois sans traitement, 77,8% (14 sur 18) ont maintenu une dose de réactivité ≥ 1000 mg. Les réactions cutanées au niveau de la peau patchée était fréquentes mais diminuaient au fur et à mesure du traitement. Aucun épisode nécessitant l'usage d'épinéphrine n'a été observé pendant l'extension de l'étude clinique (du 12^{ème} au 36^{ème} mois). L'observance du traitement a été de 96,9% et les abandons dues aux effets secondaires égales à 1%.

En parallèle de ces études cliniques, de nombreux mécanismes immunitaires de l'EPIT utilisant la technologie Viaskin® ont été documentés dans différents modèles murins d'allergie (Mondoulet et al., 2009; Mondoulet et al., 2012a; Mondoulet et al., 2012b). Les résultats de ces publications sont décrits dans le chapitre « 2.3 Mécanismes de l'ITA » et permettent d'apprécier les mécanismes possibles sous-jacents à l'efficacité clinique chez l'Homme.

2.2.5 Comparaison des différentes voies de désensibilisation

Au vu des résultats des études cliniques réalisées avec OIT ou SLIT ou EPIT, il apparaît que chaque traitement présente des avantages et des limites qu'il est possible de synthétiser ainsi : l'OIT semble offrir une meilleure efficacité de désensibilisation mais induit un plus grand nombre d'effets indésirables assez contraignants. L'EPIT a montré une très bonne innocuité avec un faible pourcentage d'effets indésirables qui sont majoritairement restreints à la peau où est appliqué l'allergène. En revanche, l'efficacité de désensibilisation est plus faible que l'OIT. Enfin, la désensibilisation par SLIT semble se situer entre les deux avec une moindre efficacité qu'OIT mais des effets secondaires moins sévères et moins fréquents.

Néanmoins, la variabilité de durée des protocoles, de la dose de maintenance ou utilisé pour le test de provocation limite une comparaison formelle des différentes voies d'administration.

Tableau 12 Comparaison des protocoles d'OIT, SLIT et EPIT pour l'allergie alimentaire (adapté de Dantzer & Wood, 2019)

Voie de l'immunothérapie	Bénéfice	Limites	Commentaires
Orale	La plupart des patients tolérant le traitement peuvent être désensibilisés. >60% de désensibilisation Persistance de la désensibilisation validée à 1 mois.	Fort taux d'effets secondaires. Changements immunologiques peuvent être temporaires	Utilisé à l'hôpital pour les allergies au lait, à l'œuf. Désensibilisation avec des gélules d'extrait d'arachide commercialisé depuis janvier 2020 (Palforzia®).
Sublinguale	Bien tolérée. >60% de désensibilisation	Persistance de la désensibilisation à démontrer.	Etudes pour l'arachide, le lait, la noisette, les fruits.
Epicutanée	Très bien tolérée. >30% de désensibilisation Persistance de la désensibilisation validée à 1 mois.	Désensibilisation modérée par rapport à OIT et SLIT	Etudes pour l'œuf, le lait et l'arachide. Patch Viaskin® en cours de développement.

2.3 Mécanismes immunitaires de l'immunothérapie allergénique (ITA)

Comme évoqué précédemment, l'immunothérapie allergénique, est un traitement qui vise à réinduire une tolérance chez le patient (désensibilisation). Cela nécessite donc une modulation de la réponse immunitaire déjà en place chez le patient allergique tant au niveau cellulaire qu'humoral. De nombreux mécanismes prenant place au cours des ITA ont été décrits. Ils peuvent se résumer ainsi :

1. Induction et activation de LT régulateurs,
2. Anergie, délétion ou déviation du profil cytokinique des LT effecteurs,
3. Induction de LB régulateurs,
4. Déviation de la réponse anticorps,
5. Inhibition des mastocytes et basophiles,
6. Inhibition des cellules dendritiques.

La majorité des observations ou démonstrations concernant ces mécanismes immunologiques proviennent d'études cliniques et précliniques utilisant des protocoles de désensibilisation par voie sous-cutanée (SCIT), sublinguale (SLIT) ou orale (OIT), pour le traitement d'allergies respiratoires ou aux venins d'hyménoptères. Il s'agit donc de présenter ici les mécanismes généraux liés à l'efficacité de la désensibilisation, puis de préciser les mécanismes immunitaires communs ou spécifiques au traitement par EPIT de l'allergie alimentaire.

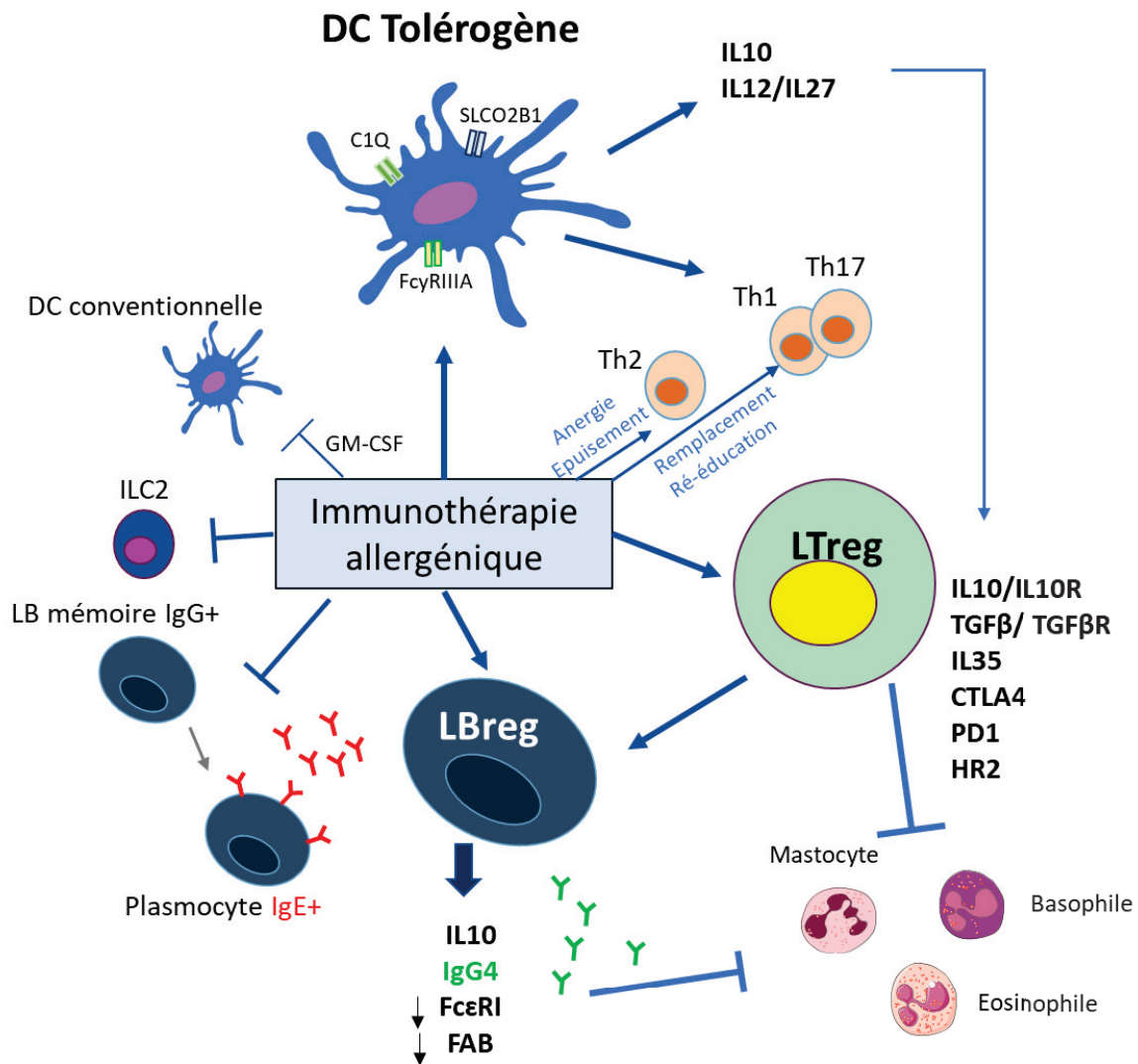


Figure 17 Mécanismes immunitaires associés à l'ITA

L'ITA induit des modulations de la réponse lymphocytaire T et B, ainsi que des compartiments de l'immunité innée (cellules dendritiques, cellules lymphoïdes innées). L'ensemble de ces mécanismes est associé à une hausse des IgG (hausse des IgE à court terme) et une baisse de la réponse Th2 qui concourent à limiter la réactivité cellulaire effectrice des symptômes allergiques (mastocytes, basophiles, éosinophiles).

2.3.1 Lymphocytes T régulateurs

Les LT_{REG} sont les cellules essentielles de l'équilibre entre les réponses immunitaires effectrices et l'homéostasie. Leur absence ou un défaut de leurs fonctions peuvent conduire à des maladies auto-immunes ou l'apparition d'allergies (Grant et al., 2015; Grindebacke et al., 2004; Ling et al., 2004). Un des mécanismes majeurs de la désensibilisation repose sur l'induction et l'activation de LT_{REG} au cours de l'ITA. En effet, de par leurs fonctions inhibitrices multiples, les LT_{REG} vont permettre de limiter la réactivation de l'ensemble des autres cellules immunitaires telles que les LT conventionnels (naïfs ou mémoires), les LB, les DC, les granulocytes ou les mastocytes, basophiles.

En ce sens, il a été montré qu'une désensibilisation par SCIT de patients allergiques aux acariens induisait l'activation de LT_{REG} (FoxP3+Helios+IL-10+) spécifiques de l'allergène Der p 1 (Boonpiyathad et al., 2019a). Également, après 1 an de traitement par SCIT pour une allergie au pollen, le nombre de LT_{REG} CD25+IL-10+ circulants dans le sang (PBMC) était augmenté (Francis et al., 2003).

En comparant 67 patients allergiques aux acariens (*Der p* et *Der f*) après 1 an de traitement SLIT ou SCIT, une étude montra que les deux traitements augmentaient le nombre de LT_{REG} CD4+CD25+Foxp3+ (Xian et al., 2020).

En outre, l'efficacité d'un traitement par SLIT après 24 mois, chez des patients allergiques aux acariens corrélait avec l'induction de LT_{REG} (FoxP3+CD25+CD127^{low}) capables d'inhiber *in vitro* la prolifération et la production de cytokines par les lymphocytes T spécifiques effecteurs (CD25-CD127^{hi}) via le TGF- β (O'Hehir et al., 2009). Une autre étude révéla que les LT_{REG} induits et détectés dans les cellules du sang (PBMC) au début du traitement SLIT (après 4 semaines) avaient une capacité suppressive dépendante de l'IL-10 (Bohle et al., 2007). De plus, les LT_{REG} induits par SLIT peuvent présenter un phénotype particulier qui renforce leur capacité suppressive, notamment via l'expression du récepteur inhibiteur PD-L1 (Palomares et al., 2018) ou du récepteur du complément CD46 pour certains Tr1 (Tsai et al., 2014). Une immunothérapie contre l'allergie au pollen a également démontré que les LT_{REG} induits pouvaient s'accumuler dans la muqueuse nasale, dont 20% était IL-10+ (Radulovic et al., 2008). Enfin, un traitement SLIT pour la double allergie aux acariens et au pollen de graminées (*Phleum pratense*) démontra une induction de LT_{REG} mémoires (FoxP3+CD25^{hi}CD127^{low}CD45RO+) avec une hypométhylation des sites CpG du locus FoxP3, démontrant la stabilité de leur phénotype régulateur (Swamy et al., 2012).

Concernant l'OIT pour l'allergie à l'arachide, des LT_{REG} Foxp3+ qui présentaient une hypométhylation du locus FoxP3 comparativement aux sujets non traités étaient détectés (Syed et al., 2014).

Dans le cadre d'immunothérapie aux venins d'abeilles, il a également été observé l'induction de LT_{REG} spécifiques de l'allergène (détectés par l'utilisation d'un tétramère HLA-DR 1*1501 couplé à un peptide Ves v 5), producteurs d'IL-10 et partageant un précurseur clonotypique commun avec des LT conventionnels (LT_{CONV}) de type 2

(producteurs d'IL-4). Ceci suggère une conversion de LT_{CONV} en LT_{REG} au cours du traitement, comme déjà observé *in vitro* en présence de TGF- β , acide rétinoïque et rapamycine, ou *ex vivo* au cours d'OIT (Abdel-Gadir et al., 2018; Aslam et al., 2010; Kim et al., 2010).

En résumé, l'immunothérapie allergénique augmente le nombre de LT_{REG} spécifiques dont les fonctions suppressives dépendent en partie du TGF- β et de l'IL-10 (Jutel et al., 2003).

L'IL-10 est une cytokine avec un effet pléiotrope de par l'expression large de son récepteur IL-10R. Sa fixation active la voie JAK1/STAT3 et le facteur de transcription SOCS3 inhibant la voie des MAPK et donc la production de cytokines inflammatoires et/ou la prolifération des cellules cibles (Tableau 13). Ainsi, l'IL-10 permet d'induire l'anergie des lymphocytes T au cours des ITA tout en favorisant en parallèle l'induction de LT_{REG} IL-10⁺ renforçant ainsi son action (Akdis and Blaser, 2001). De plus, il a été montré chez la souris que l'IL-10 peut inhiber la dégranulation mastocytaire (Palaniyandi et al., 2004). A noter que les LT_{REG} peuvent également inhiber l'expression du Fc ϵ RI et la dégranulation du mastocyte par contact cellulaire indépendamment de l'IL-10 et du TGF- β (Gri et al., 2008; Kashyap et al., 2008). Enfin, bien que les propriétés anti-inflammatoires de l'IL-10 soient clairement établies, cette cytokine peut au contraire augmenter la dégranulation mastocytaire aux IgE et participer au développement de l'allergie alimentaire chez la souris (Polukort et al., 2016). Il convient donc d'être prudent et d'évaluer son rôle en fonction du modèle utilisé.

Le TGF- β est également une cytokine à effet pléiotrope qui peut se fixer sur les récepteurs TGF- β RI/II présents sur de nombreuses cellules (**Tableau 13**). La fixation du TGF- β active alors la voie canonique des protéines Smad ou la voie non canonique indépendante des Smad, toutes deux aboutissant à l'expression de différents gènes selon le type cellulaire : Le TGF- β va par exemple augmenter l'expression de FoxP3 et inhiber l'expression de cytokines inflammatoires ou de molécules cytotoxiques par les lymphocytes effecteurs.

Tableau 13 Fonctions de l'IL-10 et du TGF- β
(adapté de M. Akdis & Akdis, 2014)

Type Cellulaire	IL-10	TGF- β
DC immatures	Inhibe de la maturation des DC: réduction de l'expression du CMH-II et des molécules de costimulation Inhibe la présentation antigénique aux LT Inhibe la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires	Favorise le développement des cellules de Langerhans Inhibe la maturation des DC et la présentation antigénique Diminue l'expression des récepteurs Fc ϵ RI à la surface des cellules de Langerhans
Lymphocytes T	Inhibe les lymphocytes T effecteurs spécifiques de l'allergène Bloque les voies de costimulation B7/CD28, ICOS, et CD2	Inhibe la prolifération, différenciation et la fonction des LT _{H1} et LT _{H2} Favorise les LT _{REG} et LT _{H17}
Lymphocytes B et immunoglobulines	Améliore la survie Favorise la production d'IgG en particulier les IgG4	Inhibe la prolifération des lymphocytes B Induit l'apoptose des LB immatures ou naïfs Inhibe la plupart des changements de classe des immunoglobulines
IgE	Réprime la production d'IgE spécifiques de l'allergène	Réprime la production d'IgE spécifiques
LT _{REG} CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	Effet indirect sur leur génération	Augmente l'expression de Foxp3 Favorise la génération des LT _{REG} Foxp3 inducibles en périphérie
LT _{r1} (IL-10+)	Favorise l'induction des LT _{REG} IL-10+	Peut favoriser la synthèse d'IL-10
Monocytes /Macrophages	Inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et la présentation antigénique	Inhibe les fonctions effectrices et de phagocytose, incluant la production de cytokines inflammatoires et la présentation antigénique Favorise le chimiotactisme
Eosinophiles	Inhibe la survie et la production de cytokines	Chimio-attractif pour les éosinophiles
Mastocytes	Inhibe l'activation des mastocytes incluant la production de cytokines	Favorise le chimiotactisme Effets variables sur les autres fonctions Pourrait inhiber l'expression des récepteurs Fc ϵ RI
Neutrophiles	Inhibe la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires	Chimio-attractif pour les neutrophiles

Plus récemment, une étude a montré qu'une population de LT_{REG} CD4⁺CD25⁺IL35⁺ était induite chez des patients traités par SLIT comparativement au groupe contrôle. L'IL-35 promouvait la différenciation de LT naïfs en LT_{REG} IL-35⁺, et au contraire inhibait la différenciation des LT naïfs en LT_{CONV} de type 2, ainsi que la production d'IgE spécifiques par les LB (Shamji et al., 2019a).

En plus des cytokines sécrétées, les LT_{REG} peuvent inhiber les cellules de leur environnement grâce à des récepteurs inhibiteurs tels que CTLA-4, LAG-3, PD-1, qui se lient respectivement aux récepteurs CD80/86, CMH-II, PD-L1 présents notamment à la surface des cellules dendritiques. De plus, le récepteur de l'IL-2 (CD25) qui est fortement exprimé sur les nLT_{REG} et les Tr1, permet de séquestrer l'IL-2 de l'environnement et ainsi limiter l'activation et la prolifération des LT_{CONV}. Également, au cours d'une immunothérapie intranasale dans un modèle de rat souffrant d'allergie respiratoire, il a été montré que les LT_{REG} peuvent surexprimer les ectonucléotidases

membranaires CD39 et CD73 produisant de l'adénosine anti-inflammatoire dans le milieu environnant (Moitra et al., 2017).

Le rôle des LT_{REG} dans l'efficacité des ITA est renforcé par des études réalisées dans des modèles murins d'allergie. Le transfert de LT CD4+CD25+ spécifiques de l'ovalbumine dans des souris receveuses allergiques à l'OVA réduit l'hyper-réactivité bronchique, le recrutement d'éosinophiles et l'expression de cytokines de type 2 dans les poumons après un test de provocation. Cet effet était dépendant de l'IL-10 induit (Kearley et al., 2005, 2008). Également, dans un modèle d'allergie à la crevette (allergène rMet e 1), l'ITA a conféré une protection clinique aux souris allergiques, qui était associée à l'induction de LT_{REG} FoxP3+ dans les tissus lymphoïdes du tube digestif (Leung et al., 2017). Le TGF- β est également nécessaire chez la souris pour induire des LT_{REG} et rendre les LT_{REG} CD4+CD25+ immunosuppresseurs (Chen et al., 2003; Huber et al., 2004). Enfin, les LT_{REG} sont nécessaires pour la tolérance orale via l'action du récepteur CTLA-4 qui se lie aux molécules CD80/CD86 exprimés sur les DC (Krempski et al., 2019).

Ainsi, les LT_{REG} activés lors de l'ITA peuvent aussi bien inhiber l'expansion de LT_{CONV}, participer à la baisse d'IgE et l'augmentation d'IgG4 (Meiler et al., 2008), réprimer l'activation mastocytaire ou encore inhiber la maturation des cellules dendritiques (Oderup et al., 2006; Onishi et al., 2008). Tout cela participe à la mise en place d'une réponse tolérogène protectrice.

2.3.2 Lymphocytes T effecteurs: anergie et déviation du profil cytokinique

Chez les sujets allergiques, les LT_{CONV} arborent principalement un profil cytokinique de type 2 (IL-4, IL-5, IL13) qui entretient la pathologie en favorisant la production d'IgE par les LB et l'activation des mastocytes, basophiles lors d'un contact avec l'allergène. Du fait de l'induction de LT_{REG} décrite précédemment, et leur capacité à inhiber ou dévier le profil cytokinique des LT_{CONV}, plusieurs études ont analysé l'impact de l'ITA sur 1) le nombre de LT_{CONV} (délétion par apoptose), 2) l'anergie des LT_{CONV} et 3) la modulation de leur profil cytokinique.

Délétion ou déviation du profil cytokinique

Chez l'homme, une étude de désensibilisation aux graminées par SCIT et SLIT démontra une amélioration clinique qui corrélait avec la baisse du nombre de LT_{CONV} Th2a (CRTH2+CCR4+CD27-CD4+) (Scadding et al., 2017). Également, Wambre et al. ont démontré que lors d'une ITA aux graminées, les LTh2a spécifiques étaient préférentiellement délétées sans affecter la proportion de LTh1/LTr1 (Wambre et al., 2014). Les LTh2a sont une population particulière de Th2 qui se définissent par le phénotype CRTH2+CD161+CD49d+CD27-CD45RB^{low}CCR7^{low}CD7^{low} et sont associés à la réponse allergique (Wambre et al., 2017). De même, après 52 semaines de traitement SLIT contre l'allergie aux acariens, le nombre de LT_{CONV} Th2 (IL5+IL13+CD161+CD27-CD4+ et ST2+CD45RO+CD4+) était significativement diminué (Ihara et al., 2018). D'autres études de désensibilisation par SLIT (allergie à la pomme) ou par injection intradermique de peptides Fel d 1 (allergène majeur du chat) ont également montré une baisse du nombre de LT_{CONV} Th2, et une baisse de l'expression du récepteur CRTH2 à la surface des LT_{CONV}, respectivement (Kitzmüller et al., 2019; Rudulier et al., 2019). A noter que le récepteur CRTH2 est un marqueur des LT_{CONV} Th2 (aussi exprimé sur d'autres cellules), qui permet après interaction avec la prostaglandine PDG2 de l'environnement, de stimuler la production de cytokines de type 2 (Singh et al., 2017).

De manière intéressante, une désensibilisation au lait par OIT a montré après 3 mois que les LT CD4+ avaient dévié leur production d'IL-4 vers une production d'IFN- γ (Bedoret et al., 2012). Déjà auparavant, il avait été observé une augmentation des cellules T productrices d'IFN- γ , en réponse à des stimulations allergéniques réalisées chez des sujets souffrant de rhinites allergiques traités par ITA. Également, Secrist et al. ont démontré que la stimulation *ex vivo* spécifique des LT du sang induisait la production d'IL-4 chez des patients non traités et d'IFN- γ chez des patients désensibilisés aux acariens ou aux graminées (Durham et al., 1996; Secrist et al., 1993). Une étude OIT pour l'allergie à l'arachide a aussi démontré l'augmentation de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (Jones et al., 2009). Enfin, après 6 mois de traitement SLIT, les PBMC produisaient plus d'IFN- γ et d'IL-10 en réponse à l'allergène Derp-1, comparativement à la période pré-traitement (Cosmi et al., 2006). Cette déviation immunitaire des LT a également été observé après désensibilisation aux venins d'hyménoptères (Bellinghausen et al., 1997; Schuerwegh et al., 2001).

L'ensemble de ces études ne permettent pas d'établir formellement la proportion de clones Th2 qui ont été éliminés et remplacés par des nouveaux clones (hypothèse du remplacement), par rapport à des clones qui sont devenus anergiques ou ont changé leur programme transcriptomique (hypothèse de l'éducation) au cours de l'ITA. Néanmoins, une étude préliminaire tirant avantage du séquençage des TCR $\alpha\beta$ au cours de l'OIT suggère que les deux phénomènes de délétion et d'éducation prennent place, avec un léger avantage pour l'hypothèse du remplacement (délétion), bien que la significativité ne soit pas atteinte en raison du faible nombre de patients (Bégin and Nadeau, 2015).

Anergie et épuisement (« exhaustion »)

L'anergie se définit par une non-réactivité et l'absence d'activation d'une cellule malgré un stimulus. L'épuisement (« exhaustion ») se caractérise par l'activation de la cellule et l'acquisition d'un phénotype effecteur suivi par la mise en place d'un phénotype particulier limitant toute nouvelle activation, on parle alors de cellules épuisées. Chez des patients allergiques à l'arachide traités avec succès par OIT, une étude a montré l'apparition d'une population de LT_{CONV} Th2 spécifiques anergiques, caractérisés par la baisse de CD69/CD38/CD28/CD45RA, comparativement aux patients avant traitement ou aux patients sains (Ryan et al., 2016). De la même manière, un traitement OIT contre l'arachide a montré l'apparition de LT CD4⁺ spécifiques anergiques uniquement chez les sujets répondeurs (Wang et al., 2020b).

- LTh2A (CRTH2+CD45RO+)
- LTfh2 (CXCR5+IL-13+)

- nLTreg (FoxP3+CD25+)
- iLTr1 (FoxP3-CD25-IL-10+)
- iLTh3 (FoxP3-CD25-LAP+)
- LTfr (CXCR5+FoxP3+CD25+IL10+)
- LTh1 (IFN- γ)

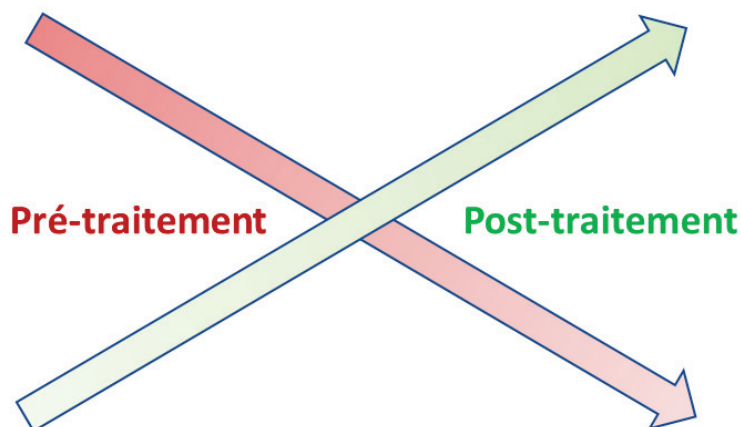


Figure 18 : Modulation des lymphocytes T au cours de l'ITA
(adapté de Komlósi et al. 2020)

2.3.3 Lymphocytes T folliculaires régulateurs (LT_{FR})

Les lymphocytes T folliculaires régulateurs (LT_{FR}) CD4⁺ Foxp3⁺ Bcl-6⁺ ont été découverts assez récemment. Ils sont capables d'inhiber les LT folliculaires helpers (LT_{FH}) qui contribuent classiquement à l'activation des LB et à la production d'anticorps (Chung et al., 2011; Linterman et al., 2011). Une étude récente a montré que le nombre de LT_{FR} circulants, et leur capacité suppressive étaient augmentés au cours d'une désensibilisation par SCIT chez des patients allergiques aux acariens souffrant de rhinite allergique (Yao et al., 2019). Cependant, les LT_{FR} peuvent également participer à la réponse IgE et la mise en place de l'allergie, via la production d'IL-10 ou d'IL-13 (Gowthaman et al., 2019; Xie et al., 2020). Ainsi, l'impact de l'ITA sur les LT_{FR} et leur rôle exact pour la désensibilisation restent à explorer précisément (Schulten et al., 2018).

2.3.4 Lymphocytes B régulateurs (LB_{REG})

Les LB au-delà de leur capacité à produire des anticorps peuvent également sécréter des cytokines pro- ou anti-inflammatoires qui vont moduler la réponse immunitaire et notamment les LT_{CONV} environnants. On parle alors de LB régulateurs (LB_{REG}) dans le cas où ces LB participent à une réponse tolérogène : production d'IgG4 bénéfiques au cours des ITA, production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β , IL-35). Il existe de nombreuses sous-populations de LB_{REG} mais ils peuvent se classer en 3

grands groupes : les cellules B1a-like (CD5+) chez la souris, et les cellules B10 (CD27+CD24^{hi}) et BR1 (CD25+CD71+) chez l'homme. Les cellules BR1 IL10+ humaines en particulier correspondent aux LB producteurs d'IgG4 après différenciation en plasmocytes (Van De Veen et al., 2013).

Dans un modèle murin d'allergie alimentaire, les LB_{REG} ont montré leur capacité à induire des LT_{REG} via la production de TGF- β et ainsi diminuer la réponse LTh2 et protéger des symptômes allergiques (Liu et al., 2013b). Également, il a été montré que les LB pouvaient produire de l'IL-10 nécessaire pour l'induction de LT_{REG} FoxP3+ et la prévention ou diminution de l'allergie à l'ovalbumine (Amu et al., 2010).

Chez l'homme, au cours de l'ITA, plusieurs études ont rapporté l'induction de B_{REG} spécifiques producteurs d'IL-10 et/ou d'IgG4 (Boonpiyathad et al., 2017, 2019b; Van De Veen et al., 2013) alors que leur nombre est réduit chez les sujets allergiques (Kim et al., 2016a).

2.3.5 Déviation isotypique des anticorps (IgE / IgG)

Les protocoles d'ITA sont associés à une modulation des taux sériques d'IgE et d'IgG spécifiques de l'allergène au cours du traitement. En général, les IgE spécifiques augmentent pendant les premiers mois du traitement puis diminuent à long terme vers un niveau équivalent ou inférieur au taux initial (Blumberga et al., 2011; Scadding et al., 2017; Vickery et al., 2014). En parallèle, les taux sériques d'IgG1 et IgG4 humains (IgG1 et IgG2a chez la souris) spécifiques augmentent fortement et participent à l'induction de tolérance (Clinton et al., 1989; Cooke et al., 1935; Djurup et al., 1985; Freidl et al., 2017; Hoffmann, 2016; Möbs et al., 2012; Orgel et al., 2018; Santos et al., 2015; Shamji et al., 2019b). En effet, ils sont capables de se fixer sur les récepteurs inhibiteurs aux Fc γ (Fc γ RIIa/IIb) des mastocytes ou basophiles afin de limiter la réactivation IgE-Fc ϵ RI dépendante, mais également de capter directement l'allergène libre avant que celui ne se fixe sur les IgE (Cady et al., 2010; Kolfshoten et al., 2007; Mothes et al., 2003; Zha et al., 2018). Un troisième mécanisme protecteur semble aussi conféré par les IgG : la fixation d'IgG spécifiques sur des mastocytes *in vitro* conduit à l'internalisation des IgE de surface et à une moindre réactivité de ces cellules (Uermösi et al., 2014). L'étude de Burton *et al.*, a démontré chez la souris que le transfert d'IgG spécifiques au début de l'OIT prévenait l'élévation des IgE, de la réponse Th2 et de l'anaphylaxie. (Burton et al., 2014). La co-administration d'IgG au

cours de l'OIT favorisait la mise en place de la tolérance et l'inhibition de la fonction des mastocytes via sa fixation sur le FcγRIIb (Burton et al., 2018a). Chez des patients allergiques aux protéines de chat, une administration unique d'IgG spécifiques bloquantes a réduit les symptômes allergiques après un test de provocation nasal (Orengo et al., 2018). Les IgG induits par l'ITA peuvent également limiter la fixation de l'allergène sur les complexes IgE-CD23 à la surface des LB, évitant ainsi la présentation antigénique facilitée (FAP) de l'allergène aux LT (Wachholz et al., 2003).

De plus, la capacité fonctionnelle des IgG4 à inhiber la fixation des IgE sur le récepteur CD23 (quantifié par test de compétition *in vitro* « IgE-FAB ») corrèle avec l'amélioration des symptômes induits par l'ITA, contrairement au seul taux d'IgG4 spécifiques qui n'est pas un bon paramètre pour prédire l'amélioration clinique (Huber et al., 2018; Shamji et al., 2012). Ce test d'inhibition pourrait ainsi être développé comme potentiel biomarqueur.

Outre les IgG4, une augmentation des IgG1, IgG2 spécifiques ont également pu être observés au cours de l'ITA et leur contribution exacte reste à déterminer (Freiberger et al., 2016). A noter que le répertoire des IgG1 et IgG4 spécifiques après l'ITA est différent et plus varié que celui des IgE. Les IgG peuvent ainsi théoriquement cibler plus d'épitopes sur les allergènes et empêcher la seule fixation des IgE sur un allergène donné (Gepp et al., 2016; Subbarayal et al., 2015).

Le rôle des complexes immuns circulants (IgE-Ag et IgG-Ag) formés au cours de l'ITA reste à explorer mais pourrait influencer la réponse immunitaire via la fixation au CD23 des LB (Eckl-Dorna et al., 2019; Meulenbroek et al., 2013), ou moduler la prise en charge de l'allergène par les DC (Rogala et al., 1992, 2004; Schuurhuis et al., 2002).

Enfin, des études récentes ont mis en évidence l'importance du niveau de sialylation des IgE et IgG pour la réaction allergique. La sialylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'un acide sialique sur un résidu glycane. Les IgE spécifiques sialylés induisent une plus forte dégranulation des mastocytes et basophiles humains *in vitro* et sont retrouvés préférentiellement chez les patients allergiques, comparativement aux patients sains (Shade et al., 2020, 2015). De plus, contrairement aux IgG faiblement ou non sialylés, il a été montré chez la souris que la fixation d'IgG spécifiques sialylés sur les récepteurs inhibiteurs FcγRIIb augmentait en retour l'expression de ce récepteur et inhibait plus efficacement les cellules cibles, tels

que les LB, mastocytes et basophiles, régulant ainsi les réactions allergiques (Hess et al., 2013; Oefner et al., 2012; Petry et al., 2020). L'induction d'IgG sialylés a également été observé chez l'homme après un traitement par SLIT ou SCIT (Caillot et al., 2017; Oefner et al., 2012).

2.3.6 Désactivation des mastocytes, basophiles

La désactivation des mastocytes et basophiles (qui se traduit par une moindre expression des récepteurs CD63 ou CD203c après activation) est un évènement précoce observé en quelques jours lors des traitements par SCIT pour l'allergie au venin d'hyménoptères, avant même un changement des taux ou de la nature des IgE/IgG circulantes (Caruso et al., 2018; Eberlein-Konig et al., 1995; Nagao et al., 2008). Cette désactivation peut aussi être observée après 3 ans de traitement SLIT ou SCIT pour l'allergie aux pollens et corrèle avec l'efficacité clinique de la désensibilisation (Shamji et al., 2015). Cela a également été constaté dès 3 mois d'OIT pour l'allergie à l'arachide, et cela semble prédire une maintenance de la désensibilisation 1 mois après l'arrêt du traitement (Patil et al., 2019). Une seconde étude d'OIT a aussi montré que la désactivation des basophiles était associée avec l'efficacité de désensibilisation et/ou une maintenance de la désensibilisation (Tsai et al., 2020). Enfin, une troisième étude d'OIT pour l'allergie à l'œuf a montré une désactivation des basophiles après 22 mois chez les patients répondeurs (Burks et al., 2012). Néanmoins, il est à noter que la désactivation des basophiles ne corrèle pas toujours avec l'efficacité de la désensibilisation ou avec la persistance de la désensibilisation (Burks et al., 2012; Kim et al., 2018a).

Outre les changements opérants sur les immunoglobulines qui peuvent impacter fortement la réactivité des mastocytes et basophiles, la désactivation de ces cellules effectrices pourrait être dû à une plus forte expression des récepteurs inhibiteurs Fc γ RII comme observé pour les basophiles après 1 an d'ITA (Lundberg et al. 2016a; Lundberg et al. 2016b). De plus, l'augmentation rapide du récepteur de type 2 de l'histamine (H2R) sur les basophiles réduit leur activation par la voie Fc ϵ RI et peut contribuer à leur désactivation précoce observée (Novak et al., 2012). Chez des patients souffrant de rhinite allergique, l'ITA peut également réduire l'infiltration d'éosinophiles et de mastocytes dans la muqueuse nasale (Nouri-Aria et al., 2005). De manière très intéressante, la baisse de production d'histamine et de leukotriènes

après l'ITA est en partie due à l'IL-10 et l'IFN- γ produits par les LT (Kobayashi et al., 2019; Pierkes et al., 1999).

2.3.7 Cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont des cellules immunitaires décrites assez récemment. Contrairement aux lymphocytes T et B, elles n'expriment pas de récepteurs antigéniques issus de réarrangement génique (TCR, BCR). Néanmoins, elles possèdent un ensemble de récepteurs « innés » capables de reconnaître des pathogènes. Une fois activées, les ILC pourront participer à la réponse inflammatoire via des fonctions cytotoxiques et/ou la production de cytokines. Les profils transcriptomique et cytokinique des ILC ressemblent à ceux des LT, et sont ainsi utilisés pour classer les ILC en 3 sous-populations :

- ILC1 : cellules T-bet⁺ ; produisant des cytokines de type 1 ; avec une ontogénie similaire aux cellules tueuses naturelles (« natural killer (NK) cells »)
- ILC2 : cellules GATA3⁺ ; produisant des cytokines de type 2,
- ILC3 : cellules ROR γ t⁺ ; produisant des cytokines de type 17 et 22.

Les ILC2 qui ont un profil similaire aux LTh2 ont été associées au développement et au maintien de l'allergie (Lombardi et al., 2016).

Au cours de l'ITA, le nombre d'ILC2 (Lin-CD127⁺CRTH2⁺) dans le sang périphérique était significativement diminué en comparaison du groupe non traité chez des patients souffrant de rhinite allergique (Fan et al., 2016). Chez les patients traités, le nombre d'ILC2 était alors similaire aux sujets sains. De la même manière, un traitement par SCIT durant la saison des pollens diminuait le nombre d'ILC2 circulants comparativement aux patients allergiques non traités (Lao-Araya et al., 2014). En outre, chez des patients souffrant de rhinite allergique aux acariens, une troisième étude a montré que l'ITA diminuait la fréquence d'ILC2 et d'ILC3 circulants, mais augmentait la fréquence d'ILC1 chez les patients répondeurs (Mitthamsiri et al., 2018).

Enfin, une population d'ILC IL-10⁺ régulateurs (ILC_{REG}) peuvent être induits à partir des ILC2 grâce à l'acide rétinoïque (Morita et al., 2019). Les ILC_{REG} diminuent leur expression de CRTH2 et de ST2 (marqueurs des ILC2) mais augmentent l'expression du CD25 et CTLA-4. Leur participation à la désensibilisation reste à évaluer.

2.3.8 Impact sur les monocytes, macrophages et cellules dendritiques

L'ITA peut également moduler les cellules de l'immunité innée que sont les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques.

Monocytes

Les monocytes sont des cellules mononuclées du sang d'origine hématopoïétique. Elles se caractérisent par l'expression du récepteur CD14 et se répartissent en deux catégories : les monocytes classiques (CD16+) et non-classiques (CD16-). La particularité des monocytes réside dans leur capacité à infiltrer un tissu inflammatoire et se différencier en macrophages ou cellules dendritiques (appelées moDC). Cette différenciation est aussi possible à l'homéostasie en plus faible proportion afin de régénérer les cellules dendritiques et macrophages d'un tissu (Geissmann et al., 2010).

Chez des patients allergiques aux acariens traités par SCIT, il a été observé une augmentation de la fréquence des monocytes et des cellules dendritiques myéloïdes producteurs de $\text{TNF}\alpha$, dans le sang. En parallèle, le nombre de cellules dendritiques plasmacytoïdes diminuait tout en exprimant plus d' $\text{IFN-}\alpha$ par cellule. A noter que les IgE fixées à la surface de ces trois types cellulaires augmentaient au cours du traitement (Sousa et al., 2018). Une autre étude a montré que les monocytes produisaient plus d'IL-12, 15 jours après le début d'une désensibilisation au venin d'hyménoptères. Cette cytokine pro-Th1 peut être responsable de la déviation cytokinique des LT observée chez les patients traités, ou au contraire résultée de l' $\text{IFN-}\gamma$ produit par les LTh1 induits par le traitement (Magnan et al., 2001). Les monocytes CD14+ issus du sang sont également plus matures après 3 mois d'ITA comme révélé par une expression accrue de CD86 et leur capacité à produire de l'IL-10 *in vitro* (Hirata et al., 2003).

Macrophages

Les macrophages sont des phagocytes qui peuvent capter tout antigène ou allergène présent dans leur milieu. Ils sont présents dans différents tissus, notamment les muqueuses intestinales, orales, nasales et la peau. Chez la souris, au cours du traitement par SLIT, une population ressemblant aux macrophages (CD11c-CD11b+)

et possédant des propriétés tolérogènes (expression des récepteurs au mannose CD206 et de l'enzyme rétinaldéhyde déshydrogénase 2) participent à l'induction de LT_{REG} (Mascarell et al., 2011). De plus, ils produisent de l'IL-12 lors d'un nouveau contact *in vivo* avec l'allergène (Hamid et al., 1997).

Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigène par excellence qui définissent le profil cytokinique et l'amplitude des réponses adaptatives. Leur phénotype et leur fonction jouent donc un rôle essentiel dans la réorientation de la réponse immunitaire en place au cours de l'ITA. A ce titre, les signaux de costimulation au moment de la capture d'un antigène (environnement inflammatoire ou tolérogène : ligands de TLR, cytokines) sont déterminants. Chez des patients sains ou traités par ITA contre une allergie aux acariens, les moDC du sang exprimaient plus faiblement le CD86, plus fortement les HLA-DR et TLR4, comparativement aux moDC de patients allergiques. En outre, elles sécrétaient plus d'IL-10 et moins d'IL-12 après stimulation par LPS *in vitro*, (Angelini et al., 2011; Wang and Chuang, 2013). Concernant les DC myéloïdes (mDC) issues de précurseurs hématopoïétiques distincts des monocytes, leur nombre était augmenté au cours d'une ITA au venin d'hyménoptères, tandis que celui des pDC était diminué (Dreschler et al., 2011). En outre, l'expression de marqueurs de costimulation tels que CD86, CD40, TLR2 variaient au cours des 12 mois. L'expression de CD86 était augmentée à 12 mois alors que l'expression de CD40 diminuait dans les heures suivant la première injection (50 heures) avant de revenir au niveau initial après 12 mois. Les récepteurs TLR2 et FcγRII (CD32) diminuaient avec le traitement. Le récepteur TLR2 est connu pour favoriser une réponse Th2, la diminution de son expression pourrait donc limiter l'activation de la réponse Th2 pathogénique par les DC (Re and Strominger, 2001). Chez l'homme, deux études transcriptomiques des cellules dendritiques au cours de l'ITA ont permis de définir certains marqueurs associés à l'efficacité de SLIT (durée de 4 mois) chez 79 et 80 patients allergiques aux pollens, respectivement (Gueguen et al., 2016; Zimmer et al., 2012). En particulier, cinq marqueurs étaient particulièrement augmentés dans les moDC sanguins des patients répondeurs comparativement au groupe placebo : le récepteur du complément C1Q, la stabiline-1 (STAB1), le FcγRIIIa, la chaîne légère de ferritine (FTL), le polypeptide de transport d'anions organiques 2B1

(SLCO2B1). Ces marqueurs étaient associés à un profil de DC régulatrices (DC_{REG}) après différenciation *in vitro* de moDC.

Pour conclure, l'ITA permet de modifier le phénotype et les cytokines produites par les monocytes, macrophages et cellules dendritiques vers un profil tolérogène afin de promouvoir des LT_{REG} ou des LT_{CONV} de type 1.

2.3.9 Mécanismes d'action associés à EPIT

Il y a encore 15 ans, la désensibilisation par EPIT était très peu décrite. Depuis le développement des protocoles EPIT utilisant les patchs Viaskin®, les mécanismes immunitaires associés ont été explorés, en particulier dans des modèles précliniques chez la souris.

Protection clinique

Les premières études précliniques ont démontré l'intérêt et l'efficacité de l'EPIT pour la désensibilisation chez des souris BALB/c sensibilisées à un ensemble d'allergènes tels que l'arachide, l'ovalbumine, les acariens, le pollen (Mondoulet et al., 2009, 2011, 2012c). Le traitement EPIT était comparé en parallèle avec un traitement de référence SCIT ou SLIT. Le traitement EPIT durait 8 semaines et consistait en l'application hebdomadaire d'un patch contenant 100µg d'allergène, pendant 48H, sur une peau intacte (dépilée 24H au préalable). A la fin du traitement, un test de provocation par inhalation de métacholine (dérivé de l'acétylcholine) permettait de révéler l'hyperréactivité bronchique qui était utilisé comme symptôme clinique de l'allergie dans ces modèles. Le traitement EPIT diminuait significativement le score de réactivité comparativement au groupe sensibilisé non traité et était aussi efficace que le traitement de référence SCIT. Également, le recrutement d'éosinophiles dans l'épithélium des bronches était diminué, quelque soit l'approche d'ITA (EPIT, SCIT ou SLIT) comparativement aux groupes contrôles non traités. Ces résultats ont été confirmés et approfondis dans des modèles d'œsophagite à éosinophiles ou d'allergie alimentaire (Dioszeghy et al., 2014; Mondoulet et al., 2012b). Dans ce dernier cas, l'efficacité du traitement était testée suite à un régime alimentaire de 10 jours contenant l'allergène (Dioszeghy et al., 2014).

Réponse anticorps (immunoglobulines)

Dans les modèles murins d'allergie au pollen ou à l'ovalbumine, les taux d'anticorps IgE spécifiques sériques augmentaient lors d'un traitement par EPIT (Mondoulet et al., 2012c; Tordesillas et al., 2016) mais diminuaient lors des traitements par EPIT des allergies à l'arachide (Mondoulet et al., 2019). Dans tous les cas, les IgG1 et IgG2a circulants, ainsi que le ratio IgG2a/IgE augmentent avec le traitement. Ceci corrèle avec les observations faites chez l'homme où le ratio IgG4/IgE augmentait avec le traitement (Fleischer et al., 2019; Sampson et al., 2017) malgré une induction initiale d'IgE spécifique. Néanmoins, la sensibilisation passive de souris naïves par transfert de sérum provenant de souris allergiques ou traitées par EPIT, induisait le même niveau d'anaphylaxie après un test de provocation oral. En outre, un test *in vitro* d'activation des basophiles avec du sérum EPIT stimulait autant les basophiles que du sérum allergique (Tordesillas et al., 2016). Ceci démontre que les IgG induits par EPIT ne sont pas suffisantes, ou doivent opérer sur une période relativement longue, pour conférer la protection clinique. La nature des IgE et IgG (niveau de sialylation, avidité) au cours d'EPIT reste également inconnue à ce jour.

Réponse cytokinique

La déviation de la réponse des lymphocytes T est un phénomène largement observé au cours des désensibilisations décrites précédemment. La réponse cytokinique a donc été mesurée après réactivation spécifique *in vitro* de splénocytes et démontrait une chute des cytokines de type-2 (IL-4, IL-5, IL-13) uniquement dans les groupes traités. La chute des cytokines de type 2 était également observable localement au niveau des tissus bronchiques 48h après le test de provocation (Mondoulet et al., 2012c). En outre, il était aussi observé une baisse de la réponse IFN- γ et IL-10, contrairement aux observations faites dans les modèles SCIT, SLIT, OIT. Les mécanismes impliqués, à savoir, l'anergie, la délétion clonale ou la plasticité cytokinique des LT restent à explorer. En revanche la production de TGF- β semblait augmenter (Mondoulet et al., 2012c). Le TGF- β était nécessaire pour la désensibilisation induite par EPIT et pour protéger contre l'anaphylaxie suite à un test de provocation oral (Tordesillas et al., 2016).

Lymphocytes T régulateurs

En parallèle du remodelage cytokinique, le traitement par EPIT induit des LT_{REG} CD25+FoxP3+ ou LAP+ et/ou producteurs d'IL-10 (Dioszeghy et al., 2016). Les LT_{REG}

CD25⁺FoxP3⁺ après EPIT, OIT, SLIT, expriment plus fortement le récepteur CTLA-4 comparativement au groupe contrôle non traité. Parmi les LT_{REG} FoxP3⁺, c'est à la fois la proportion des LT_{REG} effecteurs (CD44^{hi}CD62L⁻) et naïfs (CD44^{lo}CD62L⁺) qui est augmentée par EPIT. Des expériences utilisant des anticorps bloquants *in vitro* ont montré que CTLA-4, contrairement à l'IL-10, semble nécessaire pour la diminution de la réponse Th2 induite par EPIT (Dioszeghy et al., 2016). De plus, en comparaison des souris traitées par OIT, SLIT ou non traitées, les LT_{REG} (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) après EPIT peuvent surexprimer un large panel de récepteurs de chimiokines permettant une localisation dans tous les tissus comparativement aux LT_{REG} de souris allergiques: augmentation de CCR4 (cœur, poumons), CCR6 (intestin et peau), CXCR3 (peau), CCR3 (cœur, poumons), CCR8 (peau), CLA (peau), CCR9 (intestin). Les LTr1 et LT_{REG} FoxP3⁺ induits par EPIT persistaient 8 semaines après arrêt du traitement, contrairement à l'OIT et SLIT (Dioszeghy et al., 2016). Des expériences de transfert adoptif ont montré que la capacité suppressive des LT_{REG} après EPIT (inhibition de cytokines IL5/13/10/IFN- γ produites par les LT_{CONV} ou inhibition du recrutement d'éosinophiles) était conservé jusqu'à 8 semaines après arrêt du traitement, contrairement aux souris non traitées, OIT et SLIT. Enfin, les LT_{REG} s'avèrent nécessaires pour l'efficacité d'EPIT puisque la déplétion par anticorps anti-CD25 bloque l'amélioration clinique et immunologique conféré par EPIT. Inversement, le transfert de LT CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺LAP⁺ dans des souris allergiques prévient l'apparition de symptômes, respectivement, lors d'un régime contenant l'allergène ou un test de provocation oral (Dioszeghy et al., 2014; Tordesillas et al., 2016).

Protection non-spécifique et persistance de la désensibilisation

Une étude a également montré que la désensibilisation par EPIT de souris BALB/c allergiques au lait, protégeait d'une future sensibilisation à l'arachide ou aux acariens (Mondoulet et al., 2015). Comme présenté précédemment, l'EPIT augmentait les IgG1, IgG2a spécifiques au détriment des IgE, induisait des LT_{REG} et diminuait la réponse cytokinique (IL4/5/13/10/IFN- γ) des splénocytes réactivés *in vitro*. De plus, le transfert des LT_{REG} (après EPIT au lait) dans des souris naïves suffisait à protéger d'une néo-sensibilisation à un autre allergène comme démontré par la réduction de l'anaphylaxie (chute de température) lors d'un test de provocation à l'arachide par voie intraveineuse (faisant suite à la phase de sensibilisation). Une augmentation de la méthylation du promoteur de GATA-3 (facteur de transcription de la réponse cytokinique de type-2)

dans les splénocytes après EPIT était observée. Cette méthylation était maintenue après la seconde phase de sensibilisation (au nouvel allergène). Ces résultats suggèrent que l’empreinte épigénétique des splénocytes (dont les LT_{REG}) confère une protection à moyen/long terme contre le développement d’une réponse allergique de type 2. Effectivement, une étude plus récente a démontré que l’hyperméthylation de Gata3 et l’hypométhylation de FoxP3 était associée à une protection maintenue dans le temps et à une protection non-spécifique de l’allergène (« by-stander ») chez des souris allergiques à l’arachide (Mondoulet et al., 2019). L’hyperméthylation de Gata3 se retrouvait dans les LT CD4⁺ Th2 (IL-4⁺) après tri cellulaire. L’hypométhylation de FoxP3 et le pouvoir immunosuppresseur était détenu par les LT_{REG} CD25⁺CD62L⁺ qui sont décrits comme des LT_{REG} avec de très fortes capacités immunosuppressives (Ermann et al., 2005; Fu et al., 2004; Lange et al., 2011). Cette persistance de désensibilisation induite par EPIT s’observe également cliniquement par une moindre anaphylaxie lors d’un test de provocation orale, contrairement à l’OIT (Tordesillas et al., 2016). Il est à noter que l’effet de protection non-spécifique a aussi été observé dans un modèle d’inflammation intestinale où des LT_{REG} (FoxP3⁺ ou LAP⁺) induits par EPIT protégeait contre une inflammation stérile via notamment le TGF- β (Dunkin et al., 2017).

Préparation de la peau et cellules dendritiques cutanées

La protection clinique et l’ensemble des mécanismes immunitaires décrits ci-dessus dépendent de deux facteurs en amont : l’homéostasie de la peau où le patch est apposé, ainsi que les cellules dendritiques cutanées qui capturent l’allergène pour le présenter au système immunitaire.

En effet, une étude a montré que l’efficacité d’EPIT était dépendante d’une peau intacte. La rupture de la barrière cutanée par tape-stripping prévenait la désensibilisation et renforçait la réponse IgE spécifique, la réponse cytokinique de type 2 (IL-4/-5/-13), empêchait la hausse du pourcentage de LT_{REG} FoxP3⁺, et augmentait le relargage d’histamine après un test de provocation oral, comparativement au groupe traité par EPIT sur une peau intacte (Mondoulet et al., 2012a). A noter qu’avec une peau intacte, l’arachide du patch était indétectable par ELISA dans le sang.

L’étude de Dioszeghy et al. de 2011 a montré que 6H après l’application d’un patch contenant de l’ovalbumine fluorescente, les cellules dendritiques de l’épiderme et du

derme étaient capables de prendre en charge l'allergène et de migrer dans les ganglions lymphatiques drainants. Le pic de migration était observé à 24-48H. De manière intéressante, la prise en charge de l'allergène par les DC et leur migration étaient significativement plus élevées chez des souris allergiques comparativement à des souris naïves. Cela suggère que l'immunité déjà en place (anticorps, cytokines, LT_{EFF/MEM}, LT_{REG}) pourraient influencer sur le comportement des DC comme cela a déjà été démontré dans d'autres modèles de pathologies inflammatoires comme la dermatite atopique (Guttman-Yassky et al., 2019).

Une étude plus récente a montré qu'après l'application d'un patch chez une souris naïve, la prise en charge de l'allergène par les cellules dendritiques dermiques se faisaient essentiellement au niveau des follicules pileux (Tordesillas et al., 2018). Les cDC2 CD11b⁺ PDL2⁺ en particulier étaient nécessaires pour la présentation antigénique aux LT CD4⁺ et l'activation de LT_{REG} LAP⁺. Néanmoins, ces mécanismes peuvent être différents dans un modèle allergique et évoluer avec l'application répétée de l'allergène.

Afin de mieux comprendre le rôle potentiel des DC cutanées au cours d'EPIT, il convient de présenter l'état de l'art sur celles-ci en termes d'ontogénie, de phénotype et fonctions.

3 Les cellules dendritiques cutanées : interface entre l'allergène et la réponse adaptative

3.1 Généralités sur les DC

Les cellules dendritiques ont été décrites dans les années 1970 par Ralph Steinman et Zanvil Cohn (Steinman and Cohn, 1973; Steinman et al., 1974). Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles de l'organisme. Elles patrouillent dans les tissus périphériques et le sang et sondent en permanence les antigènes de leur environnement. Elles peuvent induire une réponse adaptative effectrice en cas de détection d'un antigène pathogénique ou d'un allergène associé à des signaux de danger (Willart and Hammad, 2010). La nature de l'antigène et l'environnement de la DC lors de la prise en charge de l'antigène sont déterminants pour son activation et la réponse immunitaire induite. En effet, les DC possèdent un

ensemble de récepteurs qui permettent la détection de motifs exprimés par les pathogènes microbiens (appelés « pathogen-associated molecular patterns » ou PAMP), ou qui sont libérés suite à un stress ou à la destruction de cellules saines de l'organisme (appelés « damage-associated molecular patterns » ou DAMP) (Tableau 14). De ce fait, un allergène tel que Der p 2 qui possède une structure analogue au LPS bactérien peut activer directement les DC via leur récepteur TLR-4 (Hammad et al., 2009). Aussi, les récepteurs CD206 ou CD209 à la surface des DC servent à internaliser les allergènes de cacahuète et induire une réponse adaptative de type 2 (Cabanillas et al., 2018; Royer et al., 2010; Shreffler et al., 2006). De la même manière, l'environnement inflammatoire participe à l'activation des DC (Renz et al., 2018). Les kératinocytes peuvent par exemple sécréter de l'IL-33 ou de la TSLP en réponse à un stress, ce qui permet en cascade l'expression du récepteur OX40L sur les DC cutanées. La capture d'un antigène et l'engagement des PAMP/DAMP induit la maturation (forte expression membranaire du CMH-II, et des récepteurs CD80/86, CCR7), et la migration des DC vers les ganglions lymphatiques où elles vont (ré)-activer des LT spécifiques naïfs ou mémoires vers un profil de type Th1, Th2, Th17, T_{REG}... (Ebner et al., 2007; Guttman-Yassky et al., 2007, 2019; Ito et al., 2005; Murakami-Satsutani et al., 2014; Soumelis et al., 2002; Wang et al., 2006; Watanabe et al., 2005).

Tableau 14 : Récepteurs de danger exprimés par les DC.
Adapté de (Willart and Hammad, 2010)

Récepteurs et motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP)	
Famille de récepteurs	Exemples
Récepteurs Toll-like (TLR-1 à 10)	TLR-1 à 10
Récepteurs intracellulaires	Récepteurs NOD-like, TLR-3, 7, 9
Récepteurs lectines de type C (CLR)	Dectin-1, -2, DEC205, BDCA-2, récepteur au mannose
Récepteurs RIG-I-like	MDA5, LGP
Récepteurs activés par les protéases	PAR 1-3
Récepteurs et motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMP)	
Récepteurs du complément	hCR1, hCR2, hCR3, mC3aR, mC5aR
Récepteurs des prostaglandines	DP1, EP2, EP4, IP
Récepteurs des neuropeptides	NK1, CGRPR
Récepteurs purinergiques	P2X, P2Y
Récepteurs de HMGB1	RAGE
Récepteurs des protéines "heat-shock"	CD14, CD36, CD91
Récepteurs de cytokines	TSLP-R, IL-1R, GM-CSF-R, IL-33R, IL-25R

Les DC assurent également une tolérance immunitaire permanente vis-à-vis des antigènes du soi ou des antigènes exogènes inoffensifs. A l'homéostasie, les DC sont immatures. Elles expriment peu de molécules de CMH-II à leur surface (Pierre et al., 1997) et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β , l'IL-37 et/ou l'IL-10 (Guttman-Yassky et al. 2014). Lorsqu'elles captent un antigène environnant en absence de signaux de danger, elles acquièrent un phénotype semi-mature, tolérogène (Albert et al., 2001; Clausen and Kel, 2010). Ceci se traduit par une mobilisation des complexes CMH:peptide depuis les endosomes/lysosomes vers la membrane cellulaire (Chow et al., 2002), et l'expression modérée de molécules de costimulation (CCR7, CD80, CD86) (Hintzen et al., 2006; Ohi et al., 2004). Les DC CCR7+ peuvent alors migrer vers les ganglions lymphatiques drainants et présenter l'antigène sur les molécules du CMH-I ou CMH-II aux LT spécifiques. Dans ces conditions, les DC activent des LT_{REG}, et en parallèle entraînent l'anergie et/ou la délétion des LT spécifiques conventionnels (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001; Hemmi et al., 2001). Ceci permet d'assurer un phénomène de tolérance périphérique.

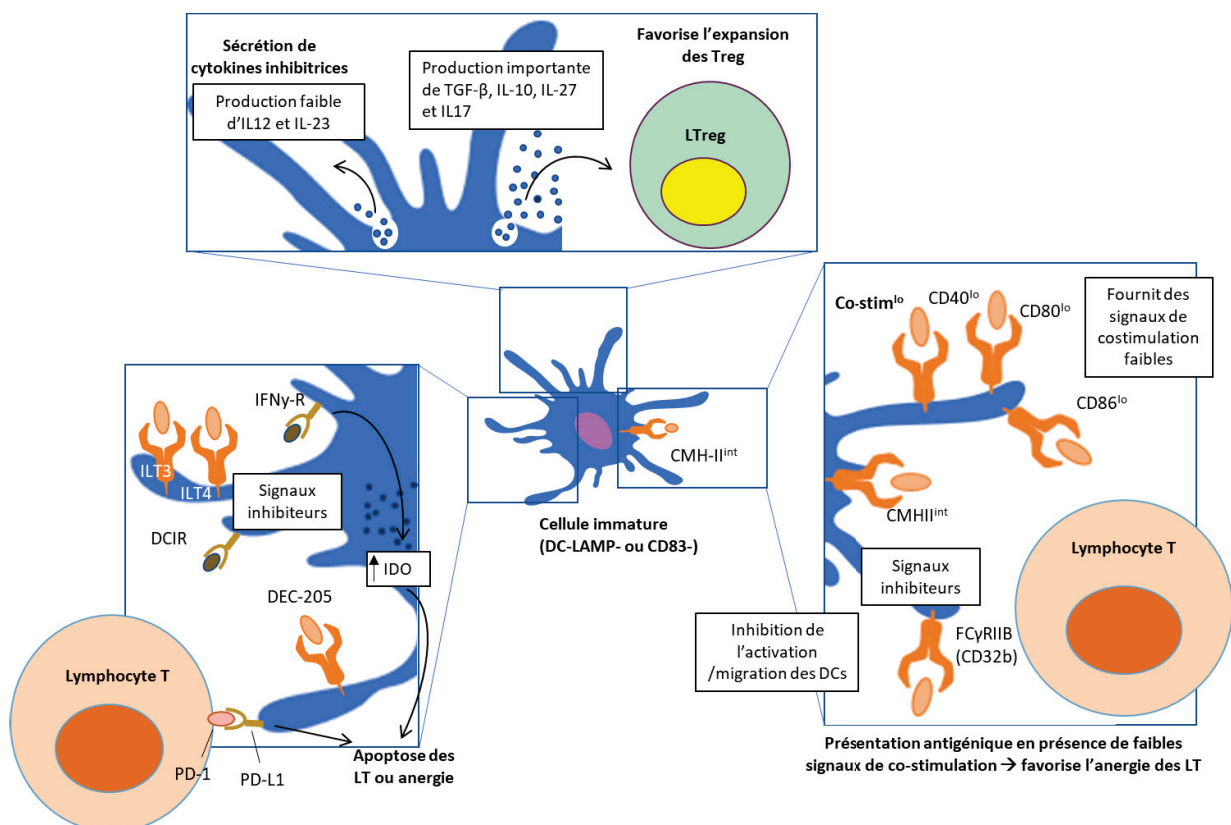


Figure 19 : Profil tolérogène d'une cellule dendritique (adapté de Guttman-Yassky et al., 2019)

Une cellule dendritique tolérogène exprime faiblement les récepteurs de costimulation (CD86, CD40, CD80...) et exprime au contraire fortement des récepteurs inhibiteurs tels que PD-L1 (ligand de PD-1 exprimé par les LT), DCIR (famille des lectines de type C) ou ILT3/ILT4 (capables d'interagir avec le CMH-I). L'ensemble des voies intracellulaires activées conduit au relargage de molécules anti-inflammatoires limitant l'activation de LT effecteurs au profit de LT régulateurs.

3.2 Classification des cellules dendritiques

Depuis une vingtaine d'années, avec l'utilisation de modèles murins transgéniques, de la cytométrie de flux (FACS) ou de masse (CyTOF) et l'essor du séquençage en cellule unique, de nombreuses études ont contribué à résoudre l'hétérogénéité des cellules dendritiques, et à les classer en fonction de leur ontogénie, de leur phénotype, et des fonctions qui leur sont associées (Anderson et al., 2020; Bosteels et al., 2020; Bourdely et al., 2020; Brown et al., 2019; Cytlak et al., 2020; Guermonprez et al., 2019; Guilliams et al., 2014a, 2016; Kashem et al., 2017; Lim et al., 2020; Merad et al., 2013; Moutel et al., 2020; See et al., 2017; Vendelova et al., 2018). Les études des cellules dendritiques réalisées chez l'homme et la souris et dans de nombreux tissus tels que le sang, les ganglions lymphatiques, l'intestin ou la peau ont permis d'avoir un panorama large de l'hétérogénéité des DC. Les principales populations décrites chez la souris ont leur équivalent chez l'homme malgré l'existence de certaines spécificités phénotypiques ou fonctionnelles (Anderson et al., 2020; Guilliams et al., 2014a; Shay et al., 2013).

Dans la peau, trois populations principales de DC résidentes ont été décrites à l'homéostasie :

- Les cellules de Langherans
- Les DC conventionnelles de type 1 (cDC1)
- Les DC conventionnelles de type 2 (cDC2)

Dans certaines conditions inflammatoires ou pathologiques, ces populations peuvent acquérir un phénotype différent, et d'autres DC peuvent également infiltrer le tissu cutané et participer à la réponse immunitaire :

- Les DC dérivées de monocytes (mo-DC)
- Les DC plasmacytoïdes (pDC)

Cette classification repose principalement sur l'ontogénie des cellules, les facteurs de transcription impliqués et les marqueurs phénotypiques de surface.

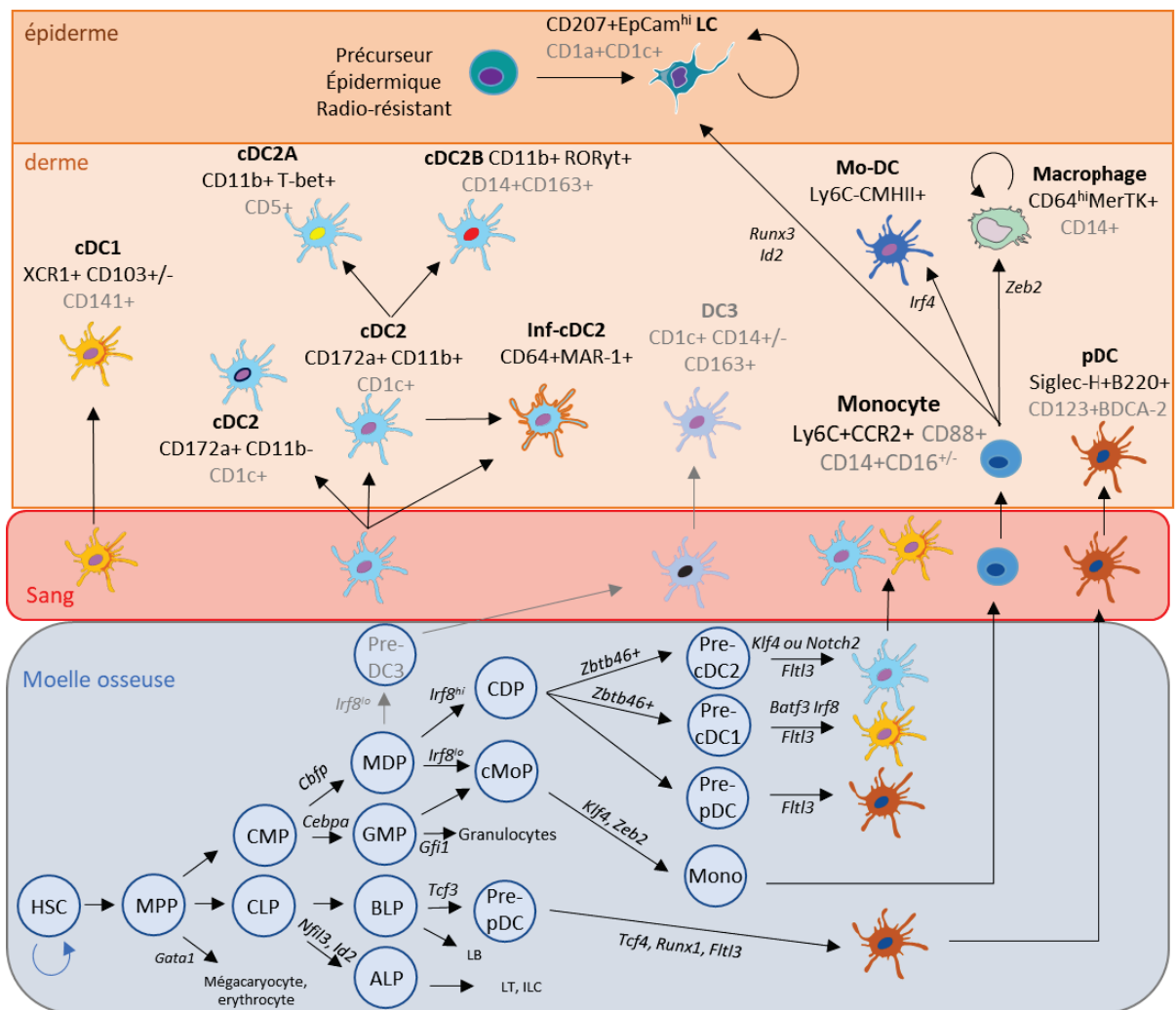


Figure 20 Hétérogénéité des cellules dendritiques cutanées : développement, phénotype et localisation
 Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) de la moelle osseuse ont un faible niveau de prolifération et assurent leur auto-régénération tout au long de la vie de l'organisme. Elles peuvent se différencier en cellules multipotentes hautement proliférantes qui sous l'action de multiples signaux et l'action de différents facteurs de transcription vont se différencier en divers progéniteurs tels que les précurseurs lymphoïdes T (ALP), lymphoïdes B (BLP), granulocyte-macrophage (GMP) ou myéloïde (MDP). Les ALP se différencient en LT et ILC. Les BLP constitueront les LB et la majorité des pré-pDC. Les GMP se différencient en granulocytes (mastocytes, basophiles, ...) et également en progéniteurs de monocytes (cMoP). Les MDP peuvent aussi se différencier en cMoP mais également en précurseur commun des DC (CDP), et uniquement démontré chez l'homme en pré-DC3. Les cMoP se différencient en monocytes qui donneront des mo-DC, macrophage ou LC. Enfin, les CDP se différencient en pré-cDC1, pré-cDC2, pré-pDC, qui donneront respectivement les cDC1, cDC2, et une minorité des pDC circulants. Dans le tissu sous l'influence de signaux les cDC2 peuvent donner des cDC2 inflammatoires ou se spécialiser en cDC2A et cDC2B.

HSC: hematopoietic stem cell; MPP: HSC-derived multipotent progenitor; CLP: Common lymphoid progenitor; CMP: Common myeloid progenitor; MDP: macrophage and DC progenitor; GMP: Granulocyte-macrophage progenitor; ALP: All lymphoid progenitors; BLP: B cell-biased lymphoid progenitor; cMoP: Common monocyte progenitor; CDP: Common DC precursor; Mono: monocyte

Les flèches et marqueurs en gris ou noirs correspondent à l'homme ou la souris, respectivement.

3.2.1 Cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans ont été découvertes en 1868 par Paul Langerhans mais il aura fallu attendre les travaux de Ralph Steinman un siècle plus tard avant de comprendre leur fonction (phagocytose et présentation antigénique) (Langerhans, 1868). Ce sont les seules cellules dendritiques de l'épiderme. Les LC sont présentes

dans les interstices entre les kératinocytes des zones interfoliculaires, mais également au niveau des follicules pileux qui sont des zones d'échange privilégiées avec le microbiote cutané et les antigènes exogènes (Tordesillas et al., 2018). Elles peuvent également étendre leurs dendrites à l'extérieur de l'épiderme à travers le stratum corneum afin de capter des antigènes à la surface de la peau (Kubo et al., 2009; Yoshida et al., 2014).

Phénotype

Les LC se caractérisent chez l'homme et la souris par l'expression du marqueur hématopoïétique CD45 (Ly5), du CMH-II qui permet la présentation antigénique, de la cadhérine E qui interagit avec les kératinocytes ou les LT (Brand et al., 2020; Cepek et al., 1994; Tang et al., 1993), de la molécule d'adhésion EpCAM qui permet de migrer hors de l'épiderme (Ouchi et al., 2016), de l'intégrine CD11b qui participe à la phagocytose (Chen et al., 2008), et de la protéine CD172 α (SIRP α) qui reconnaît le récepteur de surface CD47 et peut ainsi réguler négativement la phagocytose des cellules du soi (Barclay, 2009). Les LC expriment également la langérine, qui est un récepteur lectine de type-C (CLR) permettant la reconnaissance de résidus du mannose (motifs présents sur des pathogènes ou allergènes). L'engagement de la langérine par un ligand induit son internalisation et la formation des granules de Birbeck (Jenny Valladeau et al. 2000) qui sont des organites caractéristiques des LC mais dont la fonction exacte reste encore incomprise (Kissenpfennig et al., 2005a; Mc Dermott et al., 2002).

Chez la souris, la lectine CD205 (DEC205) est aussi constitutivement exprimée sur les LC et impliquée dans la capture de certains allergènes, de leur dégradation et leur apprêtement (« processing ») (Inaba et al., 1995; Jiang et al., 1995). De plus, les LC murines expriment fortement l'intégrine CD11c (intégrine α X) qui est notamment impliquée dans la phagocytose, la reconnaissance de protéines du complément (iC3b) ou des molécules d'adhésion telles que ICAM-1, ICAM-2 ou VCAM-1 (Sadhu et al., 2007; Wu et al., 2018). A noter que les modèles transgéniques murins couplant le promoteur CD11c à la recombinaison Cre ont été largement développés pour cibler l'ensemble des cellules dendritiques (Anderson et al., 2020). En revanche, les modèles de type « Langerin-Cre » permettent de cibler plus finement les LC. Dans ce modèle, la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur Langérine est associée à une

séquence codant pour le récepteur de la toxine diphtérique (DTR), dont l'expression est conditionnée par l'excision Cre-dépendante d'un codon stop floxé en début de séquence. L'injection de toxine diphtérique (DT) permet donc l'élimination des cellules Langerin+. Après injection, la reconstitution naturelle de la population de LC chez la souris prend une quinzaine de jours, contrairement aux cDC1 dermiques (Langerin+) qui sont reconstituées en 3 à 5 jours. Ainsi, ce modèle est très intéressant pour étudier le rôle des LC (Kaplan, 2017).

Chez l'homme, les LC n'expriment que faiblement l'intégrine αX (CD11c^{lo}). En revanche, elles expriment les récepteurs CD1a et CD1c qui sont des glycoprotéines de la famille du CMH-I, qui permettent la présentation d'antigènes lipidiques aux LT (Hunger et al., 2004; Peiser et al., 2003; Sugita et al., 2000).

Développement et maintien

Les LC ont une ontogénie atypique comparativement aux autres cellules dendritiques. Des LC, déjà fonctionnelles (Schuster et al., 2009), colonisent la peau avant la naissance. Elles dérivent séquentiellement de précurseurs hématopoïétiques provenant du sac vitellin embryonnaire puis de monocytes issus de l'hématopoïèse du foie fœtal. Ces monocytes permettent de constituer la majorité des précurseurs de LC présents dans l'épiderme à l'âge adulte (Hoeffel et al., 2012; Schulz et al., 2012).

La différenciation et le maintien des LC nécessitent la signalisation des récepteurs AXL, BMP7 et TGF- β R (Bauer et al., 2012; Capucha et al., 2018; Yasmin et al., 2013). Ce dernier en particulier active les facteurs de transcription Runx3, PU.1 et Id2 (Chopin et al., 2013; Fainaru et al., 2004; Hacker et al., 2003). Tout comme les cDC, les LC ont besoin du facteur de transcription Zbtb46. A noter qu'elles se différencient des macrophages par l'expression du facteur Mafk (Satpathy et al., 2012; Wu et al., 2016). L'activation de la forme latente du TGF- β (LAP) dépend des intégrines $\alpha v \beta 6$ et $\alpha v \beta 8$ exprimées à la surface des kératinocytes (Mohammed et al., 2016). Bien que le TGF- β soit produit par différentes cellules épidermiques (kératinocytes, LC, LT $\gamma\delta$), le TGF- β 1 produit par les LC (sécrétion autocrine ou paracrine) est nécessaire à leur maintien dans l'épiderme, sans quoi elles émigrent de l'épiderme (Bobr et al., 2012). En outre, la signalisation du récepteur CSF1R (« Colony Stimulating Factor 1 Receptor ») activée par l'IL-34 (produite par les kératinocytes), et par le CSF1 (produit par les neutrophiles), est également indispensable à la formation et au maintien des LC (Wang

et al., 2012, 2016). Contrairement aux cellules dendritiques conventionnelles et plasmacytoïdes, les LC ne dépendent pas du récepteur FLT3 ni de son ligand FLT3L. *In vivo*, le réseau de LC reste inchangée en l'absence de GM-CSF (Merad et al., 2008). Grâce à une étude de suivi des LC par microscopie confocale intravitale, la durée de vie des LC est estimée entre 53 et 78 jours chez la souris (Vishwanath et al., 2006).

Le maintien du réseau de LC repose sur la différenciation de cellules souches épidermiques et la prolifération de LC matures (Czernielewski and Demarchez, 1987; Czernielewski et al., 1985; Glacometti and Montagna, 1967; Okumura et al., 2020; Schuster et al., 2014). Ceci a été observé grâce à des expériences de lignage cellulaire et de transfert de cellules hématopoïétiques congéniques (Chorro et al., 2009; Merad et al., 2002, 2008). Des expériences similaires ont été réalisées après irradiation aux UV ou rayons X mettant en évidence que les LC sont radio-résistantes (Merad et al., 2002) comparativement aux autres cellules hématopoïétiques cutanées. Cela semble due à une meilleure capacité des LC à réparer leur ADN et/ou arrêter leur cycle cellulaire grâce à la kinase CDKN1A (« cyclin-dependent kinase inhibitor ») (Price et al., 2015).

A l'homéostasie, les LC émigrent en permanence de l'épiderme (après avoir capté un antigène), grâce aux molécules CXCR4, EpCAM et CCR7 (Gaiser et al., 2012; Ouwehand et al., 2008). Arrivées dans le derme, elles suivent le gradient CCL19 et CCL21 des vaisseaux lymphatiques vers les organes lymphoïdes secondaires drainants (Tan et al., 2015). L'arrivée des LC dans les ganglions drainants est retardée par rapport aux DC dermiques (Tomura et al., 2014). A l'homéostasie, la reconstitution des LC épidermiques se fait principalement grâce aux précurseurs épidermiques (Merad et al., 2002). Leur migration est augmentée en contexte inflammatoire. Ceci s'explique notamment par la production de cytokines par les kératinocytes telles que l'IL-1 β , IL-18, TNF- α , et la signalisation MyD88 des LC.

Lors d'une inflammation cutanée, les LC émigrent donc vers les ganglions drainants, puis le réseau de LC est reconstitué par une première vague de monocytes Gr1+ à courte durée de vie, puis par une seconde vague de précurseurs hématopoïétiques dérivés de la moelle osseuse. (Ghigo et al., 2013; Ginhoux et al., 2006; Seré et al., 2012). Le recrutement de ces précurseurs (exprimant les marqueurs CCR2 ou CCR6) dépend des chimiokines CCL2 et CCL20 produites respectivement par les cellules de

l'isthmus et de l'infundibulum des follicules pileux. Les précurseurs de LC recrutés sont exclus du bulge folliculaire (zone de cellules souches de kératinocytes) par l'interaction CCR8-CCL8 (Nagao et al., 2012). Plus récemment, il a été montré chez l'homme que les DC myéloïdes cD1c+ peuvent également reconstituer le pool de LC épidermiques lors d'une histiocytose (Lim et al., 2020).

3.2.2 Cellules dendritiques conventionnelles

Contrairement aux cellules de Langerhans présentes uniquement dans l'épiderme cutané et l'épithélium de la cavité buccale, les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) sont présentes dans la plupart des organes de l'organisme (peau, intestin, poumons, foie, ganglions lymphatiques, rate, ...), et dépendent de la voie Flt3-Flt3l (McKenna et al., 2000; Waskow et al., 2008). Etant donné l'hétérogénéité phénotypique entre les cDC d'un tissu à l'autre, le critère d'ontogénie a permis d'homogénéiser cet ensemble et de définir deux grands groupes de cDC : (i) les cDC de type 1 (cDC1) dépendants de Batf3 et Irf8, et (ii) les cDC de type 2 (cDC2), dépendants d'Irf4, et de Klf4 ou Notch2, pour leur différenciation et leur migration (Anderson et al., 2020; Guillems et al., 2014a).

Dans la peau, les cDC1 et cDC2 sont localisées dans le derme. Les cDC1 représentent une fraction minoritaire des cDC.

3.2.2.1 Cellules dendritiques conventionnelles de type 1 (cDC1)

Phénotype

Les cDC1 expriment la protéine de surface XCR1 (X-C Motif Chemokine Receptor 1) qui est le récepteur de XCL1 exprimé par les LT CD8+ (Dorner et al., 2009). Chez la souris les cDC1 expriment la langérine et peuvent exprimer le marqueur CD103 (pour 70% d'entre elles) (Bursch et al., 2007; Guillems et al., 2016). Elles peuvent également exprimer le récepteur lectine DNGR-1 encodé par Clec9a (récepteur de l'actine F) qui participe à la présentation croisée d'antigènes associés aux cellules mortes (Iborra et al., 2016; Poulin et al., 2012). Néanmoins, chez l'homme, DNGR-1 ne semble pas présent au niveau protéique dans les cDC1 de la peau ou migrantes vers les GLD (Alcantara-Hernandez et al., 2017; Poulin et al., 2010; Schreibelt et al., 2012; Segura et al., 2012). Chez l'homme, elles étaient initialement définies par l'expression du CD141/BDCA-3 bien que celui-ci puisse être surexprimé par d'autres DC CD1c+CD14+, et ne peut donc pas être utilisé comme marqueur spécifique (Chu et

al., 2012; Haniffa et al., 2012). Elles expriment également les récepteurs CD1a et CD1c. Les cDC1 du derme sont semblables aux cDC1 CD8 α +CD103- résidentes des ganglions lymphatiques (Edelson et al., 2010). Les cDC1 n'expriment pas les récepteurs CD11b, CD172 α ou CD14 (Miller et al., 2012). Des modèles murins de déplétion conditionnelle (basés sur l'expression du récepteur à la toxine diphtérique qui les rend sensibles à son injection) XCR1^{DTR} et Clec9a^{DTR} ont été développés pour étudier leur fonction (Anderson et al., 2020).

Développement et maintien

Le développement et la différenciation des cDC1 dermiques nécessitent l'activation des récepteurs FLT3 et CSF2R via la fixation de leurs ligands FLT3L et CSF2. Elles dépendent des facteurs de transcription BATF3, IRF8, ID2, NFIL3 (Grajales-Reyes et al., 2015; Guillems et al., 2014a; Hildner et al., 2008; Tussiwand et al., 2012). De manière intéressante, les souris déficientes en facteur BATF3 n'ont pas de cDC1 dermiques ou spléniques mais les cDC1 des ganglions lymphatiques sont présentes. Chez l'homme des expériences *in vitro* ont également montré la dépendance des cDC1 pour FLT3L, CSF2 ou IRF8.

3.2.2.2 Cellules dendritiques conventionnelles de type 2 (cDC2)

Phénotype

Les cDC2 sont les DC majoritaires du derme et représentent les DC les plus hétérogènes phénotypiquement (Alcantara-Hernandez et al., 2017). Elles se caractérisent classiquement par l'expression du récepteur CD172 α et du facteur de transcription IRF4. Elles expriment également les récepteurs CCR2, CD11c et CX₃CR₁. La majorité des cDC2 dermiques expriment le récepteur CD11b (pour 70% d'entre elles) (Guillems et al., 2016). Elles se distinguent des macrophages ou des monocytes par l'absence d'expression de récepteurs CD64/MerTK, ou Ly6C, respectivement (Tamoutounour et al., 2012, 2013). Les cDC2 peuvent exprimer faiblement la langérine et augmenter son expression en réponse à une exposition à du TGF- β ou à la TSLP (Bigley et al., 2015; Martínez-Cingolani et al., 2014; De Monte et al., 2016). A noter que chez l'homme, les cDC2 CD5^{hi} activent plus fortement les LT cytotoxiques et les LTh22 (IFN- γ , IL-22) comparativement aux cDC2 CD5^{lo} (Korenfeld et al., 2017; Yin et al., 2017). De manière intéressante, une fraction des cDC2 dermiques peut exprimer l'enzyme ALDH1A2 (aldéhyde déshydrogénase 1, membre

A2) sous l'influence de la vitamine D3 (Guilliams et al., 2010; Sato et al., 2013). ALDH1A2 (aussi appelée RALDH2) permet la production d'acide rétinoïque. L'acide rétinoïque est un métabolite de la vitamine A qui promeut la génération de LT_{REG} à partir de LT CD4+ naïfs. Néanmoins, en cas de réactions allergiques sévères de l'œil, l'activité de l'ALDH1A2 dans les cDC2 CD11b+ peut aussi causer une fibrose de la conjonctive (Ahadome et al., 2016).

Une sous-population de cDC2 CD11b+ dermiques exprime le récepteur CD301b. CD301b (aussi appelé MGL2) est un récepteur lectine de type C reconnaissant les antigènes possédants des résidus de type galactose et N-acetylgalactosamine (Gal/GalNAc). Cette sous-population dépend de la voie FLT3-FLT3L mais requiert également du GM-CSF (Kim et al., 2018b). Les cDC2 CD301b+ sont capables d'induire une réponse Th2 dans des modèles d'allergie à l'ovalbumine ou à l'haptène FITC, mais aussi d'initier une réponse Th17 lors d'une infection à *C.albicans*, via une interaction avec les nocicepteurs cutanés (Kashem et al., 2015a; Kumamoto et al., 2009, 2013).

La dépendance aux facteurs de transcription Klf4 ou Notch2 permet de différencier deux sous-catégories de cDC2. En effet, l'absence de Klf4 (souris CD11c^{Cre}Klf4^{fl/fl}) réduit la population de cDC2 CD11b- migrantes de la peau et abroge la réponse Th2 en réponse à un challenge d'extraits d'acarien (*Der p*) chez des souris sensibilisées. Cette population se distingue des monocytes Klf4+ par l'expression de CD1a+CD14+ (Jurkin et al., 2017; Tussiwand et al., 2015). Néanmoins, ces travaux n'excluent pas que l'absence de Klf4 impacte également les autres populations CD11c+ qui ne sont pour autant pas déléetées. Quant aux cDC2 CD11b+ Notch2+, elles contribuent à la formation des centres germinatifs spléniques, à la réponse Th17 anti-fongique, et à la réponse IL-22/23 en réponse à une infection bactérienne *C.rodentium* (Briseño et al., 2018; Lewis et al., 2011; Satpathy et al., 2013; Tussiwand et al., 2015).

Plus récemment, une étude transcriptomique a mis en évidence les sous populations cDC2A et cDC2B qui expriment respectivement les facteurs de transcription T-bet et ROR γ t (Brown et al., 2019). Les cDC2A sont douées de capacités anti-inflammatoires via la production d'amphiréguline (AREG) et un niveau d'expression modéré de CD86 en réponse à des stimuli inflammatoires (LPS, TNF- α). Au contraire, les cDC2B produisent du TNF- α et de l'IL-6 après stimulation et participent à la boucle

inflammatoire. Ces deux populations ont été détectées chez l'homme et la souris dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. A noter que dans le sang humain, seulement la population cDC2B est retrouvée.

Enfin, en contexte inflammatoire, sous l'influence de l'interféron de type 1, les pré-cDC ou cDC2 peuvent acquérir un phénotype particulier qui ressemble à celui des macrophages ou des DCs dérivées de monocytes (moDC) : on parle alors de cDC2 inflammatoires (inf-cDC2) (Bosteels et al., 2020). Elles se caractérisent par un phénotype CD88^{neg}, CD26+, CD64+ (FcγRI) et MAR-1+. MAR-1 est un épitope de FcεRI. C'est aussi le nom du clone de l'anticorps qui le reconnaît. Les fonctions de présentation antigénique et de production de cytokines/chimiokines des inf-cDC2 sont dépendantes du facteur de transcription IRF8. Ainsi, l'absence de présentation croisée observée dans des souris *Irf8*^{-/-} doit être repensée en regard d'un rôle amoindri des inf-cDC2. Elles peuvent internaliser les complexes immuns via leur récepteur Fc et activer les LT CD4+ et LT CD8+ plus efficacement que les cDC2 classiques. Au même titre que les moDC, leur migration est dépendante du récepteur CCR2. L'utilisation de souris *Ccr2*^{-/-} a longtemps entraîné une confusion entre le rôle des inf-cDC2 et des moDC. Il apparaît désormais clairement que l'induction d'une réponse Th2 dans un modèle d'allergie aux acariens *Dermatophagoïdès farinae* (DerF), attribuée initialement aux moDC, est majoritairement due aux inf-cDC2 (Plantinga et al., 2013).

Développement et maintien

Tout comme les cDC1, les cDC2 requièrent les facteurs de croissance FLT3L et CSF2, et leurs récepteurs. En effet, ils prolifèrent en réponse à FLT3L et leur nombre est réduit dans les souris déficientes en FLT3 ou FLT3L. De plus, leur développement dépend des facteurs de transcription PU.1, RELB et RBPJ. Comme discuté auparavant, les cDC2 semblent dépendre soit de KLF4 soit de NOTCH2 bien que la discrimination entre ces deux populations reste à explorer davantage selon les conditions (homéostasie ou inflammation) (Jurkin et al., 2017). Le facteur IRF4 quant à lui, n'est pas nécessaire au développement des cDC2 mais il est requis pour leur survie et leur migration dans les ganglions lymphatiques. Le facteur IRF8 qui est associé aux cDC1 est aussi impliqué dans le développement des cDC2, uniquement chez l'homme. En effet, la mutation autosomale dominante IRF8 T108A conduit à une perte des cDC2 du sang contrairement aux souris IRF8 KO ou *Irf8*^{R294C} pour lesquelles

le compartiment cDC2 n'est pas touché. Le renouvellement des cDC2 chez l'homme est d'environ 30 jours comme observé après transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

3.2.3 Autres types de cellules dendritiques cutanées

3.2.3.1 DC3

Ces dernières années, une nouvelle catégorie de DC, appelée DC3, a été décrite chez l'homme dans le sang, les ganglions lymphatiques, la rate et le derme (Alexandra-Chloé Villani et al., 2017; Bourdely et al., 2020; Cytlak et al., 2020; Dutertre et al., 2019; See et al., 2017). Elles dérivent d'un précurseur hématopoïétique pré-DC3 IRF8^{low} CLEC12A⁺ différent des CDP et des cMoP (Cytlak et al., 2020; Villar and Segura, 2020). Contrairement aux cDC1 et cDC2 leur développement ne dépend pas de FLT3L mais du GM-CSF. Elles se caractérisent par un phénotype CD1c⁺ CD63⁺ CD14^{lo/hi} CD88⁻ CD5^{lo/hi} et peuvent donc être discriminées des moDC (qui sont CD88⁺ CD1c⁺ CD14⁺ CD63⁻). L'existence de cette population chez la souris reste à démontrer. Les DC3 sont aussi efficaces que des cDC2 pour stimuler des LT naïfs. Il a été montré que les DC3 du sang ont un profil transcriptomique enclin à induire une réponse Th17 à l'homéostasie (Dutertre et al., 2019). Néanmoins, Bourdely *et al.* ont montré qu'après stimulation des TLR, les DC3 induisent des LTh1 et non des LTh17 (Bourdely et al., 2020). La capacité fonctionnelle des DC3 doit être envisagée selon le contexte inflammatoire qui révèle sa plasticité. Enfin, les DC3 peuvent induire l'expression de CD103 sur les LT et permettre leur résidence dans les tissus (Bourdely et al., 2020).

3.2.3.2 DC dérivées des monocytes

Les moDC ressemblent phénotypiquement aux cDC2 dermiques. Elles partagent l'expression des récepteurs SIRP α , CD11c, CD11b, CX₃R₁, CCR2. Chez la souris, elles présentent un phénotype MERTK^{-/low} CD64^{-/low} (Tamoutounour et al., 2013). Chez l'homme, elles expriment également les récepteurs CD1c, CD14 (co-récepteur de TLR-4) et peuvent être CD16^{lo} (monocytes classiques) ou CD16^{hi} (monocytes non classiques) (Misharin et al., 2014).

Le développement des moDC dans la peau nécessite la signalisation via le récepteur CCR2. Les moDC dérivent des monocytes Ly6C^{hi} qui pénètrent dans la peau, se mettent à exprimer le CMH-II et perdent progressivement l'expression de Ly6C (Tamoutounour et al., 2013). Le développement des monocytes et donc des moDC est

dépendant des facteurs de transcription PU.1, IRF8, KLF4. A noter que les monocytes infiltrants la peau peuvent se différencier en moDC ou macrophages selon les stimuli, notamment la voie du récepteur arylhydrocarboné (AhR) qui favorise la différenciation en moDC (Goudot et al., 2017).

Les moDC migrent très peu de la peau vers les ganglions lymphatiques pour activer des LT CD4+ et CD8+, comparativement aux LC et cDC.

La demi-vie des moDC dermiques est de quelques jours. Elles sont continuellement renouvelées par les monocytes du sang (Malissen et al., 2014).

3.2.3.3 DC plasmacytoïdes

A l'homéostasie, la peau ne contient pas ou peu de DC plasmacytoïdes (pDC). Elles sont recrutées lors d'une inflammation. Elles sont spécialisées dans la production d'interféron alpha qui permet la réparation du tissu ou l'élimination d'un pathogène (Swiecki and Colonna, 2015). Chez la souris, elles sont caractérisées par l'expression des récepteurs B220, Siglec-H, CD317 et une expression intermédiaire de CD11c (CD11c^{int}). Chez l'homme les pDC sont CD11c^{neg}, CD123/IL-3R+, CD303 (BDCA-2)+. Les pDC peuvent se développer à partir des précurseurs communs de DC (CDP) ou des progéniteurs lymphoïdes B (BLP). Leur développement dépend des facteurs de transcription E2-2, SPIB, IRF7, IRF8. Les pDC possèdent un programme transcriptomique spécialisé dans la production d'interféron 1 et dans la réponse antivirale. Ils expriment fortement les récepteurs TLR7 et TLR9 capables de reconnaître les acides nucléiques des virus.

Tableau 15 : Phénotype et facteurs de transcription des DC cutanées

		Marqueurs de surface		Principaux Facteurs de transcription
		Souris	Humain	Souris
LC	Epiderme	CD11c CD11b CD207 (langerin) CD301b ^{-/+} CD172α (SIRPα) F4/80 CD326 (EpCAM) CX ₃ CR ₁ CD24 CD205	HLA-DR CD11c ^{low} CD1a CD1c (BDCA-1) CD207 CD326 (EpCAM) CD324 (E-cadherin) CD11b ^{low} CX ₃ CR ₁ CD172α (SIRPα)	Id2 Irf8 Runx3
cDC1	Derme	CD11c CD103 XCR1 CD327(CLEC9A) CD207 CD24 CD205	HLA-DR CD11c ^{low} CD304 (BDCA-3) CD141 (BDCA-4) XCR1 CD370 (CLEC9A)	Batf3 Id2 Irf8
	GLD/rate	CD11c CD8α XCR1 CD327 (CLEC9A) CD207 ^{-/+} CX ₃ CR ₁ ^{-/+} CD24 CD205 CMH-II ^{high}		
cDC2	Derme	CD11c CD11b ^{-/+} CD301b CD172α (SIRPα) CCR2 F4/80 CX3CR1 CD205	HLA-DR CD11c CD1a (derme) CD1c CD304 ^{-/+} CD141 ^{-/+} CD207 ^{-/+} (derme) CD11b CX3CR1 CD172α(SIRPα)	Irf4 Klf4 ou Notch2
	GLD/rate	CD11b CD172α (SIRPα) CD24 CD205		
moDC	Derme	CD11b CD301b CD64 (FCγR1) ^{low/+} MERTK ^{-/low} CCR2 F4/80 CD205	HLA-DR CD11c CD14 CD1c ^{+/-} CD11b CX ₃ CR ₁ CD172α (SIRPα)	Irf4 Klf4, Zeb2

GLD : ganglions lymphatiques drainants.

3.3 Fonctions des DC cutanées

Comme décrit au début de ce chapitre, les DC de l'organisme et en particulier du tissu cutané ont une double fonction : 1) éliminer toute infection ou danger qui pénètre le tissu, 2) maintenir une tolérance vis-à-vis des antigènes inoffensifs (exogènes ou du soi).

Depuis plus de 20 ans, au fur et à mesure de la caractérisation phénotypique des DC, la question de la spécialisation fonctionnelle des sous-populations est apparue. Ainsi, la contribution des différentes sous-populations de DC a été étudiée à travers des modèles d'allergie, de cancer, d'auto-immunité, d'infection bactérienne, parasitaire ou virale. La majorité des résultats proviennent de modèles murins qui permettent la déplétion conditionnelle ou constitutive des différentes sous-populations de DC (modèles Langerin^{DTR}, XCR1^{DTR}, Mgl2^{DTR}, Siglec-H^{DTR}, Clec9a^{DTR}, Irf4^{fl/fl}, Klf4^{fl/fl}, Batf3^{-/-}, ...) (Anderson et al., 2020; Kaplan et al., 2008). Il s'agit donc de rappeler ici les principaux résultats de la littérature démontrant la spécialisation fonctionnelle des DC pour les réponses effectrices de type-1, type-2, type-17, ou au contraire des réponses régulatrices (Anderson et al., 2020; Clausen and Stoitzner, 2015; Durai and Murphy, 2016; Malissen et al., 2014). En préambule, il convient de rappeler que l'environnement cellulaire, la nature et la dose de l'antigène sont des facteurs déterminants pour l'acquisition de la fonction des DC. Ainsi, bien que les modèles utilisés soient d'une très grande utilité, la réponse d'une DC chez l'homme doit être considérée vis-à-vis des paramètres précis lors de la capture d'un antigène ou allergène donné, en particulier l'environnement immunitaire. Les DC orientent la réponse immunitaire grâce à l'expression d'un panel précis de récepteurs de surface (TLR, lectines de type C, ...), et d'une capacité à produire préférentiellement certaines cytokines.

3.3.1 Réponse immunitaire de type-1 (Th1)

La réponse de type Th1 se définit par l'activation de LT CD8+ cytotoxiques (Tc1) et de LT CD4+ (Th1) T-bet+ principalement producteurs d'IFN- γ . Elle est considérée comme une réponse immunitaire à médiation cellulaire et nécessite les cytokines IL-12 et IL-27 pour sa mise en place. Elle permet d'éliminer les pathogènes intracellulaires, les cellules tumorales et toute cellule qui présente sur son CMH-I des molécules étrangères telles que des haptènes.

La contribution des sous-populations de DC à la réponse Th1/Tc1 a beaucoup été étudiée à travers des modèles murins d'hypersensibilité de contact (CHS). Ce modèle a permis de montrer que les cellules de Langerhans participent à la sensibilisation aux haptènes (Bennett et al., 2005). Au contact de fortes doses d'haptènes, ces derniers pénètrent davantage le derme et peuvent être pris en charge plus efficacement par les cDC1 et cDC2 qui suffisent à induire une réponse allergique CD8+ cytotoxique de type Th1 (Kissenpfennig et al., 2005b). Si les cDC1 et les LC sont absents, la sensibilisation est diminuée même à fortes doses (Clausen and Kel, 2010).

En outre, les cDC1 ont une très forte capacité à induire une réponse effectrice Th1 grâce à leur production élevée d'IL-12. Des souris *Batf3*^{-/-} (délétées en cDC1) infectées par le parasite intracellulaire *Toxoplasma gondii* ne peuvent pas générer de réponse Th1 et éliminer le pathogène (Mashayekhi et al., 2011). Également, l'administration intradermique du parasite *Leishmania Major* dans des souris *Batf3*^{-/-}, empêche le développement d'une réponse effectrice de Th1 et conduit à une augmentation de la charge parasitaire, des LT_{REG} et de la réponse Th2 (Martínez-López et al., 2015). Enfin, la réponse Th1 induite par l'infection épicutanée du champignon *C.albicans* (pseudohyphe) dépend des cDC1 dermiques, et non des LC ou cDC2 (Kashem et al., 2015b). Cette réponse Th1 confère non seulement une protection locale mais aussi systémique contre le champignon.

Enfin, une des grandes particularités des cDC1 est leur forte capacité à faire de la présentation croisée (PC). Cela consiste à présenter des antigènes/peptides exogènes sur les molécules de CMH-I afin d'activer des LT CD8+ cytotoxiques spécifiques (Eickhoff et al., 2015; Kitano et al., 2016). La PC est essentielle pour éliminer les cellules tumorales, et limiter la dissémination des virus et bactéries intracellulaires. Par exemple, lors de l'infection épicutanée par le virus HSV-1 (herpès simplex virus), les cDC1 CD103+ sont clés pour activer les LT cytotoxiques et permettre l'élimination du virus (Bedoui et al., 2009). En réponse à une infection de la peau par le virus de la vaccine, les cDC1 induisent la génération de LT_{RM} T-bet+ cutanés grâce au récepteur DNGR-1 et à la production d'IL-12 (Iborra et al., 2016).

Les cDC2 peuvent aussi participer à la mise en place d'une réponse Th1. Lors de l'inoculation par voie cutanée du bacille *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin (BCG), celui-ci est pris en charge par les cDC2 dermiques qui migrent alors dans les GLD de

manière IL-1R-MyD88-dépendante et induisent une réponse Th1 spécifique (Bollampalli et al., 2015).

Concernant les moDC, lors d'une infection par le parasite *Leishmania major*, elles sont recrutées dans le derme pour prendre en charge l'allergène, migrer dans les GLD et induire une réponse Th1 (León et al., 2007). En réponse à la bactérie *Listeria monocytogenes in vitro*, les moDC produisent de fortes quantités d'IL-12 (Zhan et al., 2010). Les moDC sont aussi capables de faire de la présentation croisée d'antigènes tumoraux aux LT CD8+ cytotoxiques (Sheng et al., 2017).

3.3.2 Réponse immunitaire de type-2 (Th2)

La réponse de type Th2 se définit majoritairement par l'activation de LT CD4+ GATA-3+ producteurs d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-10. Il s'agit de la réponse principale pour éliminer les parasites. Elle est également responsable de certaines allergies et maladies atopiques. Cette réponse est associée à une immunité humorale spécifique de nature IgE.

Les LC peuvent participer au développement de LTh2 en réponse à une application cutanée de l'haptène FITC (Cho et al., 2017). En outre, les LC IgE+ peuvent induire efficacement des clones Th2 et peuvent donc entretenir un environnement pathogénique chez les patients souffrant de dermatite atopique (Mudde et al., 1992). Les peptidoglycanes des *Staphylococcus aureus* présents sur la peau peuvent stimuler la production de CCL17 par les LC qui recrutent des LT CD4+ Th2 CCR4+ (Matsui and Nishikawa, 2005; Matsui et al., 2015).

Les cDC1 peuvent avoir un rôle inhibiteur de la réponse Th2 induite par les helminthes ou les allergènes, via la production d'IL-12 de manière constitutive (indépendant de l'activation des TLR) ou induite, respectivement (Conejero et al., 2017; Everts et al., 2016). Néanmoins, les cDC1 humains (CD141+) exposés aux antigènes du virus Influenza sont capables d'activer *ex vivo* des LT CD4+ allogéniques producteurs de cytokines Th2 (IL-4, IL-13), via l'interaction OX40-OX40L (Yu et al., 2014). De plus, chez la souris, après administration intranasale d'ovalbumine, les cDC1 (CD103+CD11b-) pulmonaires sont capables d'induire des LTh2 *ex vivo* (Nakano et al., 2012).

Concernant les cDC2 (Irf4+), il a récemment été prouvé qu'elles sont nécessaires à la sensibilisation épicutanée par *Dermatophagoïdès pteronyssinus* (Der p) (Deckers et

al., 2017). D'autre part, les cDC2 CD301b⁺ sont capables d'induire une réponse Th2 en réponse à des allergènes ou des parasites. Le transfert de cDC2 CD301b⁺ à partir de souris sensibilisées à l'haptène FITC, dans des souris receveuses naïves, entraîne le développement d'une réponse Th2 (Kumamoto et al., 2009). De la même manière, l'application de FITC-dibutyl phtalate (DBP) sur la peau, induit l'activation des cDC2 dermiques de manière STAT5-dépendante et TSLP-dépendante. Les cDC2 expriment alors CCR7 et CCL17 et migrent dans les GLD pour initier une réponse Th2 (Kitajima and Ziegler, 2013). La déplétion du récepteur du TSLP affecte toutes les DC mais impacte principalement la phosphorylation de la protéine STAT5 des cDC2, et limite la génération de la réponse Th2 (Bell et al., 2013). Les cDC2 CD11b⁺ et les LC jouent un rôle complémentaire *in vivo* pour induire la réponse Th2 lors de la sensibilisation par du FITC (Cho et al., 2017).

Également, la déplétion des cDC2 CD301b⁺ (modèle Mgl2-DTR) ou des cDC2 Klf4⁺ (modèle CD11c^{Cre}Klf4^{fl/fl}) inhibe la réponse Th2 spécifique de l'ovalbumine, de la papaïne ou du nématode *Nippostrongylus brasiliensis* (Gao et al., 2013; Kumamoto et al., 2013). Leur déplétion n'affecte pas la réponse Th1 ni la réponse Tfh. A noter que l'injection de toxine diphtérique (DT) dans des souris Mgl2-DTR impacte aussi les macrophages et monocytes (Anderson et al., 2020). De la même manière, les cDC2 Klf4⁺ sont nécessaires pour la réponse Th2 (et non Th1 ni Th17) après une infection épicutanée au parasite *Schistosoma mansoni* (Tussiwand et al., 2015).

Il a aussi été montré qu'après sensibilisation, les cDC2 dermiques produisent la chimiokine CCL17 sous l'action de l'IL-13 produite par les ILC2. La chimiokine CCL17 est nécessaire pour attirer et activer les LTh2 mémoires CCR4⁺ (Halim et al., 2016). Les cDC2 ont donc besoin d'interagir avec d'autres cellules immunitaires pour réactiver les LT de type 2 efficacement (possiblement aussi lors de l'activation primaire).

3.3.3 Réponse immunitaire de type-17 (Th17)

La réponse de type-17 se définit par l'activation de LT CD4⁺ ROR γ t⁺ producteurs principalement d'IL-17 mais également d'IL-22, d'IL-26, d'IFN- γ ou de TNF- α . Son induction est conditionnée par un ensemble de cytokines telles que le TGF- β , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 (Annunziato et al., 2015; Veldhoen, 2017). Les LTh17 sont impliqués dans la réponse immunitaire contre les bactéries extracellulaires et certains

champignons. Elle peut également causer des réactions délétères pour l'organisme comme dans le cas du psoriasis qui est une maladie inflammatoire chronique cutanée.

Chez la souris, l'infection épicutanée par *C.albicans* promeut la migration des LC vers les GLD où ils produisent de l'IL-1 β , l'IL-6 et du TGF- β (Igyártó et al., 2011). L'ablation des LC n'impacte pas la prolifération des LT spécifiques de *C.albicans* mais abroge leur différenciation en LTh17 (Kashem et al., 2015b). La reconnaissance de *C.albicans* par le récepteur Dectine-1 des LC est nécessaire pour la sécrétion d'IL-6 et la différenciation des LTh17.

En outre, lors d'une dysbiose de *Staphylococcus aureus*, les LC sont nécessaires pour l'induction de LT CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 dans la peau et limiter les symptômes de type dermatite atopique (Kobayashi et al., 2015).

Chez l'homme, les LC peuvent aussi induire la différenciation des LTh17 via la production d'IL-6 et d'IL-15.

Les cDC1 et cDC2 induisent également des LT CD8⁺ producteurs d'IL-17 (Tc17) en réponse au *Staphylococcus epidermidis* du microbiote cutané. Ces Tc17 sont recrutés de manière permanente dans la peau afin de limiter toute invasion pathogénique (Naik et al., 2015).

Suite à l'administration épicutanée ou intradermique de *C.albicans* sous forme de pseudohyphe, les cDC2 sont incapables d'induire une réponse effectrice LTh17, seules les LC permettent une protection locale. Cependant, les cDC2 CD11b⁺ peuvent induire une réponse protectrice si les animaux sont administrés avec un antigène de surface de *C.albicans* (Hwp1) et d'un ligand du récepteur Dectine-1, le caldran. Ainsi, la capacité des cDC2 CD11b⁺ à induire une réponse de type-17 dépend de la nature et de la forme de l'antigène. Le pseudohyphe représente possiblement un système évolutif d'évasion du système immunitaire (Kashem et al., 2015b).

Enfin, les cDC2 CD301b⁺ du derme peuvent initier une réponse Th17 causant des symptômes de type psoriasis chez la souris (Kim et al., 2018b).

3.3.4 Réponse anticorps

Les anticorps produits en réponse à un pathogène ou un allergène sont déterminants pour la réponse immunitaire. Les anticorps (immunoglobulines) sont produits par les LB. Ces derniers adaptent l'isotype (commutation isotypique) et l'affinité

(hypermutation somatique) des anticorps produits en fonction des cytokines environnantes et/ou sous l'action des LTh et LT_{FH} induits par les DC. Ces deux phénomènes se produisent dans le centre germinatif des GLD ou de la rate. Ainsi, chez la souris, la production d'IgG2a par les LB est associée aux réponses Th1 tandis que les IgE et les IgG1 sont favorisées par les réponses Th2 (Bretscher, 2014). Il est difficile d'établir une homologie précise (structurale et fonctionnelle) des isotypes d'immunoglobulines entre la souris et l'homme. Néanmoins, chez ce dernier la réponse Th1 est associée à la génération d'IgG1, IgG2 et IgG3, tandis que la réponse Th2 est associée aux IgG4 et IgE (Gauchat et al., 1990; Hjelholt et al., 2013; Punnonen et al., 1993, 1997; Snapper et al., 1997; Sousa et al., 1998).

Chez la souris, l'application d'ovalbumine sur une peau abrasée (« tape stripping ») conduit à l'induction d'une réponse IgE OVA-spécifique dépendante des LC (Mondoulet et al., 2012a; Nakajima et al., 2012). Des souris déficientes pour le récepteur du TSLP sur les LC ne produisent pas d'anticorps IgE spécifiques. Également, les LC sont nécessaires à la formation des centres germinatifs en réponse à l'application cutanée d'antigènes dérivés de *Leishmania major* (Zimara et al., 2014). Les LC permettent une production d'IgG1 en réponse à une infection cutanée aux *Staphylococcus aureus* (Ouchi et al., 2011).

Également, les cDC1 via la capture d'ovalbumine par leur récepteur Clec9A (et non pas Clec12A ou DEC205), sont capables d'activer efficacement des LT_{FH} nécessaires à la production d'anticorps (Lahoud et al., 2011; Park et al., 2013).

Les cDC2 participent aussi à la régulation des réponses anticorps. Après immunisation cutanée à l'ovalbumine, l'absence de cDC2 (dans un modèle Mgl2^{DTR}) ou leur incapacité à migrer (CD11c^{Cre} Irf4^{fl/fl}) entraîne une exacerbation du nombre de LB et de LT_{FH} dans les centres germinatifs (Kumamoto et al., 2016). Ceci corrèle avec un taux plus élevé d'anticorps IgG1, IgG2b, IgE spécifiques. Dans ce modèle, les cDC2 CD301b⁺ sont nécessaires pour réguler la réponse humorale via un mécanisme dépendant de PD-L1 et PD-L2.

Ainsi, les différentes sous-populations de DC participent à la réponse humorale spécifique via l'activation des LT et LT_{FH}.

3.3.5 Réponse immunitaire tolérrogène

Au-delà des réponses effectrices, les DC sont essentielles à la tolérance via notamment l'activation de LT_{REG}. Les DC captent en permanence les antigènes de l'environnement à l'homéostasie et migrent dans les GLD afin de stimuler des LT_{REG} spécifiques limitant toute réaction immunitaire délétère contre un antigène du soi ou un allergène inoffensif. L'administration d'un antigène couplé à un anticorps anti-DEC205 exprimé par les DC, ou anti-CLEC9A exprimé par les cDC1, en absence de signaux inflammatoires, induit principalement des LT_{REG} Foxp3+ qui favorisent la tolérance (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001; Joffre et al., 2010).

Les LC permettent la tolérance aux allergènes chimiques de l'environnement qui rentrent en contact avec la peau via l'induction de LT CD4+ FoxP3+ (Mercedes Gomez de Agüero et al., 2012). Il a récemment été montré que les LC peuvent capter les antigènes protéiques appliqués sur une peau intacte via la langérine, migrer dans les GLD, produire de l'IL-10 et induire une réponse régulatrice (Luo et al., 2019). Cette tolérance est dépendante de la voie AhR (Hong et al., 2020).

Les cDC1 activés *in vitro* par de l'ovalbumine et de l'acide rétinoïque sont capables d'activer des LT_{REG} FoxP3- LAG3+ après transfert *in vivo* limitant ainsi la réponse effectrice chez les souris receveuses allergiques à l'ovalbumine (Dawicki et al., 2017).

De manière intéressante, les cDC2 présents dans les ganglions lymphatiques drainants la peau sont capables de produire de l'acide rétinoïque et d'induire des LT_{REG} FoxP3+ à l'homéostasie (Guilliams et al., 2010). Comme vu précédemment, les cDC2 CD301b+ peuvent aussi limiter la réponse humorale en réponse à des antigènes protéiques (Kumamoto et al., 2016).

Les pDC sont également douées de propriétés tolérrogènes via la sécrétion d'IL-10 ou d'IFN- α/β qui participent à la cicatrisation de la peau (Goubier et al., 2008; Gregorio et al., 2010).

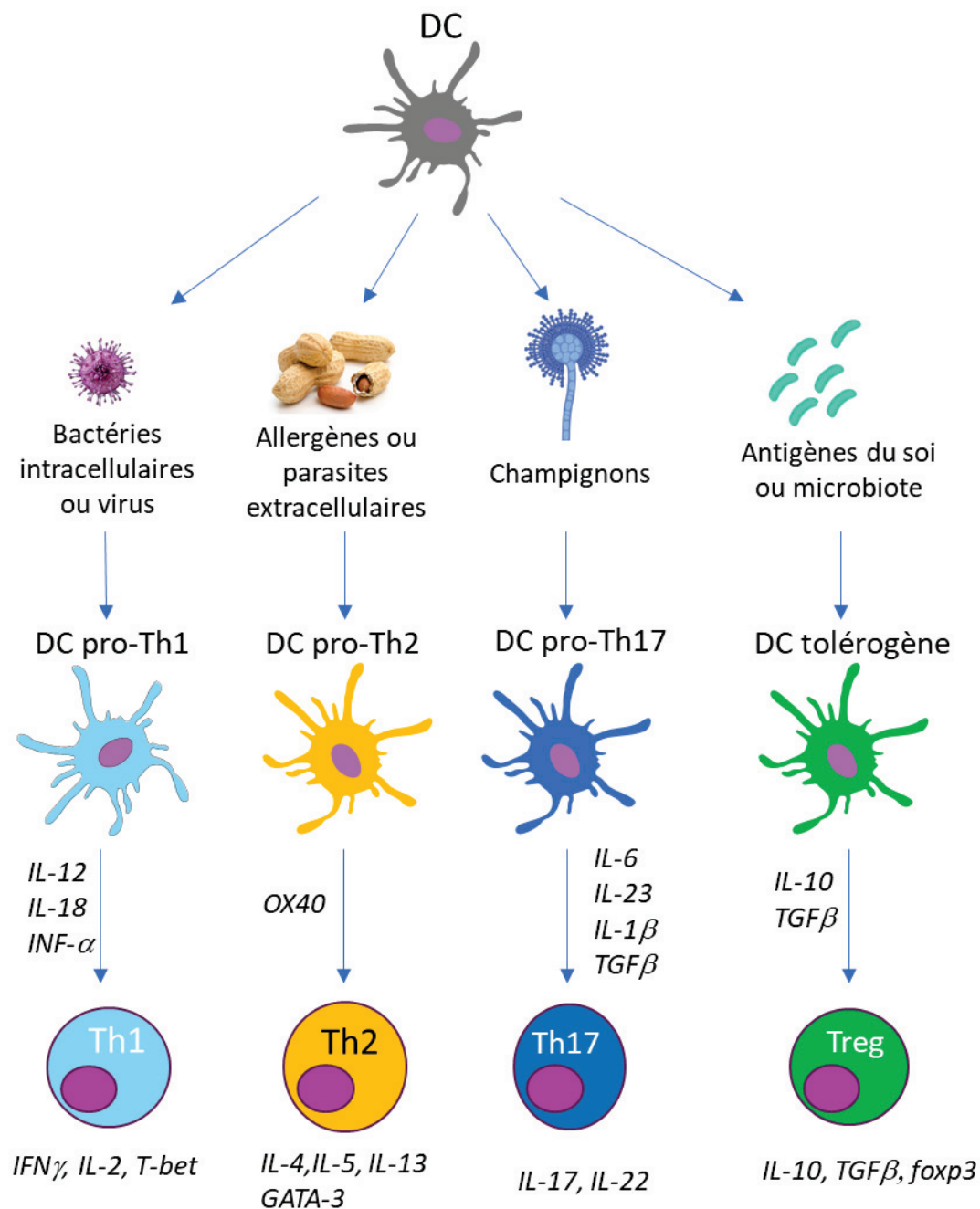


Figure 21 Fonctions des DC dans la polarisation de la réponse adaptative.

Les cellules dendritiques détectent et internalisent grâce à un ensemble de récepteurs membranaires les antigènes de l'environnement. Elles acquièrent ensuite un phénotype d'activation qui leur permet de stimuler les LT naïfs et de les polariser vers un profil adapté. Les sous-populations de DC (cDC1, cDC2, LC, etc.) acquièrent préférentiellement certaines fonctions en fonction du contexte inflammatoire et de la nature de l'antigène (les cDC1 sont les plus aptes à réaliser la présentation croisée induisant une réponse Th1 ; les cDC2 activent efficacement une réponse Th2 en réponse aux allergènes ; les LC sont très efficaces pour induire une réponse LTh17 en réponse aux antigènes fongiques. Néanmoins, comme décrit dans ce chapitre, elles sont toutes potentiellement capables d'induire l'ensemble des réponses LT dépendamment du stimulus (Th1, Th2, Th17, LT_{REG}).

Pour conclure, les différentes sous-populations de DC cutanées peuvent participer au développement de réponses immunitaires face à différents dangers. Néanmoins, il apparaît qu'en réponse à une infection ou un allergène, certaines sous-populations de DC sont plus adaptés pour induire une réponse adaptative efficace. D'une part, Les

cDC1 sont spécialisées dans la présentation croisée (activation de Tc1) et sont donc une population majeure pour l'immunité anti-tumorale et contre les pathogènes intracellulaires. D'autre part, les cDC2 et LC peuvent induire efficacement une réponse Th2, Th17 et humorale face à de nombreux parasites, champignons ou allergènes.

Il est donc nécessaire d'évaluer la contribution des sous-populations de DC dans le cas précis de la désensibilisation épicutanée, et de comprendre les mécanismes associés à leurs fonctions. En particulier, comme précédemment énoncé, les récepteurs membranaires mis en jeu lors de la capture de l'allergène (TLR, CLR, FcR, ...) et l'interaction avec les autres cellules de la peau (LT_{REG}, ILC2, ...) sont des éléments déterminants de la réponse induite (Berin et al., 2006; Dawod et al., 2020; Hooper et al., 2019; Jun et al., 2017; Laurence Ardouin et al., 2016; Vander Lugt et al., 2017; Nikolic et al., 2017; Trompette et al., 2009; Vendelova et al., 2018).

DEUXIEME PARTIE : PROJET DE RECHERCHE

1 Contexte et objectifs du projet

Mes travaux de recherche sont issus d'une collaboration entre, d'une part, l'équipe de recherche INSERM dirigée par J.-F. Nicolas et M. Vocanson, spécialisée dans l'allergie et l'immunité cutanée, et d'autre part, l'entreprise française DBV Technologies qui développe le patch Viaskin® pour l'immunothérapie épicutanée des allergies alimentaires.

L'objectif général de ce projet de recherche est de mieux comprendre les mécanismes immunitaires associés à l'EPIT afin de mettre en évidence des voies d'amélioration du traitement et/ou de définir des biomarqueurs d'efficacité.

Au cours de ma thèse, je me suis en particulier intéressé aux cellules dendritiques cutanées qui semblent un acteur essentiel entre l'allergène apporté par le patch et la réponse immunitaire induite.

En effet, des résultats publiés en 2011 avaient montré l'absence de passage passif de l'allergène dans la circulation, après l'application d'un patch contenant de l'ovalbumine fluorescente sur une peau intacte de souris allergique. En revanche, l'allergène était pris en charge par les DC cutanées et transporté dans les ganglions lymphatiques (Dioszeghy et al., 2011).

Ces résultats ouvraient alors le champ d'étude sur la contribution des différentes sous-populations de DC cutanées dans l'efficacité du traitement.

L'objectif de ma thèse a donc été de caractériser le phénotype, la dynamique et les fonctions des trois principales sous-populations de DC cutanées (LC, cDC1, cDC2), afin de répondre à deux questions majeures:

1. Quelles populations de cellules dendritiques sont responsables de l'efficacité du traitement ?
2. Quels mécanismes associés aux DC participent à la désensibilisation ?

2 Résultats

Article n°1 : Contribution des cellules de Langerhans à l'efficacité de l'immunothérapie épicutanée

Mes premiers travaux de recherche se sont intéressés au rôle des cellules de Langerhans. En effet, ces cellules localisées dans l'épiderme sont en contact direct avec l'allergène du patch appliqué au cours du traitement par EPIT. Les fonctions des cellules de Langerhans peuvent varier selon le contexte immunitaire et le stimulus reçu. Ainsi, leur contribution à l'efficacité de désensibilisation par EPIT restait inconnue.

Pour étudier le rôle des LC, nous avons utilisé un modèle de désensibilisation chez des souris BALB/c allergiques à l'ovalbumine. Après une application unique d'un patch contenant 100µg d'ovalbumine, nous avons évalué la prise en charge de l'allergène, la maturation, la migration, et la capacité des LC épidermiques à activer des lymphocytes T CD4+ *in vitro*. En outre, l'utilisation d'un modèle transgénique de souris Langerin-DTR nous a permis d'évaluer l'efficacité d'un traitement complet de 8 semaines (application hebdomadaire pendant 48h d'un patch contenant 100µg d'ovalbumine sur la peau intacte du dos), en absence de cellules de Langerhans.

Les principaux résultats de cet article sont les suivants :

- Après l'application d'un patch, les LC prennent en charge l'allergène et migrent dans les ganglions lymphatiques drainants.
- Les LC qui ont migré dans les ganglions drainants activent fortement les LT régulateurs LT_{REG} FoxP3+CD62L+ et LT_{REG} FoxP3^{neg}LAP+ *in vitro*.
- La déplétion *in vivo* des LC au cours d'un protocole d'EPIT empêche la protection clinique lors d'un test de provocation oral.
- Cette absence de protection corrèle avec une absence : (i) d'activation des LT_{REG} FoxP3+, FoxP3^{neg}LAP+, (ii) de baisse des IgE circulantes et (iii) de modulation de la réponse cytokinique de type 2.

Ces travaux nous ont donc permis de démontrer le rôle essentiel des cellules de Langerhans dans la désensibilisation par EPIT.



Antigen Uptake by Langerhans Cells Is Required for the Induction of Regulatory T Cells and the Acquisition of Tolerance During Epicutaneous Immunotherapy in OVA-Sensitized Mice

Vincent Dioszeghy^{1*}, Lucie Mondoulet¹, Leo Laoubi¹, Véronique Dhelft¹, Camille Plaquet¹, Adeline Bouzereau¹, Christophe Dupont² and Hugh Sampson³

¹ DBV Technologies, Montrouge, France, ² Department of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France, ³ DBV Technologies, New York, NY, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Michiko Oyoshi,
Harvard University, United States

Reviewed by:

Baojun Zhang,
Duke University, United States
Harley Y. Tse,
Wayne State University, United States

*Correspondence:

Vincent Dioszeghy
vincent.dioszeghy@
dbv-technologies.com

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance and
Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 31 May 2018

Accepted: 07 August 2018

Published: 03 September 2018

Citation:

Dioszeghy V, Mondoulet L, Laoubi L,
Dhelft V, Plaquet C, Bouzereau A,
Dupont C and Sampson H (2018)
Antigen Uptake by Langerhans Cells
Is Required for the Induction of
Regulatory T Cells and the Acquisition
of Tolerance During Epicutaneous
Immunotherapy in OVA-Sensitized
Mice. *Front. Immunol.* 9:1951.
doi: 10.3389/fimmu.2018.01951

The skin is a major immunologic organ that may induce protection, sensitization or tolerance. Epicutaneous immunotherapy (EPIT) has been proposed as an attractive strategy to actively treat food allergy and has been shown to induce tolerance in sensitized mice through the induction of Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs), especially CD62L⁺ Tregs. Among immune cells in the skin, dendritic cells are key players in antigen-specific immune activation or regulation. The role of different populations of skin DCs in tolerance induction remains to be elucidated. Using OVA-sensitized BALB/c mice, we demonstrated that the application of a patch containing OVA-A647 to the skin resulted in allergen uptake by Langerhans cells (LCs) and CD11b⁺ dermal cDC2 and subsequent migration into skin draining lymph nodes. These 2 populations induced Foxp3 expression in CD4⁺ cells *in vitro*. Only LCs induced LAP⁺ cells and CD62L⁺ Tregs. Using Langerin-eGFP-DTR mice, we analyzed the role of LCs in the mechanisms of tolerance induction by EPIT *in vivo*. Following complete depletion of LCs, a dramatic decrease in the number of OVA⁺ DCs and OVA⁺ CD11b⁺ dermal cDC2 was observed in skin draining lymph nodes 48 h after epicutaneous application. Likewise, 2 weeks of EPIT in non-depleted mice induced Foxp3⁺ Tregs, especially CD62L⁺, and LAP⁺ Tregs in skin draining lymph nodes and spleen, whereas no induction of Tregs was observed in LC-depleted mice. Following 8 weeks of treatment, EPIT-treated mice showed significant protection against anaphylaxis accompanied by a significant increase of Foxp3⁺ Tregs, especially CD62L⁺ Tregs, which was not seen in the absence of LCs. In summary, although both LCs and CD11b⁺ dermal cDC2s could induce regulatory T cells, the absence of LCs during EPIT impaired treatment efficacy, indicating their crucial role in skin-induced tolerance.

Keywords: food allergy, Epicutaneous immunotherapy, mechanisms, skin dendritic cells, Langerhans cells, regulatory T cells

INTRODUCTION

Food allergy is a growing public health concern and manifestations can be severe even life-threatening. Its prevalence increased dramatically during the last decades up to 10% in 2018 (1). There is no approved cure other than strict avoidance of identified foods and availability of self-injectable epinephrine. Allergen-specific immunotherapy aiming at reduction of the sensitivity to an allergen is an attractive strategy to actively treat food allergy. Proposed immunological mechanisms include decreased allergen-specific IgE and increased IgG4 levels, reduced responses of effector CD4⁺ T cells, and induction of regulatory T cells (Tregs). Epicutaneous immunotherapy (EPIT) is a novel therapy that is currently under investigation. Safety and efficacy of Viaskin[®] Peanut in allergic patients has been studied in a recent phase 3 clinical program after positive results in a phase IIb trial (2).

The mechanisms of EPIT have been investigated in animal models of food allergy. In sensitized mice, EPIT with the corresponding allergen induced desensitization (3, 4), protected from allergic gut inflammation (5) and prevented food-induced anaphylaxis (6) and sensitization to new allergens (7). Tregs induced by EPIT are key: the protective effect of EPIT is abrogated by depletion of CD25⁺ cells and is transferred to sensitized mice by the transfer of Tregs (8). EPIT increased CD62L[−] and CD62L⁺ Foxp3⁺ Tregs whereas other immunotherapies induced mainly CD62L[−] Tregs in peanut sensitized mice (9). In a recent study, the sustained protection and bystander effect of EPIT was related to epigenetic modifications in this CD62L⁺ population of Tregs (10).

The unique immunologic features of the skin keratinocytes and antigen-presenting cells might explain the specific induction of this particular population of Tregs by EPIT. Among immune cells in the skin, dendritic cells (DCs) are key players in antigen-specific immune activation or regulation. Skin DCs can be divided into Langerhans cells (LCs) in the epidermis, the superficial layer of the skin, and a different subset of dermal DCs closely related to conventional DCs, which may themselves be divided into cDC1s and cDC2s, identified based on XCR1 and CD11b expression, respectively. It has been shown that cDC1s are more prone to induce a Th1 response and cross-present Ag to CD8⁺ cells, whereas cDC2s are more likely to induce a Th2 response. LCs activate and induce Th17 or Tregs depending on the environmental stimuli (11). In previous studies, we demonstrated rapid allergen uptake by dendritic cells through intact skin leading to down-regulation of allergen-specific responses in sensitized mice treated by EPIT (12). However, the role of the different populations of skin DCs in tolerance induction remains to be elucidated.

Using OVA-sensitized mice, we demonstrated that epicutaneous application of allergen resulted in uptake by LCs and CD11b⁺ dermal cDC2s. After migration into skin draining lymph nodes (sdLNs), both populations could induce Foxp3 expression in CD4⁺ T cells *in vitro*. However, only LCs induced LAP⁺ cells and CD62L⁺ Tregs, and the depletion of LCs significantly decreased the induction of Foxp3⁺ Tregs, especially CD62L⁺ and LAP⁺ Tregs in skin draining lymph

nodes and spleen, compared to non-depleted mice. Moreover, the EPIT-induced protection against anaphylaxis was not seen in the absence of LCs. Thus, although both LCs and CD11b⁺ dermal cDC2 can induce regulatory T cells, the absence of LCs during EPIT reduced the effectiveness of the treatment, indicating their crucial role in skin-induced tolerance.

METHODS

Mice

BALB/c mice were obtained from Charles River (Charles Rivers, Lyon, France). Langerin-DTR mice, obtained from Pr Malissen (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix Marseille Université, INSERM, CNRS UMR, Marseille, France), were back-crossed on a BALB/c background and maintained as breeding colonies at DBV-Technologies. All procedures were performed according to the European Community rules on animal care with permission and ethical approval # 7811 from the French Authorities. Mice were acclimated in the animal facility for 1 week prior to initiating any procedures. Each experiment was reproduced twice independently.

Sensitization

Mice were sensitized on days 0 and 7 with 200 µl of a homogenous suspension of 10 µg of OVA (grade V, Sigma-Aldrich, France) and 2 mg of aluminum hydroxide (Imject[®] Alum, Thermo scientific, France) by subcutaneous administration on the back of the neck. Mice were then boosted intranasally on day 14 with OVA (10 µg).

Measurement of Allergen Capture by Skin DCs

For epicutaneous application, the skin of sensitized mice was shaved with electric clippers and then depilatory cream was applied 24 h before applying the epicutaneous patch. For studies of allergen capture and skin DCs migration, VIASKIN[®] with 100 µg OVA-alexa647 (V-OVA) were applied for indicated times on the back of mice and maintained with a non-occlusive linen. Mice were then sacrificed and skin and skin-draining lymph nodes (sdLN) were harvested.

Skin and sdLN Cell Isolation

Using an insulin microneedle, 8 mm skin biopsies were injected 5–10 times with Liberase TL (250 µg/mL)-DNase (500 µg/mL) solution, placed in 1 ml of Liberase TL-DNase solution in a 24-well plate (dermal side down), and then incubated for 2 h at 37°C in a cell culture incubator (5% CO₂). To stop the enzymatic action at the end of the incubation period, 500 µL of DNase working solution and 75 µl of 0.1 M EDTA were added. Tissues were placed in a Medicon tissue grinder (BD Biosciences) and mixed for 8 min in a Medimachine (BD Biosciences). Cell suspensions were filtered using 50 µm syringe filter (Falcon, BD Biosciences), washed and counted.

Skin draining lymph nodes were harvested in Petri Dishes containing 1 mL RPMI 1640. Then, 1 mL of Liberase TM (0.52 U/mL)/DNase I (50 µg/mL) in RPMI 1640 were added to each Petri Dish. Each LN was flushed using an insulin microneedle

and incubated for 20 min at 37°C. Two hundred fifty microliter of solution of EDTA at 100 mM were added to each Petri Dish to stop the reaction. Lymph node cell suspensions were then obtained by subsequent tissue dissociation and filtration through a cell strainer (100 μ m), washed and counted.

In vitro Tregs Induction Measurement

OVA⁺ migrating LCs and CD11b⁺ DCs were isolated from sdLN cells by magnetic sorting using a CD11c isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) followed by flow cytometry sorting of MHC-II⁺ CD11c⁺ OVA⁺ CD11b⁺ EPCAM⁺ and MHC-II⁺ CD11c⁺ OVA⁺ CD11b⁺ EPCAM⁻, respectively. As control DCs, MHC-II⁺ CD11c⁺ OVA⁻ CD11b⁻ EPCAM⁻ cells were also sorted from the CD11c positive fraction. CD4⁺ cells were sorted from the CD11c negative fraction using CD4 microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France). Each DC subset was then co-culture with CD4⁺ cells at ratio 1:5 in 200 μ L RPMI 1640 supplemented with FCS, penicillin, streptomycin, and β -mercaptoethanol in 96 wells plate. After 6 days, cells were stained for analysis of Foxp3 or LAP Tregs and expression of CD62L.

Epicutaneous Immunotherapy

Sensitized mice were treated weekly with VIASKIN[®] containing 100 μ g OVA for 48 h. Tregs induction was measured after 2 weeks of treatment in sdLN and spleen. For measurement of allergen-specific oral reactivity, sensitized mice treated for 8 weeks or not treated were boosted by oral gavage with 20 mg OVA every 3 days X's 6 before receiving an oral challenge with 50 mg OVA. Animal temperatures were measured before and during challenge using microchips (Plexx IPTT). Single cell suspensions of mouse spleen were obtained by tissue dissociation and filtration through a cell strainer for *in vitro* re-stimulation and cytokine production measurements previously described (ref).

Langerhans Cells Depletion

Langerin-DTR mice were injected i.p. with 0.1 μ g of diphtheria toxin 5 days and 1 day before the first application of VIASKIN[®] and every 2 weeks 24 h before VIASKIN[®] application. This resulted in complete depletion of skin Langerhans cells

throughout the treatment period, as verified by flow cytometry (data not shown).

Flow Cytometry

For DC analysis in the skin and sdLNs, cells were stained with different combinations of the following antibodies: MHC-II-Vioblue, CD11c-PerCPVio700, CD11b-VioGreen, CD11b-PerCPVio700, XCR1-Viobright-FITC, EPCAM-PE, CD86-PE-Vio770, CD86-APC-Vio770, PD-L2-PE-Vio770 (all from Miltenyi Biotec), CD11c-APC-Cy7 (BD Biosciences), XCR1-BV510 (Biolegend). Dead cells were excluded from analysis using Zombie dye (Biolegend) of appropriate color depending of the antibodies used.

For Tregs analysis, cells were stained with combinations of the following antibodies: anti-mouse CD4-FITC (Miltenyi), CD25-APC-Cy7, CD62L-PE-Cy7 (all from BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), Latency-associated peptide (LAP)-PE and Foxp3-APC (from e-Bioscience, Paris, France), or control isotypes. Intracellular staining was performed after fixation and permeabilization, using Foxp3 Perm Kit (e-Bioscience, Paris, France). Dead cells were excluded from analysis using Zombie dye aqua (Biolegend).

Flow cytometry was performed on a MACSquant cytometer and analyzed using FlowJo software.

Statistical Analysis

The GraphPad Prism Software 5.0 (San Diego, CA, USA) was used for statistical analyses. Results are expressed as median with range. Statistical significance comparing different sets of mice were determined by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

RESULTS

Characterization of Dendritic Cells Implicated in Allergen Uptake in OVA Sensitized Mice

To determine which skin DCs take up allergen following epicutaneous application, sensitized mice were treated with

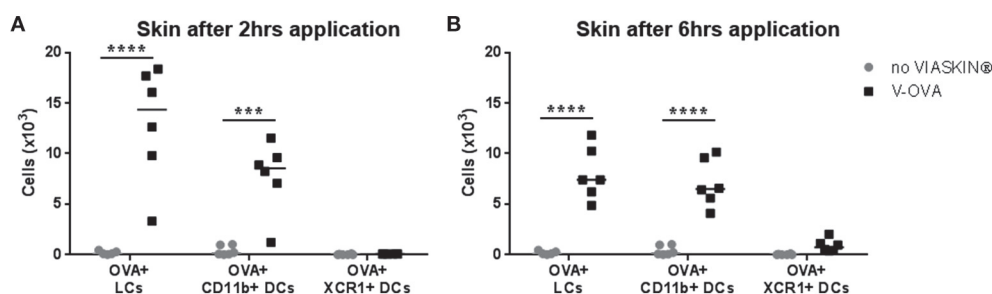


FIGURE 1 | Allergen capture by skin dendritic cells after epicutaneous application. VIASKIN[®]-OVA-AF647 (V-OVA) was applied on the back of sensitized mice for 2 h (A) or 6 h (B). Sensitized not treated mice were used as control (no VIASKIN[®]). Skin were then harvested and counted before immunostaining for flow cytometry analysis. In live single cells gate, migrating DCs were gated as MHC-IIhigh CD11c+ and Langerhans cells (LCs), CD11b⁺ DCs and XCR1⁺ DCs were identified as CD11b⁺EPCAM⁺XCR1⁻, CD11b⁺EPCAM⁻XCR1⁻, and CD11b-EPCAM⁻XCR1⁺, respectively. Proportion of OVA⁺ cells inside each population were measured and reported to number of cells. Each symbol represents a mice and bar represent median. Experiment was reproduced twice independently. *****p* < 0.0001 by 2-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test.

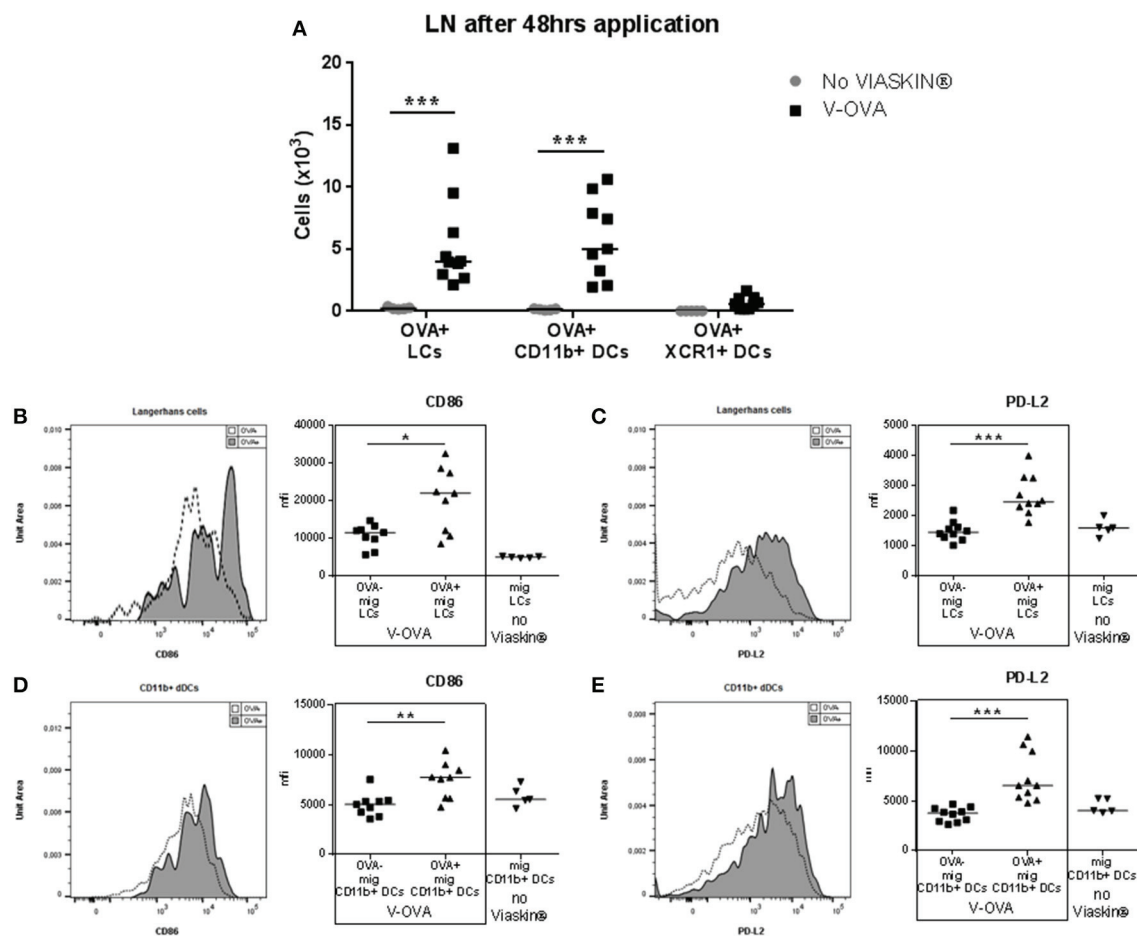


FIGURE 2 | Migration toward draining lymph nodes of skin dendritic cells that capture allergen after epicutaneous application. VIASKIN®-OVA-AF647 (V-OVA) was applied on the back of sensitized mice for 48 h. Sensitized not treated mice were used as control (No VIASKIN®). sdLN were then harvested and cells isolated and counted before immunostaining for flow cytometry analysis. In live single cells gate, migrating DCs were gated as MHC-II^{high} CD11c⁺ and Langerhans cells (LCs), CD11b⁺ DCs and XCR1⁺ DCs were identified as CD11b⁺EPCAM⁺XCR1⁺, CD11b⁺EPCAM⁺XCR1⁺, CD11b⁺EPCAM⁺XCR1⁺, respectively. Proportion of OVA⁺ cells inside each population were measured and reported to number of cells (A). Expression of activation marker CD86 (B,D) and PD-L2 (C,E) were analyzed in OVA⁺ and OVA⁺ LCs or in total migrating LCs in not treated mice (B,C) and in OVA⁺ and OVA⁺ CD11b⁺ DCs or in total migrating CD11b⁺ DCs in not treated mice (D,E). Each symbol represents a mice and bar represent median. Experiment was reproduced twice independently. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

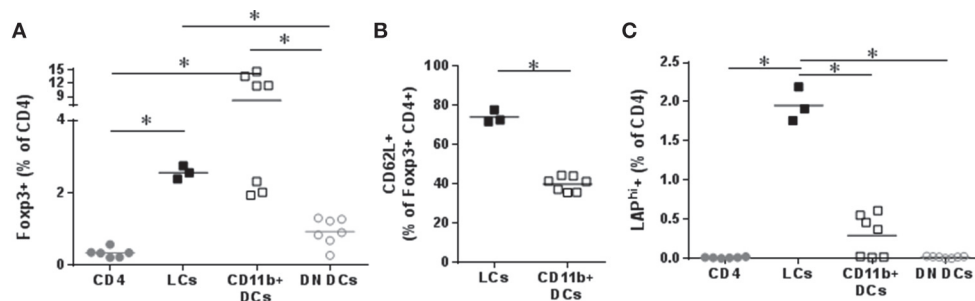


FIGURE 3 | Capacity of skin migrating Dendritic Cells to induce Tregs. VIASKIN®-OVA-AF647 (V-OVA) was applied on the back of sensitized mice for 48 h. sdLN were then harvested and cells isolated and OVA⁺ Langerhans cells (LCs), OVA⁺ CD11b⁺ DCs and OVA⁺ EpCAM⁺ control DCs (DN DCs) were FACS sorted and cultured with CD4⁺ cells for 6 days. Proportion of CD25⁺Foxp3⁺ among CD4⁺ cells (A), of CD62L⁺ among CD25⁺Foxp3⁺ (B) and of LAP^{hi} (C) among CD4⁺ cells were analyzed. Each symbol represents a well and bar represent median from two independent experiments. * $p < 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

VIASKIN[®]-OVA-AF647 for 2 or 6 h. Evaluating OVA⁺ DCs from each subset showed that both LCs and dermal CD11b⁺ DCs (DC2s) captured allergen efficiently after 2 h whereas XCR1⁺ DCs (DC1s) did not (**Figure 1A**). After 6 h of application, OVA⁺ LCs and OVA⁺ CD11b⁺ DCs were still present in the skin, but to a lesser extent suggesting that some cells had already migrated from skin. Extremely low levels of OVA⁺XCR1⁺ cells were detectable even after 6 h of application (**Figure 1B**).

In previous experiments, after application of VIASKIN[®]-OVA on intact skin of OVA-sensitized mice, skin dendritic cell migration toward sdLN peaked after 48 h (12). We then characterized the migration of skin dendritic cells into sdLNs after 48 h. Skin migrating DCs were gated as CD11c⁺ cells expressing high levels of MHC-II. Among skin migrating cells, the 3 subsets were gated using XCR1, CD11b, and EpCAM expression. As expected from results in the skin, OVA was detected in LCs and CD11b⁺ DCs, and to a lesser extent in XCR1⁺ DCs (**Figure 2A**). Skin and sdLN results strongly suggest that allergen uptake following epicutaneous application in sensitized mice is mediated by LCs and CD11b⁺ DCs. We then further analyzed their activation status by evaluating the expression of CD86 and PD-L2. OVA⁺ LCs and OVA⁺ CD11b⁺ DCs had significantly increased expression of CD86, indicating a higher activation status compared to OVA⁻ migrating cells

(**Figures 2B,D**, respectively). Both populations of OVA⁺ cells also expressed significantly higher levels of PD-L2 suggesting a potential tolerogenic capacity (**Figures 2C,E**). As a control for activation, skin DCs migrating to sdLN after application of VIASKIN[®]-OVA on tape-stripped skin expressed higher levels of CD86, but lower levels of PD-L2 (data not shown).

To analyze their tolerogenic potential, we measured LC and DC capacity to induce CD4⁺ cells into regulatory T cells *in vitro*. OVA⁺ LCs and OVA⁺ CD11b⁺ DCs were FACS sorted and co-cultured with CD4 T cells. Both populations significantly increased Foxp3 in CD4 cells *in vitro* compared to CD4 cultured alone or in presence of control DCs (**Figure 3A**). We had previously shown the capacity of EPIT to induce CD62L⁺ Tregs in comparison to other forms of immunotherapy, e.g., oral and sublingual immunotherapy, and checked the proportion of CD62L in *in vitro* induced Tregs. OVA⁺ LCs induced higher levels of CD62L on Foxp3⁺CD4 cells compared to CD11b⁺ DCs (**Figure 3B**). Furthermore, only OVA⁺ LCs significantly increased LAP⁺ CD4 cells *in vitro* (**Figure 3C**) suggesting that LCs are the key players in Tregs induction during EPIT.

The generation of peripheral Tregs requires TGF- β (13). The ability of DCs to activate TGF- β from its “latent” precursor has been recently linked to the expression of specific integrin by DCs in gut, i.e., α V β 8 (14, 15). In sdLN, OVA⁺

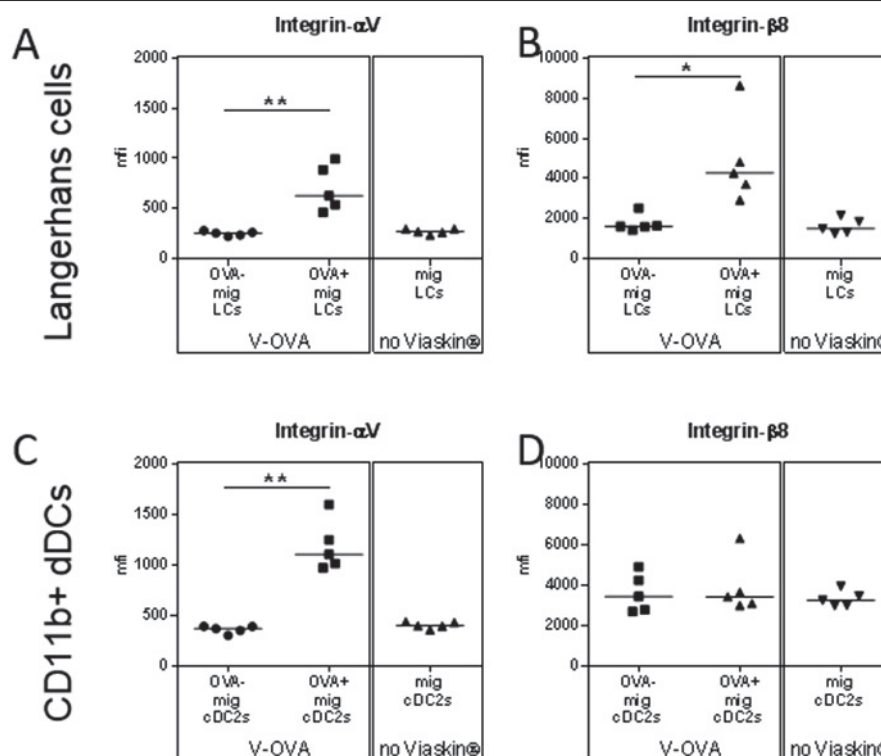


FIGURE 4 | Capacity of skin migrating Dendritic Cells to induce Tregs is mediated by TGF- β . (A–D) VIASKIN[®]-OVA-AF647 was applied on the back of sensitized mice for 48 h. Sensitized not treated mice were used as control (No VIASKIN[®]). sdLN were then harvested and cells isolated and counted before immunostaining for flow cytometry analysis. Expression of integrin α V (A,C) and β 8 (B,D) were analyzed in OVA⁻ and OVA⁺ LCs or in total migrating LCs in not treated mice (A,B) and in OVA⁻ and OVA⁺ CD11b⁺ DCs or in total migrating CD11b⁺ DCs in not treated mice (C,D). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

skin migrating LCs and CD11b⁺ dDCs expressed higher level of integrin alphaV than OVA⁺ or control DCs (Figures 4A,C). OVA⁺ skin migrating LCs also expressed higher level of integrin beta8 compared to OVA⁺ or control LCs whereas CD11b⁺ dDCs did not (Figures 4B,D), suggesting a possible role of integrin beta8, and TGF- β in the capacity of migrating LCs to induce Tregs.

Characterization of the Allergen Uptake in Absence of LCs

To validate the possible role of LCs in the induction of tolerance by EPIT, we compared allergen uptake in sensitized LANG-DTR mice after depletion of LCs. After DT injection, depletion of LCs was confirmed by flow cytometry. As expected, no OVA⁺ LCs was detected following application of VIASKIN-OVA-AF647 in the skin of LC-depleted mice (Figure 5A). DT injection did not alter the CD11b⁺ DCs subset and allergen capture by those cells was no different in the skin of mice not LC-depleted after 2 or 6 h (Figure 5B).

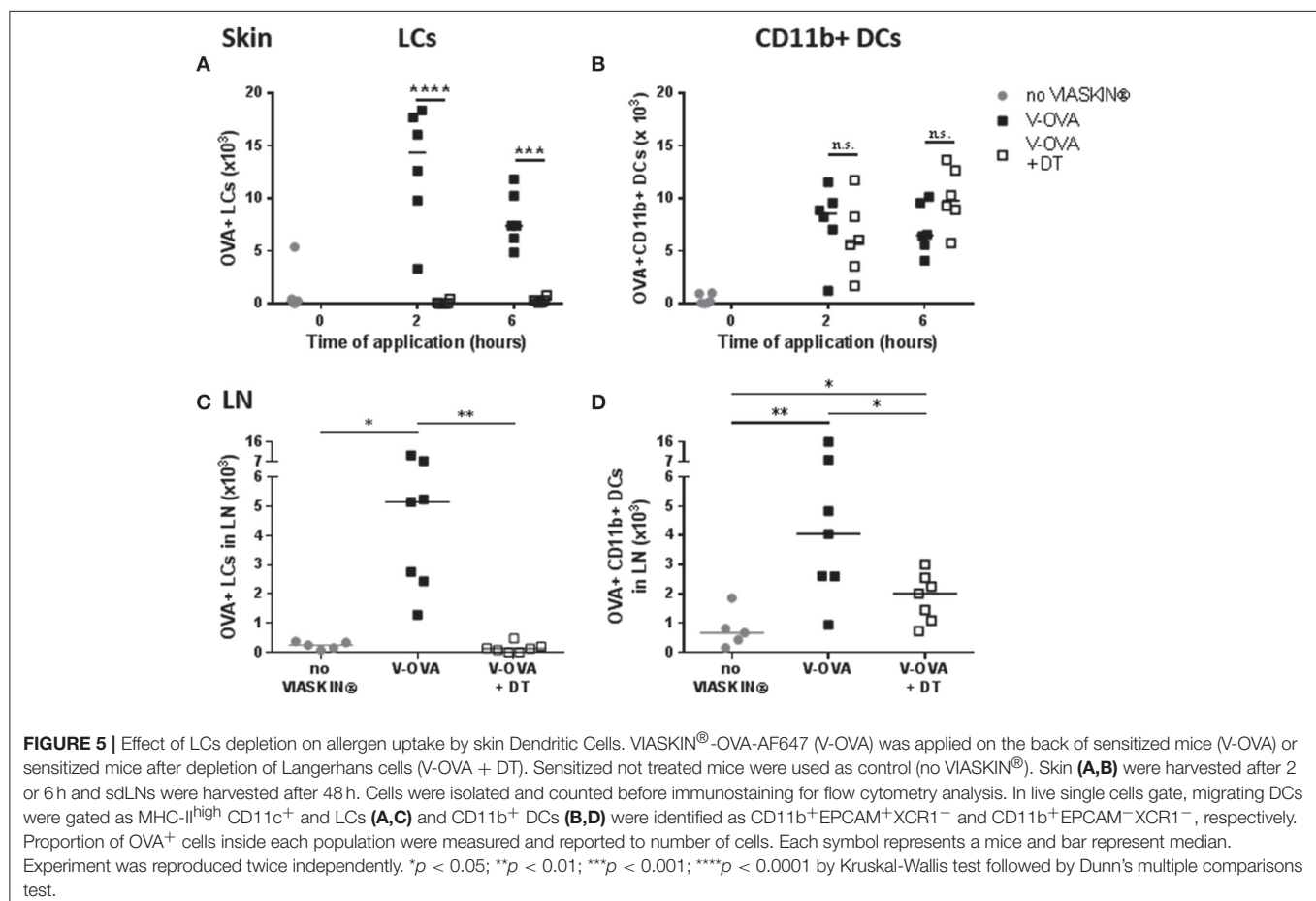
In sdLN, no OVA⁺ LCs were detected, as expected (Figure 5C). Interestingly, LC depletion significantly decreased OVA⁺ CD11b⁺ DCs migration into sdLNs after 48 h (Figure 5D) even though antigen capture in the skin was not altered. This

suggested a possible interaction between LCs and dermal DCs in the skin, that would be needed for CD11b⁺ DCs migration.

Langerhans Cells Are Required for the Induction of Regulatory T Cells *in vivo*

Two weeks' treatment of sensitized mice with EPIT induced a local increase in regulatory T cells. The amount of CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs significantly increased in sdLNs of EPIT treated mice compared to untreated animals (Figure 6A). More specifically, the CD62L⁺ subset of Foxp3⁺ Tregs was induced (Figure 6B). EPIT also induced greater numbers of LAP⁺ Tregs compared to untreated mice (Figure 6C). This induction of Tregs was not limited to local LNs but was also observed in spleen of treated mice compared no untreated animals (Figures 6D–F). In the absence of LCs, no induction of Tregs was observed either in sdLNs or in the spleen (Figure 6) after 2 weeks of treatment.

Since the usual treatment period for EPIT in sensitized mice is 8 weeks, we checked the induction of Tregs in the spleen after 8 weeks of EPIT. We confirmed that DT alone did not alter normal responses as the Control + DT group showed similar levels of CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs and LAP⁺ Tregs, and similar expression of CD62L (Figure 7). As expected, EPIT-treated mice had significantly higher levels of CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs, especially



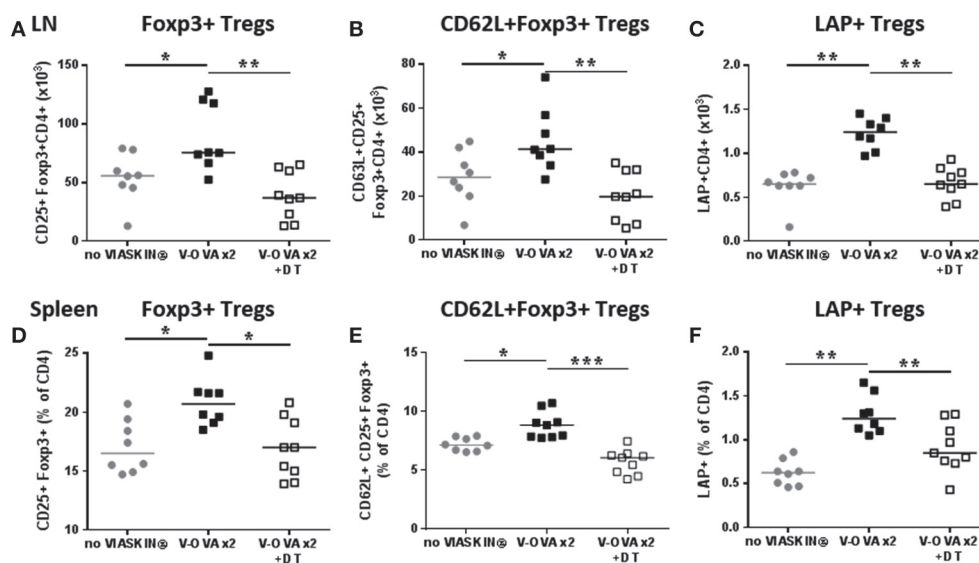


FIGURE 6 | Short term induction of Tregs by EPIT requires LCs. VIASKIN®-OVA (V-OVA) was applied on the back of sensitized mice (V-OVA) or sensitized mice after depletion of Langerhans cells (V-OVA + DT) for 48 h once a week for 2 weeks and level of Tregs was evaluated the week after the 2nd application in sdLN (A–C) and spleen (D–F). Sensitized not treated mice were used as control (no VIASKIN®). Cells were isolated and counted before immunostaining for flow cytometry analysis. Number of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (A), CD4⁺CD62L⁺CD25⁺Foxp3⁺ (B) and CD4⁺LAP⁺ (C) cells in sdLN and proportion of CD25⁺Foxp3⁺ (D), CD62L⁺CD25⁺Foxp3⁺ (E) and LAP⁺ (F) among CD4⁺ cells were analyzed. Each symbol represents a mice and bar represent median. Experiment was reproduced twice independently. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

CD62L⁺ Tregs compared to the Control group (Figures 7A,B). In contrast to mice treated for 2 weeks, no induction of LAP⁺ Tregs was observed after 8 weeks of treatment suggesting that the induction of LAP⁺ cells is transient. In the absence of LCs, no induction of Tregs was observed even after 8 weeks of EPIT treatment, confirming the crucial role of LCs in induction of Tregs by EPIT.

Role of LCs in the Induction of Tolerance by EPIT

To confirm that the induction of Tregs by EPIT is associated with desensitization, the anaphylactic response following oral challenge was evaluated in sensitized mice treated by EPIT and compared to untreated animals. Untreated mice experienced a significant decrease in body temperature (median = −3°C) following oral challenge with OVA compared to naïve mice. Injection of DT did not alter this response. EPIT treated mice showed a −0.85°C drop in body temperature, significantly less than that in untreated mice (Figure 8A). This protection from anaphylaxis was associated with a significant decrease of OVA-specific IgE levels (Figure 8B) and a decrease in cytokine response by *in vitro* re-stimulated splenocytes (Figures 8C–E) from EPIT-treated mice compared to untreated controls.

In mice treated in absence of LCs, oral challenge induced anaphylactic reactions with a significant drop in body temperature of −2.2°C compared to EPIT-treated mice (Figure 8A). EPIT did not induce any decrease of sIgE nor OVA specific cytokine responses when LCS were depleted

(Figures 8B–E). These results support the crucial role of LCs in mechanisms of induction of tolerance by EPIT in sensitized mice.

DISCUSSION

The different populations of skin DCs are key players in antigen-specific immune activation or regulation. Indeed, skin has been proposed as route of sensitization, but perhaps more importantly, is also a way to induce tolerance, as in the case of EPIT. The role of the different population of skin DCs in this tolerance induction requires further clarification. In this study, we demonstrated that both LCs and CD11b⁺ dermal cDC2s can take up allergen in the skin and migrate to draining LN to induce regulatory T cells. However, the absence of LCs during EPIT impaired allergen uptake and Foxp3⁺ Treg induction, especially CD62L⁺ Tregs, resulting in absence of desensitization and protection from oral allergen exposure, indicating their crucial role in skin-induced tolerance.

The role of LCs in inducing allergic responses or suppressing immunity is still controversial. In the steady state, LCs have been shown to induce tolerance to skin antigen (16–18). LCs have also been implicated in Treg expansion in response to antibody-targeted antigen or irradiation (19, 20). Initiation of epicutaneous sensitization with protein antigens depended on LCs (21) whereas skin sensitization to house dust mite depended on dermal cDC2 and was even increased in absence of LCs (22). In our model, we demonstrated that LCs are critical for the induction of Tregs and subsequent desensitization of

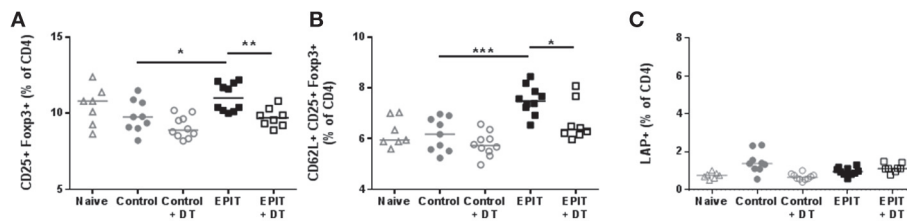


FIGURE 7 | LCs are required for the induction of regulatory T cells. Sensitized mice were treated with VIASKIN® containing 100 µg OVA for 48 h once a week in presence (EPIT) or absence (EPIT + DT) of LCs. Not treated sensitized mice were used as control and effect of DT was also checked in a control group (Control + DT). After 8 weeks of treatment, induction of Tregs was measured by the proportion of CD25⁺Foxp3⁺ (A) and CD62L⁺CD25⁺Foxp3⁺ (B) and LAP⁺ (C) cells among CD4⁺ splenocytes. Each symbol represents a mice and bar represent median. Experiment was reproduced twice independently. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

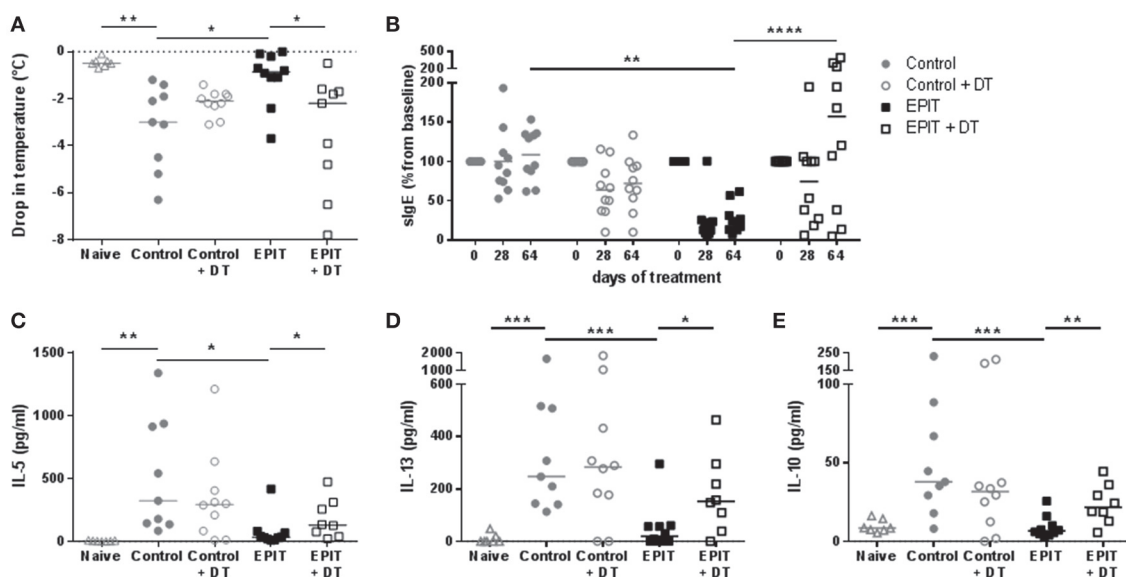


FIGURE 8 | Desensitization induced by EPIT is not observed in absence of LCs. Sensitized mice were treated with VIASKIN® containing 100 µg OVA for 48 h once a week in presence (EPIT) or absence (EPIT + DT) of LCs. Not treated sensitized mice were used as control and effect of DT was also checked in a control group (Control + DT). After 8 weeks, mice were challenged orally and anaphylactic reaction was measured by the drop in temperatures (A). Percentage of OVA-specific IgE compared to baseline was measured after 28 and 64 days of treatment (B). Production of IL-5 (C), IL-13 (D), and IL-10 (E) by *in vitro* restimulated splenocytes isolated at the end of treatment were analyzed. Each symbol represents a mice and bar represent median. Experiment was reproduced twice independently. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (A,C-E); and ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ by 2-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (B).

mice by EPIT, suggesting of tolerogenic capacities of LCs in the context of previously established sensitization. Differences of immunological status and/or keratinocyte activation could explain the divergence concerning the role of LCs between the different models, as we previously observed their impact on allergen uptake (12, 23).

Dermal cDC2s have been previously implicated in IL-17-mediated psoriasis-like response (24). These cells appear critical for the induction of Th2 responses and epicutaneous sensitization to house dust mite (22, 25). On the other hand, cDC2s can suppress antibody production by blocking the development of follicular helper T cells, and inducing Foxp3⁺ Tregs (26, 27). In our model, dermal CD11b⁺ cDC2s were as

efficient as LCs in taking up allergen following epicutaneous application and migrating into sdLNs. Moreover, migrating cDC2s could induce Foxp3⁺ Tregs, suggesting that they may play a role in tolerance induction during EPIT. However, these cells are not sufficient since depletion of LCs without alteration of the CD11b⁺ DC compartment failed to induce Tregs *in vivo*. We can postulate that cDC2s play a role in the mechanisms of induction of Tregs in sensitized mice in which they need interaction of LCs to be fully activated and to migrate. Indeed, depletion of LCs did not alter allergen capture by skin cDC2s, but did impair their migration into sdLNs. Interaction between LCs and dermal DCs may be needed for optimal migration of dermal DCs. Cooperation of LCs and dermal DCs has

been observed previously in the induction of Th2 responses (28), and migrating LCs can also interact with DCs to induce DC maturation and antigen transfer (29). Further studies are required to decipher the possible interactions between these populations and by which mechanisms LCs cooperate with DCs.

In addition to the possible interactions between LCs and dermal DCs, cDC2s were not sufficient to induce Tregs and provide protection *in vivo* because particular Treg populations implicated in EPIT were not induced by cDC2s. *In vitro*, migrating cDC2s induced Foxp3⁺ Tregs, but low levels of LAP⁺ Tregs. The induction of LAP⁺ Tregs has been observed during EPIT in different models (6, 9). The absence of induction of these LAP⁺ Tregs by CD11b⁺ DCs could explain the absence of protection observed after depletion of LCs. Noteworthy, the induction of LAP⁺ Tregs seems transient in this model with a significant increase following 2 weeks of treatment, which is no longer observed after 8 weeks of treatment either in the sdLN or in the spleen. The LAP⁺ Tregs may participate in the first mechanistic steps of EPIT to induced CD25⁺Foxp3⁺ Tregs that are crucial for efficacy of EPIT (8).

One unique feature of EPIT is its ability to induce both CD62L⁺ and CD62L⁻ Foxp3⁺ Tregs, whereas only CD62L⁻ Tregs are induced by other immunotherapies (oral and sublingual) in our models (9). This population of CD62L⁺ Tregs seems central to the mechanism of EPIT given the epigenetic modification, i.e., foxp3 demethylation, the sustained protection and the bystander effect, which were recently shown to be features of the CD62L⁺ population of Tregs (10). Migrating LCs induced significantly more CD62L⁺ Tregs than cDC2s *in vitro* and the depletion of LCs abrogated any induction of CD62L⁺ Tregs *in vivo*. Given the importance of this particular population of Tregs in EPIT, the capacity of LCs to induce them may explain their crucial role in efficacy of EPIT.

As previously shown for gut DCs (14, 15), skin migrating LCs, but not cDC2s, expressed higher level of integrin beta8, suggesting that requirement of LCs to induce particular

population of Tregs could be due to their capacity to activate TGF- β . However, further experiments are needed to decipher the exact role of this pathway in mechanism of induction of Tregs during EPIT.

This unique property of cutaneous LCs is also distinguished from the induction of Tregs with sublingual immunotherapy (SLIT). Although Langerhans-like cells are present in the oral mucosa, studies of allergen uptake during SLIT in an animal model demonstrated an important role for both CD11b⁺ DCs and CD11b⁺ macrophage-like cells (30, 31). These populations of APCs support the differentiation of Tr1 cells. Thus, the difference of Tregs induced by EPIT compared to SLIT may be explained by the intrinsic difference of APC implicated in these different routes of treatment. Similarly, subcutaneous immunotherapy, which “bypasses” the epidermis and resident LCs, induces Tr1 cells, suggesting the importance of LCs, and epicutaneous route for induction of the CD62L⁺ population of Tregs.

In conclusion, we demonstrated that during EPIT of sensitized mice, allergen is taken up by LCs and dermal cDC2s that migrate to the sdLNs to induce Tregs. However, the capacity to induce both CD62L⁺ Foxp3⁺ Tregs and LAP⁺ Tregs reside mainly in LCs. Indeed, the absence of LCs during EPIT decreased treatment efficacy indicating their crucial role in skin-induced tolerance.

ETHICS STATEMENT

Project license from French authorities #7811.

Comité d’Ethique en Expérimentation Animale de DBV Technologies N°127 (CEEA127).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ViD wrote the article and is corresponding author. LM had valuable contribution to the underlying concept and the design of the research. LL, Véd, CP, and AB performed the experiments and some analysis. CD and HS (senior author) had valuable contribution to the underlying concept and the design of the research.

REFERENCES

1. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol.* (2018) 141:41–58. doi: 10.1016/j.jaci.2017.11.003
2. Sampson HA, Shreffler WG, Yang WH, Sussman GL, Brown-Whitehorn TF, Nadeau KC, et al. Effect of varying doses of epicutaneous immunotherapy vs placebo on reaction to peanut protein exposure among patients with peanut sensitivity: a randomized clinical trial. *JAMA* (2017) 318:1798–809. doi: 10.1001/jama.2017.16591
3. Mondoulet L, Dioszeghy V, Ligouis M, Dhelft V, Dupont C, Benhamou, PH. Epicutaneous immunotherapy on intact skin using a new delivery system in a murine model of allergy. *Clin Exp Allergy* (2010) 40:659–67. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03430.x
4. Mondoulet L, Dioszeghy V, Vanoirbeek JA, Nemery B, Dupont C, Benhamou, P.-H. Epicutaneous immunotherapy using a new epicutaneous delivery system in mice sensitized to peanuts. *Int Arch Allergy Immunol.* (2011) 154:299–309. doi: 10.1159/000321822
5. Mondoulet L, Dioszeghy V, Larcher T, Ligouis M, Dhelft V, Puteaux E, et al. Epicutaneous immunotherapy (EPIT) blocks the allergic esophago-gastroenteropathy induced by sustained oral exposure to peanuts in sensitized mice. *PLoS One* (2012a) 7:e31967. doi: 10.1371/journal.pone.0031967
6. Tordesillas L, Mondoulet L, Blázquez AB, Benhamou, P.-H., Sampson HA, Berin MC. Epicutaneous immunotherapy induces gastrointestinal LAP⁺ Tregs and prevents food-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* (2017) 139:189.e4–201. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.057
7. Mondoulet L, Dioszeghy V, Puteaux E, Ligouis M, Dhelft V, Plaquet C, et al. Specific epicutaneous immunotherapy prevents sensitization to new allergens in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* (2015) 135:1546–57. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.028
8. Dioszeghy V, Mondoulet L, Dhelft V, Ligouis M, Puteaux E, Dupont C, et al. The regulatory T cells induction by epicutaneous immunotherapy is sustained and mediates long-term protection from eosinophilic disorders in peanut-sensitized mice. *Clin Exp Allergy* (2014) 44:867–81. doi: 10.1111/cea.12312
9. Dioszeghy V, Mondoulet L, Puteaux E, Dhelft V, Ligouis M, Plaquet C, et al. Differences in phenotype, homing properties and suppressive activities of regulatory T cells induced by epicutaneous, oral or sublingual

- immunotherapy in mice sensitized to peanut. *Cell Mol Immunol.* (2016) 13:1–13. doi: 10.1038/cmi.2016.14
10. Mondoulet L, Dioszeghy V, Busato F, Plaquet C, Dhelft V, Bethune K, et al. Gata3 hypermethylation and Foxp3 hypomethylation are associated with sustained protection and bystander effect following epicutaneous immunotherapy in peanut-sensitized mice. *Allergy* (2018). doi: 10.1111/all.13479. [Epub ahead of print].
 11. Kashem SW, Haniffa M, Kaplan DH. Antigen-presenting cells in the skin. *Annu. Rev. Immunol.* (2017) 35:469–99. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052215
 12. Dioszeghy V, Mondoulet L, Dhelft V, Ligouis M, Puteaux E, Benhamou, PH., et al. Epicutaneous immunotherapy results in rapid allergen uptake by dendritic cells through intact skin and downregulates the allergen-specific response in sensitized mice. *J Immunol.* (2011) 186:5629–37. doi: 10.4049/jimmunol.1003134
 13. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei, KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25[−] naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* (2003) 198:1875–86. doi: 10.1084/jem.20030152
 14. Païdassi H, Acharya M, Zhang A, Mukhopadhyay S, Kwon M, Chow C, et al. Preferential expression of integrin $\alpha\beta 8$ promotes generation of regulatory T cells by mouse CD103⁺ dendritic cells. *Gastroenterology* (2011) 141:1813–20. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.076
 15. Boucard-Jourdin M, Kugler D, Endale Ahanda, ML, This S, De Calisto J, Zhang A, et al. $\beta 8$ integrin expression and activation of TGF- β by intestinal dendritic cells are determined by both tissue microenvironment and cell lineage. *J Immunol.* (2016) 197:1968–78. doi: 10.4049/jimmunol.1600244
 16. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2002) 99:351–8. doi: 10.1073/pnas.231606698
 17. Clausen BE, Kel JM. Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? *Immunol Cell Biol.* (2010) 88:351–60. doi: 10.1038/icb.2010.40
 18. Kitashima DY, Kobayashi T, Woodring T, Idouchi K, Doebel T, Voisin B, et al. Langerhans cells prevent autoimmunity via expansion of keratinocyte antigen-specific regulatory T cells. *EBioMedicine* (2018) 27:293–303. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.12.022
 19. Flacher V, Tripp CH, Mairhofer DG, Steinman RM, Stoitzner P, Idoyaga J, et al. Murine Langerin⁺ dermal dendritic cells prime CD8⁺ T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance. *EMBO Mol Med.* (2014) 6:1191–204. doi: 10.15252/emmm.201303283
 20. Price JG, Idoyaga J, Salmon H, Hogstad B, Bigarella CL, Ghaffari S, et al. CDKN1A regulates Langerhans cell survival and promotes Treg cell generation upon exposure to ionizing irradiation. *Nat Immunol.* (2015) 16:1060–8. doi: 10.1038/ni.3270
 21. Nakajima S, Igyártó BZ, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Hara-Chikuma M, et al. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol.* (2012) 129:1048.e6–55. doi: 10.1016/j.jaci.2012.01.063
 22. Deckers J, Sichien D, Plantinga M, van Moorleghe J, Vanheerswynghe M, Hoste E, et al. Epicutaneous sensitization to house dust mite allergen requires interferon regulatory factor 4-dependent dermal dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* (2017) 140:1364.e2–77. doi: 10.1016/j.jaci.2016.12.970
 23. Mondoulet L, Dioszeghy V, Puteaux E, Ligouis M, Dhelft V, Letourneur F, et al. Intact skin and not stripped skin is crucial for the safety and efficacy of peanut epicutaneous immunotherapy (EPIT) in mice. *Clin Transl Allergy* (2012b) 2:22. doi: 10.1186/2045-7022-2-22
 24. Kim, T.-G., Kim SH, Park J, Choi W, Sohn M, Na HY, et al. Skin-Specific CD301b⁺ dermal dendritic cells drive IL-17-mediated psoriasis-like immune response in mice. *J Invest Dermatol.* (2018) 138:844–53. doi: 10.1016/j.jid.2017.11.003
 25. Gao Y, Nish SA, Jiang R, Hou L, Licona-Limón P, Weinstein JS, et al. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* (2013) 39:722–32. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.028
 26. Williams M, Crozat K, Henri S, Tamoutounour S, Grenot P, Devillard E, et al. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103[−] dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *Blood* (2010) 115:1958–68. doi: 10.1182/blood-2009-09-245274
 27. Kumamoto Y, Hirai T, Wong PW, Kaplan DH, Iwasaki A. CD301b⁺ dendritic cells suppress T follicular helper cells and antibody responses to protein antigens. *Elife* (2016) 5:e17979. doi: 10.7554/eLife.17979
 28. Cho Y, Kwon D, Kang, SJ. The cooperative role of CD326⁺ and CD11b⁺ dendritic cell subsets for a hapten-induced Th2 differentiation. *J Immunol.* (2017) 199:3137–46. doi: 10.4049/jimmunol.1601262
 29. van den Berg LM, Cardinaud S, van der Aar AM, Sprokholt JK, de Jong MA, Zijlstra-Willems EM, et al. Langerhans cell-dendritic cell cross-talk via langerin and hyaluronic acid mediates antigen transfer and cross-presentation of HIV-1. *J Immunol.* (2015) 195:1763–73. doi: 10.4049/jimmunol.1402356
 30. Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol.* (2008) 122:603.e5–9. doi: 10.1016/j.jaci.2008.06.034
 31. Mascarell L, Saint-Lu N, Moussu H, Zimmer A, Louise A, Lone Y, et al. Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunol.* (2011) 4:638–47. doi: 10.1038/mi.2011.28

Conflict of Interest Statement: This study was supported by DBV Technologies, the developer and owner of Viaskins. ViD, LM, LL, Véd, CP, AB, HS are DBV Technologies employees. CD received honoraria and/or compensation with regard to the study, as investigators, coordinators or experts, in relation with the time spent on the study.

Copyright © 2018 Dioszeghy, Mondoulet, Laoubi, Dhelft, Plaquet, Bouzereau, Dupont and Sampson. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article n°2 : Spécialisation fonctionnelle des cDC2 et des LC au cours d'EPIT

Basé sur notre première étude, nous avons ensuite cherché à comprendre si les cDC2 et cDC1 dermiques jouaient également un rôle dans la désensibilisation. En effet, la déplétion des cellules de Langerhans (modèle Lang-DTR) au cours d'EPIT réduisait aussi la migration vers les ganglions lymphatiques des cDC2 CD11b+, qui captent l'allergène dans la peau après l'application d'un patch (Dioszeghy et al. 2018). Ce modèle ne permettait donc pas d'exclure un rôle potentiel des différentes DC dermiques (cDC1 et cDC2) dans l'efficacité de la désensibilisation. Nous avons donc fait l'hypothèse que les DC dermiques pouvaient également participer à l'efficacité d'EPIT.

En outre, dans notre étude précédente, nous nous étions intéressés au phénotype d'activation et à la fonction des LC après l'application d'un seul patch. Or, des études réalisées chez des patients allergiques au cours d'un traitement par SLIT, ont démontré l'acquisition progressive d'un phénotype tolérogène (Gueguen et al., 2016; Zimmer et al., 2012). L'acquisition d'un phénotype et de fonctions tolérogènes est sans aucun doute un élément majeur de l'efficacité des protocoles d'EPIT et ceci pourrait servir de biomarqueurs afin de prédire la réponse des patients au traitement. Nous avons donc cherché à établir à quel moment, et comment, le phénotype et les fonctions des DC cutanées sont modulés au cours du protocole d'EPIT. A ce titre, nous avons postulé que la modulation fonctionnelle des DC contribue à l'induction de LT_{REG} et à la déviation immunitaire associées à la protection clinique.

Pour explorer ces deux hypothèses, nous avons capitalisé sur un modèle de souris C57BL/6J allergiques à l'ovalbumine. Après 1, 3, et 8 semaines de traitement par EPIT, nous avons analysé le phénotype et les fonctions des LC, cDC2 et cDC1 dans la peau et après migration avec l'allergène dans les ganglions lymphatiques drainants. Nous avons également mis en place des tests de fonctionnalité *in vitro* (systèmes de coculture de DC et de lymphocytes T CD4+). Nos principaux résultats démontrent que :

- La désensibilisation clinique par EPIT est effective dès 3 semaines de traitement (et confirmée à 8 semaines).

- Le traitement par EPIT induit des LT_{REG} FoxP3+, LT_{REG} LAP+ associés à une baisse d'activation de LT spécifiques après 3 semaines.
- En parallèle, la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 par les LT CD4+ spécifiques diminue avec l'EPIT au profit de l'IL-10 et l'IL-17.
- La fréquence de capture de l'OVA dans la peau par les LC, cDC2, cDC1 est constante au cours du traitement. Le nombre de LC détectées dans la peau est augmenté avec l'EPIT.
- La migration des sous-populations de DC OVA+ est maintenue au cours du traitement (1, 3 et 8 semaines d'EPIT).
- Néanmoins, leur état d'activation est profondément modulé (modulation de l'expression de CD86, CD40 ou PD-L2 ; baisse de la quantité d'OVA captée par les LC et cDC2).
- Fonctionnellement, les LC démontrent une capacité intrinsèque d'activation des LT_{REG} augmentée avec l'EPIT, tandis que celle des cDC2 est notable mais constante.
- Cependant, les cDC2 induisent une réponse lymphocytaire Th1 et Th17 au détriment d'une réponse Th2.
- Les cytokines IFN- γ et IL-17 démontrent des propriétés inhibitrices de la dégranulation des mastocytes *in vitro*.

Ces travaux démontrent l'acquisition progressive d'un phénotype tolérogène des DC cutanées au cours du traitement et suggèrent un rôle complémentaire des cDC2 et des LC dans l'efficacité de la désensibilisation induite par EPIT.

Distinct phenotype and functions of Langerhans cells and dermal dendritic cells during epicutaneous allergen immunotherapy

Léo Laoubi^{1,2}, Morgane Lacoffrette¹, Séverine Valsesia¹, Vanina Lenief¹, Aurélie Guironnet-Paquet¹, Amandine Mosnier¹, Gwendoline Dubois¹, Anna Cartier¹, Laurine Monti¹, Jacqueline Marvel¹, Eric Espinosa³, Bernard Malissen⁴, Sandrine Henri⁴, Lucie Mondoulet², Hugh A. Sampson^{2,5}, Audrey Nosbaum^{1,6}, Jean-François Nicolas^{1,6}, Vincent Dioszeghy^{2*} and Marc Vocanson^{1*}

¹ CIRI-Centre International de Recherche en Infectiologie; INSERM, U1111; Univ Lyon; Université de Lyon 1; Ecole Normale Supérieure de Lyon; CNRS, UMR 5308, Lyon, France

² DBV Technologies, Montrouge, France.

³ Inserm, U1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Toulouse F-31037, France; Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse F-31062, France

⁴ Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix Marseille Université, INSERM, CNRS, 13288 Marseille, France

⁵ Department of Pediatrics, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA.

⁶ Allergology and Clinical Immunology Department, Lyon Sud University Hospital, Pierre Bénite, France.

*Equal contributors

Correspondence:

Marc Vocanson, CIRI-INSERM U1111, 21 avenue Tony Garnier 69007 Lyon, France

Tel:+33 437 28 23 48; e-mail address: marc.vocanson@inserm.fr

Short title: Contribution of skin dendritic cell subsets to epicutaneous immunotherapy

Conflict of interest statement:

LL, VD, LM, and HAS are current or former employees of DBV technologies. ML, SV, VL, AM, AGP, AM, GD, AC, LM, EE, BM, SH, JM, AN, JFN and MV are public employees from INSERM or Lyon's University.

Abbreviations

BMDC: bone-marrow-derived dendritic cell

cDC: Conventional DC

CTV: Cell trace violet

dLN: Draining lymph node

DC: Dendritic cell

DT: Diphtheria toxin

EPIT: Epicutaneous immunotherapy

FA: Food allergy

Ig: Immunoglobulin

IFN: interferon

IL: Interleukin

IT: Immunotherapy

i.v. : Intravenous

LC: Langerhans cells

MFI: Median fluorescence intensity

MHC: Major histocompatibility complex

migDC: migratory DC

mMCP-1: Mucosal mast cell protease-1

OVA: Ovalbumin

SkDC: Skin DC

T_{EFF/MEM}: effector/memory T lymphocyte

T_{REG}: regulatory T cells

TGF- β : transforming growth factor- β

Abstract

Background: Epicutaneous immunotherapy (EPIT) protocols have recently been developed to restore tolerance in patients with food allergy (FA). The mechanisms by which EPIT protocols promote desensitization rely on a profound immune deviation of pathogenic T and B cell responses.

Objective: To date, little is known about the contribution of skin dendritic cells (skDCs) to T cell remodelling and EPIT efficacy.

Methods: We capitalized on a preclinical model of FA to ovalbumin (OVA), in which allergic C57BL/6 mice were desensitized by 8 weekly 48h-applications of OVA-containing patches. The phenotype and functions of OVA⁺ skDCs were monitored throughout the course of EPIT by flow cytometry and *in vitro* DC-T-cell co-culture assays.

Results: Our results demonstrated that all skDCs (Langerhans cells (LCs), dermal conventional cDC1 and cDC2) subsets maintained their capacity to capture OVA in the skin and to migrate towards the skin-draining lymph nodes during EPIT. However, their activation status and stimulatory properties were significantly impaired, as shown by the gradual and selective reduction of CD86, CD40, and OVA expression in the different subsets of migratory DCs. Interestingly, we observed that OVA⁺ LCs progressively lost their capacity to prime CD4⁺ T_{EFF}, but gained T_{REG} stimulatory properties upon EPIT. In contrast, cDC1 were inefficient in priming CD4⁺ T_{EFF} or reactivating T_{MEM} *in vitro*, while cDC2 retained moderate stimulatory properties throughout EPIT, and progressively biased type-2 immunity (IL-4, IL-5, IL-13) towards type-1 (IFN- γ) and type-17 (IL-17) responses.

Conclusions: Our results therefore emphasize that the acquisition of distinct phenotypic and functional specializations by skDCs during EPIT is at the cornerstone of the desensitization process.

Keywords: Food allergy, skin dendritic cells, allergen immunotherapy, epicutaneous desensitization, T cell responses

Introduction

Food allergy (FA) is defined as an adverse effect resulting from a specific immune response that occurs reproducibly upon exposure to a given food. It is estimated that 3 to 6% of the global population is affected by FA, which has a strong impact on their quality of life ¹.

FA symptoms are many and varied. They manifest as digestive pain, diarrhea, cutaneous oedema or ocular signs, and in severe cases, as life-threatening anaphylaxis. They develop in sensitized individuals as a result of mast cells (MC) and basophils degranulation, in response to interactions of food allergens with specific IgE antibodies bound to their high affinity FcεRI receptors²⁻⁴.

Currently, there is no effective treatment to FA, which forces FA patients to strictly avoid allergens. However, allergen-specific immunotherapy (AIT) protocols have been recently developed and clinically tested. These protocols aim to improve patient's tolerance to allergen, in order to avoid the development of anaphylaxis in patients at-risk. They are based on the repeated exposure to low doses of allergens, to re-induce progressive and long-term immune tolerance⁵. Depending on AIT protocols, food allergens can be (re)administrated through the sublingual, oral or epicutaneous route. Among them, the daily application of peanut-containing patches (Viaskin®) on the healthy skin of young allergic children has recently shown a significant improvement in their tolerance to peanut intake after 1 year ^{6,7}, demonstrating the value of the epicutaneous route for effective AIT. Besides, epicutaneous IT (EPIT) has the advantage of limiting the systemic spread of allergens, which reduces the risk of adverse events during IT.

The mechanisms by which EPIT protocols induce immune desensitization in FA individuals are analogous to the mechanisms delineated for other AIT. They rely on two key phenomena: the induction of regulatory T cells (T_{REG}) and a profound immune deviation of pathogenic T and B cell responses. Both were reported to limit mast cell and basophil re-activation and thus the allergic symptoms ^{8,9,10-21}. Two categories of T_{REG} play a critical role during EPIT: FOXP3⁺CD25⁺ T_{REG} ¹² and FOXP3⁻ LAP⁺ T_{REG} (also known as TH3 cells) ¹⁰. FOXP3⁺CD25⁺ T_{REG} favour the reinduction of tolerance in preclinical models of EPIT by inhibiting the expansion of allergen-specific effector/memory T cells (T_{EFF/MEM}), through mechanisms depending on transforming growth factor (TGF)-β and cytotoxic T-lymphocyte

associated protein (CTLA)-4¹², while FoxP3⁺ LAP⁺ T_{REG} would inhibit mast cell/basophil reactivation through TGF- β secretion¹⁰. In addition, EPIT protocols are classically associated with a significant remodelling of antibody responses, with a rapid and robust increase in IgG4 levels in human (or IgG1 and IgG2a levels in the mouse system), and a long-term decrease (after an initial rise) in specific IgE pools^{6,12,22,23}. However, it is not clear whether EPIT protocols promote the rise of Th1 cell responses, as suggested in other IT protocols^{24,25}.

Increasing experimental evidence suggests that skin DCs (skDCs), which are considered to be the primary targets of EPIT protocols, are central to the desensitization process^{26,27}. SkDCs are classically divided into 3 major subsets, based on their localization, ontogeny and phenotypic marker expression^{28–31}: (i) Langerhans cells (LCs) in the epidermis, and conventional DCs (cDCs) 1 and 2 in the dermis. LCs are characterized by the expression of Langerin and dermal cDC1s and cDC2s by XCR1/IRF8 and SIRP α /IRF4 markers, respectively. We have recently demonstrated in a mouse model of FA desensitization, that all skDC subsets capture the allergen upon EPIT, and next migrate towards the dLNs to reactivate allergen-specific T_{EFF/MEM} or T_{REG}^{27,32}. Besides, we have demonstrated that LCs are instrumental to the desensitization process, as clinical protection is abrogated in LC-depleted models. In absence of LCs, there is no T_{REG} (both FoxP3⁺ and LAP⁺ subsets) increase upon allergen exposure, compared to wild-type animals, and no modulation in OVA-specific Th2 response, suggesting the existence of a major LC- T_{REG} axis to induce tolerance³². By contrast, to date, it is not clear whether dermal cDC2s and cDC1s complement or antagonize LC functions during the desensitization process. cDC2, which are strong Th2 response inducers³³, stimulate FoxP3⁺ T_{REG} proliferation after 1 or 2 weeks of EPIT treatment³². But at this stage, when animals were tested for tolerance induction, there was no improvement in clinical protection, which calls into question the exact mechanisms leading to protection. Similarly, it is not recognized whether cDC1, which are known to preserve skin tolerance to self-antigens³⁴, can also boost T_{REG} proliferation or immune deviation and favour tolerance during EPIT. In fact, very few is known about the phenotypic and functional changes of skin DCs throughout EPIT protocols. skDCs are probably progressively tolerized with repeated allergen exposure, as suggested for blood DCs collected in some IT patients^{35,36}, but it remains to precisely evaluate how these changes influence T and B cell response during EPIT,

and how they provide clinical benefits. Moreover, the respective contribution of each skin DC subset remains to be firmly established.

Here, we capitalized on a preclinical model of FA to ovalbumin (OVA), in which C57BL/6J allergic mice were desensitized by the repeated applications of OVA-containing patches, to longitudinally monitor the phenotype and functions of OVA⁺ skDC subsets during EPIT. Our results highlight an underestimated modulation of skDC specialization after repeated allergen contacts, which indicates that there is a clear division of labour between skDC subsets and the mechanisms by which they remodel T cell responses to lead to individual desensitization.

Results

Progressive remodelling of OVA-specific T cell response correlates with EPIT-induced clinical protection

C57BL/6J mice allergic to OVA were progressively desensitized by 8 weekly 48h-skin applications of OVA-containing patches (**Fig 1A**). In this model, animals treated by EPIT showed a better tolerance to allergen re-exposure 15 days after the last patch application, as illustrated by the lower temperature drop (a major clinical hallmark of anaphylaxis in mice) (**Fig 1B-C**) and the lower mMCP-1 (a major serum biomarker of mast cell degranulation) production (**Fig 1D**) upon i.p. OVA challenge. Importantly, time course experiments demonstrated that tolerance re-induction was observable as soon as the 3rd week of treatment, indicating that key tolerance events start well before the end of the desensitization protocol (**Fig 1B-D**).

To correlate symptom improvement with underlying immunity, we next assessed the proliferation of CD4⁺ T_{EFF/MEM} at different intervals of EPIT protocol. Before EPIT, we detected 2% of dLN T_{EFF/MEM} CD4⁺FoxP3⁺CD44⁺Ki67⁺ showing the basal proliferation in allergic mice. A significant rise in the percentage of proliferating T_{EFF/MEM} was recorded after the first patch application, which significantly decreased after 3 and 8 weeks of treatment (**Fig 1E**). In parallel, we analysed the priming of OVA-specific reporter T cells (CD45.2⁺ OT-II cells ³⁷) 8 days after their adoptive transfer in congenic (CD45.1⁺ mice) allergic recipients receiving EPIT (**Fig S1A**). We observed a robust drop in OT-II cell proliferation (percentage of CTV^{low} cells among the total CD45.2⁺ cell fraction) when donor cells were transferred before the 3rd and 8th patches comparatively to the 1st patch (**Fig S1B-C**). As control, we detected very low OT-II cell proliferation in non-patched animals (**Fig S1B-C**). Altogether, these results demonstrate that there is a progressive regulation of T_{EFF/MEM} (re)expansions during EPIT. The 1st patch induces a robust (re)expansion of allergen-specific T_{EFF/MEM}, which become weaker and weaker with repeated applications. Nevertheless, such (re)expansions were not completely inhibited at the end of EPIT protocol, as shown by the substantial number of dLN CD4⁺FoxP3⁺Ki67⁺ cells at week 8 (**Fig 1F**).

To determine if the desensitization protocol also induced changes in $T_{\text{EFF/MEM}}$ polarization, dLN T cells collected one week after the 1st, 3rd and 8th patch were reactivated *ex vivo* for 3 days with OVA-pulsed bone-marrow-derived DCs (BMDCs). A strong inhibition of IL-5 and IL-13 secretion was detected in cultures from EPIT-treated groups (**Fig 1G**). By contrast, a parallel increase in IL-10 and IL-17 secretion, and a relatively stable production of IL-4 and IFN- γ was also detected (**Fig 1G**). These results thus confirm that the functions of allergen-specific $T_{\text{EFF/MEM}}$ that are reactivated at late intervals of EPIT protocol are not completely inhibited. By contrast those cells are progressively biased from a prominent type-2 immunity towards a mixed type-17 and type-1 phenotype, following patch repetition.

Robust accumulation of T_{REG} subsets along EPIT

In parallel to the $T_{\text{EFF/MEM}}$ response, we also analysed the expansion of T_{REG} cells during EPIT. Conversely to $T_{\text{EFF/MEM}}$ cells, we observed that the percentage (**Fig 2A**) and the number (**Fig 2B**) of proliferating FoxP3+Ki67+ T_{REG} increased steadily along EPIT. Hence, the ratio between the number of proliferating T_{REG} and the respective number of $T_{\text{EFF/MEM}}$, increased by 2-fold with EPIT (**Fig 2C**). Of note that the induction of T_{REG} along EPIT was not limited to the FoxP3 subset. A strong increase of CD4+FoxP3-LAP+ cells in the dLNs (both in term of percentages among the total CD4+ T cell fraction (**Fig 2D**) and numbers (**Fig 2E**)) was also detected after 8 weeks of EPIT. These results thus confirm that repeated allergen exposures promote a progressive accumulation of T_{REG} subsets in the dLNs of desensitized mice.

Allergen uptake by skDC subsets is constant

We then studied the various parameters of DC biology susceptible to modulate the (re)activation of $T_{\text{EFF/MEM}}$ and T_{REG} pools throughout the EPIT protocol.

First, we investigated the kinetic of OVA uptake by skDC subsets (respectively total DCs or LC, cDC1 & cDC2 subsets; **Fig S2**). To this end, we analysed by FACS, the percentage and the number (**Fig 3**) of OVA+ DCs present in skin biopsies, 48h after the 1st, 3rd and 8th patch. After a primary gate on Lineage^{neg}MHCII+CD11c+CD64^{neg} cells, LCs were targeted using SIRP α , EpCAM and CD24 markers, and cDC2s and cDC1s using the SIRP α and XCR1

markers, respectively (**Fig S2**). Of note, in order to track OVA⁺ cell subsets, the last patch applied to the mouse skin contained a fluorescent OVA protein (OVA^{AF-647}).

Our kinetics experiments confirmed that the 3 skDC subsets capture OVA at the different intervals of EPIT protocol (**Fig 3A-D**). In addition, we observed that LCs and cDC1s are less prone to OVA uptake than their cDC2 counterparts, as shown by lower percentages of OVA^{AF-647} cells (**Fig 3B**), and by lower OVA^{AF-647} median fluorescence intensity (MFI) levels (in cDC1 only, **Fig 3C**). Of note, the frequency of OVA^{AF-647} cells tended to decrease in LC fraction during EPIT, but not in cDC1 or cDC2 subsets (**Fig 3B**). However, conversely, a significant rise in the number of OVA^{AF-647} cells was observed with repeated patch applications, with clear differences at weeks 3 and 8 for LCs and cDC1s and a tendency at week 8 for their cDC2s counterparts (**Fig 3D**). Comparable increases were also detected in OVA^{neg} LCs, and tendencies in OVA^{neg} cDC1 and cDC2 (**Fig S3A**). These results therefore demonstrate that skDCs maintain their ability to capture OVA during EPIT. They also indicate that there is an accumulation of OVA⁺ DC subsets within the skin upon patch application, possibly due to an inhibition of skDC migration or an increase recruitment/proliferation of DC precursors. Of note, we did not detect any significant modulation of their activation/maturation phenotype (as revealed by the FACS analysis of the CD86, CD40 and PD-L2 MFIs; **Fig S4**).

No alteration in skDC migration

To determine a potential effect of allergen exposure on DC migration, we next analysed the percentage and number of OVA^{AF-647} DCs that migrated from the skin to the dLNs (here referred to as migDCs, and detected using classical Lineage^{neg}MHC-II^{high}CD11c^{int} phenotype), 48h after the 1st, 3rd and 8th patch application (**Fig 4 & Fig S5**).

Depending on the DC subsets, approximately 1 to 7% of OVA^{AF-647} cells were detected among migDCs (**Fig 4A-B**). Besides, while this percentage fluctuated relatively at the different intervals of the kinetic study (**Fig 4B**), the number of the 3 OVA^{AF-647} DC subsets remained fairly stable (**Fig 4C**), suggesting a regular and constant migration of skDCs to the dLNs during EPIT. In terms of distribution, the number of OVA^{AF-647} cDC2 was 2 to 3 times

higher than the number of OVA^{AF-647} LCs and 10 times higher than the number of OVA^{AF-647} cDC1 (**Fig 4B**), this mimicking OVA^{neg} DC results (**Fig S3B**).

Of note, relatively few OVA^{AF-647} cells were detected among resident LN DCs (detected using Lineage^{neg}MHC-II^{int}CD11c^{high} phenotype) compared to migDCs (**data not shown**).

Progressive and selective modulation of the OVA^{AF-647} DC phenotype

We next searched to correlate the modulation of T cell responses during EPIT with changes in the DC activation/ maturation phenotype.

To this end, we first investigated whether the amount of OVA protein carried by migDCs varied. As expected, OVA^{AF-647} expression (MFI) was significantly lower in migDCs (**Fig 4D**), compared to their skin counterparts (**Fig 3C**), which may indicate that the allergen was processed during DC migration. Besides, we observed that OVA^{AF-647} MFI in total DCs, as well as in LCs and cDC2s (and to a less extent in cDC1s), substantially decreased after 3 or 8 patch applications (**Fig 4D**).

In parallel experiments, we observed that the expression of CD86 (**Fig 4E**), CD40 (**Fig 4F**) and PD-L2 (**Fig 4G**) markers among OVA^{AF-647} migDCs also varied during EPIT. A significant reduction of CD86 MFI was observed in the LC and cDC1 subsets after 8 weeks of EPIT, while it increased in cDC2s after 3 (but not 8) patch applications (**Fig 4E**). In contrast, CD40 (**Fig 4F**) and PD-L2 MFI (**Fig 4G**) were affected in cDC2s only (both after 3 and 8 weeks of EPIT).

Collectively those results thus demonstrate that there is a progressive and selective modulation of DC phenotype during EPIT. They also suggest that migLCs and migcDC2s present less antigen after repeated patch application. Nevertheless, cells remain substantially activated at the end of EPIT protocol, as suggested by their higher CD86/CD40/PD-L2 MFI levels, compared to OVA^{neg} migDCs (**Fig 4E-G**).

LCs progressively lose their ability to prime T_{EFF} while cDC2 gain the capacity to prime type-1/17 responses

Finally, we tested the stimulatory properties of skDCs present in the dLNs at different time points along EPIT. To this end, we FACS sorted OVA^{AF-647} migDCs present in the dLNs (**Fig 5S**), 48 hours after the application of the 1st, 3rd or 8th patch, and cultivated those cells with naïve CTV-labelled OT-II cells (**Fig 5A**). In these experiments, we used OVA-specific transgenic T cells to optimize the detection of reactivated cells, regarding the very low number of OVA^{AF-647} migDCs that it was possible to FACS sort. When collected after the 1st patch, LCs and cDC2s, but not cDC1s, induced a robust priming of FoxP3^{neg} OT-II cells. Approximately 80% and 60% of cells have diluted CTV dye in LC and cDC2 co-cultures respectively, while 10% only have proliferated in cDC1 cultures (**Fig 5B-C**). Concomitant to FoxP3^{neg} OT-II cell proliferation, LCs and cDC2s also induced a low but significant proliferation of FoxP3⁺ OT-II cells. Approximately 2 and 4% of CTV^{low} FoxP3⁺ cells were detected in LC and cDC2 cocultures (**Fig 5D**). While the stimulatory properties of OVA^{AF-647} migcDC2s remained relatively constant throughout the EPIT protocol, we observed that OVA^{AF-647} migLCs primed less OT-II cells after the 3rd and 8th patch (approximately 60% of CTV^{low} FoxP3^{neg} cells) (**Fig 5C**). By contrast, they primed more FoxP3⁺ OT-II cells (approximately 4% of CTV^{low} FoxP3⁺ cells) (**Fig 5D**).

To confirm and extend these results, we performed a second set of experiments, in which we cultivated migDCs, FACS sorted independently of their OVA expression, with CTV-labelled CD4⁺ T cells purified from allergic donor mice (**Fig 6A**). Results obtained in this second set of co-cultures confirmed our primary observations. LCs and cDC2s, but not cDC1s, induced a robust reactivation of OVA-specific T_{EFF/MEM} and T_{REG} after 4 days of culture (as measured by the notable % of CD4⁺ CD44⁺ FoxP3^{+/-} T cells which have diluted CTV (**Fig 6B-C**), and the significant production of Th2 cytokines in culture supernatants (**Fig 6D**)). Moreover, when LCs were collected after the 3rd or the 8th patch, they induced a lower T cell proliferation (**Fig 6B**), correlating with a decreased IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A and interferon (IFN)- γ secretion in culture supernatants (**Fig 6D**). In contrast to LCs, cDC2s induced a relatively similar T cell proliferation at all EPIT intervals. Proliferation was associated with a progressive loss of type-2 cytokine (IL-4, IL-5, IL-13) secretion over time, and on the contrary, with an increase in the production of IFN- γ and IL-17A cytokines (**Figure 6D**).

Taken together, our results therefore demonstrate a significant and selective modulation of DC subset functions during EPIT. While cDC1s do not seem to participate to

CD4+T_{EFF/MEM} proliferation, LCs progressively lose their stimulatory capacity along EPIT, and cDC2s maintain their capacity to stimulate T cell proliferation and gain the capacity to prime Th1 and Th17 responses.

Discussion

The main objective of our study was to gain further insights on the mechanisms by which skin DCs recondition T cell response during epicutaneous allergen immunotherapy. Our longitudinal study demonstrated that, if LCs and dermal DCs maintain their ability to capture OVA in the skin and to migrate towards the skin-draining lymph nodes throughout the course of EPIT, their activation/maturation status (OVA, CD86 and CD40 marker expression) and their stimulatory properties were gradually and selectively hindered. To explain the quick (as soon as week 3) but limited inhibition of T_{EFF/MEM} (re)expansion upon EPIT, as well as the progressive skewing of their polarization, we reported that (i) OVA⁺ migLCs lost their capacity to prime/reactivate CD4⁺ T_{EFF/MEM}, but gained T_{REG} stimulatory properties; (ii) migcDC1s were inefficient at priming CD4 T_{EFF} and T_{MEM} reactivation *in vitro*; (iii) migcDC2s retained moderate stimulatory properties throughout EPIT, and promoted significant changes in the nature of cytokines produced by reactivated T cells. These results therefore emphasize that the acquisition of distinct phenotypic and functional specializations by skDCs during EPIT is at the cornerstone of the desensitization process.

The remodelling of antigen-specific T cell pools during EPIT

The mechanisms leading to the remodelling of antigen-specific T_{EFF/MEM} during AIT are complex, mainly because they are extremely varied. If the suppression of T cell proliferation and skewing of the pathogenic Th2 response toward a Th1 or T_{REG} phenotype are major hallmarks described in the majority of IT protocols (including EPIT)^{12,24,38}, it is still unclear whether suppression is due to (i) a progressive anergy/deletion or exhaustion of pathogenic T cells consecutive to chronic stimulation, (ii) an active regulation by T_{REG}, and/or (iii) a modulation of intrinsic DC functions^{35,36,39,40}. Beside, another question is whether the observed changes in T cell polarization result from (i) reprogramming of dominant clones or (ii) their replacement by different clones, either by existing non-dominant T_{MEM} clones that could be preferentially expanded with EPIT or by *de novo* T_{EFF} generation^{38,41}. The findings brought by our study address some of these fundamental issues. Indeed, our *ex vivo* proliferation assays, performed with OVA^{AF-647} migDCs collected at different intervals of EPIT protocol and cultivated with the same T_{EFF/MEM} cell population (**Fig 5&6**), clearly showed that the inhibition of intrinsic DC functions is at the basis of T cell suppression in this model. Also,

such inhibition certainly explains the gradual decline in T cell priming observed *in vivo* in **Fig S1**, even if in this case we cannot exclude a probable T_{REG} participation. Indeed, we confirmed in this study that there is a sustained accumulation of proliferating T_{REG} (both FoxP3⁺ and also LAP⁺ T_{REG}) during EPIT, whose numbers overweight the number of proliferating T_{EFF/MEM} at the end of EPIT protocol (**Fig 2C**). We demonstrated in previous studies that T_{REG} are key in EPIT desensitization, as their acute depletion prevented symptom improvement. However, our *in vivo* and *in vitro* experiments performed here established that the accumulation of T_{REG} during EPIT is not sufficient to completely block the reactivation and the production of key effector cytokines (IFN- γ and IL-17) by OVA-specific T_{EFF/MEM}, even after 8 weeks of EPIT.

Additionally, the fact that we observed a significant reactivation of Th1 and Th17 cells in the supernatants of cDC2 cultures (**Fig 6D**), but not in control cultures using T cells from naïve mice (**data not shown**), favours the T cell clone replacement hypothesis over *de novo* T_{EFF} generation. Bégin and Nadeau recently demonstrated, using next-generation TCR- β sequencing performed on proliferating T cells from patients undergoing oral IT, an extremely diversified polyclonal repertoire with a very small fraction of consistent clones over time, supporting the T cell replacement hypothesis as main hypothesis in these patients ⁴¹. Similarly, Wambre et al. reported in patients with grass pollen allergy that the phenotype of allergen-reactive cells depends on the epitopes that they recognize, and that allergen-specific Th2 clones were more sensitive to deletion than their Th1 counterparts ³⁸. It will thus be interesting to validate whether migcDC2s collected at week 1, 3 or 8 of treatment re-expanded the same T cell clones in our *ex vivo* proliferative assays (**Fig 6**) or re-educated the Th2 clones towards Th17 profile, as suggested by certain T cell plasticity models.

The mechanisms of DC phenotypic & functional modulation

Another interesting finding of our study is the demonstration that the phenotype of OVA^{AF-647} DC subsets is progressively and selectively modulated during EPIT. Although our phenotypic study relied on a minimal set of activation/maturation markers, we observed clear differences between markers expressed by migLCs and migcDC2s. CD86, CD40 or PD-L2 receptors were all shown to be instrumental for the priming and cytokine production of effector T cells or T_{REG} in different models. However, at this stage, it is not obvious to

associate variations in marker expression in migLCs or migcDC2s, as the sole explanation for their different stimulatory functions, or for the capacity of migLCs to prime more T_{REG} from week 3 onwards. A comprehensive transcriptomic study should help us to better understand how changes in DC phenotype impact T cell (re)expansion and polarization. A recent study conducted on patients with grass pollen allergy undergoing sublingual IT identified 5 biomarkers (C1Q, CD141, FcγRIIA, GATA3 and RIPK4) expressed by blood DCs which seem to be associated with clinical benefit ^{35,36}. It will be interesting to determine the expression of such markers in our model ⁴².

In parallel to variations in co-stimulatory factors, we also observed slight but significant reductions in OVA MFI in migDCs after repeated patch applications, suggesting that migDCs activate less T_{EFF/MEM}. However, the fact that migcDC2s retained potent functions while expressing a lower amount of OVA at week 3 and 8 compared to LCs, raises the question of how much an impact these reductions have on DC subset functions.

How to explain the progressive modulation of the skDC phenotype and functions during EPIT? It has been widely documented that T_{REG} promote a tolerogenic phenotype in DCs by modulating their maturation and functions. By forming aggregates with DCs ^{43,44}, they down-regulate the expression of CD86 on mature DCs, via CTLA-4- and trans-endocytosis-dependent mechanisms ⁴⁵, and this without affecting the expression of CD40 or MHC-II molecules ⁴³. Hence, it is possible that the gradual accumulation of T_{REG} during EPIT (**Fig 2B**) may have generated a local environment conducive to DC regulation and CD86 inhibition, at least for migLCs. Alternatively, it can also be hypothesized that functional variations recorded along EPIT were due to a physiological adaptation of the skDC network to the repeated patch application. Indeed, the latter induces successive waves of DC migration, which are each time replenished by new cell precursors. For this purpose, we observed at the end of the EPIT protocol a substantial increase in the total number of DCs in the skin, notably of LCs (**Fig 3D & Fig S3A**). Different precursors and models have been described to explain how the epidermis DC network is reconstituted. This involves both newly recruited monocytes and/or undefined LC precursors ^{29,46–48}. In addition, single cell analysis recently illustrated the heterogeneity of both human and mouse cDC2 population, revealing the existence of two principal subtypes within the classical CD11b+/SIRPα+ colony, delineated by the transcriptional regulator T-bet (cDC2A) and RORγT (cDC2B) respectively ⁴⁹. In the same

line, Bosteels *et al.* described a population of inflammatory cDC2s, which acquire properties of macrophages (they are CD64+) and cDC1 (they depend on IRF8) to orchestrate immunity in model of respiratory viral infection ⁵⁰. Hence, it is possible that along EPIT, the continuous replenishment of the skin leads to LC and/or cDC2 pools which are endowed with distinct molecular and functional features. Here, our gating strategy partially excluded the collection of the newly described inflammatory CD64+ cDC2s (**Fig S2 & Fig S5**). On the other hand, we did not explore the possible accumulation of cDC2A or cDC2B subsets.

The contribution of skDC subsets to symptom improvement

Finally, the acquisition of phenotypic and functional specialization by skDCs during EPIT raises questions about their respective contribution to symptom improvement.

Confirming our previous results obtained in a similar model of BALB/c mice, we validated in this study that LCs are key to EPIT desensitization, as their depletion significantly abrogated symptom improvement in C57BL/6 mice (**Fig S6A**). Moreover, we observed that cDC1s, which (re)activated CD4+ T_{EFF/MEM} poorly in our model, were dispensable to symptom improvement (**Fig S6B**). Their depletion (using diphtheria toxin) in EPIT-treated XCR1-iDTR animals had no effect on challenge-induced symptoms (**Fig S6B**). Unfortunately, we did not evaluate the impact of cDC2 on EPIT-induced desensitization, since no adequate model for selective ablation of this population exists to date ⁵¹. The fact that symptoms are largely abrogated in mice devoid of LCs suggest that the contribution of cDC2s during EPIT, if any, is certainly secondary to that of LCs. However, we observed that OVA^{AF-647} cDC2 migration is severely compromised in mice devoid of LCs, which may have hidden the contribution of this subset in this setting. Furthermore, by inducing significant production of IFN- γ and/or IL-17, cDC2s may participate in modulating the reactivity of mast cells and basophils^{8,17}. Indeed, we have observed that the addition of IFN- γ , but also IL-17, in cultures of bone marrow-derived mast cells *in vitro* strongly inhibits their degranulation. Conversely, the addition of IL-4 and IL-5, at comparable doses, tended to increase degranulation (**Fig S7**). By repolarizing T_{EFF/MEM} response, cDC2 then certainly play a major role in limiting the recurrence of FA allergy episodes.

In conclusion, our results highlight an underestimated modulation of skDC specialization during the course of EPIT, which indicates a clear division of labour between skDC subsets and the mechanisms by which they remodel T cell responses to lead to individual desensitization.

Material & Methods

Mice

C57BL/6J mice were obtained from Charles River (Charles Rivers, Lyon, France). Langerin-IRES-eGFP, Langerin-DTR mice were bred in house (PBES, Lyon, France). XCR1-iDTR mice were developed by crossing iDTR^{flox/flox} mice (PBES, Lyon, France) with *Xcr1*^{Cre-mTFP1} animals ³⁴, kindly provided by B.Malissen (CIML, Marseille, France). OT-II FoxP3^{eGFP} were bred in house. All procedures were performed according to the European Community rules on animal care with permission and ethical approval from the local institutional review board (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale) and the French Authorities (Approval #8266-2016103022315203v5 and #23278-2019082916475589v7). Mice were acclimated in the animal facility for 1 week prior to initiating any procedures.

OVA sensitization

Mice were sensitized by subcutaneous injection of 10µg ovalbumin grade V (Sigma Aldrich, France) mixed with aluminium hydroxid (Life Technologies, France) once per week for two weeks. On the third week, sensitized animals were triggered by intranasal administration of 10µg OVA grade V. OVA sensitization was validated by ELISA through IgE/IgG serum quantification collected on the 4th week (**data not shown**).

OVA challenge

One week before challenge, animals were injected s.c. with a temperature-recording and an identification electronic chip in the upper part of the back. They were then challenged i.p. with 75µg OVA grade V (Sigma-Aldrich, France), and temperature was measured every 10 minutes during the 120 minutes following challenge.

Epicutaneous immunotherapy treatment

Once a week, during 1, 3 or 8 weeks, 1.5cm² back skin of mice was shaved and depilated with depilatory cream (Veet®). After 24H, an OVA-containing patch (produced by DBV Technologies according to a proprietary technology) was applied on the depilated area and

maintained with bandage (Urgoderm®). After 48H, patch and bandage were removed under anesthesia with isofluorane.

Adoptive cell-transfer experiments

OT-II CD4⁺ lymphocytes were sorted and stained with cell trace violet before intravenous injection of 1-4 million cells in congenic CD45.1 recipient animals, 24h before the 1st, 3rd and 8th patch. Brachial LNs were then collected and cells analysed by flow cytometry to assess proliferation and phenotype.

Depletion of DC subsets *in vivo*

To deplete Langerhans cells, Langerin-DTR mice were injected with 100ng diphtheria toxin (DT, Merck), 5 days and 24h before the 1st patch application. Then, the DT was injected every two weeks, 24h before the application of the patch. To deplete cDC1 cells, XCR1-iDTR mice were injected with 100ng DT each week, 24H before the application of the patch.

Skin and sdLN cell isolation

Skin biopsies (punch 8mm diameter under patch, when applicable) and sdLN were collected, crushed and incubated 45min or 20min, respectively, at 37°C in digestion medium containing collagenase type 1 (121.9 CDU/mL; Sigma-Aldrich), DNase I (2 KU/mL; Sigma-Aldrich), HEPES (25mM; Gibco), RPMI 1640 (Gibco) and passed through a 100-µm cell strainer to obtain single-cell suspensions (Thermo Fisher Scientific). Cell viability was determined using trypan blue exclusion.

BMDC generation and antigen-pulse

BMDCs were generated *in vitro* from C57BL/6 bone marrow progenitors with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), as previously described ⁵². On day 7 of culture, 100µg/mL OVA grade V (Sigma) was added for 4 hours before harvesting cells.

Flow cytometry

Cells were stained following standard techniques using different combinations of the following antibodies: CD3 ϵ (145-2C11), CD19 (1D3), CD44 (IM7), CD45R (RA3-6B2), CD161 (PK136), PD-L2 (TY25), Fixable Viability Dye, all from eBioscience; CD11c (N418), CD45.2 (104), CD63 (NVG-2), CD64 (X54-5/7.1), SIRP α (P84), TCRb (H57-597), XCR1 (ZET), all from Biolegend; CD24 (M1/69), CD40 (3123), CD45.1 (A20), CD86 (GL1), MHC-II (AF6-120.1), all from BD Biosciences. Cells were acquired on a BD Biosciences Fortessa flow cytometer, using FACSDiva software and analysed with FlowJo analysis software (Treestar). Viable cell numbers were calculated by trypan blue exclusion during the isolation process and for some experiments, subsequently normalized using AccuCheck Counting Beads (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturer's protocol.

DC sorting

Cells isolated from dLN were depleted of CD3⁺ and CD19⁺ cells using magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France). OVA^{+/-} migratory DCs (MHC-II^{high}CD11c⁺), migLCs (SIRP α +XCR1-Epcam⁺), migcDC2s (SIRP α +XCR1-Epcam^{low}), migcDC1 (SIRP α -XCR1⁺) were then FACS sorted using FACSARIA machine (Becton Dickinson).

Single cell RNA-seq

OVA^{+/-} DC subsets were sorted in 384-wells plate, frozen at -80°C and further processed by Single Cell Discoveries who performed CEL-seq2 protocol and sequencing.

T cell-DC co-cultures *in vitro*

Cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L HEPES, 50 μ mol/L β -mercaptoethanol (all from Life Technologies, Carlsbad, Calif), and 10% FCS (Lonza, Basel, Switzerland).

Sorted OVA^{AF-647} DC subsets from skLN were co-cultured with sorted OT-II foxP3^{eGFP+/-} CD4⁺ from naïve mice, stained by cell trace violet (ThermoFisher) at a ratio DC:T from 1:5 to 1:20. Alternatively, sorted total DC subsets from skLN were cocultured with WT CD4⁺ T

cells from allergic animals. After 4 days, supernatant was collected and stored at -20°C until use. Cells were then stained to analyse effector and regulatory T cell proliferation by flow cytometry.

Cytokine and mMCP-1 titration

Cytokine levels in the supernatants of T cell-DC cocultures were determined using Luminex kit (Merck) and Magplex machine (Biorad) according to manufacturer's instructions.

mMCP-1 titration was performed on plasma using the ELISA Ready-SET-Go!™ MCPT-1 (mMCP-1) (eBioscience, San Diego, Calif).

Mast cell culture *in vitro*

BMMCs were generated from the femoral bone marrow cells of mice. Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mmol/L l-glutamine, 10 mmol/L HEPES, 50 µmol/L β-mercaptoethanol (all from Life Technologies), 10% FCS (Lonza) and 10ng/mL IL-3 (Peprotech). Medium was renewed every 3-4 days and cells were kept 60 days maximum. >90% of the cells were identifiable as mast cells as determined by FACS analysis of cell surface expression of *c-kit* and FcεRI.

Quantification of β-hexosaminidase release

To assess the impact of cytokines on their reactivity, BMMCs were restimulated 3 days with IL-4, IL-5, IL-17, IFN-γ at 1ng/mL (all from Peprotech) before 18h incubation with IgE (0,5µg/mL; BD Biosciences) followed by 30 minutes challenge at 37°C, 5% CO₂, with anti-IgE (0,2µg/mL; BD Biosciences) diluted in Tyrode's Buffer.

Statistical analysis

The GraphPad Prism Software 8 (San Diego, CA, USA) was used for statistical analyses. Statistical significances comparing groups of mice were determined by non-parametrical Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis multiple comparison's test with Dunn's correction.

Acknowledgments

We would like to thank T. Andrieu and S. Dussurgey from the AniRA-Cytometry core facility (Lyon, France) for the help provided for FACS sort and analysis, as well as M. Duee, T. Dorel, M. Teixeira from the animal's facility.

Author contributions

LL, ML, SV, VL, AM, AGP, AM, GD, AC, LM carried out cytometry, cellular immunology and *in vivo* experiments. LL, JM, LM, HAS, EE, AN, JFN, VD and MV had valuable contribution to the underlying concept or the design of the research. JFN, VD and MV supervised the progress of the study. LL, JFN, VD and MV wrote the manuscript.

Bibliography

1. Sicherer, S. H. & Sampson, H. A. Food Allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 41–58 (2017).
2. Pouessel, G. *et al.* Food-induced fatal anaphylaxis: from epidemiological data to general prevention strategies. *Clin. Exp. Allergy* (2018) doi:10.1111/cea.13287.
3. Ogawa, Y. & Grant, J. A. Mediators of Anaphylaxis. *Immunology and Allergy Clinics of North America* vol. 27 249–260 (2007).
4. Sampson, H. A. *et al.* Mechanisms of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 11–19 (2018).
5. Burks, A. W., Sampson, H. A., Plaut, M., Lack, G. & Akdis, C. A. Treatment for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 141 1–9 (2018).
6. Fleischer, D. M. *et al.* Effect of Epicutaneous Immunotherapy vs Placebo on Reaction to Peanut Protein Ingestion Among Children With Peanut Allergy. *JAMA* (2019) doi:10.1001/jama.2019.1113.
7. Sampson, H. A. *et al.* Effect of Varying Doses of Epicutaneous Immunotherapy vs Placebo on Reaction to Peanut Protein Exposure Among Patients With Peanut Sensitivity: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **318**, 1798–1809 (2017).
8. Sellge, G. *et al.* Interferon- γ regulates growth and controls Fc γ receptor expression and activation in human intestinal mast cells. *BMC Immunol.* **15**, 27 (2014).
9. McLeod, J. J. A., Baker, B. & Ryan, J. J. Mast cell production and response to IL-4 and IL-13. *Cytokine* vol. 75 57–61 (2015).
10. Tordesillas, L. *et al.* Epicutaneous immunotherapy induces gastrointestinal LAP⁺ regulatory T cells and prevents food-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **0**, (2016).
11. Dioszeghy, V. *et al.* The regulatory T cells induction by epicutaneous immunotherapy is sustained and mediates long-term protection from eosinophilic disorders in peanut-sensitized mice. *Clin. Exp. Allergy* **44**, 867–881 (2014).
12. Dioszeghy, V. *et al.* Differences in phenotype, homing properties and suppressive activities of regulatory T cells induced by epicutaneous, oral or sublingual immunotherapy in mice sensitized to peanut. *Cell. Mol. Immunol.* (2016) doi:10.1038/cmi.2016.14.
13. Mondoulet, L. *et al.* Gata3 hypermethylation and Foxp3 hypomethylation are associated with sustained protection and bystander effect following epicutaneous immunotherapy in peanut-sensitized mice. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **74**, 152–164 (2019).
14. Burton, O. T. *et al.* Direct effects of IL-4 on mast cells drive their intestinal expansion and increase susceptibility to anaphylaxis in a murine model of food allergy. *Mucosal Immunol.* **6**, 740–750 (2013).
15. Ochi, H., De Jesus, N. H., Hsieh, F. H., Austen, K. F. & Boyce, J. A. IL-4 and -5 prime human mast cells for different profiles of IgE-dependent cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10509–10513 (2000).
16. Kobayashi, T., Shimabukuro-Demoto, S., Tsutsui, H. & Toyama-Sorimachi, N. Type I interferon limits mast cell-mediated anaphylaxis by controlling secretory granule homeostasis. *PLoS Biol.* **17**, (2019).
17. Mann-Chandler, M. N. *et al.* IFN- γ Induces Apoptosis in Developing Mast Cells. *J. Immunol.* **175**, 3000–3005 (2005).
18. Okayama, Y., Kirshenbaum, A. S. & Metcalfe, D. D. Expression of a Functional High-Affinity IgG Receptor, Fc γ RI, on Human Mast Cells: Up-Regulation by IFN- γ . *J. Immunol.* **164**, 4332–4339 (2000).
19. Mekori, Y. A. & Hershko, A. Y. T Cell-Mediated Modulation of Mast Cell Function: Heterotypic Adhesion-Induced Stimulatory or Inhibitory Effects. *Front. Immunol.* **3**, 6 (2012).
20. Gri, G. *et al.* CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Mast Cell Degranulation and Allergic

Responses through OX40-OX40L Interaction. *Immunity* **29**, 771–781 (2008).

21. Zha, L. *et al.* An unexpected protective role of low-affinity allergen-specific IgG through the inhibitory receptor FcγRIIb. *J. Allergy Clin. Immunol.* **142**, 1529–1536.e6 (2018).
22. Mondoulet, L. *et al.* Epicutaneous Immunotherapy Using a New Epicutaneous Delivery System in Mice Sensitized to Peanuts. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **154**, 299–309 (2011).
23. Mondoulet *et al.* Epicutaneous Immunotherapy Compared with Sublingual Immunotherapy in Mice Sensitized to Pollen (*Phleum pratense*). *ISRN Allergy* **2012**, (2012).
24. Bedoret, D. *et al.* Changes in antigen-specific T-cell number and function during oral desensitization in cow's milk allergy enabled with omalizumab. *Mucosal Immunol.* **5**, 267–276 (2012).
25. Cosmi, L. *et al.* Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-γ- and interleukin-10-production. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 261–272 (2006).
26. Dioszeghy, V. *et al.* Epicutaneous Immunotherapy Results in Rapid Allergen Uptake by Dendritic Cells through Intact Skin and Downregulates the Allergen-Specific Response in Sensitized Mice. *J. Immunol.* **186**, 5629–5637 (2011).
27. Tordesillas, L. *et al.* PDL2+ CD11b+ dermal dendritic cells capture topical antigen through hair follicles to prime LAP+ Tregs. *Nat. Commun.* **9**, 5238 (2018).
28. Guillems, M. *et al.* Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* **45**, 669–684 (2016).
29. Kashem, S. W., Haniffa, M. & Kaplan, D. H. Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 469–499 (2017).
30. Cytlik, U. *et al.* Differential IRF8 Transcription Factor Requirement Defines Two Pathways of Dendritic Cell Development in Humans. *Immunity* **53**, 353–370.e8 (2020).
31. Bourdely, P. *et al.* Transcriptional and Functional Analysis of CD1c+ Human Dendritic Cells Identifies a CD163+ Subset Priming CD8+CD103+ T Cells. *Immunity* **53**, 335–352.e8 (2020).
32. Dioszeghy, V. *et al.* Antigen Uptake by Langerhans Cells Is Required for the Induction of Regulatory T Cells and the Acquisition of Tolerance During Epicutaneous Immunotherapy in OVA-Sensitized Mice. *Front. Immunol.* **9**, 1951 (2018).
33. Deckers, J. *et al.* Epicutaneous sensitization to house dust mite allergen requires interferon regulatory factor 4–dependent dermal dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2017) doi:10.1016/j.jaci.2016.12.970.
34. Wohn, C. *et al.* Absence of MHC class II on cDC1 dendritic cells triggers fatal autoimmunity to a cross-presented self-antigen. *Sci. Immunol.* **5**, (2020).
35. Gueguen, C. *et al.* Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 545–58 (2016).
36. Zimmer, A. *et al.* A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1020–1030 (2012).
37. Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. & Carbone, F. R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA- based α- and β-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**, 34–40 (1998).
38. Wambre, E. *et al.* Specific immunotherapy modifies allergen-specific CD4+ T-cell responses in an epitope-dependent manner. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 872–879.e7 (2014).
39. Wang, W. *et al.* Transcriptional changes in peanut-specific CD4+ T cells over the course of oral immunotherapy. *Clin. Immunol.* **219**, 108568 (2020).
40. Ryan, J. F. *et al.* Successful immunotherapy induces previously unidentified allergen-specific CD4+ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1286–E1295 (2016).
41. Bégin, P. & Nadeau, K. C. Changes in peanut-specific T-cell clonotype with oral

- immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 1636-1638.e3 (2015).
42. Mascarell, L. *et al.* The regulatory dendritic cell marker C1q is a potent inhibitor of allergic inflammation. *Mucosal Immunol.* **10**, 695–704 (2017).
 43. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10113–10118 (2008).
 44. Tran, D. Q. *et al.* Analysis of Adhesion Molecules, Target Cells, and Role of IL-2 in Human FOXP3 + Regulatory T Cell Suppressor Function . *J. Immunol.* **182**, 2929–2938 (2009).
 45. Ovcinnikovs, V. *et al.* CTLA-4-mediated transendocytosis of costimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells. *Sci. Immunol.* **4**, 31 (2019).
 46. 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).
 47. Otsuka, M., Egawa, G. & Kabashima, K. Uncovering the Mysteries of Langerhans Cells, Inflammatory Dendritic Epidermal Cells, and Monocyte-Derived Langerhans Cell-Like Cells in the Epidermis. *Frontiers in immunology* vol. 9 1768 (2018).
 48. Merad, M. *et al.* Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* **3**, 1135–1141 (2002).
 49. Brown, C. C. *et al.* Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. *Cell* **179**, 846-863.e24 (2019).
 50. Bosteels, C. *et al.* Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity* **52**, 1039-1056.e9 (2020).
 51. Persson, E. K. *et al.* IRF4 Transcription-Factor-Dependent CD103+CD11b+ Dendritic Cells Drive Mucosal T Helper 17 Cell Differentiation. *Immunity* **38**, 958–969 (2013).
 52. Vanbervliet, B. *et al.* Histamine receptor H1 signaling on dendritic cells plays a key role in the IFN- γ /IL-17 balance in T cell-mediated skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 943-953.e10 (2011).

Figure legends

Figure 1: Kinetics of clinical and T cell responses along EPIT.

A. Experimental design: OVA-allergic C57BL/6J mice were treated with 100µg OVA-patches applied on back skin for 48H, once a week during 8 consecutive weeks. Clinical and cellular analysis was performed at different intervals (after 0, 1, 3 or 8 weeks) of EPIT treatment.

B-D. Tolerance: assessment: Tolerance induction was appreciated by measuring temperature drop (**B,C**) and mMCP-1 production (**D**) following i.p. OVA challenge. Data are depicted as mean $\pm$ SEM temperature drop ($^{\circ}\text{C}$) (**B**), as well as box-and-whisker plots with individual values of the areas under the curve during 120 minutes (**C**), or with individual mMCP-1 concentrations in the plasma (**D**). Naïve C57BL/6J mice were used as controls.

E-F. $T_{\text{EFF/MEM}}$ proliferation: $T_{\text{EFF/MEM}}$ proliferation was evaluated in the dLNs by FACS analysis, 5 days after the application of the 1st, 3rd and 8th patch. Unpatched allergic recipient mice were used as controls. Data are depicted as box-and-whisker plots with individual percentages (among total CD4⁺ T cells, **E**) and numbers (**F**) of dLN CD4⁺FoxP3⁺CD44⁺Ki67⁺ cells.

G. OVA-specific T cell responses: The polarization of OVA-specific $T_{\text{EFF/MEM}}$ cells was appreciated by cultivating dLN cells (collected at day 7 after the last patch application) with OVA-pulsed BMDCs for 3 days. Data are depicted as box-and-whisker plots with individual concentrations of IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17A and IFN- γ in the culture supernatants, as measured by Luminex assay.

All results are representative of two or three independent experiments with 4-10 mice per group.

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Mann-Whitney U test compared to the group “0 weeks”.

Figure 2: T_{REG} accumulation during EPIT.

A-C. FoxP3⁺ T_{REG} : The proliferation of FoxP3⁺ T_{REG} was evaluated in the dLNs by FACS analysis, 5 days after the application of the 1st, 3rd and 8th patches. Unpatched allergic

recipient animals were used as controls. Data are depicted as box-and-whisker plots with individual percentages (among total CD4⁺ T cells, **A**) and numbers (**B**) of dLN CD4⁺FoxP3⁺Ki67⁺ cells. The ratio between proliferating FoxP3⁺ T_{REG} and T_{EFF/MEM} is also shown (**C**).

D-E. LAP+FoxP3- T_{REG}: The percentage (among total CD4⁺T cells, **D**) and the number of CD4⁺FoxP3-LAP⁺ T_{REG} in the dLNs (**E**) was assessed and depicted as in **A-B**.

All results are representative of two independent experiments with 5-7 mice per group.

n.s.=not significant, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001. Mann-Whitney U test.

Figure 3: OVA-uptake by skDCs during EPIT.

The capture and expression of OVA protein by skDC subsets was evaluated by FACS, 48h after the application of the 1st, 3rd or 8th patch (i.e. at 1, 3 or 8 weeks of EPIT treatment).

A. Representative FACS plots of OVA^{AF-647}CD11c⁺ skDCs.

B-D. Percentages (among respective subsets, **B**), **phenotype** (OVA mean fluorescence intensity, **C**) and **numbers** (**D**) of OVA^{AF-647} LCs (red), cDC2s (blue) or cDC1s (green) detected in 8mm skin biopsy. Total DCs (black) are also shown.

Data are depicted as box-and-whisker plots with individual values. They are representative of 2 experiments with n=5 mice per group.

*P<0.05, **P<0.01, when compared to the group “1 week”. [§]P<0.05 when compared to the group “3 weeks”. Mann-Whitney U test.

Figure 4: Percentage, number and phenotype of OVA^{AF-647} migDCs during EPIT.

The percentage, number and phenotype of OVA^{AF-647} skDCs, which have migrated towards the dLNs (referred to as migDCs), was evaluated by FACS 48h after the application of the 1st, 3rd or 8th patch (i.e. at 1, 3 or 8 weeks of EPIT treatment).

A. Representative FACS plots of OVA^{AF-647}CD11c⁺ migDCs.

B-C. Percentage (**B**) and **number** (**C**) of OVA^{AF-647} migLCs (red), migcDC2s (blue) and migcDC1s (green). Total migDCs (black) are also shown.

D-G. OVA (D), CD86 (E) CD40 (F) and PD-L2 (G) median fluorescence intensity (MFI) in respective OVA^{AF-647} migDC subsets. Data are depicted as box-and-whisker plots with individual values.

Median of CD86, CD40 and PD-L2 MFI in OVA^{neg} migDCs are also shown as control (empty symbols).

Data are representative of 3 experiments with n=5 mice per group.

*P<0.05, **P<0.01, when compared to the group “1 week”. [§]P<0.05 when compared to the group “3 weeks”. Mann-Whitney *U* test.

Figure 5: OT-II cell stimulatory properties of OVA^{AF-647} migDC subsets during EPIT.

A. Experimental design: 1x10³ OVA^{AF-647} LCs (red), cDC2s (blue) or cDC1s (green), purified from the dLNs 48h after the application of the 1st, 3rd or 8th patch (i.e. at 1, 3 or 8 weeks of EPIT treatment) were cultivated with 20x10³ naïve CTV-labelled OT-II cells for 4 days.

B-D. Representative FACS plot (B) and percentage of proliferating OT-II T_{EFF} (CTV^{low}CD4+FoxP3-CD44+ cells, **C**) **and OT-II T_{REG}** (CTV^{low}CD4+FoxP3+ cells, **D**).

Data are depicted as box-and-whisker plots with individual values. They are representative of 3 experiments with n=10-15 mice pooled per group and 2-3 technical replicates per experiment. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005. Mann-Whitney *U* test

Figure 6: Changes in the polarizing capacities of OVA^{AF-647} migDC subsets during EPIT.

A. Experimental design: 20x10³ CD11c^{int}MHC-II^{high} LCs (red), cDC2s (blue) or cDC1s (green) purified from the dLNs 48h after the application of the 1st, 3rd or 8th patch (i.e. at 1, 3 or 8 weeks of EPIT treatment) were cultivated with 100x10³ CTV-labelled CD4+ T cells from allergic mice, for 4 days. Total CD11c^{int}MHC-II^{high} cells (black) were used in control cultures.

B-C. Percentage of proliferating T_{EFF/MEM} (CTV^{low}CD4+FoxP3- cells, **B**) **and T_{REG}** (CTV^{low}CD4+FoxP3+ cells, **C**).

D. IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17A and IFN-γ concentrations in the culture supernatants, as measured by Luminex assay.

Data are depicted as box-and-whisker plots with individual values. They are representative of 3 experiments with $n=10-15$ mice pooled per group and 2-3 technical replicates per experiment. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$. Mann-Whitney U test

Supplementary figure legends

Figure S1: OT-II cell priming kinetic during EPIT.

CD45.1⁺ C57BL/6 recipient animals were transferred i.v. with 4×10^6 of naive CTV-labelled CD45.2⁺ OT-II cells, 24H before the 1st, 3rd or 8th patch application. Unpatched allergic recipients were used as controls (**A**). Results depict representative FACS plot (**B**) and individual data $\pm$ SD percentage of proliferating (CTV^{low}) OT-II cells in the dLNs 8 days after transfer, as determined by FACS analysis (**C**).

Data are representative of 2 experiments with n=4-5 mice per time-point. *p<0.05. Mann-Whitney *U* test

Figure S2: Lineage gating strategy used for FACS analysis of skDCs.

Representative example of the gating strategy used to identify OVA^{AF-647} DCs in the skin. After doublet exclusion, viable (livedead negative) CD45⁺ hematopoietic cells were then progressively subcategorized into different subpopulations: MCH-II⁺ lineage (CD19, CD3 ϵ , B220, NK1.1) negative cells and next CD64-CD11c⁺ DCs. Such DCs were then further subcategorized into SIRP α -XCR1+OVA^{AF-647} cDC1s, SIRP α +EpCam+CD24+OVA^{AF-647}LCs and SIRP α +EpCam^{-/low}OVA^{AF-647}cDC2s. OVA^{AF-647} cells and their OVA⁻ counterpart are shown respectively in red and blue.

Figure S3: Number of skin and dLN OVA^{neg} DCs during EPIT.

The number of OVA^{neg} DCs (total DCs (black), LCs (red), cDC2s (blue) and cDC1s (green)) was evaluated in the skin (**A**) or the dLNs (**B**) by FACS, 48h after the application of the 1st, 3rd or 8th patch (i.e. at 1, 3 or 8 weeks of EPIT treatment).

Data are depicted as box-and-whisker plots with individual values. They are representative of 3 experiments with n=5 mice per group.

Figure S4: Phenotype of OVA^{AF-647} skDCs.

The median fluorescence intensity (MFI) of CD86 (A), CD40 (B) and PD-L2 (C) markers on respective OVA^{AF-647}DC subsets (total DCs (black), LCs (red), cDC2s (blue) and cDC1s (green)) present in the skin was evaluated by FACS, 48h after the application of the 1st, 3rd or 8th patch (i.e. at 1, 3 or 8 weeks of EPIT treatment).

Data are depicted as box-and-whisker plots with individual values.

Median of CD86, CD40 and PD-L2 MFI in OVA^{neg} DCs are also shown as control (empty symbols).

Data are representative of 3 experiments with n=5 mice per group.

Figure S5: Lineage gating strategy used for FACS analysis of migDCs.

Representative example of the gating strategy used to identify OVA^{AF-647} skDCs, which have migrated towards the dLNs (referred to as migDCs). After doublet exclusion, viable (livedead negative) CD45+ hematopoietic cells were then progressively subcategorized into different subpopulations: MCH-II+ lineage (CD19, CD3ε, B220, NK1.1) negative cells and next CD64-CD11c^{int}MHC-II^{high} migDCs. Such migDCs were then further subcategorized into XCR1+OVA^{AF-647} cDC1s, SIRPα+EpCam^{-/low}OVA^{AF-647} cDC2s and SIRPα+EpCam+CD24+OVA^{AF-647} LCs. OVA^{AF-647} cells and their OVA- counterpart are shown respectively in red and blue.

Figure S6: Efficacy of EPIT desensitization in LC and cDC1-depleted animals.

OVA-allergic Langerin- (A) or XCR1- (B) iDTR-mice were treated or not with 100μg OVA-patches applied on back skin for 48h, once a week during 8 consecutive weeks. In some groups, animals were depleted in LCs or XCR1+ cDC1s by DT injection 24h before patch application every 2 weeks (A) or every week (B), respectively. Naïve mice were used as controls.

Tolerance to allergen reexposure was appreciated at the end of EPIT treatment by measuring temperature drop within the minutes following i.p. OVA challenge. Results depict individual and mean ± SD calculations of the areas under the curve during 120 minutes.

Data are representative of 2 experiments with n=4-11 mice per group. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005. Mann-Whitney *U* test

Figure S7: Impact of type-1, type-17 and type-2 cytokines on bone-marrow derived mast cell degranulation *in vitro*.

Results depict mean $\pm$ SEM β -hexosaminidase release measured in bone-marrow-derived mast cell (BMMC) cultures, 30 min after challenge. BMMCs were previously incubated with 1ng/mL of IL-4, IL-5, IL-17 or IFN- γ for 3 days. Data are representative of 2 experiments.

FIGURE 1:

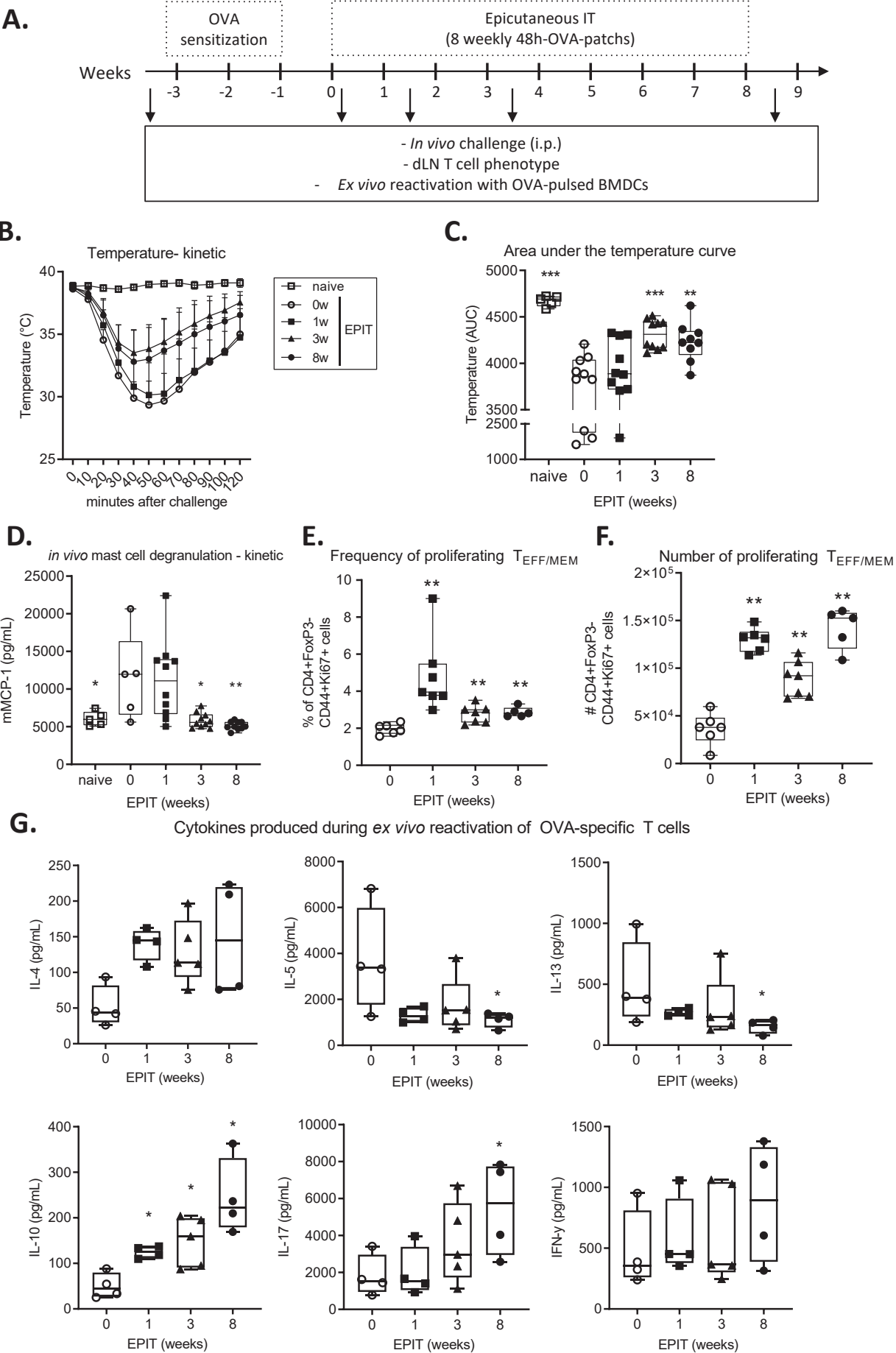
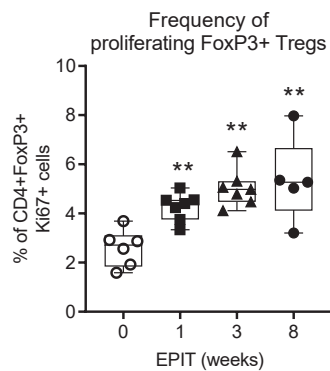
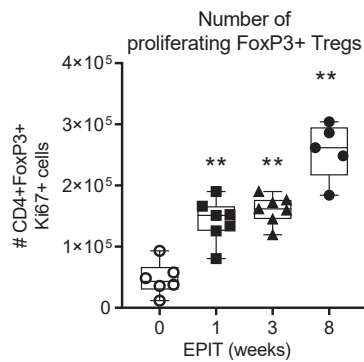


FIGURE 2:

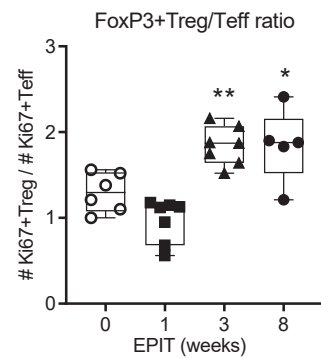
A.



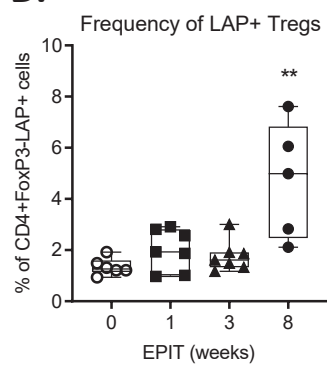
B.



C.



D.



E.

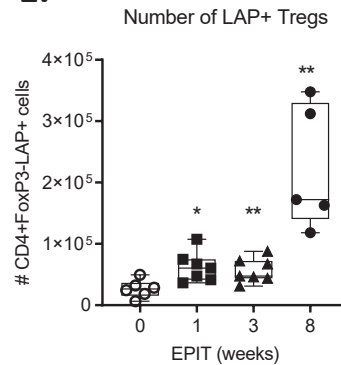


FIGURE 3:

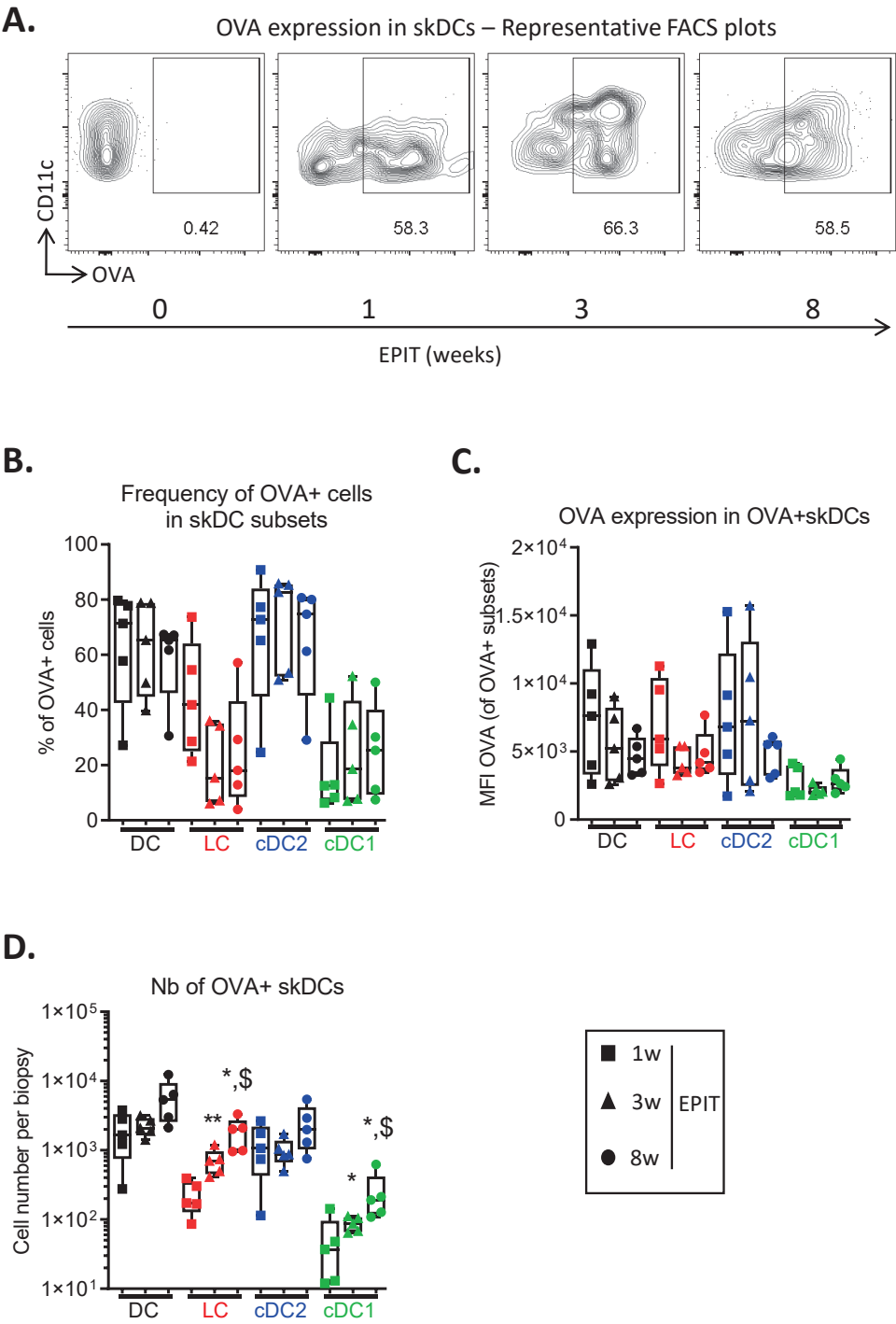


FIGURE 4:

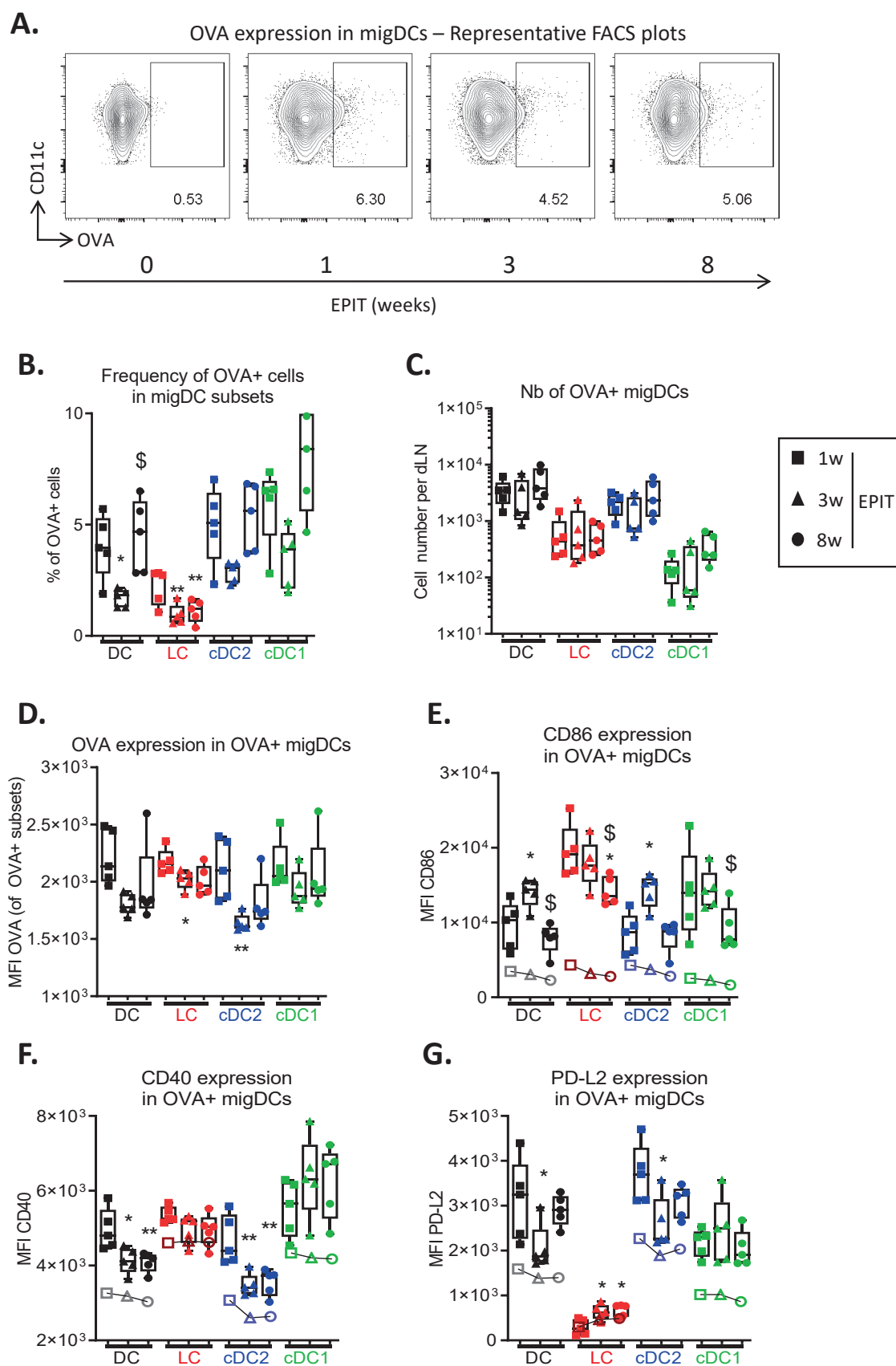
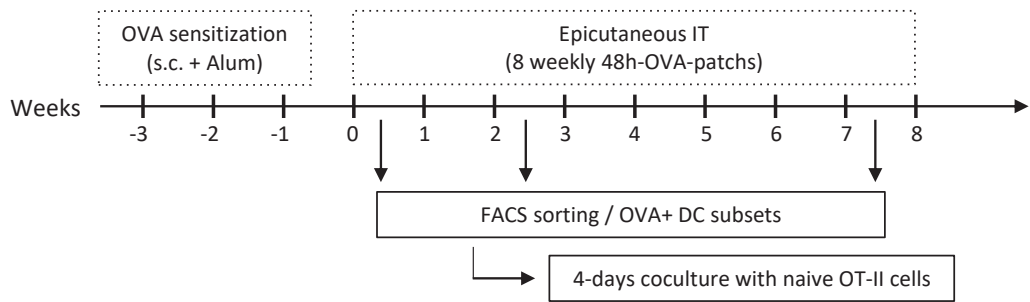
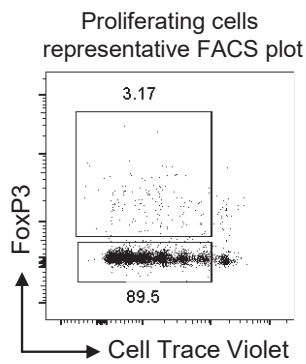


FIGURE 5:

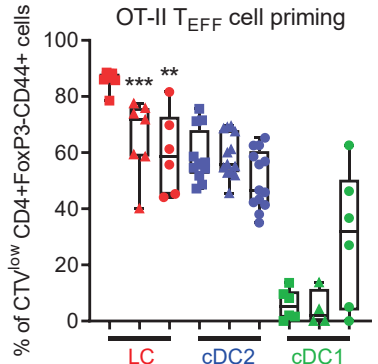
A.



B.



C.



D.

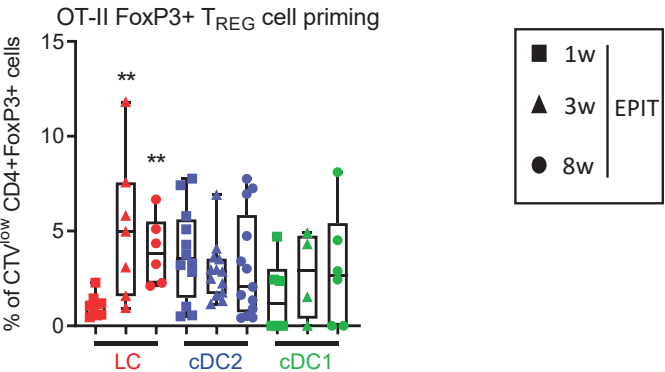


FIGURE 6:

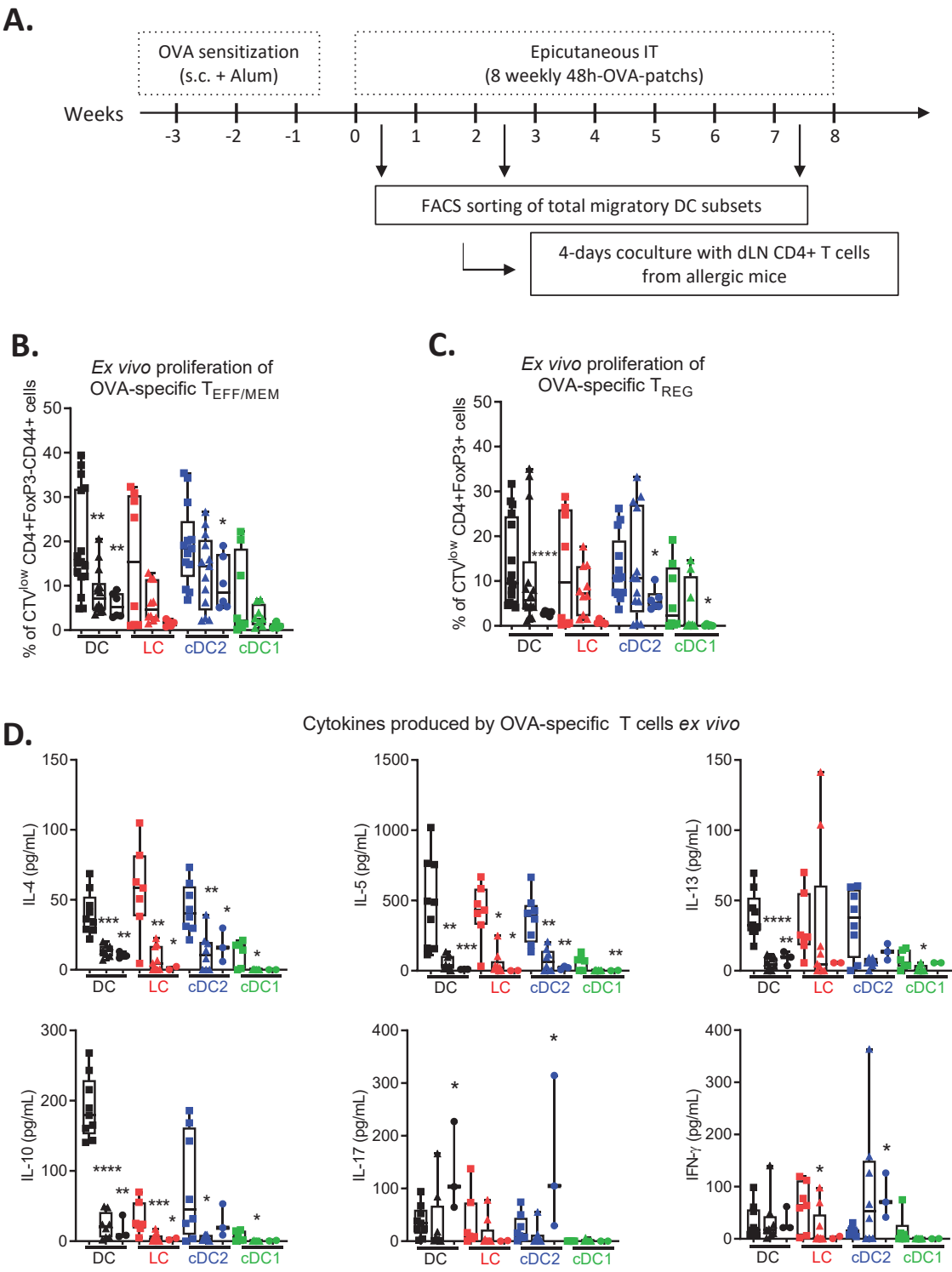


FIGURE S1:

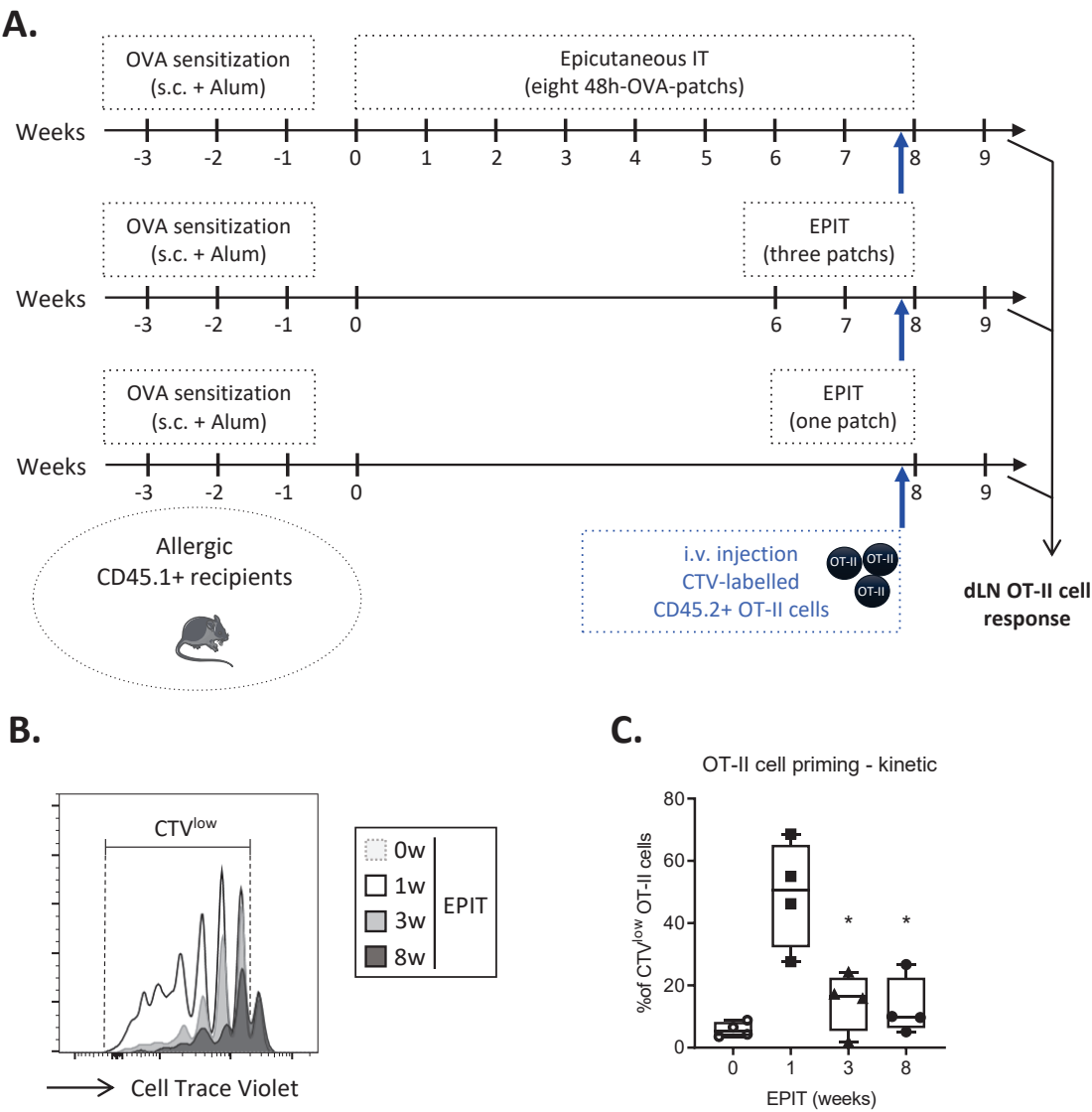


FIGURE S2:

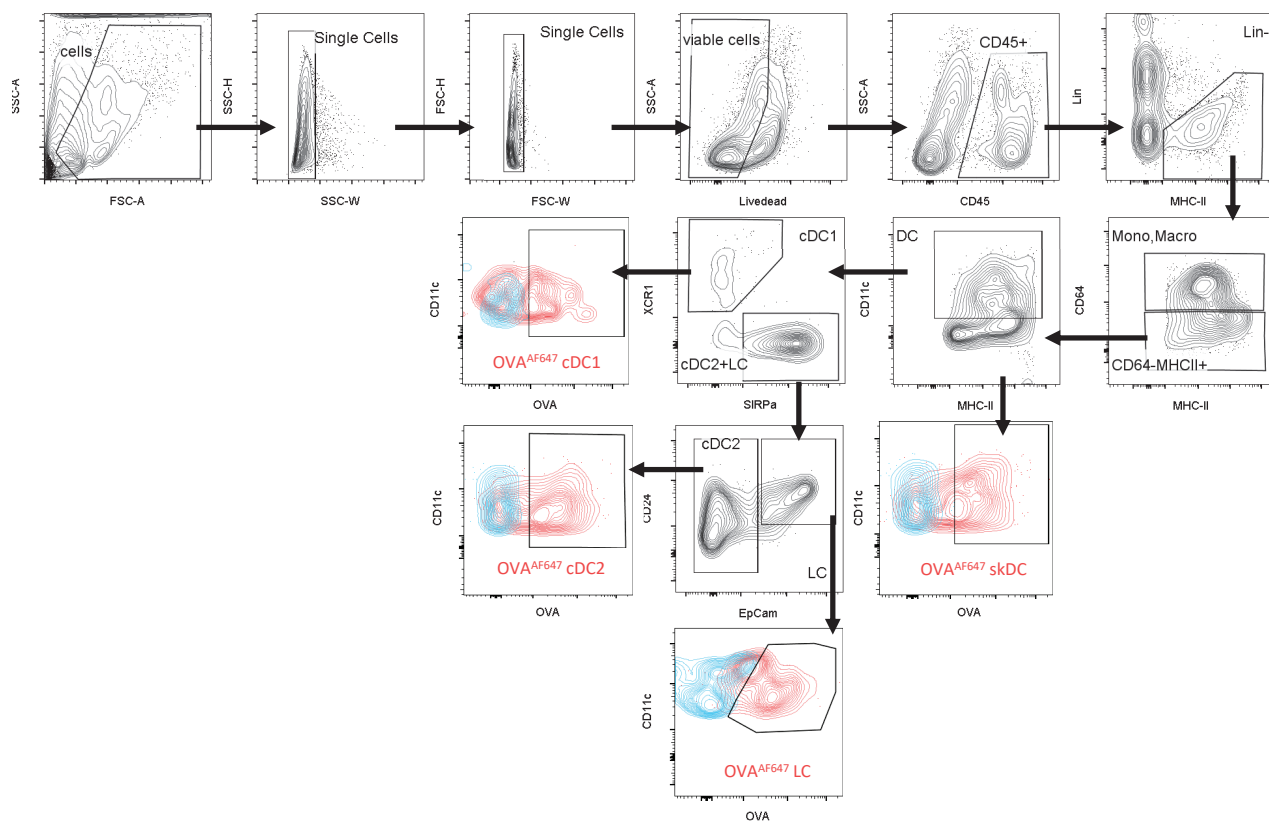


FIGURE S3:

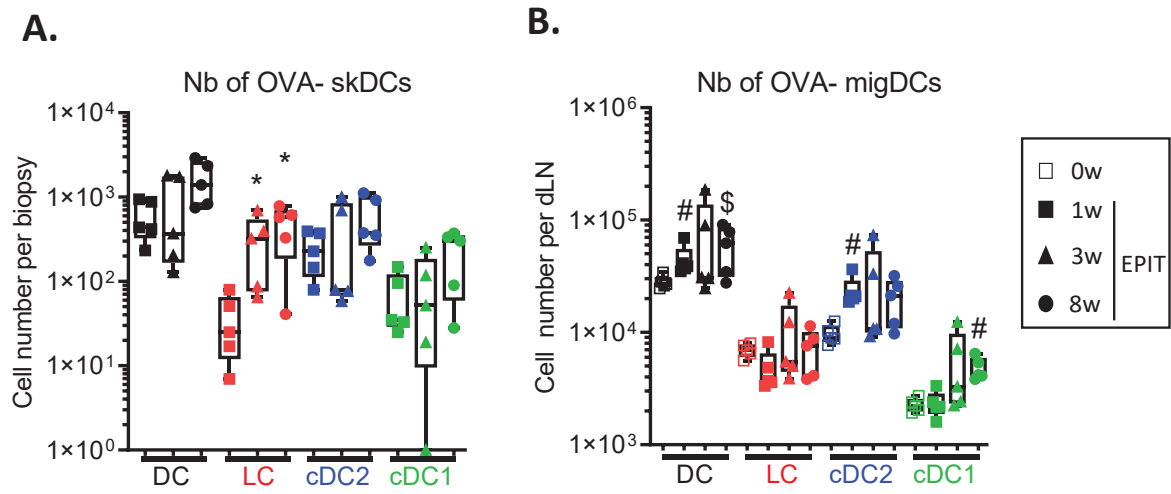


FIGURE S4:

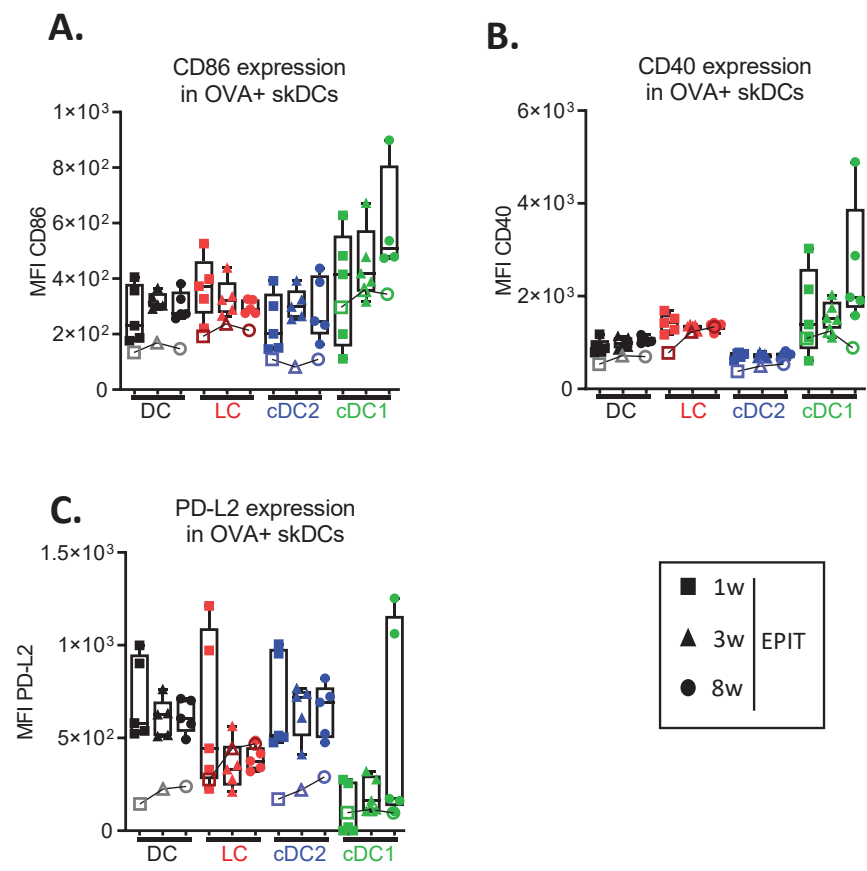


FIGURE S5:

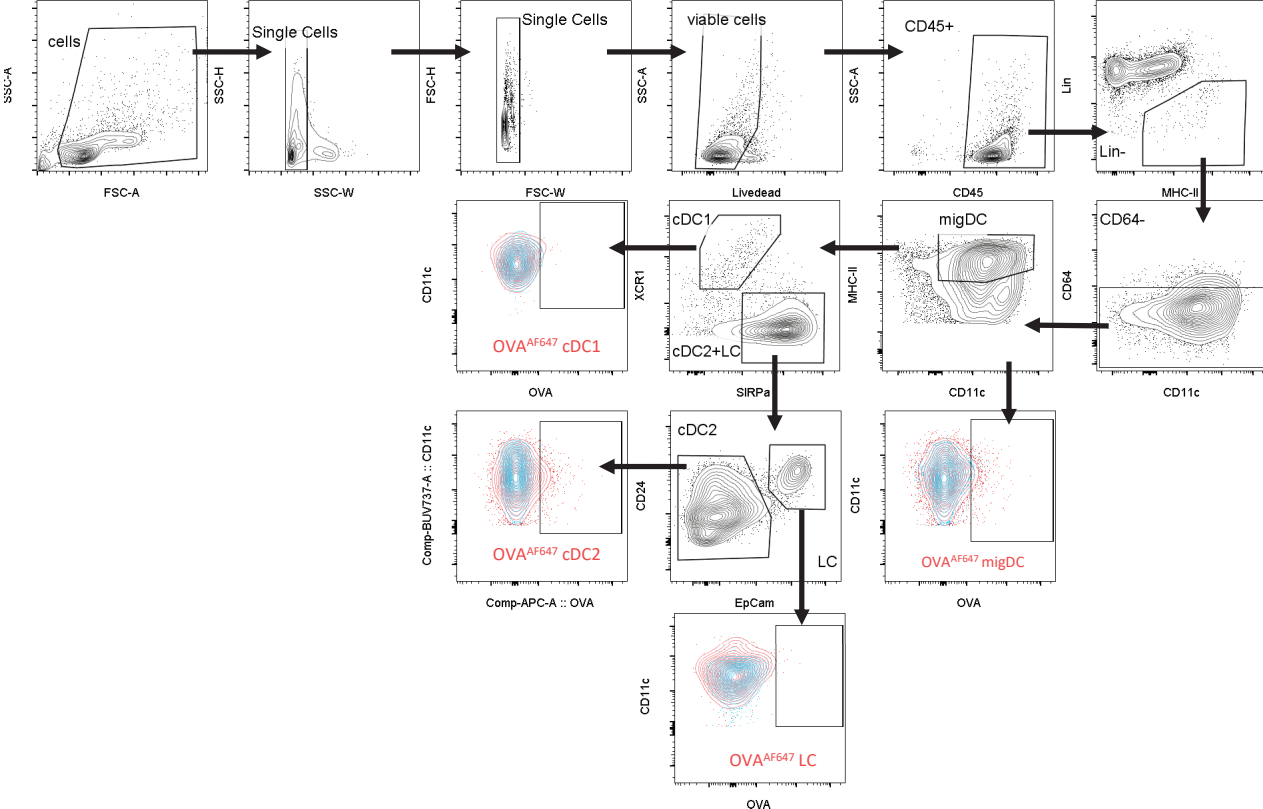


FIGURE S6:

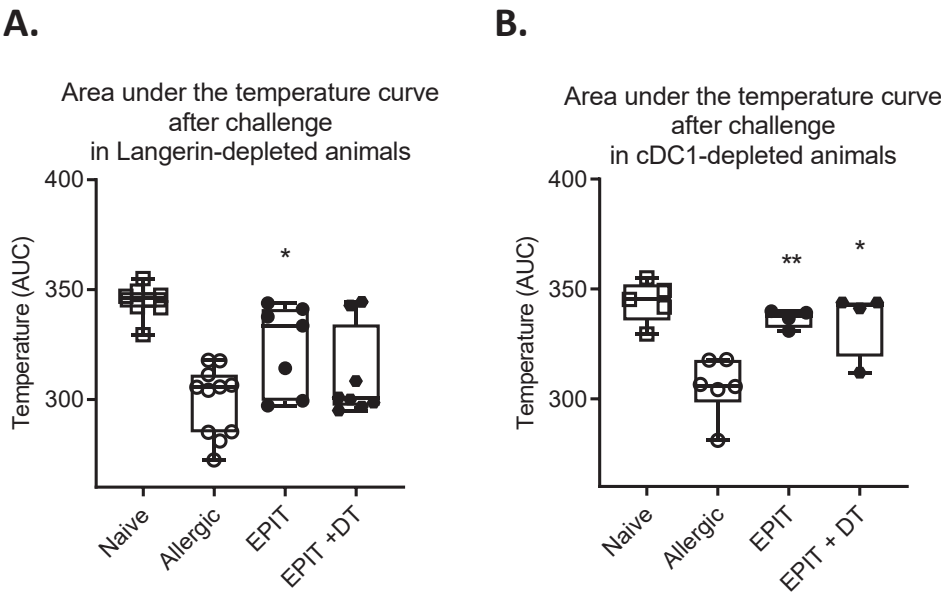
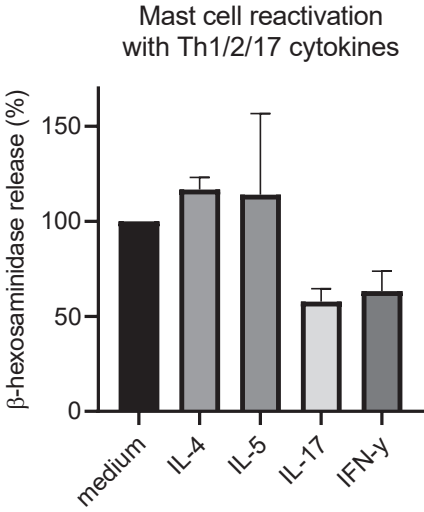


FIGURE S7:



3 Discussion

3.1 Synthèse des résultats

Au cours de mes travaux de thèse, je me suis intéressé à la contribution des DC cutanées dans la désensibilisation par EPIT. Cette dernière est associée à deux phénomènes complémentaires : l'induction de LT_{REG} et la déviation immunitaire (induction d'IgG et baisse de la réponse Th2). Ces deux mécanismes concourent à limiter la réactivité des mastocytes/basophiles responsables de l'anaphylaxie lors de la réexposition à un allergène.

Dans un premier article, nous avons démontré que les cellules de Langerhans étaient nécessaires pour la protection clinique conférée par EPIT. De plus, l'induction des LT_{REG} FoxP3⁺ ou LAP⁺, la chute de la réponse Th2 et la baisse d'IgE spécifiques étaient abrogées en absence de LC.

Néanmoins, ces résultats n'excluaient pas une contribution complémentaire ou antagoniste des cDC2 et cDC1 du derme. En effet, après un patch Viaskin® la migration des cDC2 CD11b⁺ dans les GLD était altérée en absence de LC. Nous avons donc voulu comprendre si les DC du derme participaient ou limitaient la désensibilisation, et quels étaient les mécanismes associés à leur fonction.

Dans un second article, nous avons ainsi montré que les cDC1 n'étaient pas nécessaires pour la protection clinique conférée par EPIT. En absence de modèle *in vivo* adéquat pour dépléter les cDC2, nous avons suivi leur phénotype et leurs fonctions *ex vivo*. Après traitement, nos résultats montrent que les cDC2 et LC migrantes ont acquis un phénotype tolérogène notamment révélé par la baisse de CD40 ou CD86, respectivement. En outre, les cDC2 semblent jouer un rôle complémentaire à celui des LC en favorisant l'expansion de LT Th1 et Th17 après EPIT. Ces cytokines peuvent limiter la réactivation de mastocytes *in vitro* suggérant leur participation à la protection clinique.

Mes travaux de thèse permettent donc de mieux comprendre la spécialisation fonctionnelle des sous-populations de DC cutanées au cours d'EPIT. Pour réaliser ces travaux, j'ai capitalisé sur un modèle pré-clinique de souris BALB/c ou C57BL/6J allergiques à l'ovalbumine dont le symptôme clinique de référence est l'anaphylaxie

(caractérisée par une chute de température lors d'un TPO/TPI). Ce modèle murin récapitule en partie les mécanismes immunitaires de l'homme mais présentent des particularités que je détaillerai dans le chapitre suivant. En outre, dans mon modèle, je n'ai pas démontré l'impact des changements immunitaires induits par les LC et cDC2 (LT_{REG}, induction d'une réponse Th1/Th17, augmentation du ratio IgG/IgE) sur les cellules effectrices de l'anaphylaxie *in vivo* (mastocytes et basophiles). Cet aspect sera donc discuté. Enfin, la modulation du phénotype et des fonctions des DC au cours d'EPIT peut être conditionnée par de nombreux facteurs qui seront également discutés ici. Ce dernier point est d'intérêt majeur pour optimiser leur fonction tolérogène et l'efficacité du traitement grâce à des stratégies novatrices.

3.2 Limites de l'étude

Quel est l'impact de l'utilisation des modèles murins sur les résultats de l'étude?

Mes travaux de thèse ont été réalisés dans un modèle de souris BALB/c pour la première partie, et un modèle C57BL/6J pour la seconde partie. Il est bien établi que des différences immunologiques existent entre ces deux lignées murines, à la fois concernant la nature et l'intensité des réponses innée et adaptative (Chen, 2005; Godoy et al., 2020; Mills and Ley, 2014; Nagashima et al., 2019; Watanabe et al., 2004). Par exemple, la stimulation de splénocytes issus de C57BL/6J par des antigènes de *Bordetella pertussis* induit plus efficacement une réponse Th1 (IFN- γ sécrété par les LTCD8⁺ et cellules NK ; IL-12 produite par les DC) comparativement aux splénocytes issus de souris BALB/c (Mosley et al., 2017). De la même manière, en réponse à *Mycobacterium tuberculosis*, les DC pulmonaires (CD11c⁺CD103⁺) de souris C57BL/6J induisent une fréquence plus élevée de LT CD4⁺ IFN- γ +IL-17⁺ comparativement aux DC de souris BALB/c (Sérgio et al., 2015). Enfin, dans un modèle de sensibilisation à l'ovalbumine par voie épicutanée, les souris C57BL/6J développent une réponse clinique (hyperréactivité bronchique) et une sécrétion tissulaire d'IL-4 plus élevée que les souris BALB/c (Kodama et al., 2010). En revanche, ces dernières présentent une réponse IgG1 et IgE supérieure aux C57BL/6J.

Ainsi, il est possible que la réponse IL-4 induite et maintenue au cours d'EPIT (article n°2, figure 1G) soit une particularité des souris C57BL/6J. En effet, il a précédemment été montré que l'IL-4 diminuait avec l'EPIT dans les souris BALB/c (Dioszeghy et al., 2011). L'IL-4 est importante pour la commutation isotypique IgE des LB. Cela pourrait

donc en partie expliquer la différence de réponse anticorps observée entre les deux modèles : Dans le modèle BALB/c, une diminution du taux d'IgE spécifiques de l'OVA est observée (article n°1, figure 8), contrairement à son augmentation dans le modèle C57BL/6J (**Figure 24** présentée et décrite dans le chapitre 3.3.2 de cette discussion). La réponse anticorps observée chez les C57BL/6J se rapproche plus de ce qui est observé chez l'homme pendant les premiers mois de traitement (augmentation des IgE spécifiques). Il serait intéressant de poursuivre le traitement dans ce modèle afin de voir si la réponse IgE diminue à long terme comme cela est observé chez l'homme (Fleischer et al., 2020).

En outre, dans le modèle C57BL/6J, nous avons observé au cours de l'EPIT, une augmentation de l'IL-10 et IL-17 produites par les LT CD4⁺ de GLD, réactivés spécifiquement *ex vivo* (article n°2, figure 1G). En revanche, la production d'IL-10 diminuait après l'EPIT lors de la réactivation spécifique de splénocytes *ex vivo* dans le modèle BALB/c (l'IL-17 n'a pas été analysée). Cette différence de réponse cytokinique pourrait donc s'expliquer i) par la différence du fond génétique du modèle murin ou ii) par la nature des cellules réactivées (LT CD4⁺ purifiés mis en coculture avec des BMDC pulsées dans le modèle C57BL/6J, splénocytes totaux pulsés avec l'allergène dans le modèle BALB/c). De plus, dans le modèle C57BL/6J, nous avons montré que les cDC2 après EPIT étaient capables d'induire la production d'IFN- γ et d'IL-17 par les LT CD4⁺ contrairement aux cDC2 avant EPIT (article n°2, figure 6). La puissance statistique de cette analyse méritera d'être renforcée, en particulier pour le temps « 8 semaines d'EPIT ».

Enfin, il serait d'un grand intérêt de valider l'ensemble de ces observations chez l'homme, dont les DC possèdent des différences phénotypiques avec le modèle murin. L'analyse du profil transcriptomique et fonctionnelle des DC humaines (issues de biopsie de peau patchée ou du sang) avant et après le traitement, ainsi que l'analyse du profil cytokinique des LT CD4⁺ issus des PBMC permettraient d'identifier plus précisément de potentiels biomarqueurs ou cibles thérapeutiques.

Quelles sont les cellules et médiateurs moléculaires responsables de l'anaphylaxie dans notre modèle ?

Dans notre modèle, nous utilisons l'anaphylaxie (chute de température et relargage de mMCP-1 dans le sang) comme référence de l'efficacité clinique ou non du traitement.

Chez la souris, il a été montré qu'en réponse à un antigène tel que l'OVA, l'anaphylaxie peut être induite par la voie classique, c'est-à-dire via le récepteur FcεRI des mastocytes et/ou basophiles, mais également par la voie alternative, impliquant la voie FcγRIII des macrophages et/ou neutrophiles (Finkelman, 2007; Jönsson et al., 2011; Reber et al., 2017).

Les travaux récents de Pelletier *et al.* ont montré dans un modèle de souris C57BL/6J sensibilisées aux extraits de noix de cajou que l'anaphylaxie induite par un test de provocation oral était majoritairement dépendante des réponses IgE (Pelletier et al., 2020).

De même, dans un modèle C57BL/6J sensibilisé à l'ovalbumine sans adjuvant, puis challengé par voie intrapéritonéale, il a été montré que la réponse d'anaphylaxie est réduite après déplétion des mastocytes ou des monocytes/macrophages. Au contraire, l'ablation des basophiles ou neutrophiles est sans incidence sur la réponse anaphylactique (hypothermie et inflammation) (Balbino et al., 2017).

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'anaphylaxie dans notre modèle est majoritairement dépendante de la voie classique (IgE) et des mastocytes. De plus, l'amélioration clinique apportée par EPIT corrèle avec la baisse de la production de mMCP-1 qui est une molécule produite par les mastocytes et spécifique de l'anaphylaxie dépendante des IgE (Khodoun et al., 2011).

Néanmoins, une proportion de la réponse pourrait être causée par la voie alternative. Dans ce cas, l'efficacité de la désensibilisation (toujours associée à une hausse d'IgG) pourrait être masquée par la fixation des IgG induits sur les FcγRIII des macrophages/neutrophiles entraînant une dégranulation de médiateurs inflammatoires (voie alternative de l'anaphylaxie).

A noter que chez l'homme, l'existence de l'anaphylaxie IgG-dépendante n'a pas été formellement démontrée mais pourrait prendre place en réponse à des traitements d'IVIG (« intravenous injection of IgG ») où une forte dose d'IgG est administrée pour restaurer une immunité chez des personnes immunodéficientes (Finkelman et al., 2016).

3.3 Mécanismes associés à la désensibilisation

3.3.1 Quel est le lien entre LT_{REG}, LTh1, LTh17 et efficacité de désensibilisation ?

Dans notre modèle murin, il a été montré que la désensibilisation dépend de l'induction et de l'action des LT_{REG} FoxP3⁺ (V. Dioszeghy et al. 2014; 2016). Mes travaux de thèse révèlent que (i) l'absence de LC empêche l'induction de LT_{REG} Foxp3⁺ et que (ii) les cDC2 permettent d'induire des LT producteurs d'IFN- γ et d'IL-17.

Néanmoins, nous ne savons pas comment, quand et où les LT_{REG}, LTh1 et LTh17 régulent les cellules effectrices de l'anaphylaxie (mastocytes, basophiles). Ces dernières pourraient être régulées/remodelées progressivement à chaque nouvelle application de l'allergène qui réactive les populations de LT_{REG} ou LTh1/Th17. Au contraire, la régulation des mastocytes/basophiles pourrait avoir lieu au moment du challenge avec une forte dose d'allergène délivrée de manière systémique.

De nombreuses études ont montré l'impact des LT_{REG} ou des cytokines sur les mastocytes ou basophiles (Caslin et al., 2018; McLeod et al., 2015; Mekori and Hershko, 2012; Ochi et al., 2000; Reinhart and Kaufmann, 2018). En particulier, les LT_{REG} sont capables d'interagir directement avec les mastocytes pour inhiber leur activation (Gri et al., 2008; Kashyap et al., 2008). Aussi, les cytokines produites par les LT_{REG} telles que le TGF- β ou l'IL-10 induisent l'apoptose des mastocytes ou inhibent l'expression du Fc ϵ RI (Bailey, 2006; Gillespie et al., 2004; Kennedy Norton et al., 2008; Speiran et al., 2009). L'IL-4 quant à elle peut avoir un effet opposé selon les conditions (Macey et al., 2010; Nabeshima et al., 2005). Elle peut inhiber l'expression du Fc ϵ RI sur des mastocytes murins dérivés de cellules de moelle osseuse (BMMC ; bone-marrow derived mast cells), et au contraire induire ce même récepteur sur des mastocytes humains cultivés *in vitro* (Ryan et al., 1998; Toru et al., 1996). Elle peut aussi stimuler la prolifération des mastocytes murins *in vivo* (Burton et al., 2013). L'IFN- γ peut réguler la croissance et l'expression de Fc γ R des mastocytes (Mann-Chandler et al., 2005; Okayama et al., 2000; Sellge et al., 2014).

Il est donc nécessaire de déchiffrer les mécanismes de régulation des mastocytes/basophiles propres au traitement par EPIT et à notre modèle.

3.3.1.1 Quelle est la place des cytokines dans la régulation des mastocytes *in vitro* ?

Dans notre article n°2, nous avons montré que l'ajout d'une seule cytokine (IL-4 ou IL-5) stimulait la dégranulation de BMMC (article n°2, figure S7); au contraire, l'IL-17 ou l'IFN- γ réduisait cette activation. Ces résultats suggèrent un rôle bénéfique de l'IL-17 et l'IFN- γ induit par les cDC2 après EPIT. Il sera également intéressant de regarder l'effet des cytokines anti-inflammatoires TGF- β et IL-10 produites par les LT_{REG}. En 2016, Tordesillas *et al.* avait montré que le TGF- β limitait la réactivation des mastocytes *in vitro*, contrairement à l'IL-10 qui l'augmentait (Tordesillas *et al.*, 2016). Cet effet de l'IL-10 est en accord avec une autre publication de 2016 qui avait montré sa contribution à la réponse mastocytaire dans un modèle murin BALB/c d'allergie alimentaire (Polukort *et al.*, 2016). Néanmoins, la combinaison de différentes cytokines peut avoir un effet différent comparativement aux cytokines seules (Macey *et al.*, 2010), et nous testons actuellement des combinaisons de cytokines afin de reproduire le mélange cytokinique présent *in vivo*. De plus, nous avons utilisé des mastocytes dérivés de cellules de moelle osseuse. Ils peuvent présenter un phénotype différent comparativement aux mastocytes tissulaires (péritonéaux par exemple), et pourraient répondre différemment aux stimuli (Malbec *et al.*, 2007). Il est également possible que les mastocytes issus de souris allergiques ou de souris traitées par EPIT expriment un phénotype différent (expression modulée des Fc ϵ RI, Fc γ R, récepteurs de costimulation) en raison du contact répété avec l'antigène, les anticorps, les cytokines ou par contact direct avec les LT CD4⁺ induits par EPIT. Ce dernier point est discuté plus loin.

3.3.1.2 Quelle est la place des LT_{REG} et LT_{CONV} dans la régulation des mastocytes *in vitro* ?

Basé sur nos résultats de l'article n°2, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes associant l'induction de LT_{REG}, LTh1/Th17, avec la régulation des mastocytes.

Pour ce faire, nous avons réactivé *in vitro* des LT provenant de souris allergiques ou traitées par EPIT en présence de mastocytes. Pour ce faire, nous avons réalisé une tri-culture de 3 jours contenant (i) des BMMC, (ii) des cellules de ganglions lymphatiques (GLD) provenant de souris allergiques ou de souris traitées par EPIT, et

(iii) des BMDC (cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse) pulsées ou non à l'OVA. Au 3^{ème} jour, nous avons sensibilisé les mastocytes présents dans la tri-culture avec de l'IgE pendant 16H, puis challengé ces derniers avec un anticorps anti-IgE afin d'induire leur dégranulation. Nous avons suivi leur réactivation en dosant la production de β -hexosaminidase relarguée dans le milieu (**Figure 22**). Nos résultats préliminaires montrent que des BMDC dégranulent très fortement ($\sim 50\%$ de relargage de β -hexosaminidase) lorsqu'ils sont cultivés avec des cellules ganglionnaires provenant de souris allergiques, et réactivés par des BMDC pulsées avec de l'OVA, par rapport à des cultures contrôles (BMDC non pulsées ; $\sim 35\%$ de relargage de β -hexosaminidase). De façon intéressante, les BMDC dégranulent moins (environ $\sim 35\%$ de relargage de β -hexosaminidase) lorsqu'ils sont cultivés avec des cellules ganglionnaires provenant de souris traitées par EPIT, et réactivés par des BMDC pulsées avec de l'OVA. Ceci suggère donc que (i) les BMDC sont régulés par le microenvironnement créé par la réactivation des cellules ganglionnaires provenant de souris traitées par EPIT, ou (ii) qu'ils sont davantage stimulés en présence de cellules provenant de souris allergiques.

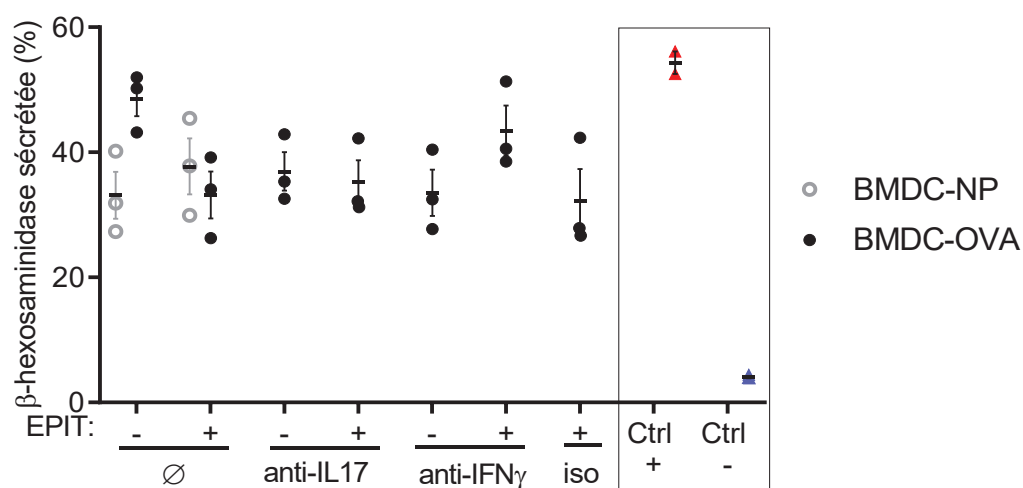


Figure 22 : Activation de mastocytes *in vitro* après coculture avec des cellules ganglionnaires provenant de souris allergiques ou EPIT.

Des BMDC ont été cultivés 3 jours avec des cellules de ganglions lymphatiques provenant de souris allergiques (EPIT -) ou de souris traitées par EPIT (EPIT +), et des BMDC pulsées à l'ovalbumine (BMDC-OVA ; points noirs) ou non pulsées (BMDC-NP ; cercles gris). 1ng/mL d'anticorps anti-IL-17 ou anti-IFN γ ou l'isotype correspondant ont été ajoutés au début de la culture. Après 3 jours de tri-culture, de l'IgE (0,5 μ g/mL) a été ajouté 16H, puis un anti-IgE a été incubé pendant 30min afin d'induire la dégranulation mastocytaire. En contrôle positif (Ctrl +), des mastocytes seuls ont été sensibilisés avec l'IgE et activés avec l'anti-IgE (triangles rouges). En contrôle négatif (Ctrl -), des mastocytes seuls ont été uniquement sensibilisés (triangles bleus). Le graphique représente le pourcentage de β -hexosaminidase relarguée dans le surnageant par rapport à la β -hexosaminidase non sécrétée.

Nous avons observé dans notre article n°2 que les LT CD4⁺ de souris traitées par EPIT réactivées avec des BMDC chargées avec de l'OVA, produisent de l'IL-17 et de l'IFN- γ (article n°2, figure 1G). Également, l'ajout d'IL-17 ou d'IFN- γ sur des BMMC limitait leur réactivation (article n°2, figure S7). Nous avons donc évalué, si bloquer la production d'une de ces 2 cytokines permettait de limiter la dégranulation des BMMC (**Figure 22**). L'ajout d'un anticorps anti-IL-17 dans le puits de culture n'a en rien changé le niveau de dégranulation des BMMC par rapport à une culture additionnée d'un anticorps isotypique contrôle. Au contraire, l'ajout d'un anticorps anti-IFN- γ a augmenté de façon significative la dégranulation des BMMC, ceci suggérant que la sécrétion d'IFN- γ dans le puits de culture a un effet inhibiteur sur la réactivation des mastocytes *in vitro*. L'IFN- γ produit par les cellules ganglionnaires de souris désensibilisées par EPIT pourrait donc être déterminant dans la régulation des cellules effectrices (mastocytes, voire basophiles) de l'anaphylaxie. Ces expériences seront reproduites à partir de lymphocytes T CD4⁺ purifiés de souris allergiques ou désensibilisées. Nous chercherons aussi à savoir si l'IFN- γ et l'IL-17 présentent un effet synergique et par quel mécanisme l'IFN- γ inhibe la réactivité des mastocytes (par exemple, via l'augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs Fc γ RIIb). Le blocage de l'IL-17 (**Figure 22**) ne montre pas d'effet sur l'activation des BMMC en triculture contrairement à l'ajout d'IL-17 sur des BMMC seuls qui a un effet inhibiteur (article n°2, figure S7). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par le fait que dans l'expérience de blocage (**Figure 22**), de nombreuses cellules ganglionnaires et autres cytokines sont présentes dans le milieu. L'effet de l'IL-17 pourrait ainsi être compenser ou masquer par les autres cytokines en présence.

En outre, nous ne pouvons pas exclure des mécanismes d'inhibition ou d'activation par contact direct des cellules des ganglions sur les BMMC. Des expériences de « trans-well » où les BMMC et les LT CD4⁺ seraient physiquement séparés pourraient nous aider sur ce point.

3.3.1.3 Quelle est la place des cytokines dans la régulation des mastocytes *in vivo* ?

Comme énoncé précédemment, si la régulation des mastocytes *in vivo* au cours d'EPIT est due aux cytokines produites par les LT CD4⁺ (IL-10, IL-17, IFN- γ), celle-ci pourrait être progressive (à chaque application du patch contenant l'allergène) ou

prendre place au moment du challenge, lorsqu'une forte dose d'allergène est administrée. Nous avons donc deux stratégies pour évaluer cet aspect : i) bloquer les cytokines *in vivo* tout au long du traitement ou ii) bloquer les cytokines au moment du challenge.

i) Rôle des cytokines lors de l'anaphylaxie

Nous avons donc réalisé des expériences *in vivo* afin d'étudier le rôle de l'IL-10 et l'IL-17 dans la protection clinique conférée par EPIT. En effet, ces cytokines étaient graduellement induites au cours d'EPIT, comme observé après réactivation spécifique *ex vivo* des LT CD4+ (article n°2, figure 1G). Pour ce faire, nous avons traité des souris sensibilisées par EPIT pendant 3 semaines. Puis, 10 jours après la dernière application de patch, nous avons réalisé un test de provocation intrapéritonéale (TPI). 24h et 4h avant ce TPI, des anticorps bloquants la protéine IL-10 et son récepteur (anti-IL10R (200µg) et anti-IL10 (200µg)), ou bloquant la protéine TGF-β (anticorps anti-TGF-β (1mg)), ou un contrôle isotypique ont été injectés. Comme attendu, les souris traitées par EPIT ont développé une moindre chute de température (anaphylaxie) comparativement aux souris sensibilisées non traitées. Les différents groupes EPIT traités à l'aide d'anticorps bloquants ne présentaient pas de différence de protection, par rapport au groupe EPIT traité à l'aide d'un isotype contrôle (**Figure 23**).

Des résultats similaires ont été obtenus en bloquant l'IL-17 (données non montrées). Ces résultats suggèrent que l'IL-10, l'IL-17 et le TGF-β ne sont donc pas nécessaires pour limiter la réactivation des mastocytes/basophiles lors d'un TPI. Cependant, Tordesillas *et al.* avaient observé que le TGF-β était requis pour la protection conférée par EPIT lors d'un TPO par dose croissante (Tordesillas et al., 2016). Nous ne pouvons pas exclure que la voie de challenge (i.p. ou orale) mette en jeu des mécanismes de régulation différents.

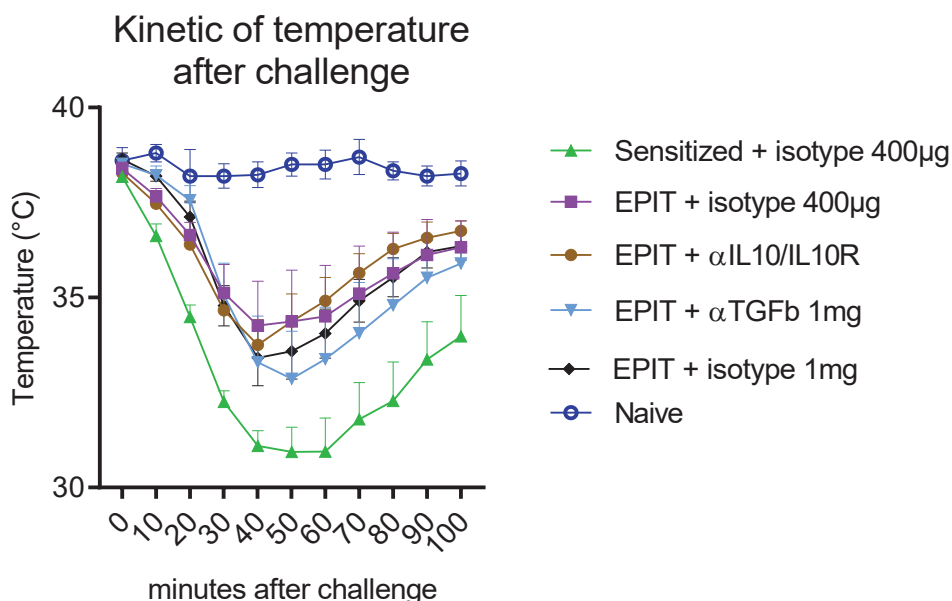


Figure 23 : Rôle des cytokines lors d'un test de provocation intra-péritonéale
Les souris sensibilisées ont été traitées par EPIT ou non, et injectées avec un anticorps bloquant anti-TGF- β (1mg) ou une combinaison d'anti-IL-10 (200µg) et anti-IL-10R (200µg) ou un isotype contrôle (200µg ou 1mg), 24h et 4h avant un test de provocation intrapéritonéale. La température a été relevée toutes les 10 minutes pendant 100min. La température moyenne $\pm$ SEM est représentée pour chaque groupe. n=6.

i) Rôle des cytokines dans la régulation progressive des mastocytes

Les cytokines produites par les LT CD4⁺ dans notre modèle (IL-10, IL-17, IFN- γ) ont possiblement une action sur le long terme dans le remodelage phénotypique et fonctionnel des mastocytes, et non pas un rôle inhibiteur au moment de l'engagement de la voie Fc ϵ RI.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons bloqué la cytokine IL-10 au cours du traitement par EPIT. Cette cytokine est connue pour avoir des propriétés anti-inflammatoires et diminuer l'expression du Fc ϵ RI et la signalisation d'activation des mastocytes (Kennedy Norton et al., 2008). Des anticorps bloquants anti-IL-10 (200µg) ont été administrés pendant la deuxième moitié du traitement (2 injections sur 4 semaines de traitement par EPIT), la veille de l'application des patchs Viaskin®. Le blocage de l'IL-10 n'a pas modifié la protection clinique induite après traitement EPIT (chute de T°C suite à un TPI) comparativement au groupe injecté avec un isotype contrôle. L'IL-10 ne semble donc pas importante pour inhiber la réactivation des mastocytes au cours d'un traitement EPIT. Cependant, l'IL-10 a été injectée dans cette expérience de façon transitoire. Or, nous avons observé dans ce modèle que la

protection clinique induite par le traitement EPIT est précoce (effective dès la 3^{ème} semaine d'application du patch). L'injection d'anticorps bloquant dans cette expérience a possiblement été trop tardive pour réguler l'effet de l'IL-10 sur les mastocytes. A noter qu'il sera également intéressant de tester le blocage de l'IL-17 et surtout de l'IFN- γ (au regard de nos résultats de tri-culture), dès le début du traitement.

3.3.2 Quelle est la place des anticorps dans la désensibilisation ?

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai principalement étudié le rôle des DC sur la réponse lymphocytaire T et les cytokines associées. Néanmoins, la réponse anticorps a aussi été suivie.

Le traitement par EPIT module la réponse anticorps des souris sensibilisées. Dans le modèle BALB/c, les IgE spécifiques diminuent avec le traitement par EPIT tandis que les IgG1/IgG2a augmentent fortement (le ratio IgG/IgE augmente également) (article n°1, Figure 8). La chute des IgE est perdue en absence de cellules de Langerhans indiquant que les LC peuvent influencer la réponse anticorps induite par EPIT. A noter que la réponse IgG1, IgG2a est inchangée par rapport au groupe contrôle (données non montrées). De plus, après 2 semaines d'EPIT, la déplétion en LC réduit significativement l'induction de LT_{FH} (CXCR5+ICOS+PD1+FoxP3-), LT_{FR} (CXCR5+ICOS+PD1+FoxP3+), et des centres germinatifs (CD19+GL7+), dans les ganglions lymphatiques, comparativement au groupe EPIT contrôle (données non montrées). Les LT_{FH} et LT_{FR} sont importants pour la commutation isotypique des LB. Etant donné qu'en absence des LC, les cDC2 migrent moins avec l'allergène au cours d'EPIT, un rôle des cDC2 dans la réponse anticorps est également possible.

Chez des souris C57BL/6J traitées par EPIT, nous nous sommes aperçus, contrairement au modèle utilisant des souris BALB/c, que la concentration sérique d'IgE spécifiques augmente avec le traitement EPIT (**Figure 24**). Cependant, les ratios IgG1/IgE ou IgG2a/IgE augmentent de façon similaire entre les deux modèles. De manière intéressante, dans le modèle C57BL/6J Langerin-DTR, la déplétion en LC a une tendance à réduire l'augmentation d'IgG2a spécifiques induites par le traitement EPIT (données non montrées). Ainsi, les DC cutanées à travers l'activation de LT_{FH}, LT_{FR} et l'induction de LT_{REG}, LT_{CONV} producteurs de cytokines de type 1, peuvent influencer la production d'anticorps par les LB au cours d'EPIT.

En outre, le degré d'affinité des anticorps ou la sialylation des anticorps produits n'a pas été suivi mais peuvent être responsables de la réactivité diminuée des mastocytes/basophiles (Petry et al., 2020; Shade et al., 2020). Il serait intéressant de purifier les anticorps IgE ou IgG du sérum avant et après EPIT afin de comparer leur état de sialylation par spectrométrie de masse.

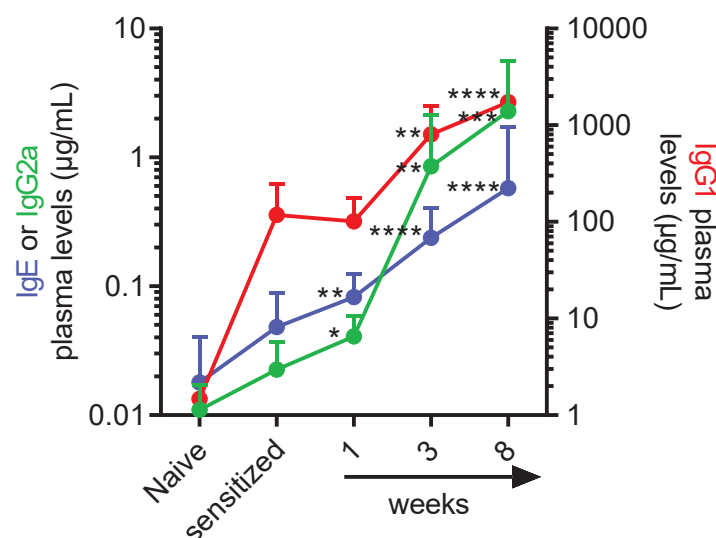


Figure 24 Cinétique des IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques au cours d'EPIT.

Les taux d'IgE (en bleu), IgG2a (en vert) et IgG1 (en rouge) dans le plasma sont représentés chez des souris naïves et des souris sensibilisées à l'OVA et traitées par EPIT. La moyenne $\pm$ SD est représentée pour chaque groupe. n= 5-10 souris. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001 par rapport au groupe sensibilisé, test statistique de Mann-Whitney.

3.3.2.1 Quelle est la place des anticorps dans l'inhibition des cellules responsables de l'anaphylaxie IgE-dépendante ?

Les mastocytes expriment de nombreux récepteurs activateurs ou inhibiteurs tels que CD300a, PIR-B, PECAM-1, MAFA, gp49B1 et les récepteurs des fractions Fc des immunoglobulines (FcR). Parmi ces derniers, les Fc ϵ RI et Fc γ RIII sont activateurs du mastocyte, après formation du complexe FcR ϵ I-Ag-IgE ou Fc γ RIII-Ag-IgG. En revanche, le Fc γ RIIb est le seul récepteur inhibiteur chez la souris et l'homme. (Burton et al., 2018b; Finkelman, 2007; Nimmerjahn and Ravetch, 2006).

3.3.2.1.1 Est-ce que le sérum est suffisant pour prévenir la dégranulation des mastocytes ?

Les immunoglobulines sont déterminantes dans le développement de la réponse anaphylactique lors d'un challenge et leur modulation par les ITA peut participer à la désensibilisation (Zha et al., 2018).

Cependant, le transfert de sérum provenant de souris allergiques ou traitées par EPIT induit dans les deux cas une sensibilisation active de souris naïves: Après challenge des souris receveuses, la réponse anaphylactique est la même dans les deux groupes transférés (Tordesillas et al. 2016 ; et données non montrées). Ceci s'explique par la fixation des IgE du sérum sur les FcεRI des mastocytes induisant leur dégranulation. Dans ces conditions, les IgG présents dans le sérum induits au cours de l'ITA ne sont donc pas suffisants pour réguler cette activation. Nous pouvons supposer que l'action inhibitrice des IgG via le FcγRIIb se fait sur une période plus longue. Néanmoins, une étude récente de Storni *et al.* a montré que le transfert d'IgG de haute affinité et spécifiques d'Ara h 2 réduisait l'anaphylaxie de souris BALB/c sensibilisées qui ont été challengées seulement 24H après le transfert d'anticorps. Le mécanisme était dépendant du FcγRIIb (Storni et al., 2020a). De la même manière, O.Burton *et al.* ont montré que la seule présence d'IgG1 en plus des IgE spécifiques de l'ovalbumine, lors d'une sensibilisation passive de souris BALB/c naïves receveuses suffisait à prévenir le développement d'une anaphylaxie déclenchée 24H plus tard par un TPI (Burton et al., 2014). La protection était perdue chez des souris receveuses dépourvues en récepteur FcγRIIb.

Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que i) l'affinité et la nature isotypique des anticorps induits par EPIT, ainsi que ii) l'expression des récepteurs Fc à la surface des mastocytes, et en particulier celle du FcγRIIb, sont clés pour l'inhibition des mastocytes et la protection clinique associée à EPIT.

3.3.2.1.2 **Est-ce que le traitement par EPIT module la nature des FcR et des anticorps présents à la surface des mastocytes ?**

Au cours de travaux préliminaires non publiés (Hervé et al.), nous avons suivi l'évolution du nombre de mastocytes dans le sang, l'intestin, la cavité péritonéale et la peau. Nous avons également analysé l'évolution de l'expression des récepteurs FcεRI, FcγRII/III (CD32/CD16), CD117 et la quantité d'IgE, d'IgG1 et IgG2a/b fixés à la surface des mastocytes au cours du traitement EPIT. Les résultats montrent une augmentation significative de l'expression des FcγRII/III sur les mastocytes dans tous les tissus après EPIT comparativement aux souris sensibilisées non traitées. De manière intéressante, la fréquence des mastocytes exprimant des IgG2a/b à leur surface est augmentée dans l'intestin après traitement EPIT (**Figure 25**). La quantité

d'IgG2a/b exprimée par mastocyte a tendance à augmenter également. Dans cette expérience, la quantité d'IgE à la surface des mastocytes de la peau et de la cavité péritonéale augmentait avec EPIT (données non montrées). Néanmoins, le niveau de FcεRI membranaire ne semblait pas moduler mis à part dans l'intestin. Ces résultats suggèrent que le traitement par EPIT favorise la voie inhibitrice FcγRIIb ou activatrice FcγRIII. De plus, le traitement EPIT module le phénotype des mastocytes de manière systémique et non pas uniquement dans la peau. Il sera intéressant de valider l'augmentation de l'expression du récepteur FcγRIIb en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement celui-ci. Nous pourrions également bloquer ce récepteur *in vivo* au cours d'EPIT, ou développer des souris C-kit^{Cre}, FcγRIIb^{fl/fl} afin de mettre en évidence son importance pour la désensibilisation et la protection clinique lors du challenge.

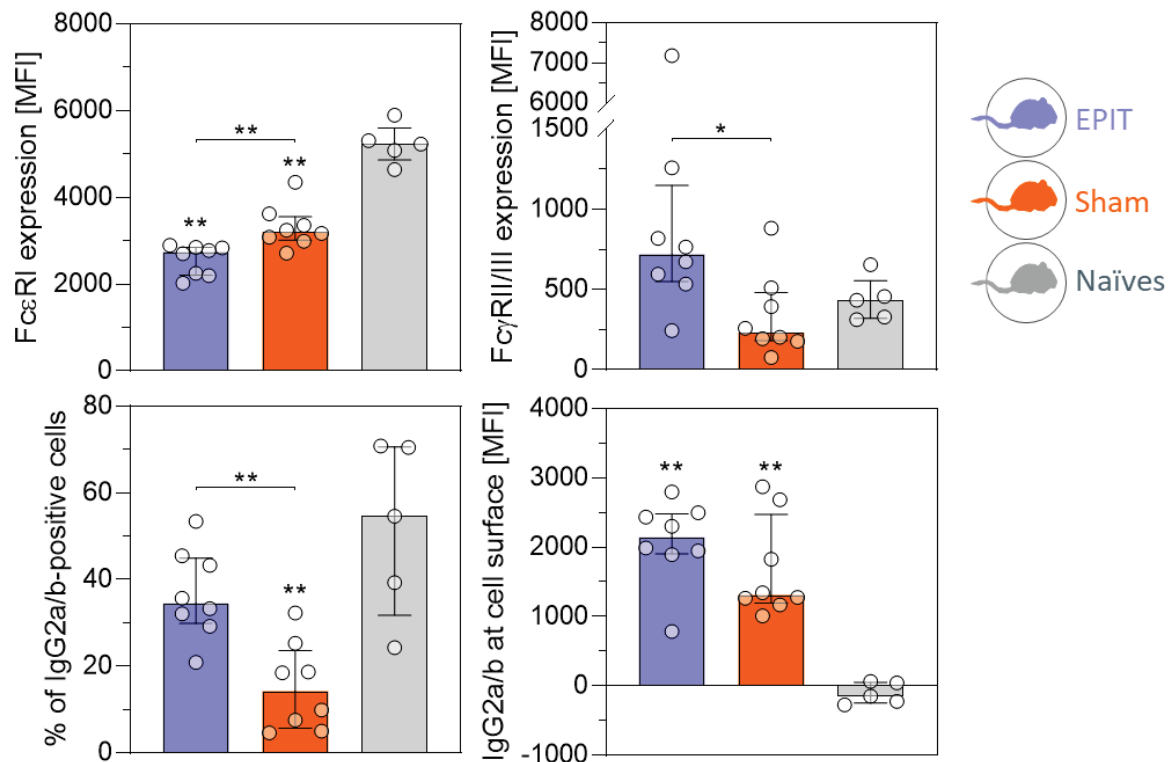


Figure 25 Phénotype des mastocytes dans l'intestin après EPIT (Hervé *et al.*)

Les graphiques représentent les cellules viables Lin-(CD3-CD19-) CD45+ CD117+ FcεRI+.

La médiane de l'intensité de fluorescence (MFI) du FcεRI (panel en haut à gauche), du FcγRII/III (panel en haut à droite), de l'IgG2a/b (panel en bas à droite) ou le pourcentage de mastocytes positifs pour l'IgG2a/b, sont représentés. Les histogrammes (bleu : EPIT ; orange : SHAM ; gris : naïves) représentent la médiane ± SD et les valeurs individuelles.

* p<0.05, **p<0.01. Test statistique de Mann-Whitney.

Outre les anticorps, le contact répété de l'allergène sur les mastocytes peut limiter leur capacité à être réactivé. Cela a été montré avec un protocole de désensibilisation des BMMC *in vitro*, à faible dose, croissante (Sancho-Serra *et al.*, 2011). La désactivation mastocytaire était spécifique de l'antigène. Elle est due à une rigidification de la membrane et une baisse de l'internalisation des complexes IgE-Ag-FcεRI. Nous ne pouvons pas exclure qu'un tel phénomène prend place lors de l'application répétée de l'allergène sur la peau et participe à la régulation des mastocytes au cours d'EPIT.

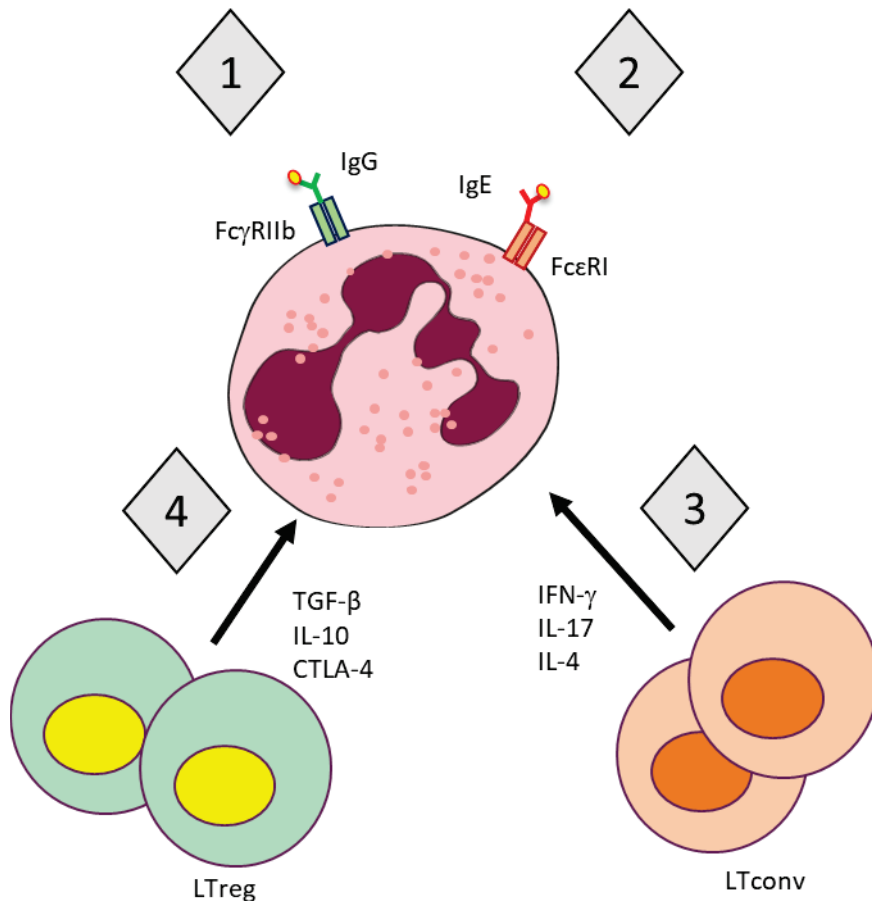


Figure 26 Mécanismes d'inhibition ou d'activation des mastocytes pouvant prendre place au cours d'EPIT

1) Inhibition du mastocyte par fixation des IgG sur le récepteur inhibiteur FcγRIIb.

2) Activation du mastocyte par fixation des IgE sur le FcεRI, et possiblement inhibition progressive par contact répétée à faible doses.

3-4) Activation ou inhibition du mastocyte par les cytokines produites par les LT_{conv} et LT_{reg}. Cet effet peut possiblement être temporaire ou réguler sur le long cours la réactivité du mastocyte.

Pour conclure, les DC induites par EPIT peuvent moduler la réponse lymphocytaire T et B, ce qui peut avoir de multiples conséquences sur les cellules responsables de l'anaphylaxie (**Figure 26**). Il sera intéressant de relier fonctionnellement par des expériences *in vivo* les trois compartiments : DC – lymphocytes – mastocytes

3.3.3 Quels mécanismes modulent le phénotype et la fonction des cellules dendritiques au cours d'EPIT?

Au cours du traitement par EPIT, nous avons montré que les sous-populations de DC qui captent l'allergène acquièrent un phénotype d'activation différent (expression différentielle de CD86, CD40, PD-L2) qui corrèle avec une modulation de leurs capacités à activer des LT CD4⁺ *in vitro*. Il convient donc de s'interroger sur les mécanismes responsables de la modulation des DC afin de pouvoir agir dessus et optimiser le traitement EPIT.

Dès 2011, Dioszeghy *et al.* ont montré que la capacité de prise en charge de l'allergène par les DC cutanées était augmentée dans des souris allergiques comparativement à des souris naïves (Dioszeghy *et al.*, 2011). Ces résultats suggéraient alors que l'immunité pré-existante influait sur le phénotype, la prise en charge de l'Ag et les fonctions des DC. Ceci pourrait impliquer :

1. les anticorps et les complexes immuns IgG-Ag,
2. les cellules (LT_{REG}, LT_{CONV}, ILC, kératinocytes...) ou cytokines environnantes,
3. l'éducation/remplacement des DC (changements épigénétiques, transcriptomiques, métaboliques) au cours de la désensibilisation.

Est-ce que la prise en charge ou l'internalisation de l'allergène par les DC cutanées est modulée au cours d'EPIT ?

Dans notre article n°2, nous avons observé que la quantité d'OVA (MFI) détectée dans les LC et cDC2 migrantes dans les GLD à 48H avait tendance à diminuer au cours d'EPIT. Cela pourrait s'expliquer par une diminution de la prise en charge de l'allergène dans la peau dans les heures précoces après l'application du patch ou par une internalisation et dégradation de l'allergène fluorescent différentes. Dans notre étude, nous avons regardé la prise en charge de l'allergène par les DC dans la peau à 48h après application du patch. Il serait intéressant d'évaluer plus précocement celle-ci (entre 1 et 6h après application du patch) à 1,3, et 8 semaines de traitement.

La capture et l'internalisation de l'allergène par la DC sont décisives pour sa fonction (Kamphorst *et al.*, 2010). Cette capture peut se faire par différents mécanismes : la pinocytose/macropinocytose (indépendant des récepteurs de surface), l'endocytose dépendant ou indépendant de la clathrine et impliquant des récepteurs tels que CD205 ou CD206 (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2015; Sandvig *et al.*, 2018), la phagocytose pour des éléments antigéniques de taille plus importante (cellules morte, bactéries). Enfin, les récepteurs aux Fc peuvent également participer à l'internalisation des antigènes et leur présentation sur les CMH-I/II. L'internalisation par les FcR dépend de la clathrine (Flinsenberg *et al.*, 2012; Guillemins *et al.*, 2014b; Junker *et al.*, 2020; Lehmann *et al.*, 2017; van Montfort *et al.*, 2012).

Une étude transcriptomique (RNA-seq) est actuellement en cours afin de déterminer si les DC qui ont capté l'allergène dans la peau et migré vers les GLD, ont adapté leur programme transcriptomique au cours du protocole d'EPIT. Ainsi, nos résultats

pourraient mettre en évidence certains récepteurs clés pour la fonction tolérogène des DC. Que ce soit en termes de molécules de costimulation des LT ou en termes de récepteurs pour internaliser l'allergène. Le ciblage d'allergènes sur ces récepteurs serait alors une stratégie potentielle pour favoriser une réponse tolérogène.

Est-ce que les FcR participent à la prise en charge de l'allergène par les DC ?
Quelles conséquences sur la fonction des DC ?

Des résultats non publiés de la société DBV Technologies (Hervé et al., en soumission) ont montré qu'après 6h d'application d'un patch OVA, les cDC1 et cDC2 CD11b+ captent plus d'allergène dans des souris allergiques comparativement à des souris naïves (**Figure 27A**). De plus, la comparaison de l'expression des FcR de surface à l'homéostasie (sans application de patches) révèle que l'expression des FcεRI/II et FcγRI/II/III varie selon les sous-populations. De manière intéressante, quand un patch contenant de l'OVA est appliqué sur la peau, l'expression des récepteurs de surface FcγRII/III est drastiquement diminuée sur les 3 sous-populations. L'expression des récepteurs FcεRI sur les cDC1 ou FcγRI sur les cDC2, est également diminuée comparativement aux souris sensibilisées non patchées (**Figure 27B**). Ces résultats suggèrent que les DC internalisent, au moins en partie, l'allergène via les récepteurs aux Fc.

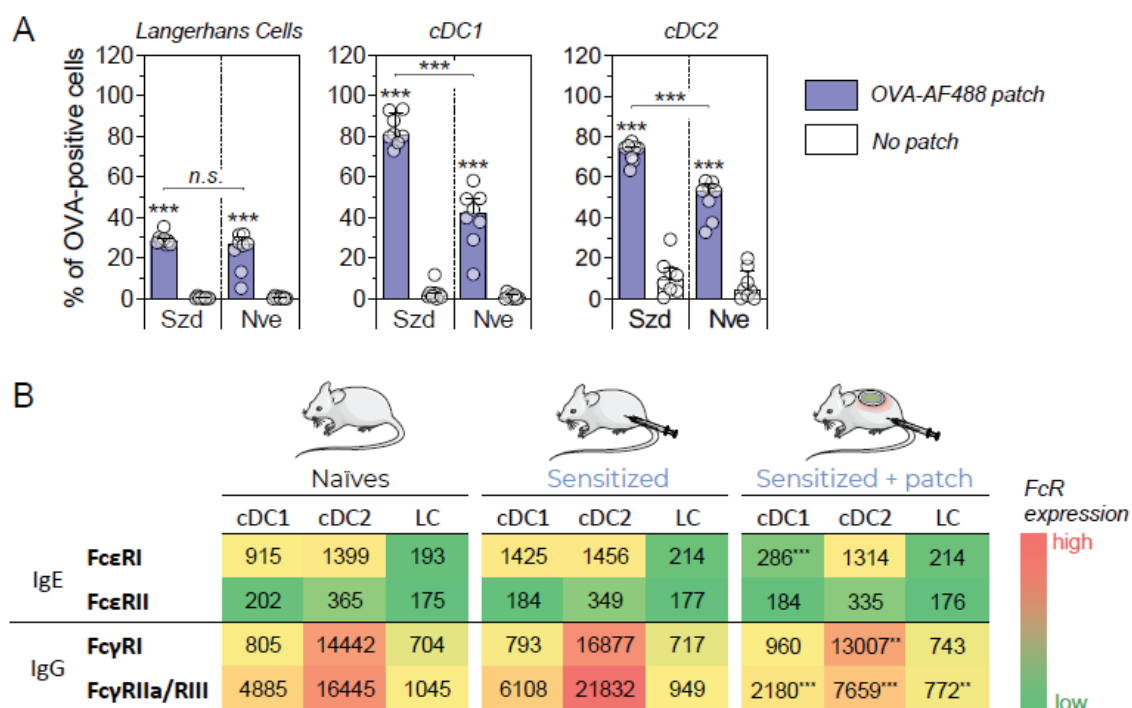


Figure 27 : Prise en charge de l'allergène et expression des FcR sur les DC cutanées.

(A) Souris sensibilisées à l'OVA (SzD) ou naïves (Nve) recevant un patch contenant de l'OVA-AF488 sur la peau dépilée du dos (histogrammes bleus). En contrôle, des souris n'ont pas reçu de patch (histogrammes blancs). Six heures après application, une biopsie de la peau patchée (ou non) du dos est prélevée pour une analyse par FACS. Le pourcentage de cellules OVA+ parmi les cellules de Langherans, cDC1 et cDC2 est indiqué. Les valeurs individuelles sont affichées avec la médiane et l'écart interquartile. (n=8 par groupe). (B) L'expression des récepteurs aux Fc est exprimée en médiane de l'intensité de fluorescence (MFI). Les données affichées représentent la médiane des MFI individuelles (n=8 par groupe). La significativité statistique est indiquée pour le groupe « sensibilisé + patch » (sensitized + patch) en comparaison des souris « sensibilisées » (sensitized). (**, P<0.01; ***, P<0.001. Test statistique de Mann-Whitney.

De plus, le transfert d'IgG purifiées provenant de souris allergiques dans des souris naïves augmente le nombre de DC OVA+ migrantes dans les GLD (48H après l'application d'un seul patch), comparativement à des souris naïves non transférées (Hervé et al., en soumission, données non montrées). Ceci suggère que la formation de complexes IgG-OVA facilite leur prise en charge par les DC. Enfin, chez des souris allergiques, le blocage des récepteurs FcγRII/III (CD32/CD16) diminue la prise en charge de l'allergène dans la peau par les LC, cDC1 et cDC2 et leur migration. Ces résultats démontrent que chez les souris sensibilisées, les 3 sous-populations de DC cutanées prennent en charge l'allergène par endocytose grâce aux FcγR, du moins en partie. D'autres voies de prise en charge (FcεRI, CD205/206, pinocytose) peuvent également intervenir puisque le blocage des FcγRII/III n'abolit pas complètement la prise en charge.

Au vu de mes résultats de thèse indiquant une baisse de la quantité d'ovalbumine détectée dans les LC et cDC2 migrantes au cours d'EPIT, il sera intéressant d'évaluer si cela est due à une modulation de l'expression des Fc γ R. Nous pourrions bloquer ces récepteurs au cours d'EPIT (anticorps bloquants) et suivre la prise en charge de l'allergène dans la peau tout au long du traitement. De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé uniquement contre le Fc γ RIIb ou le Fc γ RIII permettra de discriminer une prise en charge via un récepteur inhibiteur ou activateur, respectivement. Il sera aussi important de déterminer si la prise en charge par la voie Fc γ RIIb ou Fc γ RIII influe sur la fonction de la DC à activer/polariser des LT.

En effet, dans l'étude de Hervé et al. citée ci-dessus (données non montrées), le blocage des Fc γ RII/III ne modifie pas l'expression des marqueurs d'activation (CD86 et PD-L2) à 6h dans la peau (après un seul patch). Il est possible que la variation des marqueurs d'activation soit plus tardive ou que d'autres récepteurs de costimulation soient modulés. Dans mes travaux de thèse, je n'ai pas observé de modulation d'expression des molécules de costimulation (CD86, CD40, PD-L2) sur les DC dans la peau 48H après l'application des patchs à 1,3 et 8 semaines. Néanmoins, une modulation de ces molécules était visible sur les DC migrantes à 48H. Le moment et l'organe où l'analyse est réalisée est donc importante pour appréhender la dynamique d'activation des DC. Une étude plus fine de la dynamique d'expression des récepteurs de costimulation dans la peau serait d'intérêt pour clarifier le lien entre prise en charge de l'allergène et phénotype d'activation.

Quel est l'impact de l'environnement cellulaire sur l'activation et la fonction des DC cutanées ?

Comme évoqué ci-dessus, mes travaux de thèse montrent que l'état d'activation des DC migrantes est modulé au cours d'EPIT. Etant donné que le patch contenant l'allergène est appliquée de manière répétée au même endroit (dos de la souris) durant le traitement, nous pouvons supposer que de cellules immunitaires sont recrutées et que d'autres cellules déjà présentes sont également modulées. Il sera par exemple très intéressant de suivre le phénotype ou la signature cytokinique des macrophages résidents de la peau. De la même manière, il convient de s'interroger sur la modulation des DC cutanées par :

- Les lymphocytes T mémoires résidents

- l'interaction avec les mastocytes cutanés
- les kératinocytes

Quel est l'impact des LT mémoires résidents sur les DC cutanées ?

L'application répétée d'un allergène sur la peau conduit à une redistribution et/ou remodelage des cellules immunitaires présentes. En particulier, il a été montré que des LT mémoires résidents pouvaient infiltrer la peau et persister jusqu'à 1 an après la résolution d'une lésion d'eczéma allergique (Gamradt et al., 2019). Dans notre modèle C57BL/6J, nous avons observé une accumulation progressive du nombre de LT_{RM} CD4⁺ et CD8⁺ (CD69⁺CD103⁺) présents dans la peau au cours du traitement par EPIT (données non montrées). Ainsi, ces LT_{REG} recrutés pourraient influencer la maturation/migration des DC cutanées et participer à l'acquisition d'un profil tolérogène bénéfique pour EPIT comme démontré dans un modèle de sensibilisation épicutané (Hanakawa et al., 2019). Pour mettre en évidence un rôle des LT_{RM} régulateurs sur les DC cutanées, il serait intéressant de dépléter les LT_{RM} à la 8^{ème} semaine du traitement, et d'évaluer la migration et l'activation des DC suite à l'application d'un patch contenant l'allergène, en comparaison d'un groupe contrôle non déplété. Cette expérience pourrait tirer avantage de souris CD3 ϵ ^{-/-} reconstituées initialement avec des LT CD4⁺DTR et des LT CD8⁺WT (provenant de souris donneuses iDTR/CD4cre et C57BL/6, respectivement) Ce modèle permet en effet de dépléter à la fois les LT CD4⁺ circulants et résidents. En contrôle, un groupe traité avec des anticorps anti-CD4 permet d'éliminer uniquement les LT CD4⁺ circulants (Gamradt et al., 2019). Une expérience similaire pourrait être réalisée en éliminant les LT_{RM} CD8⁺ dont le rôle au cours d'EPIT reste inconnu. Du fait de leurs fonctions cytotoxiques et de leur potentiel à produire de l'IFN- γ , ils peuvent participer à l'inflammation locale et impacter la maturation/activation des DC.

Quel est l'impact des mastocytes sur les DC cutanées ?

Mis à part les LT, les mastocytes de la peau sont également capables d'interagir avec les DC. Nous ne savons pas à ce jour si l'application répétée du patch augmente ou diminue le nombre de mastocytes dans la peau, néanmoins leur phénotype pourrait être modulé (cf §3.3.2.1.2).

Premièrement, en conditions inflammatoires, les mastocytes activés par les IgE peuvent favoriser un profil pro-Th2 des DC (Kitawaki et al., 2006). De plus, les

mastocytes et le relargage de granules contenant de l'histamine ou du TNF- α participent à l'inflammation cutanée et à la migration des DC en réponse à l'application d'haptènes ou de LPS (Dudeck et al., 2011, 2019; Simon et al., 2012). Il est connu que l'application répétée des patchs durant un protocole d'EPIT génère une inflammation locale (visible cliniquement à la fois chez la souris et l'homme). Celle-ci est possiblement due en partie à la réactivation des mastocytes cutanés et contribue à la migration des DC. Etant donné que le traitement par EPIT n'est pas efficace lorsque la peau est abrasée par une procédure de tape-stripping, si une inflammation est nécessaire pour l'activation/migration des DC, celle-ci doit être modérée (Mondoulet et al., 2012a).

Deuxièmement, le GM-CSF produit par les mastocytes dans un modèle d'allogreffe favorise un profil tolérogène des DC qui sont alors incapables d'activer les LT après migration dans les GLD. Ceci conditionne la tolérance de l'allogreffe (de Vries et al., 2011).

Troisièmement, en conditions inflammatoires les DC peuvent transférer leurs CMH-II aux mastocytes augmentant ainsi la capacité de ces derniers à activer des LT régulateurs environnants et à réguler indirectement les DC (Dudeck et al., 2017).

Le rôle des mastocytes sur l'activation et la migration des DC dans notre modèle reste donc largement à explorer.

Quel est l'impact des kératinocytes sur les DC cutanées ?

Les kératinocytes forment l'épiderme et ont un rôle structurant pour la peau. Ils constituent la première ligne de protection face aux agents extérieurs (physique, chimique, biologique). Ils sont en contact direct avec l'allergène lors de l'application d'un allergène par voie épicutanée. De plus, les kératinocytes possèdent des fonctions immunologiques qui participent à l'homéostasie et à l'inflammation cutanée. Les kératinocytes sont capables de reconnaître des allergènes ou des signaux de danger via leurs récepteurs (TLRs, PAR-2, IL-1R, lectines de type-C...), et de produire à leur tour des cytokines inflammatoires (TSLP, GM-CSF, IL-33, IL-25, pro-IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-7, peptides antimicrobiens, chimiokines,...) (Albanesi et al., 2018; Bernard et al., 2017; Mizutani et al., 1991; Palladino et al., 2018). Ces cytokines aussi appelées « alarmines » ont pour rôle de signaler un danger pour initier une réponse immunitaire en cas de pénétration d'un agent extérieur. Les kératinocytes peuvent donc impacter

le phénotype, la dynamique et les fonctions des DC (Eaton et al., 2018; Klicznik et al., 2018; Matjeka et al., 2012; Tortola et al., 2012; Volpe et al., 2014). Par exemple, dans les lésions de psoriasis, en réponse à l'IL-17, les kératinocytes relarguent des polyamines associées à de l'ARN qui se fixent sur les TLR-7 des DC myéloïdes et entraînent la production d'IL-6 (Bandyopadhyay and Larregina, 2020). Aussi, les kératinocytes peuvent produire du TGF- β qui stimule la migration des LC et DC dermiques (modèle de surexpression de TGF- β) et aggrave l'inflammation dans un modèle d'hypersensibilité de contact (Mohammed et al., 2013).

De manière intéressante, une étude *in vitro* a montré que les kératinocytes peuvent capter l'ovalbumine, puis relarguer des exosomes chargées d'ovalbumine, qui vont être à leur tour être captés/internalisés par les DC. Ceci induit une augmentation de l'expression du CD40 et la sécrétion d'IL-6/10/12 par les DC (Kotzerke et al., 2013).

Il est donc très probable que dans notre modèle de désensibilisation par EPIT, les kératinocytes aient un rôle d'activation des DC cutanées lors de la pénétration de l'OVA. Il serait intéressant d'analyser la production de médiateurs inflammatoires par les kératinocytes au cours d'EPIT afin d'optimiser dès le début du traitement un profil favorable à l'induction de DC tolérogènes.

Quel est l'impact de l'occlusion créée par le patch sur la production de cytokines dans le tissu cutané ?

Outre l'inflammation causée par la fixation directe des allergènes sur les récepteurs de danger des cellules, l'occlusion créée par le patch entraine un stimulus physico-chimique qui induit l'activation des cellules cutanées et la production d'alarmines. En effet, 6 heures après l'application d'un patch (sans allergènes), une forte induction d'IL-19 et de CCL20 exprimées dans la peau est observée par RT-qPCR (**Figure 28**).

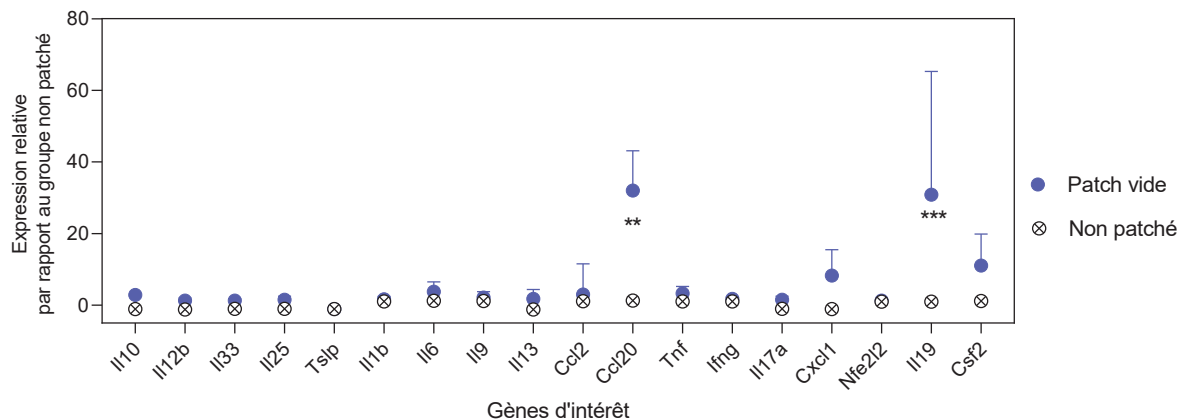


Figure 28 Cytokines et chimiokines produites dans la peau 6H après application d'un patch Viaskin® sans allergène (patch vide)

L'IL-19 est une cytokine de la famille de l'IL-10. Elle peut être produite par les monocytes, LB, kératinocytes, cellules épithéliales. Elle est impliquée dans des maladies inflammatoires telles que le psoriasis ou l'asthme (Gallagher, 2010). Lorsqu'elle est produite par les cellules épithéliales pulmonaires, elle induit la production de cytokines de type-2 par les LT. En revanche, l'IL-19 permet de réguler l'inflammation dans des modèles murins de colite ou d'hypersensibilité de contact (Fujimoto et al., 2019). Son action sur l'activation et la migration des DC cutanées dans notre modèle reste à étudier.

La chimiokine CCL20 est produite par les DC, cellules NK, LT, LB, macrophages, neutrophiles. CCL20 est le ligand du récepteur CCR6 exprimé par les LTh17, LT_{REG}, LT CD8+, LB, DC, principalement dans l'intestin et les ganglions lymphatiques (Griffith et al., 2014; Sokol and Luster, 2015). La contribution de cette chimiokine dans la dynamique et la fonction des DC lors de la désensibilisation par EPIT reste à démontrer. Néanmoins, au regard de nos résultats, nous pouvons faire l'hypothèse que les cDC2 expriment la chimiokine CCL20 favorisant l'activation des LTh17 dans la peau ou les GLD après migration.

Enfin, les patients souffrant à la fois d'allergie alimentaire et de dermatite atopique présentent une expression génique particulière dans la peau, et ce, même sur des sites non lésionnels. Notamment, ils présentent une augmentation des gènes liés aux DC (Runx3, HLA-DQA1, HLA-DPB1, LAMP-3, CD74, ...) et aux voies de la réponse type 2 (IL-4R, CCR8, et CRLF2 qui est un récepteur du TSLP). Il est donc important d'adapter le traitement selon le profil des patients et de contrôler l'environnement cutané pour induire une réponse tolérogène des DC (Leung et al., 2019).

Est-ce que le renouvellement des DC cutanées et l'acquisition d'une « mémoire innée » au cours d'EPIT module leurs fonctions?

Un point de discussion très intéressant concernant l'acquisition d'un profil tolérogène par les DC cutanées au fur et à mesure du traitement par EPIT est le concept de mémoire de l'immunité innée (« trained immunity », « éducation de l'immunité innée ») (Netea et al., 2020). Ce concept révèle qu'au même titre que les cellules de l'immunité adaptative, les cellules de l'immunité innée (DC, monocytes, macrophages, cellules NK) sont marquées sur le long terme par les épisodes inflammatoires et le contact avec les pathogènes. Ce marquage (« imprinting ») peut se faire au niveau épigénétique, transcriptomique et métabolique. A noter que cette mémoire est aussi observée dans les cellules souches de la moelle osseuse ou épithéliales (Chavakis et al., 2019; Hamada et al., 2019; Liu et al., 2016; Mitroulis et al., 2018; Naik et al., 2017; Ordovas-Montanes et al., 2018). Les DC de la peau migrent en permanence vers les GLD à l'homéostasie et plus encore lors d'une inflammation, de sorte que leur durée de vie n'est que de quelques jours. Elles sont remplacées en permanence par des précurseurs tissulaires ou issus de la moelle osseuse. Ainsi, l'éducation des cellules souches hématopoïétiques (HSC) et des précurseurs de DC explique comment les DC à courte durée de vie sont douées d'une mémoire immunitaire. En effet, Les HSC et pré-cDC possèdent des récepteurs de l'immunité (TLRs, récepteurs de cytokines) et sont donc sensibles aux réponses inflammatoires. Hole *et al.* ont montré que les DC spléniques et pulmonaires provenant de souris vaccinées par voie intranasale, plusieurs semaines auparavant, par un inoculum de *Cryptococcus neoformans*, produisent fortement de l'IL-2, IFN- γ , IL-4, TNF- α lors d'une restimulation *in vitro*. Ceci n'est pas observé lorsque les DC proviennent de souris naïves (Hole et al., 2019). En outre, cet effet n'est visible qu'en restimulant les DC avec des extraits du genre *Cryptococcus* et non pas avec des extraits de *C.Albicans* ou *S.Aureus*. Une stimulation avec un agent bactérien tel que le LPS ne permet également pas la sécrétion de cytokines inflammatoires. Ceci suggère que cette éducation est spécifique d'un antigène de *C.neoformans*, qui reste à définir. Dans une optique de vaccination/désensibilisation, il reste à déterminer pour chaque pathogène/allergène, quel épitope est le plus efficace pour induire cette mémoire immunitaire. Cette mémoire immunitaire semble lié à des changements épigénétiques tels que l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN (Eastman et al., 2019).

Nous pouvons donc imaginer que dans notre modèle, les DC cutanées qui migrent à chaque application du patch sont progressivement remplacées par des précurseurs de DC qui possèdent une empreinte épigénétique différente. Il sera intéressant de comparer la signature épigénétique des DC migrantes au début et à la fin du traitement.

Une désensibilisation (allergène + immunomodulateur) induisant un profil de DC tolérogène ou pro-Th1 pourrait éduquer les DC sur le long terme et renforcer l'efficacité du traitement par EPIT. Ceci est discuté dans le paragraphe suivant 3.3.3 *Stratégies d'amélioration du traitement*.

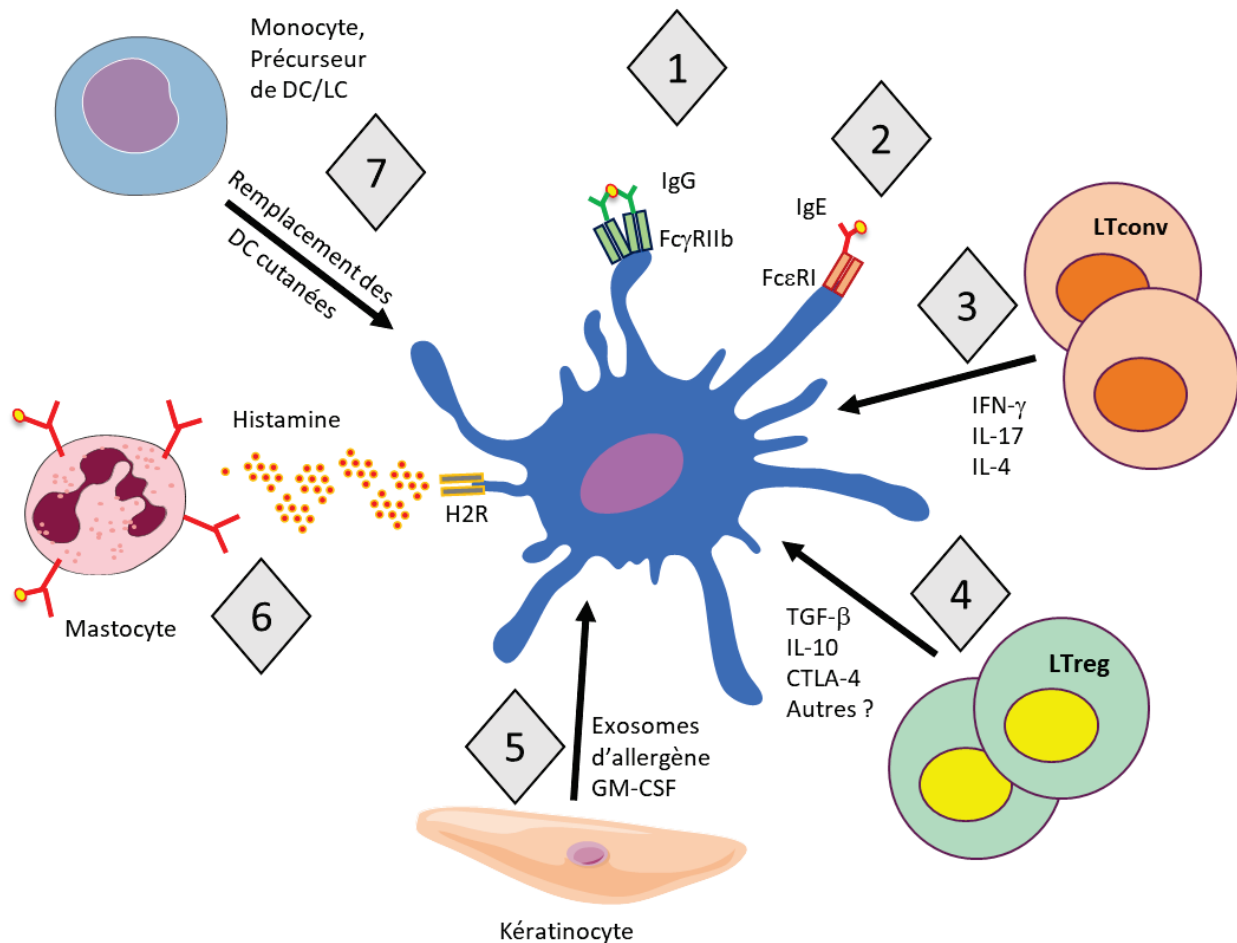


Figure 29 Mécanismes possibles de régulation des cellules dendritiques au cours d'EPIT

- 1) L'internalisation des complexes Ag-IgG via le FcγRIIb pourrait induire des DC tolérogènes.
- 2) La baisse de l'expression du FcεRI pourrait limiter l'internalisation de l'allergène via cette voie, et ainsi limiter la forte présentation antigénique des DC aux LT.
- 3-4) Les LT_{conv} et LT_{reg} peuvent produire des cytokines soit inhibe l'activation des DC soit leur confère un profil pro-Th1 qui pourrait contrebalancer la réponse Th2 pathologique.
- 5) Les kératinocytes peuvent transférer l'allergène aux DC via la sécrétion d'exosomes ; ils peuvent également produire un ensemble de cytokines qui peuvent tolérer les DC.
- 6) L'histamine produite par les mastocytes peuvent inhiber l'activation des DC via le récepteur H2R (Frei et al., 2013)

7) L'application répétée de l'allergène sur la peau entraîne l'émigration des DC qui sont potentiellement remplacées par des précurseurs de DC avec une signature épigénétique différente.

3.4 Stratégies d'amélioration du traitement

3.4.1 Modification de l'allergène et utilisation d'adjuvants

Le traitement par EPIT est prometteur mais il doit encore être optimisé afin d'augmenter i) le pourcentage de patients qui répondent au traitement, ii) la dose tolérée à la fin du traitement, iii) accélérer le phénomène de désensibilisation. Également, le traitement n'est pas efficace chez les adultes, il s'agit donc d'évaluer les leviers d'amélioration possibles du traitement pour ce groupe de patients. De nombreuses stratégies d'amélioration explorées dans les ITA visent à optimiser la prise en charge par les DC cutanées et les conditionner vers un profil tolérogène.

Est-il possible de modifier l'allergène pour favoriser une réponse tolérogène ?

Les allergènes modifiés chimiquement appelés « alléroïdes » possèdent des épitopes linéaires qui peuvent être présentés aux LT via les molécules du CMH-II des DC (immunogéniques), mais sont dépourvus d'épitopes conformationnels reconnus par les IgE (hypoallergéniques) (Kleij et al., 2019). Des études cliniques de phase I/II ont montré une bonne tolérabilité pour l'utilisation d'alléroïdes ou peptides de poissons ou d'arachide dans le traitement par SCIT (Bindeslev-Jensen et al., 2017; Zuidmeer-Jongejan et al., 2015). Également, sur le même principe, des peptides d'arachide sont développés et testés en clinique (Prickett et al., 2019).

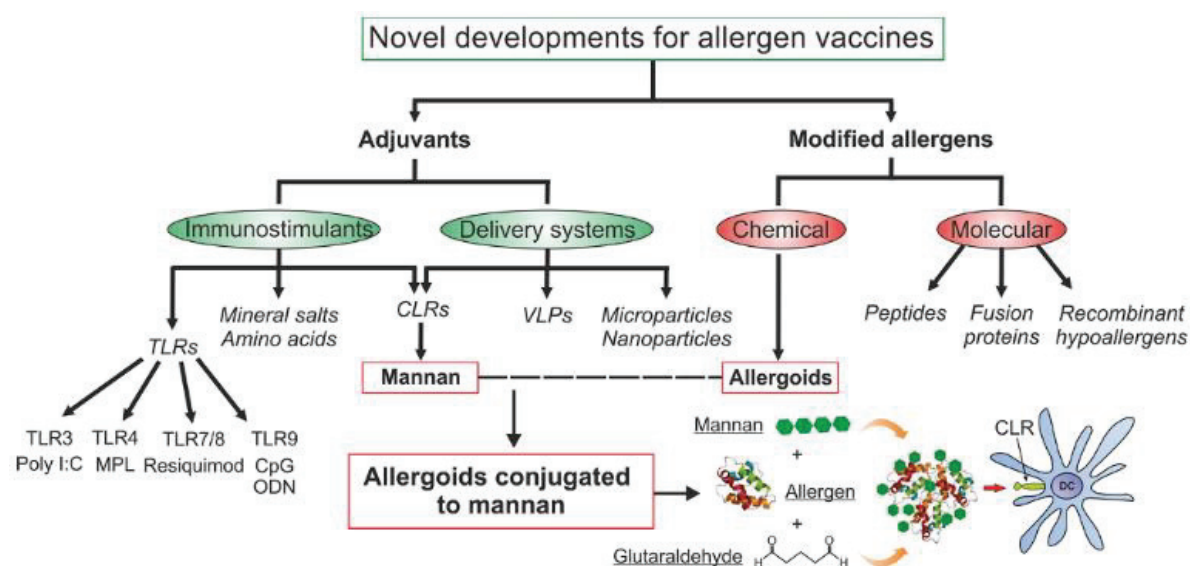


Figure 30 Stratégies pour optimiser l'immunothérapie allergénique (Benito-Villalvilla et al., 2018)

Est-il possible de coupler l'allergène à un immunomodulateur pour favoriser une réponse tolérogène ou de type-1 ?

Le couplage des alléroïdes avec des adjuvants est également une stratégie qui fait l'objet d'intenses investigations chez la souris et dans des essais cliniques de phase I/II chez l'homme (Senti et al., 2009b). Les alléroïdes peuvent être couplés à des ligands des récepteurs CLR (par exemple : les mannanes) ou des agonistes des récepteurs TLR (par exemple : les oligodeoxynucléotides de type CpG).

○ Mannanes

Les mannanes (polymères de mannose) proviennent généralement de levures. L'administration par voie intradermique ou sous-cutanée des complexes allergènes-mannanes sont pris en charge par les DC et favorise un profil pro-Th1 et/ou pro-Th17 et/ou pro-T_{REG}, limitant les paramètres allergiques (Lew et al., 2017; Rizzetto et al., 2010; Sheng et al., 2006; Sirvent et al., 2016; Weinberger et al., 2013). Des études *in vitro* avec des moDCs, cDC, pDC humains montrent qu'un alléroïde de *Phleum pratense* couplé à un mannane est internalisé plus efficacement par les DC que l'alléroïde seul et se fait principalement via le récepteur DC-SIGN. De plus, les DC expriment plus de récepteurs CD83, PD-L1, et produisent davantage d'IL-6, IL-10 mais moins d'IL-4 qu'avec l'alléroïde seul. Ces DC activent préférentiellement des LTh1 et LT_{REG} fonctionnels de manière PD-L1 dépendante.

Le récepteur DC-SIGN n'est pas exprimé par les LC (Garcia-Vallejo and van Kooyk, 2013). Ainsi, coupler l'allergène avec des résidus de mannose dans le cadre d'EPIT augmenterait principalement la prise en charge par les DC dermiques, en particulier les cDC2. Au vu de mes résultats de coculture cDC2 :LT CD4⁺ (article n°2, figure 6D), cette stratégie pourrait augmenter l'activation de clones Th1 et Th17 au cours d'EPIT. Il serait donc très intéressant d'évaluer l'amélioration clinique qui découle de cette stratégie dans notre modèle.

Chez la souris, il a été montré que ces complexes Ag-mannose sont plus efficacement pris en charge par les DC du tissu sublingual ou du sang et qu'ils augmentent plus fortement les ratios IgG2a/IgE et IFN- γ /IL-4, ainsi que le nombre de LT_{REG} FoxP3⁺IL-10⁺ comparativement à l'alléroïde seul (Benito-Villalvilla et al., 2018; Soria et al., 2017). Chez l'homme, ce principe est testé en phase clinique I pour la rhinite allergique par voie sous-cutanée et sublinguale.

Finalement, l'utilisation de ce principe pour le traitement par EPIT serait de très grand intérêt. Le verrou technologique qui limiterait son utilisation à grande échelle réside dans la possibilité de déposer ces complexes Ag-mannose par électrospray sur un patch.

- Ligands de TLR

L'utilisation de ligands des TLR montrent aussi de très bons résultats dans des modèles précliniques de désensibilisation. En particulier, l'utilisation des oligodeoxynucléotides de type CpG, ligands du récepteur TLR-9, favorise la production d'IL-12, d'IL-10, d'IL-22, diminue la production de TSLP, conduisant *in fine* à la diminution du profil Th2 et l'augmentation de la réponse Th1 et régulatrice (Johnson-Weaver et al., 2019; Mitsias et al., 2020). Les mécanismes sous-jacents impliquent notamment la voie MyD88 et l'augmentation de l'IDO à la surface des DC (Alberca-Custodio et al., 2020; Grohmann et al., 2002; Hayashi et al., 2001, 2004; Hissong et al., 1995). L'IDO dégrade le tryptophane de l'environnement en kynurénine limitant ainsi la prolifération des LT_{CONV}.

L'idée d'utiliser ces ligands de TLR pro-Th1 est née avec l'hypothèse hygiéniste qui suppose que l'absence de stimuli par des bactéries et virus de l'environnement dès le plus jeune âge, empêche l'instauration d'une réponse majoritairement type-1, au profit du type-2 (Hayashi and Raz, 2006). L'administration par voie sous-cutanée, sublinguale, intranasale de CpG (sans allergènes) permet chez la souris sensibilisée à l'OVA de réduire la réponse Th2 et les symptômes associés (Fonseca et al., 2011; Jain et al., 2003). D'autres études chez la souris ou le singe ont montré l'intérêt de l'administration répétée du CpG pour limiter la réponse Th2 et limiter des symptômes d'asthme ou de rhinite allergique (Fanucchi et al., 2004; Rhee et al., 2004; Youn et al., 2004).

La conjugaison d'un allergène avec un résidu CpG limite la reconnaissance de l'allergène par les IgE tout en conservant son immunogénicité. L'administration de ces complexes a également montré sa capacité à favoriser une déviation de la réponse Th2 vers Th1. Chez la souris BALB/c âgée (18 mois) sensibilisée à l'OVA, un traitement par voie orale d'OVA/CpG induit une réponse Th1 au détriment de la réponse Th2 (Alignani et al., 2005). Chez la souris, le récepteur TLR9 est exprimé par les LC, cDC, mDC et pDC, mais aussi d'autres cellules non immunitaires telles que

les kératinocytes (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Novak et al., 2010). L'action de cet adjuvant pourrait donc être multiple. Néanmoins, chez l'homme, parmi les DC, le récepteur TLR-9 ne semble être exprimé que par les pDC. D'autres cellules telles que les macrophages, monocytes, cellules endothéliales, l'expriment également. Ainsi, l'action du CpG chez l'homme n'est probablement pas dépendant des LC ou cDC. Néanmoins, il n'est pas à exclure que l'inflammation locale répétée due aux patchs au cours d'EPIT, puisse induire l'expression de TLR-9 sur les cDC. Une étude approfondie du transcriptome et protéome des différentes sous-populations de DC (au niveau ARN ou protéique) au cours du traitement par EPIT chez l'homme permettrait de mieux comprendre le potentiel mécanisme de cet adjuvant.

Pour conclure, l'effet observé par l'utilisation des motifs associés aux pathogènes (mannoses, CpG) sur les DC questionne sur le rôle du microbiote cutané au cours du traitement par EPIT. En effet, il est connu que les bactéries telles que *Staphylococcus epidermidis* activent les cellules de Langerhans favorisant l'infiltration de LT CD8+ résidents et une réponse antimicrobienne de type-17 (Lau et al., 2017; Naik et al., 2015). De plus, le microbiote cutané varie en fonction de la localisation anatomique. Ainsi, il serait très intéressant d'étudier dans quelle mesure la diversité du microbiote cutané influe sur l'efficacité d'un protocole d'EPIT.

- Tregitope

Une autre stratégie intéressante pour favoriser un profil tolérogène des DC et l'induction de LT_{REG} consiste à inclure dans le patch avec l'allergène des peptides pro-T_{REG}. Ce concept a été développé par la société EpiVax. Elle développe des peptides pouvant être pris en charge par les DC, présentés sur le CMH-II et induire préférentiellement des LT_{REG}. Ces peptides correspondent à de courtes séquences issues de la partie Fc des immunoglobulines G. L'idée repose initialement sur l'observation clinique que le traitement par injection intraveineuse d'immunoglobulines polyclonales (IVIG) permet de limiter les réactions auto-immunes par différents biais notamment l'induction de LT_{REG} (Kaufman et al., 2015). Dans le cadre de la désensibilisation par EPIT, des résultats prometteurs ont été obtenus chez des souris allergiques à la noix de cajou (Dioszeghy *et al.*, données en cours de publication). Les souris étaient traitées avec un patch contenant l'allergène seul ou une combinaison de l'allergène et d'un peptide immunomodulateur (PI). Le traitement EPIT « allergène+PI » accélère la désensibilisation par rapport au traitement EPIT avec

allergène seul. Ces résultats ouvrent la voie pour tester la sûreté et l'efficacité de la combinaison chez les patients. De plus, d'autres PI ont été développés par EpiVax et pourront être testés à l'avenir. Il faudra définir quel est le rôle exact des sous-populations de DC cutanées dans la présentation des PI aux LT_{REG}.

3.4.2 Co-administration de biologiques

L'administration d'anticorps anti-IL4R (Dupilumab) ou anti-IgE (Omalizumab) associés à un protocole de désensibilisation des allergies alimentaires fait actuellement l'objet d'investigations cliniques diverses (Abdel-Gadir et al., 2018; Dantzer and Wood, 2018; Rial et al., 2019). L'hypothèse de ces travaux réside dans le fait que bloquer de façon directe ou indirecte la production d'IgE et/ou la réponse Th2 pourrait accélérer la vitesse à laquelle les patients sont désensibilisés ou augmenter l'efficacité de la désensibilisation. Il sera important de valider cette hypothèse dans notre modèle *in vivo*.

Également, le traitement par faible dose d'interleukine-2 a montré des effets bénéfiques pour limiter la sensibilisation à un allergène (ovalbumine, arachide) ou empêcher l'apparition de symptômes allergiques chez des souris déjà sensibilisées (Bonnet et al., 2016). En effet, l'administration d'IL-2 à faible dose induit l'expansion des LTreg CD4⁺ et renforce leur activité suppressive. Ce traitement permet aussi l'expansion de LT CD8⁺ FoxP3⁺ à forte activité suppressive, à la fois chez l'homme et la souris (Churlaud et al., 2015). Ce traitement représente donc une solution prometteuse pour compléter et améliorer l'efficacité de l'EPIT chez les patients non répondeurs.

3.4.3 Méthode de délivrance de l'allergène

Est-ce que la nature des DC cutanées varie en fonction de la région anatomique ? Existe-t-il un intérêt à appliquer le patch sur une région particulière ?

Chez l'enfant le patch est appliqué dans la zone interscapulaire du dos, en alternant chaque jour entre 6 zones différentes. En revanche, chez l'adulte, le patch est appliqué sur la face interne du bras au niveau du biceps, en alternant également entre 6 zones différentes. Il convient donc de se questionner sur la répartition des DC dans la peau selon la zone anatomique (Béke et al., 2018). En effet, le manque d'efficacité d'EPIT observée chez l'adulte pourrait en partie être due à une différence du nombre ou du phénotype des DC cutanées au niveau de la zone patchée.

En ce sens, une étude réalisée chez l'adulte a quantifié les DC cutanées et la signature inflammatoire de la peau à partir de biopsies du dos, du bras, de l'abdomen et de la cuisse (Del Duca et al., 2019). Les résultats montrent que la peau du dos et de la cuisse est plus épaisse que celle du bras. La peau du dos contient le plus grand nombre de follicules pileux. De plus, un nombre plus important de LC, LT_{REG} et de molécules de type 17/22 (IL-17A, CCL20, lipocaline 2/LCN2, LL37/Camp/Cathelicidine, PI3/elafine, IL-12/23p40, IL8/CXCL8, and CXCL1) sont présents dans la peau du dos comparativement aux autres localisations. De plus, ces cellules sont très présentes au niveau des follicules pileux qui sont un lieu privilégié d'interaction avec les antigènes exogènes. Enfin, les molécules régulatrices IL-37, IL-34 et IL-33 sont plus abondantes dans la peau du dos. Ces résultats suggèrent clairement que la peau du dos est un lieu très favorable à l'induction d'une réponse tolérrogène lors de l'application d'un allergène, comparativement au bras.

Existe-t-il un procédé ou un vecteur qui augmenterait la délivrance de l'allergène aux DC et favoriserait un profil tolérrogène ?

De nombreuses études ont cherché à optimiser la prise en charge de l'allergène (ou allergeoïdes) par les DC afin d'améliorer l'efficacité du traitement de désensibilisation. Ceci présente un grand intérêt pour le traitement par EPIT notamment chez l'homme pour qui le traitement n'est pas efficace et dont la peau est plus épaisse que l'enfant.

- Nanoparticules

En particulier l'utilisation de nanoparticules ou liposomes pour délivrer un allergène ou un immunomodulateur par voie épicutanée orale, intranasale, intradermique, sublinguale a montré des résultats intéressants dans des modèles précliniques et cliniques (Alberca-Custodio et al., 2020; Ballester et al., 2015; Givens et al., 2018; Klimek et al., 2011; Srivastava et al., 2016). En effet, les nanoparticules/liposomes sont plus efficacement prises en charge par les DC et peuvent être recouvertes de ligands spécifiques des DC (Koushki et al., 2020; Stolk et al., 2020; Weiss et al., 2013).

- Particules pseudo-virales (« Virus-like particles »)

Sur le même principe, des particules pseudo-virales (« virus-like particles », VLPs), composées de protéines de capsid virale, facilement reconnaissables et internalisées par les DC ont montré leur intérêt dans des modèles précliniques d'allergie (Ballester et al., 2015). En particulier, des souris BALB/c sensibilisées à l'arachide et traitées avec une seule injection sous-cutanée de VLPs contenant les allergènes Ara h 1 (Storni et al., 2020b) étaient protégées des symptômes allergiques lors d'un test de provocation oral.

L'administration épicutanée et répétée de ces VLP pour la désensibilisation devra être explorée.

- Micro-aiguilles

Des études précliniques ont montré que la combinaison d'extrait d'arachide, de la vitamine D3 et du CpG délivrés par un dispositif de micro-aiguilles dissolvables appliqué sur la peau désensibilisait efficacement des souris BALB/c (Kang et al., 2012; Nikolic and Roep, 2013; Shakya et al., 2019; Yu et al., 2020). Les microaiguilles permettent de délivrer l'allergène dans l'épiderme et le derme sans diffusion dans la circulation sanguine. En effet, les microaiguilles dissolvables permettent un relargage progressif (en 48h) de l'allergène. Ceci permet un recrutement dans la peau et une prise en charge accrue de l'allergène par les DC (CD11c+CD11b+/-) et macrophages (CD11c-CD11b+) comparativement à un protocole de désensibilisation par voie intradermique classique où l'allergène diffuse hors de la peau plus rapidement. Un dispositif similaire chez l'homme a permis d'augmenter le seuil de tolérance au lait de 50% des patients allergiques traités pendant 4 semaines (Ito et al., 2020).

- Laser

Le traitement de la peau par laser avant l'application d'un allergène a également été testé (Korotchenko et al., 2019). Le principe est de créer des micropores dans l'épiderme/derme afin de faciliter la pénétration et la prise en charge de l'allergène par les DC (Hervé et al., 2019). Également, l'inflammation créée par le laser peut activer les DC et stimuler leur migration. Le traitement par laser couplé au système de microaiguilles cité ci-dessus s'est révélé plus efficace qu'un traitement par SCIT pour désensibiliser des souris allergiques à l'ovalbumine (Kumar et al., 2016). De la même manière, une désensibilisation utilisant des conjugués allergène-mannane appliqués après un traitement au laser était plus efficace qu'un traitement intradermique (Machado et al., 2017). La désensibilisation était dépendante des CD11b⁺ DC dermiques et non des cellules Langerin⁺ (LC et cDC1) comme démontrée dans un modèle transgénique (Lang-DTR).

Le laser représente donc une solution intéressante pour favoriser la prise en charge ou la migration des DC au cours du traitement. Néanmoins, son utilisation doit préférentiellement être couplé à un allergeoïde et un adjuvant pro-Th1 afin d'induire une réponse immunitaire bénéfique.

- ADN plasmidique

Il serait également possible de délivrer par voie épicutanée un ADN plasmidique (ADNp) encodant un allergène couplé au peptide signal de LAMP-1 qui permet une délivrance de la protéine au lysosome/endosome contenant les molécules de CMH-II. L'ADNp encapsulé dans des nanoparticules en polyéthylèneimine-mannose serait alors appliqué sur la peau des patients sous un patch, capté par les cellules de Langerhans, internalisé, transcrit et traduit en protéines. Celles-ci sont dirigées vers le lysosome et présentées efficacement sur les molécules du CMH de classe II aux LT des ganglions (Garaczi et al., 2013; Su et al., 2016, 2017; Toke et al., 2014). Il convient de s'assurer que la réponse spécifique induite correspond à une réponse de tolérance ou de type-1 (Chua et al., 2009; HuangFu et al., 2006). Si ce n'est pas le cas, il est possible de coupler la séquence ADN de l'allergène avec une séquence d'ubiquitination (Bauer et al., 2006).

4 Conclusions

L'immunothérapie allergénique (ITA) est un traitement ambitieux qui vise à réintroduire une réponse tolérogène vis-à-vis d'un allergène chez des patients allergiques. Le succès de l'ITA implique l'inhibition des réponses cellulaire et humorale responsables des symptômes. Dans ce contexte, les cellules dendritiques représentent le premier maillon de la chaîne immunitaire : elles intègrent l'information allergénique et la délivrent aux lymphocytes T et B afin de favoriser le développement de LT_{REG} et inhiber les réponses cellulaire et humorale pathologiques. Néanmoins, les DC sont hétérogènes et conditionnées par un ensemble de signaux environnants lors de la prise en charge de l'allergène.

Dans ce contexte, j'ai donc cherché à comprendre dans un modèle d'immunothérapie épicutanée, la contribution des différentes sous-populations de DC cutanées à l'efficacité du traitement. Je me suis également intéressé aux mécanismes responsables de la désensibilisation.

Mes travaux de thèse montrent le rôle essentiel des cellules de Langerhans dans la désensibilisation par EPIT, à travers notamment l'induction de LT_{REG} . Mes travaux suggèrent également un rôle complémentaire des cDC2 à travers l'induction de réponses Th1 et Th17 qui pourraient limiter la réactivité des mastocytes responsables de l'anaphylaxie. Les cDC1 en revanche ne contribuent pas à la protection clinique conférée par le traitement.

Cependant, plusieurs questions subsistent : Quels signaux déterminent la fonction tolérogène des DC cutanées au cours du traitement ? Comment les cytokines de type-1 et type-17 participent à la désensibilisation *in vivo* ? Quels mécanismes associés aux anticorps sont clés pour la désensibilisation ? Enfin, quels mécanismes contribuent à l'inhibition de la réactivité des cellules effectrices de l'anaphylaxie (mastocytes et basophiles) ?

Il sera de grand intérêt de résoudre ces problématiques dans le futur afin d'optimiser les traitements de désensibilisation.

Cette ambition se heurte à plusieurs piliers : i) l'hétérogénéité immunitaire des patients allergiques, qui peuvent répondre différemment selon la voie d'administration de l'allergène ou la dose d'allergène délivrée ; ii) le temps nécessaire pour inhiber ou

renverser tous les mécanismes liés aux symptômes allergiques, qui se comptent en mois voire années, et dont la persistance après arrêt du traitement reste fragile ; iii) la pluralité des mécanismes en jeu et les jeux de compensation entre les différentes réponses immunitaires.

L'avenir de l'ITA dépendra donc i) de notre capacité à identifier et fournir les signaux nécessaires aux DC pour l'induction de tolérance, et ii) de notre réussite dans la mise en œuvre à grande échelle, chez l'homme, des stratégies choisies.

5 Projets de recherche annexes

Depuis mon arrivée dans le laboratoire de Jean-François Nicolas et Marc Vocanson en 2014, j'ai eu la chance participer à différents projets de recherche articulés autour de l'allergie et de l'immunité cutanée :

Pendant plus de deux ans, je me suis intéressé à la contribution des lymphocytes T mémoires résidents de la peau (Trm) dans l'eczéma allergique de contact, en utilisant un modèle murin d'hypersensibilité de contact aux haptènes. Nous avons ainsi pu démontrer que des LT CD8⁺ mémoires résidents persistent jusqu'à 1 an dans la peau après la résolution d'un eczéma allergique induit avec l'haptène dinitrofluorobenzène (DNFB). En outre, ces CD8⁺ Trm possèdent un phénotype particulier défini par l'expression de récepteurs inhibiteurs des points de contrôle (« inhibitory checkpoint receptors ») qui contrôlent leur réactivation en réponse à des faibles doses d'haptène, limitant ainsi la résurgence de lésions d'eczéma. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le JACI en 2019 dont j'ai été co-premier auteur.

Inhibitory checkpoint receptors control CD8⁺ resident memory T cells to prevent skin allergy.

Gamradt P*, Laoubi L*, Nosbaum A, Mutez V, Lenief V, Grande S, Redoulès D, Schmitt AM, Nicolas JF, Vocanson M. J Allergy Clin Immunol. 2019 Jun;143(6):2147-2157.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2018.11.048. Epub 2019 Jan 15. PMID: 30654051. **contributed equally to this work.*

Également, j'ai co-écrit une revue des perspectives sur l'interaction entre les Trm de la peau, le microbiote cutané et les radiations UV, publié dans Frontiers in Medicine en 2019.

A Perspective on the Interplay of Ultraviolet-Radiation, Skin Microbiome and Skin Resident Memory TCRαβ⁺ Cells.

Patra V*, Laoubi L*, Nicolas JF, Vocanson M, Wolf P. Front Med (Lausanne). 2018 May 30;5:166. doi: 10.3389/fmed.2018.00166. eCollection 2018. PMID: 29900173. **contributed equally to this work*

Avant cela, j'avais participé à une étude démontrant le rôle de l'ivermectine (molécule anti-parasitaire) dans la régulation de l'inflammation allergique cutanée dans un modèle murin de dermatite atopique aux acariens. L'ivermectine possède en effet des propriétés anti-inflammatoires qui pourraient être utilisés de manière locale pour améliorer les eczémas chez l'homme.

Topical ivermectin improves allergic skin inflammation.

Ventre E, Rozières A, Lenief V, Albert F, Rossio P, Laoubi L, Dombrowicz D, Staels B, Ulmann L, Julia V, Vial E, Jomard A, Hacini-Rachinel F, Nicolas JF, Vocanson M. Allergy. 2017 Aug;72(8):1212-1221. doi: 10.1111/all.13118. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28052336

Dans une autre étude, nous avons mis au point un modèle de dermatite atopique en utilisant un épiderme reconstruit humain et démontré le rôle en amont de l'IL-1 β sur la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) responsable de l'inflammation cutanée.

IL-1 β induces thymic stromal lymphopoietin and an atopic dermatitis-like phenotype in reconstructed healthy human epidermis.

Bernard M, Carrasco C, Laoubi L, Guiraud B, Rozières A, Goujon C, Duplan H, Bessou-Touya S, Nicolas JF, Vocanson M, Galliano MF. J Pathol. 2017 Jun;242(2):234-245. doi: 10.1002/path.4887. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28191908

Enfin, j'ai eu l'opportunité de participer à l'écriture de deux revues sur les maladies immunitaires inflammatoires cutanées.

Immune-mediated skin diseases induced by chemicals and drugs

Axel P.Villani, Pia Gamradt, Audrey Nosbaum, Léo Laoubi, Denis Jullien, Jean-François Nicolas, Marc Vocanson
Current Opinion in Toxicology. 2018 Aug.. doi : 10.1016/j.cotox.2018.11.002

Toxic epidermal necrolysis: Pathophysiology and therapeutic advances

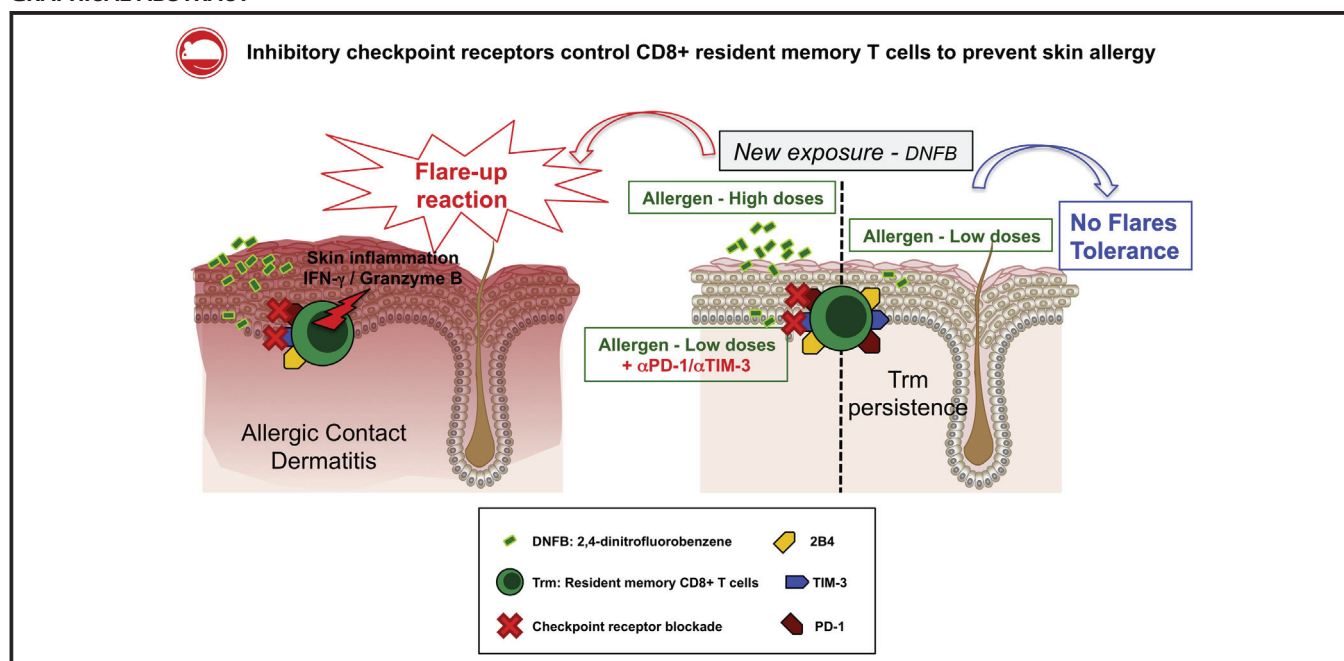
A.-P.Villani, M.Vocanson, L.Laoubi, D.Jullien, F.Bérard, J.-F.Nicolas, B.Bensaid
Revue Française d'Allergologie. 2017 Oct. doi : /10.1016/j.reval.2017.06.002

Inhibitory checkpoint receptors control CD8⁺ resident memory T cells to prevent skin allergy



Pia Gamradt, PhD,^{a,b,c,d,e,*} Léo Laoubi, MSc,^{a,b,c,d,e,*} Audrey Nosbaum, MD, PhD,^{a,b,c,d,e} Virginie Mutez, MSc,^{a,b,c,d,e} Vanina Lenief, MSc,^{a,b,c,d,e} Sophie Grande, MD,^f Daniel Redoulès, PhD,^g Anne-Marie Schmitt, MD, PhD,^h Jean-François Nicolas, MD, PhD,^{a,b,c,d,e,f} and Marc Vocanson, PhD^{a,b,c,d,e} Lyon, Pierre-Benite, and Toulouse, France

GRAPHICAL ABSTRACT



Background: Tissue-resident memory T (Trm) cells are detrimental in patients with numerous chronic inflammatory diseases, including allergic contact dermatitis (ACD). **Objectives:** We sought to analyze the contribution of Trm cells to the chronicity and severity of ACD and to define the local parameters regulating their development and functions. **Methods:** We used an experimental model of ACD (ie, contact hypersensitivity to 2,4-dinitrofluorobenzene) that is mediated by CD8⁺ T cells. **Results:** Our data show that early effector T cells accumulated in the skin during the acute contact hypersensitivity reaction

and gave rise to epidermal CD8⁺ Trm cells expressing a specific set of inhibitory checkpoint receptors (ICRs), such as programmed cell death protein 1 (PD-1) and T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM-3). Those Trm cells remained in the epidermis for several weeks and mediated the eczema exacerbations, which developed on allergen re-exposure without the contribution of circulating specific T cells. Furthermore, allergen-induced Trm cell reactivation was constrained because treatment with ICR antagonists dramatically enhanced the magnitude and severity of eczema exacerbations. Finally, we show that the persistence of the

From ^aCIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon; ^bINSERM, U1111, Lyon; ^cEcole Normale Supérieure de Lyon, Lyon; ^dUniversité Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon; ^eCNRS, UMR 5308, Lyon; ^fAllergology & Clinical Immunology, CH Lyon-Sud, Pierre-Benite; ^gPierre Fabre R&D Dermocosmétique, Toulouse; and ^hPierre Fabre R&D Pharmaceuticals, Toulouse.

*These authors contributed equally to this work.

Supported by Pierre Fabre R&D Dermocosmétique.

Disclosure of potential conflict of interest: D. Redoulès and A.-M. Schmitt are employed by Pierre Fabre. The rest of the authors are public employees from INSERM and Lyon-Sud Hospital.

Received for publication June 7, 2018; revised October 13, 2018; accepted for publication November 16, 2018.

Available online January 15, 2019.

Corresponding author: Marc Vocanson, PhD, CIRI-INSERM U1111, 21 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France. E-mail: marc.vocanson@inserm.fr.

The CrossMark symbol notifies online readers when updates have been made to the article such as errata or minor corrections

0091-6749/\$36.00

© 2019 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.048>

allergen in the epidermis for long periods of time was responsible for both the development and maintenance of epidermal Trm cells, as well as the sustained expression of ICRs. **Conclusion:** Although CD8⁺ Trm cells are key for the pathophysiology of ACD, intrinsic mechanisms control their reactivation to prevent damaging immunopathology. Developing strategies targeting the reactivation of skin Trm cells *in situ* through their ICRs should open new perspectives for the treatment of ACD. (J Allergy Clin Immunol 2019;143:2147-57.)

Key words: Resident memory T cells, eczema, allergic contact dermatitis, inhibitory checkpoint receptors, immunopathology

Resident memory T (Trm) cells, which are classically identified by their stable expression of CD69 and CD103,¹⁻⁴ constitute a recently described subset of memory T cells that do not recirculate throughout the organism. They persist in the long term within peripheral tissues and organs, where they organize an optimal front-line defense against invading pathogens or neoplastic cells.^{1,5-8}

Beyond their demonstrated active contribution to host protection, there is an emerging understanding that Trm cells also participate in several autoimmune/inflammatory diseases in which they can instigate or augment the immunopathology.^{9,10} Trm cells have been described in patients with different skin diseases, such as psoriasis, vitiligo,³ fixed drug eruption,¹¹ or leukemic cutaneous T-cell lymphoma.^{12,13}

Allergic contact dermatitis (ACD) is a common chronic and relapsing T cell–mediated allergic skin disease. ACD expresses as eczema flares (also referred to as exacerbations), which consist of worsening of skin inflammation on allergen exposure. Exacerbations usually develop on the same body sites (ie, on previously affected but healed skin).¹⁴ This observation has led to the concept of “local memory to allergens,” postulating that specific T lymphocytes (1) persist for several months in previous sites of eczema and (2) are important in flare-up reactivity and chronic inflammation.^{14,15} Recent works have shown that skin Trm cells are responsible for the development of these early and intense ACD flares.¹⁶⁻¹⁸ However, little is known regarding the functional phenotype of Trm cells, their long-term persistence, the antigen requirement for their development and survival, or the mechanisms that control their reactivation on allergen exposure.

In this study, using the experimental model of contact hypersensitivity (CHS) to the chemical allergen 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB),¹⁹ we confirm the crucial role of epidermal CD8⁺ Trm cells in eczema exacerbations, and we precisely define their phenotype and specificity. More importantly, we demonstrate that intrinsic cell mechanisms (ie, expression of inhibitory checkpoint receptors [ICRs]) prevent their uncontrolled reactivation to avoid eczema flares on allergen exposure.

METHODS

A brief description of the Methods is provided below. For additional details, see the [Methods](#) section in this article's Online Repository at www.jacionline.org.

Animals and reagents

Mice, allergens (DNFB, 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid [DNBS], or oxazolone [OXA]), and mAbs used in this study are reported in the [Methods](#) section in this article's Online Repository.

Abbreviations used

ACD:	Allergic contact dermatitis
AF:	Alexa Fluor
BMDC:	Bone marrow–derived dendritic cell
BTLA:	B- and T-lymphocyte attenuator
CHS:	Contact hypersensitivity
CTLA-4:	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DAPI:	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
dLN:	Draining lymph node
DNBS:	Dinitrobenzenesulfonic acid
DNFB:	2,4-Dinitrofluorobenzene
DNP:	Dinitrophenyl
DT:	Diphtheria toxin
FACS:	Fluorescence-activated cell sorting
ICR:	Inhibitory checkpoint receptor
iDTR:	Inducible diphtheria toxin receptor
LAG-3:	Lymphocyte activation gene 3 protein
OXA:	Oxazolone
PD-1:	Programmed cell death protein 1
TCR:	T-cell receptor
Tem:	Effector memory T
TIGIT:	T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM-3:	T cell immunoglobulin and mucin domain 3
Trm:	Resident memory T
VISTA:	V-type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation

CHS to DNFB and flare-up reactions

For most experiments, CHS was induced, as previously described.²⁰ Briefly, animals were sensitized epicutaneously on the shaved abdomen with 25 μ L of 0.5% DNFB on day –5 and challenged on the left ear on day 0 with 2 $\times$ 5 μ L of 0.13% DNFB, whereas the right ear received the acetone/olive oil vehicle. Allergic animals were next retested at day 30 or months 3, 6, and 12, with different doses (0.01%, 0.05%, and/or 0.13%) of DNFB or with 1% OXA both on healed (left ear) and naive (right ear) skin, as indicated.

In some experiments C57BL/6 or reconstituted CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice with DNFB allergy were depleted of circulating or skin CD8⁺ T cells by anti-CD8 mAbs or diphtheria toxin (DT) injections and treated with anti-programmed cell death protein 1 (PD-1; RMP1-14, 200 μ g), anti-TIM-3 (RMT3-23, 200 μ g), or respective IgG_{2a} isotype (2A3, 400 μ g; all from Bio X Cell, West Lebanon, NH) at the indicated time points.

RESULTS

Allergen-specific CD8⁺ Trm cells persist for months within the epidermis and dermis of healed CHS lesions

In this study we used mice with DNFB allergy that were sensitized (day –5) on the abdomen and challenged 5 days later (day 0) on the left ear with DNFB, leading to a CHS reaction peaking at day 2 and resolving by day 15 ([Fig 1, A](#)). Mice with DNFB allergy were then analyzed at different time points after the resolution of CHS (day 30 and months 3, 6, and 12) for the presence of Trm cells, as well as for their functional properties. In this model the left ear, which received DNFB at day 0 and had a CHS response at day 2, is called the “healed skin,” whereas the right ear, which received the vehicle and did not have CHS is called the “naive skin.” At day 30 and thereafter, naive and healed skin look identical, without any clinical or histologic signs of inflammation (data not shown).

Healed and naive skin of mice with DNFB allergy were first collected at day 30 and processed for the presence of CD8⁺

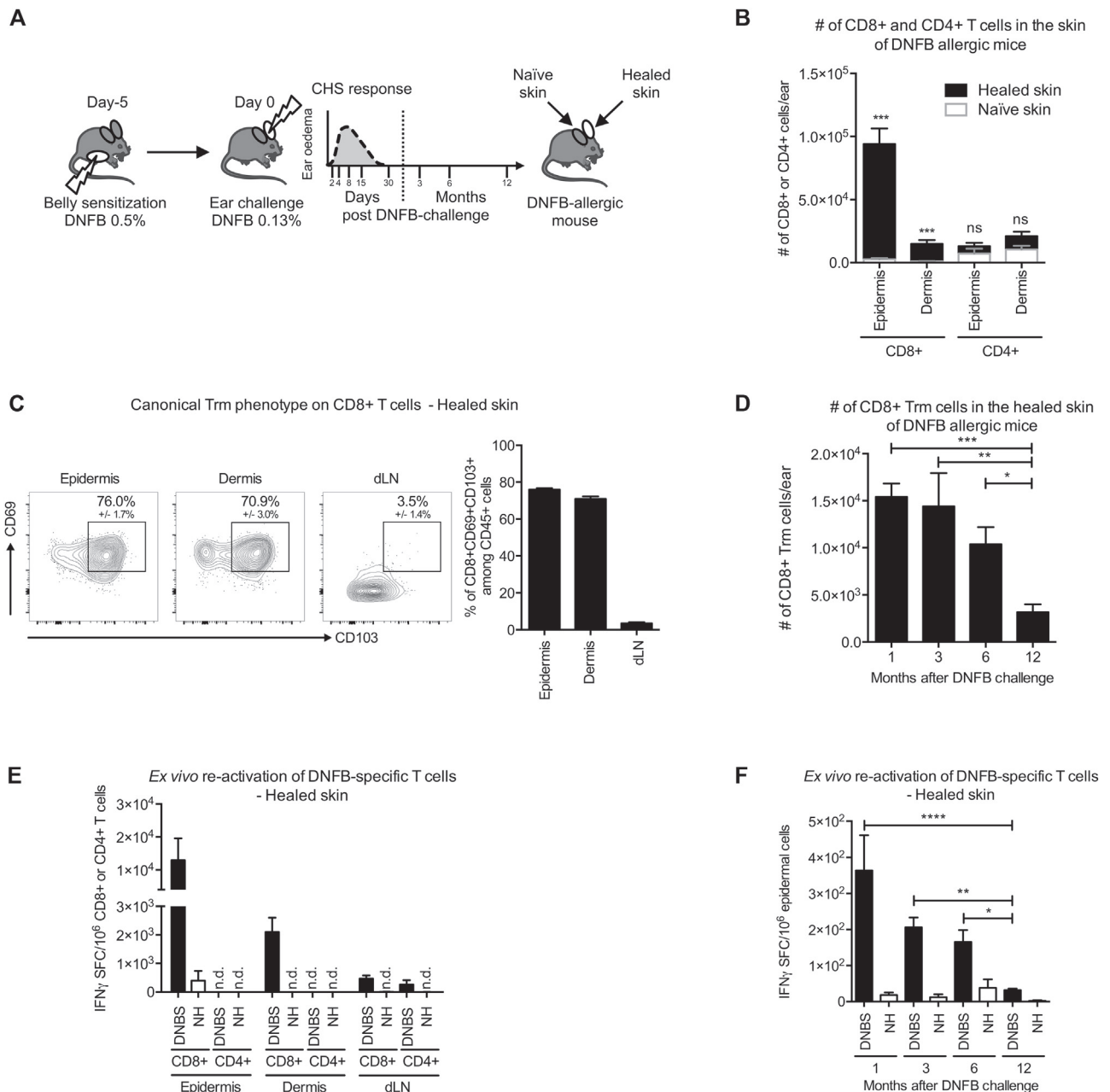


FIG 1. Allergen-specific CD8⁺ Trm cells persist in the long term in the epidermis and dermis of healed CHS lesions. **A**, Protocol: CHS response to DNFB to track the persistence and function of DNFB-specific Trm cells. **B**, Quantification of skin T-cell subsets. Histograms depict mean ± SEM numbers of CD8⁺ and CD4⁺ T-cell subsets present in the epidermis or dermis of healed and naïve skin at day 30 after challenge, as determined by using FACS analysis. **C**, Canonical Trm cell marker expression. FACS plots and histograms depict mean ± SEM percentages of CD8⁺CD103⁺CD69⁺ T cells among CD45⁺ cells present in the epidermis and dermis of healed skin or in dLNs at day 30. **D**, Long-term persistence of skin Trm cells. Mean ± SEM numbers of CD8⁺CD103⁺CD69⁺ Trm cells was also assessed at months 3, 6, and 12. **E** and **F**, DNFB-specific T-cell responses. Fig 1, **E**, Mean ± SEM numbers of DNFB-specific CD8⁺ or CD4⁺ T cells determined by using an IFN-γ ELISpot at day 30. Fig 1, **F**, Persistence in the epidermis of IFN-γ-producing DNFB-specific cells was also analyzed at months 3, 6, and 12. All results are representative of 2 or 3 independent experiments with 4 to 10 mice per group. *n.d.*, Not detected; *NH*, nonhaptized; *ns*, not significant. **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001, and *****P* < .0001, 1-way ANOVA or Mann-Whitney *U* test.

and/or CD4⁺ T-cell subsets by using fluorescence-activated cell sorting (FACS) and immunofluorescence microscopy to confirm that Trm cells persist at the sites of CHS-induced skin inflammation.¹⁶⁻¹⁸ Although the epidermis and dermis

of naïve skin were nearly exclusively seeded with CD4⁺ T cells, increased numbers of CD8⁺ T cells were recorded in healed CHS lesions (Fig 1, **B**, and see Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Approximately

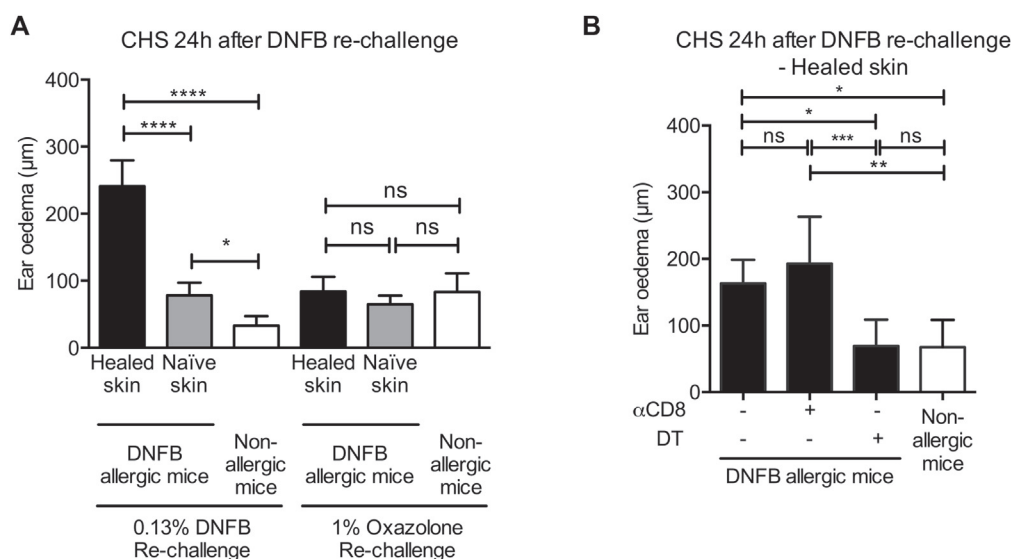


FIG 2. Skin CD8⁺ Trm cells mediate site- and antigen-specific flare-up reactions in mice with DNFB allergy. **A**, CHS response of mice with DNFB allergy to DNFB or OXA. C57BL/6 mice with DNFB allergy were rechallenged with DNFB or OXA on healed skin lesions or naïve skin at day 30. As controls, DNFB and OXA were applied on the ears of naïve mice. The following day, CHS reactions were determined by measuring mean $\pm$ SEM ear edema (in micrometers). **B**, Depletion of skin CD8⁺ Trm cells abrogates the CHS response to DNFB. CHS to DNFB was induced in CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice reconstituted with iDTR-CD8⁺ and wild-type CD4⁺ T cells. At day 30 and 60 and 1 day after DT or anti-CD8 mAb intraperitoneal injections, mice were rechallenged with DNFB. The following day, CHS reactions were determined by measuring mean $\pm$ SEM ear edema (in micrometers). All results are representative of 2 or 3 independent experiments with 4 to 5 mice per group. ns, Not significant. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, and **** $P < .0001$, 1-way ANOVA.

70% of epidermal and dermal CD8⁺ T cells coexpressed the 2 canonical Trm cell markers CD103 and CD69,²¹ emphasizing the residency properties of these cells (hereafter referred to as Trm cells; Fig 1, C).

Time-course experiments next demonstrated that CD8⁺ Trm cells progressively accumulated in the epidermis during the resolution of acute CHS inflammation, with a gradual increase between day 2 and day 15 after DNFB challenge (see Fig E2, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Trm cell numbers then stabilized between days 15 and 30, along with complete resolution of skin inflammation, before they underwent a progressive and profound attrition up to 12 months after challenge (Fig 1, D). Of note, depletion of circulating but not skin-resident CD8⁺ T cells by anti-CD8⁺ mAb treatment at day 2 after challenge did not change the numbers of epidermal Trm cells recorded in the skin (see Fig E2, B and C), indicating that skin Trm cells mainly derive from *in situ* proliferation of early effector cells present at the peak of the CHS response (see Fig E2, D).

Skin CD8⁺ and CD4⁺ T-cell subsets were subsequently collected at 30 days, FACS sorted, and reactivated *ex vivo* with allergen-pulsed bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) to determine the proportion of allergen-specific Trm cells among CD8⁺ Trm cells present in the healed lesions of mice with DNFB allergy. The following day, the number of spot-forming cells producing IFN- γ , IL-17A, or IL-4 was determined by using an ELISpot assay. Although approximately 1% of epidermal and 0.2% of dermal CD8⁺ T cells of healed CHS lesions were antigen specific and produced IFN- γ (Fig 1, E), IL-17A and IL-4 were not detected (data not shown). Comparatively, the frequency of DNFB-specific cells among total CD8⁺ T cells from draining

lymph nodes (dLNs), which comprise a mix of effector memory T (Tem) cells and central memory T cells and dLN Trm cells, was less than 0.1%.

Time-course experiments revealed a progressive and significant reduction in the numbers of DNFB-specific cells during the months after DNFB challenge, with an approximately 10-fold decrease at month 12 when compared with day 30 (Fig 1, F). Thus, these data show that healed CHS lesions are enriched for allergen-specific CD8⁺ Trm cells, which persist in the skin for months.

CD8⁺ Trm cells mediate DNFB-induced flare-up reactions

We next examined the contribution of CD8⁺ Trm cells to allergen-induced eczema flares. When animals with DNFB allergy were rechallenged on healed skin at day 30 with a standard dose of 0.13%, they experienced potent flare-up reactions, with a more severe magnitude than the response induced on naïve skin and the background response induced in nonallergic animals (Fig 2, A, left part). The flare-up CHS reactions were antigen specific because application of the irrelevant strong allergen OXA on the healed or naïve skin of animals with DNFB allergy triggered only background responses of similar magnitude to those induced in nonallergic animals (Fig 2, A, right part).

To demonstrate the contribution of DNFB-specific CD8⁺ Trm cells to the exaggerated reaction recorded in healed lesions on allergen retesting, we developed an original inducible diphtheria toxin receptor (iDTR)-based approach using CD3 $\epsilon^{-/-}$ lymphopenic recipient mice reconstituted, before induction of DNFB-CHS, with iDTR-CD8⁺ and wild-type CD4⁺ T cells collected

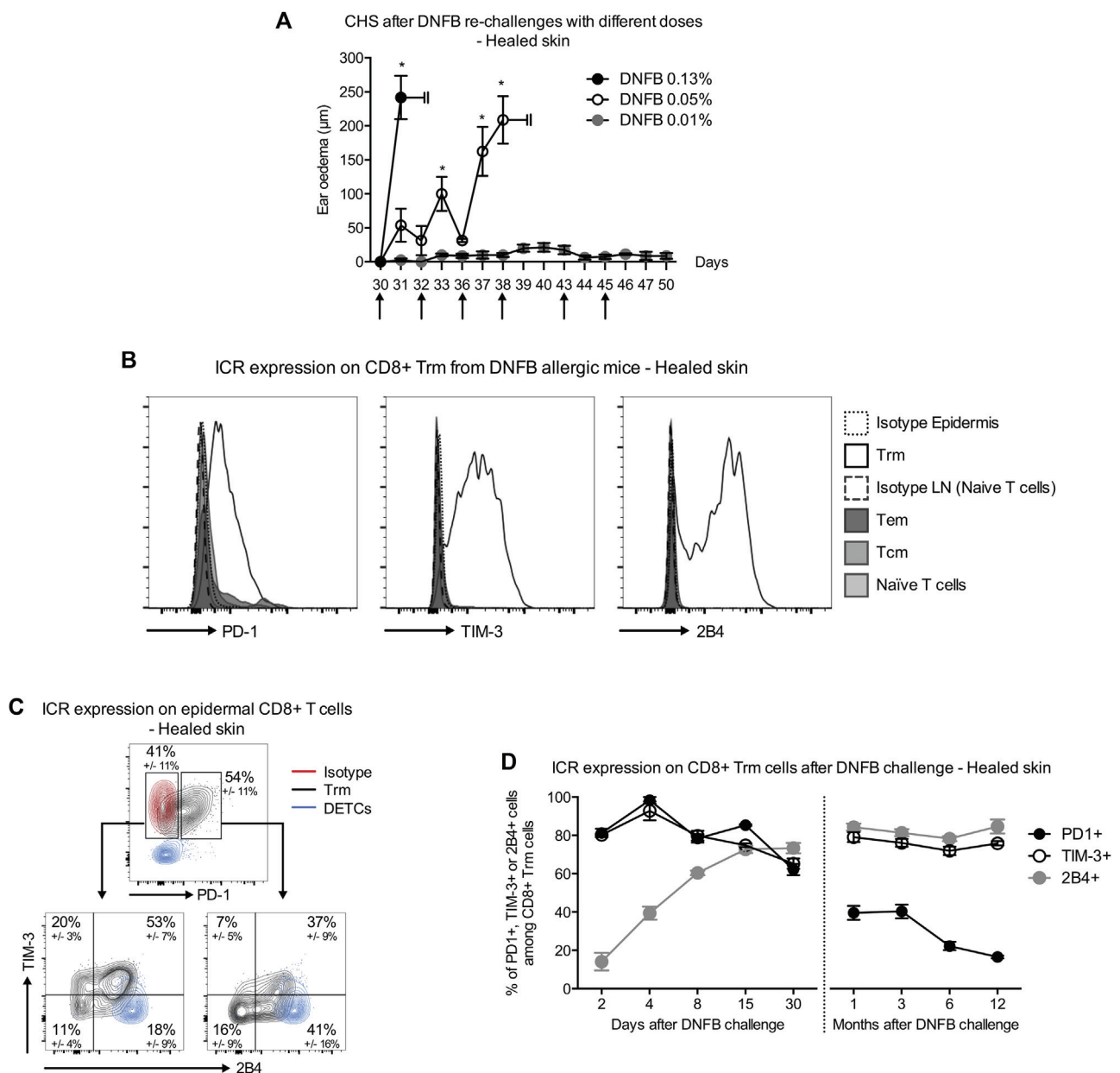


FIG 3. Epidermal CD8⁺ Trm cells, but not circulating memory CD8⁺ T cells, express several ICRs. **A**, CHS response to repeated applications of low DNFB doses. C57BL/6 mice with DNFB allergy were rechallenged (arrows) with low DNFB doses (0.05% at days 0, 2, and 6 or 0.01% at days 0, 2, 6, 8, 13, and 15) or a single standard DNFB dose (0.13% at day 0). CHS reactions were determined by measuring mean $\pm$ SEM ear edema (in micrometers). **B**, ICR expression by epidermal or dLN CD8⁺ memory T-cell subsets. FACS plots depict representative PD-1, TIM-3, or 2B4 expression by epidermal CD8⁺ Trm cells and dLN CD8⁺ Tem cells, central memory T (Tcm) cells, or naive cells at day 30 after DNFB challenge. **C**, ICR coexpression by CD8⁺ Trm cells. Mean $\pm$ SD percentages of TIM-3 and 2B4 coexpression on gated epidermal PD-1⁺ and PD-1⁻ CD8⁺ Trm cells subsets at day 30. Dendritic epidermal T cells (DETCs) are shown as controls. **D**, ICR expression by epidermal CD8⁺ T cells during the course of CHS response to DNFB and after its resolution. Mean $\pm$ SD percentages of PD-1⁺, TIM-3⁺, and 2B4⁺ cells among epidermal CD8⁺ Trm cells from day 2 to month 12. All results are representative of 2 or 3 independent experiments with 4 to 5 mice per group or time point. * $P < .05$, Mann-Whitney U test.

by means of FACS sorting from iDTR/CD4cre and C57BL/6 donor mice, respectively. Flare-up reactions on retesting were completely abrogated in recipient mice injected with DT (1 day before rechallenge), whereas untreated or anti-CD8 mAb-treated control mice had a full flare-up response (Fig 2, B).

Conversely to anti-CD8 mAb treatment, which only depletes circulating CD8⁺ T cells, DT injection depleted all the circulating and skin CD8⁺ T cells while sparing non-CD8⁺ T cells in these recipients (see Fig E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

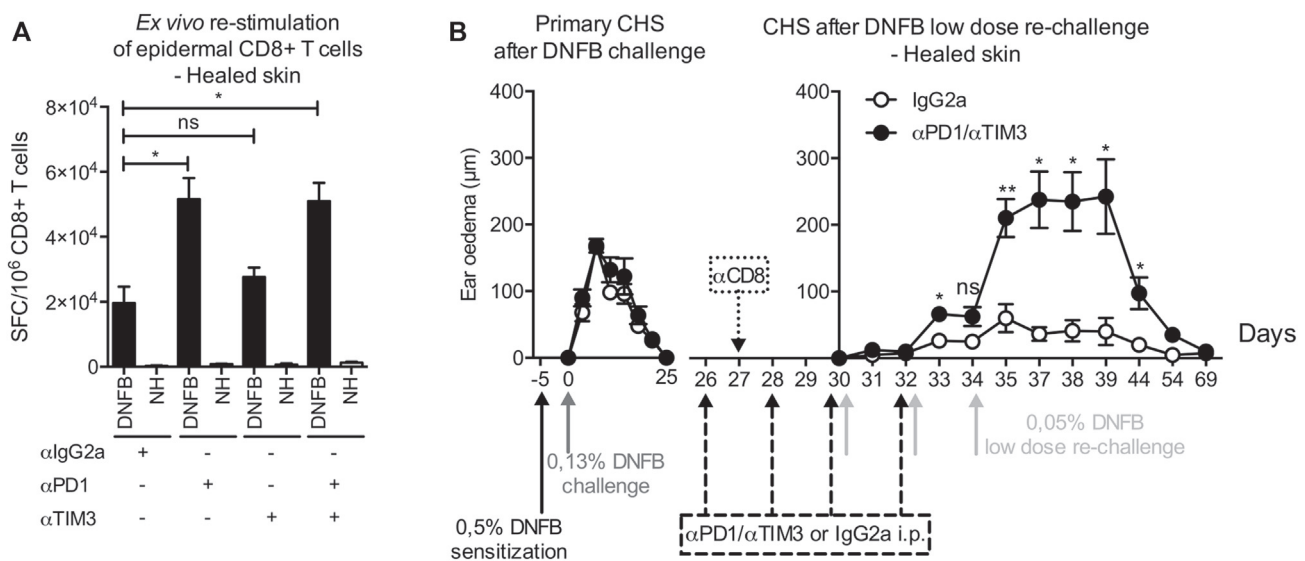


FIG 4. Blocking ICR signaling increases the reactivity of CD8⁺ T cells *in vitro* and exacerbates flare-up CHS reactions *in vivo*. **A**, DNFB-specific T-cell responses in the presence of ICR-blocking mAbs. CD8⁺ T cells from healed epidermis were cocultured overnight with haptenized (DNBS; 0.4 mmol/L) or nonhaptenized (NH) BMDCs in the presence of anti-PD-1 mAb, anti-TIM-3 mAb, or both. IgG_{2a} was added to control cocultures. The following day, the number of specific T cells was determined by using an IFN-γ ELISpot assay. Results are expressed as mean ± SEM numbers of spot-forming cells/10⁶ CD8⁺ T cells. **B**, ICR antagonists increase CHS responses to low DNFB doses. Mice with DNFB allergy were rechallenged with low DNFB doses (0.05% at days 30, 32, and 34), whereas ICR blockade was maintained by intraperitoneal injection of anti-PD-1 and anti-TIM-3 mAbs at days 26, 28, 30, and 32. As a control, mice with DNFB allergy were injected with IgG_{2a} mAbs. Circulating CD8⁺ T cells were depleted by means of intraperitoneal injection of anti-CD8 mAbs at day 27. CHS reaction was determined by measuring mean ± SEM ear edema (in micrometers). All results are representative of 3 independent experiments with 5 to 15 mice per group. *ns*, Not significant. **P* < .05 and ***P* < .01, Mann-Whitney *U* test.

Thus, our results show that antigen-specific CD8⁺ Trm cells are of prime importance for the development of recurrent flare-up reactions recorded on healed lesions of mice with DNFB allergy.

CD8⁺ Trm cells are hyporesponsive to low DNFB doses

We next examined flare-up reactions induced in allergic animals by low DNFB doses (ie, less than the standard dose of 0.13%). As expected, repeated applications of low DNFB doses on healed skin induced an intense flare-up reaction. It required 3 consecutive administrations of 0.05% DNFB (on days 0, 2, and 6) to generate flares of similar magnitude to those provoked by a single optimal dose (Fig 3, A). By contrast, 6 consecutive administrations (on days 0, 2, 6, 8, 13, and 15) of 0.01% DNFB did not induce a flare-up reaction. On naive skin, 6 consecutive administrations of 0.05% DNFB (on days 0, 2, 6, 8, 13, and 15) did not induce significant flares (data not shown). These data indicate that although specific Trm cells are seeded in the skin at significant density, they are actively restrained to prevent excessive immunoreactivity in response to DNFB application of less than a certain threshold (Fig 3, A).

Epidermal CD8⁺ Trm cells express a restricted set of ICRs

In this respect we investigated expression of different ICRs by skin CD8⁺ Trm cells.²² We noticed that these cells expressed high

levels of PD-1,²³ TIM-3,²⁴ or 2B4 (Fig 3, B),²⁵ as well as CD5,²⁶ but not T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT),²⁷ lymphocyte activation gene 3 protein (LAG-3), and cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4; see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org),²⁸ compared with CD8⁺ Tem cells and central memory T or naive CD8⁺ T cells isolated from the dLNs of mice with DNFB allergy. CD160 and B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA)²⁹ were also not observed on skin CD8⁺ Trm cells, whereas V-type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation (VISTA)³⁰ was detected at a low level (see Fig E4). Further analysis showed that approximately 55% of CD8⁺ Trm cells expressed PD-1 (Fig 3, C, top). In both the PD-1⁺ and PD-1⁻ subpopulations, a majority of the cells coexpressed TIM-3 and 2B4 (Fig 3, C, bottom).

Time-course analysis revealed a rather constant PD-1 expression on CD8⁺ Trm cells from days 2 to 15 after DNFB challenge (approximately 80%) associated with a progressive decrease in the following months (approximately 20% at month 12). By comparison, the percentage of TIM-3⁺ cells remained stable throughout the protocol (approximately 80%), whereas the percentage of 2B4⁺ cells increased dramatically from around 10% at day 4 to almost 80% from day 30 to month 12 (Fig 3, D).

Of note, the number of DNFB-specific IFN-γ-producing T cells among CD8⁺PD-1⁺ Trm cells was 2 times higher compared with that in their PD-1⁻ counterparts, as revealed by using an ELISpot assay at day 30 after DNFB challenge (see Fig E5 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

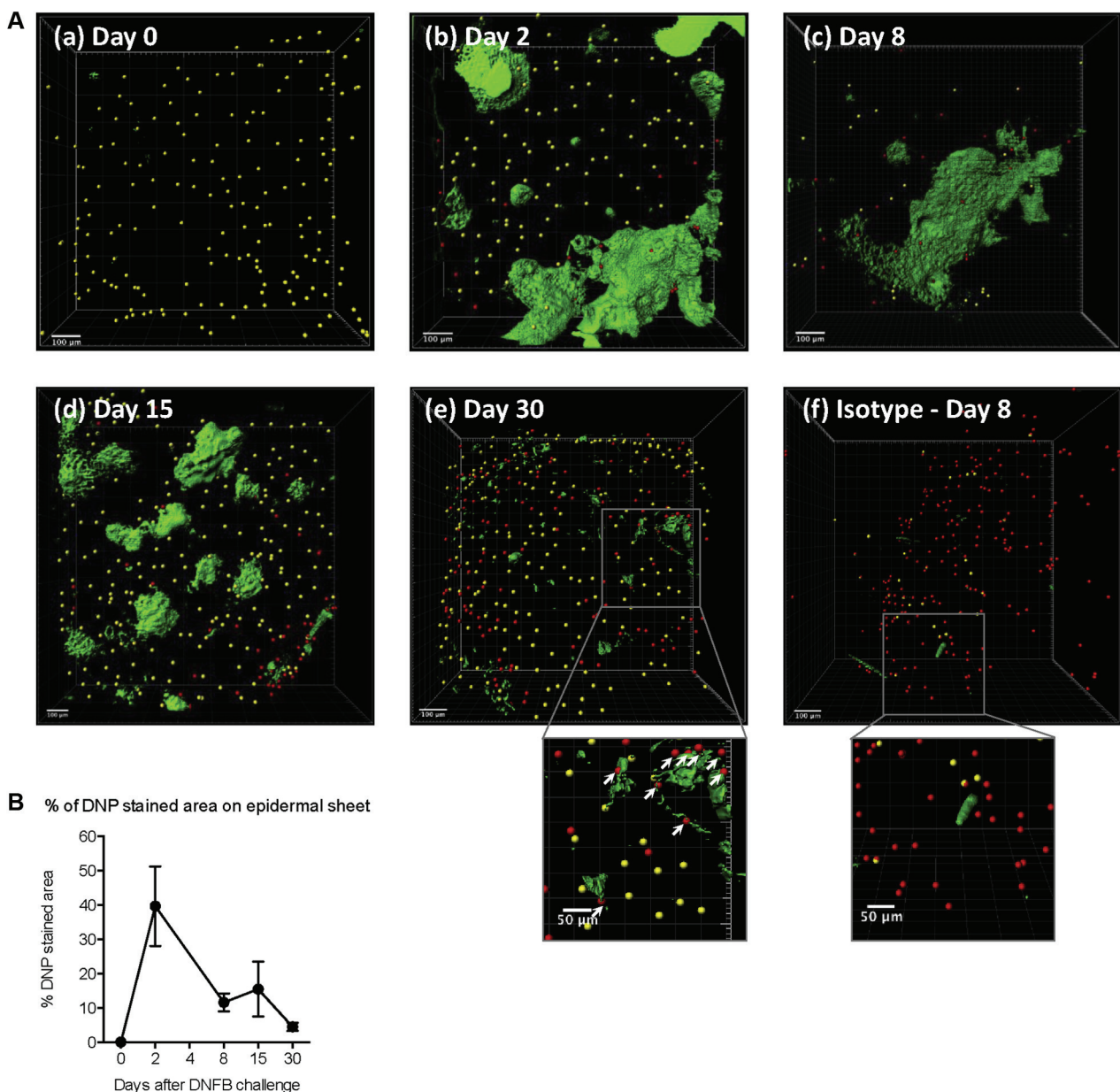


FIG 5. Allergen persistence in the skin after resolution of CHS to DNFB. Illustrative and quantitative analysis of DNP moieties present in the skin during the course of CHS to DNFB. **A**, Threshold segmentation images. Epidermal sheets collected before and 2, 8, 15, or 30 days after DNFB challenge of DNFB-sensitized animals were explored for the presence of DNP moieties (green), CD8b⁺ T cells (red), and dendritic epidermal T cells (DETCs; yellow) by using standard immunofluorescence staining. Representative photographs acquired on a LightSheet Z.1 microscope after threshold segmentation by using Bitplane Imaris are shown. Control isotype staining was performed on epidermal sheets collected at day 8. **White arrows** highlight the pronounced accumulation of CD8⁺ T cells around DNP-stained areas. **B**, Quantification. Percentage of epidermal area stained by anti-DNP mAbs was calculated throughout the CHS response to DNFB by determining the total epidermal area (cubic micrometers) analyzed by using DAPI nuclear staining and the DNP-stained area (cubic micrometers). For each mouse, 3 to 4 pictures were analyzed. All results are representative of 2 independent experiments with 3 mice per time point.

Blocking ICR signaling leads to severe CHS responses on challenge with low DNFB doses

We then tested for the functional relevance of ICRs expressed on skin Trm cells and their ability to prevent eczema exacerbation. Blocking ICRs *in vitro* by using anti-PD-1 and anti-TIM-3 mAbs increased the reactivity of purified epidermal CD8⁺ Trm cells and their capacity to produce IFN- γ (Fig 4, A) and

granzyme-B (data not shown) on *ex vivo* reactivation with allergen-pulsed BMDCs. Of note, the effect of blocked TIM-3 signaling was more modest than for PD-1, with an increase of approximately 40% and 160% regarding the number of IFN- γ -producing cells, respectively. More importantly, *in vivo* blockade of these 2 ICRs triggered severe flare-up CHS reactions when animals with DNFB allergy (depleted of all circulating

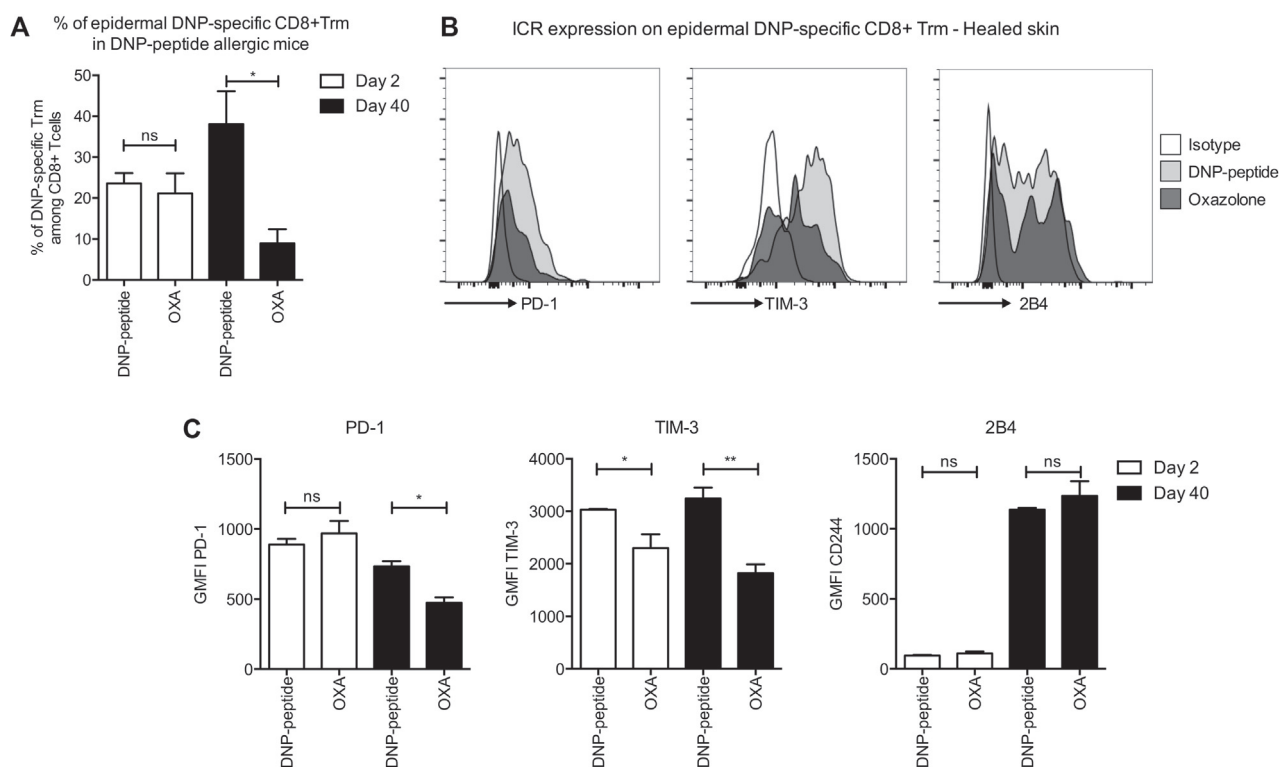


FIG 6. Accumulation of epidermal Trm cells and maintenance of ICR expression is antigen dependent. Naive C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally with DNP peptide-pulsed BMDCs and challenged 5 days later on the left ear with the DNP peptide in dimethyl sulfoxide or with an irrelevant hapten, OXA. **A**, The number of DNP peptide-specific CD8⁺ T cells recruited in the epidermis through an antigen-specific or non-antigen-specific approach (prime-and-pull strategy) was measured by using FACS at days 2 and 40 with fluorescently labeled dextramers loaded with the respective DNP peptide. Results are depicted as mean $\pm$ SEM percentages. **B** and **C**, Expression levels of PD-1, TIM-3, and 2B4 by DNP-specific CD8⁺ Trm cells after antigen-specific (DNP peptide) or non-antigen-specific (OXA) recruitment was assessed. Representative histograms (day 40; Fig 6, **B**) and mean $\pm$ SEM values of respective geometric mean fluorescence intensity (GMFI; days 2 and 40; Fig 6, **C**) are shown. All results are representative of 3 independent experiments with 4 to 5 mice per group. ns, Not significant. * $P < .05$ and ** $P < .01$, Mann-Whitney U test.

CD8⁺ T cells by anti-CD8 mAb treatment just before rechallenge) were repeatedly re-exposed to low DNFB doses (0.05%), which induced only a very mild inflammation in untreated animals (Fig 4, **B**). Of note, acute depletion of skin CD8⁺ Trm cells by means of DT injection using our iDTR-based model abrogated the development of the CHS reaction induced by anti-PD-1 and anti-TIM-3 blockade (see Fig E6 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Taken together, our results show that PD-1 and, to a lesser extent, TIM-3 control reactivation of epidermal CD8⁺ Trm cells and prevent development of CHS responses when subjects are re-exposed to low allergen doses.

Allergen persists for several weeks within the epidermis

To better understand why CD8⁺ Trm cells are restrained in the skin and maintain ICR expression for weeks, we first investigated how long DNFB, which is administrated epicutaneously, persists inside the tissue. Indeed, sustained expression of ICRs has previously been associated with recent or chronic stimulation of T cells by their cognate antigen.²²

Using standard immunofluorescence staining of dinitrophenyl (DNP) moieties generated at different time points after DNFB painting and light sheet fluorescence microscopy, we observed

that around 40% of the epidermal compartment was stained by anti-DNP mAbs at day 2 after challenge. Interestingly, approximately 10% was still stained at days 8 and 15, and about 5% remained labeled at day 30 after challenge, with a pronounced accumulation of CD8⁺ T cells (detected by using anti-CD8 mAb staining) around DNP-stained areas (Fig 5 and see Movies E1-E6 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Thus, our results revealed an underestimated persistence of chemical allergen moieties in the skin for at least 1 month.

Allergen persistence amplifies the number of CD8⁺ Trm cells and modulates their ICR phenotype

To determine whether long-term persistence of the allergen affected ICR expression on skin Trm cells, we compared cells generated through application of the cognate antigen (DNFB) or through a prime-and-pull strategy.³¹ The latter allows recruitment of antigen-specific T cells into the skin in an antigen-independent manner through application of an inflammatory but structurally irrelevant molecule. Here, we used the strong contact allergen OXA. In addition, to track specific CD8⁺ Trm cells, we developed a new CHS model based on the use of a MHC class I-restricted ovalbumin peptide bearing a DNP moiety (DNP peptide),³² which displays similar features to its DNFB counterpart but in which specific CD8⁺ T cells can be

detected by using fluorescently labeled dextramers loaded with the cognate DNP peptide (see Fig E7 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

By using the prime-and-pull strategy, the absence of cognate antigen in the skin should lead to (1) a significant decrease in CD8⁺ Trm cell numbers, as previously reported,³³⁻³⁵ and (2) a modulation of their ICR phenotype because of the lack of T-cell receptor (TCR) stimulation. Hence although we observed that similar numbers of specific CD8⁺ T cells were recruited into the epidermis 2 days after challenge with DNP peptide or OXA, only one quarter of the number of epidermis-specific CD8⁺ Trm cells induced by cognate antigen challenge was detected 40 days after OXA challenge (Fig 6, A). Moreover, significantly less TIM-3 but not PD-1 expression was detected on dextramer-positive CD8⁺ T cells at day 2 after OXA versus DNP challenge, as indicated by a decrease in the geometric mean fluorescence intensity from approximately 3000 to 2200 (Fig 6, B and C). At day 40 after challenge, expression of both PD-1 and TIM-3 was decreased (Fig 6, B and C). Conversely, we did not observe any difference in 2B4 expression between the 2 recruitment strategies (Fig 6, B and C).

Therefore, long-term persistence of the allergen in the skin not only amplifies the number of specific CD8⁺ Trm cells that populate the epidermis but also partially modulates their phenotype.

DISCUSSION

Tissue Trm cells are considered detrimental in numerous human inflammatory diseases, including skin allergies. In the present study we capitalized on a reference mouse model of ACD to study the local parameters regulating Trm cell development and functions during pathologic processes. We report that in allergic animals the sites of previously inflamed skin are seeded with a high frequency of specific CD8⁺ Trm cells in both the epidermis and dermis. These cells are instrumental for the recurrence and severity of eczema because they are sufficient to evoke intense flare-up reactions on allergen challenge without help from their circulating counterparts. However, although they are highly pathogenic, specific CD8⁺ Trm cells display certain levels of hyporesponsiveness. They express a specific pattern of inhibitory receptors, such as PD-1 and TIM-3 (but also high levels of 2B4 and CD5), which attenuate their reactivity and prevent excessive responses when subjects are re-exposed to the allergen. Finally, a major observation was the underestimated long-term persistence of the allergen inside the epidermis, which drives expansion of early CD8⁺ T-cell effectors and their differentiation into Trm cells but also modulates their ICR expression to keep them in check. Therefore, our results identify intrinsic factors that control pathogenic Trm cells to preserve skin integrity and to avoid the development of chronic and severe immunopathology.

CD8⁺ Trm cells are major drivers of the chronicity and severity of eczema

In this study allergic skin responses were triggered by epicutaneous application of DNFB, a chemical allergen/hapten endowed with strong sensitizing properties. We observed that the majority of local memory cells that populated the epidermis and dermis of previously affected skin were CD8⁺ Trm cells. We did not detect allergen-specific CD4⁺ T cells producing IFN- γ , IL-4, and IL-17A.

We demonstrated that epidermal CD8⁺ Trm cells are sufficient to prompt severe eczema exacerbations, which in consequence categorize them as prominent drivers of the chronicity and severity of eczema. The concept of local skin memory to explain the strong and accelerated allergen-induced inflammatory reaction at the site of previously affected skin was introduced more than 3 decades ago by Scheper et al.¹⁵ Thus far, major but only indirect demonstrations have suggested that skin Trm cells, notably CD8⁺ Trm cells, are responsible for the development of these early and intense flares.¹⁴⁻¹⁷ The most solid evidence came from the study by Gaide et al,¹⁶ which reported that flare-up reactions are not prevented when allergic animals are injected with drug compounds that block the egress of memory T cells from the lymphoid organs. In the present study the sharp elimination of iDTR⁺ CD8⁺ Trm cells from the skin and the subsequent abrogation of allergen-induced flares firmly demonstrated the contribution of Trm cells to allergen-induced exacerbations, excluding the potential involvement of other tissue-resident cells, such as dermal innate lymphoid cells or liver natural killer memory cells.³⁶⁻³⁸ In addition, the fact that application of the irrelevant allergen OXA produced similar inflammation on healed and naive skin of mice with DNFB allergy enabled us to exclude the possibility that the intense flares recorded at the sites of healed lesions were due to bystander activation of non-allergen-specific Trm cells solely as a result of the inflammatory environment and cytokine signaling on CD8⁺ Trm cells.³⁹⁻⁴¹

Long-term persistence of chemical allergen moieties in the skin promotes formation of CD8⁺ Trm cells

The mechanisms that drive the formation and fate of skin Trm cells are complex and thus far only partially understood. Here, we observed that the accumulation of epidermal CD8⁺ Trm cells correlated with long-term persistence of the allergen in the skin (at least >30 days), with a progressive decrease from days 0 to 30. Of note, allergen persistence at day 30 was mainly observed in keratinocytes from hair follicles. Because epidermal renewal needs only 8 to 10 days in mice, this observation strongly suggests that the allergen is stocked in long-lived slow-cycling epidermal stem cells, which represent a small fraction of inter-follicular epidermis and hair follicles.⁴²⁻⁴⁴ Hence one could speculate that, mimicking viral immunity controlling viruses integrated in our genomes,⁴⁵ allergen-specific CD8⁺ Trm cells are placed here to survey long-lived skin cells that continuously present allergen epitopes. It will be crucial to determine exactly how long an allergen can persist in the skin and whether its presence is functional and prompts Trm cell activation, survival, or both, avoiding progressive attrition of specific Trm cell pools from the epidermis (as shown in Fig 1, F). Here, confirming previous studies, we demonstrated that although a significant number of allergen-specific Trm cells can be recruited to the skin on a prime-and-pull strategy, this number is dramatically amplified when cells recognize their cognate antigen in the skin.^{33,46}

CD8⁺ Trm cells are placed at the skin interface but are kept in check

The most striking finding of our study was certainly the demonstration that, despite their key role in the recurrence of the pathology, allergen-specific CD8⁺ Trm cells are tightly

regulated and express ICRs, which prevent them from unnecessary strong reactivation on allergen exposure. Several investigators have previously reported the expression of different inhibitory molecules by CD8⁺ Trm cells not only in patients with cancer^{47,48} but also in those with viral infections,^{49–52} autoimmune uveoretinitis,⁵³ or homeostasis.^{54,55} In addition, recent comparison of the gene-expression pattern of lung Trm cells versus circulating Tem cells in human subjects demonstrated that Trm cells expressed a restrained genetic program with high expression of CTLA4, BTLA, LAG3, SPRY1, A2AR, PD1, TWIST1, BACH2 genes.⁵⁵ Here, we reported that allergen-induced Trm cells expressed different surface levels of a restricted set of ICRs (PD-1, TIM-3, and 2B4 but also a high level of CD5 and a low level of VISTA but not TIGIT, BTLA, LAG-3, CD160, or CTLA-4), corroborating the hypothesis that reactivation of Trm cells must be tightly controlled to ensure sufficient but limited reactivity.

Interestingly, a previous study demonstrated that the pattern of ICR coexpression and the number of receptors simultaneously expressed by the same CD8⁺ Trm cells affect the magnitude of the restraint on the Trm cells.²² In this study we observed that the pattern of ICR coexpression varies over time, with a progressive increase in 2B4 expression compared with expression of PD-1, TIM-3, or both, during the first month after DNFB challenge, and a late decrease in PD-1 but not TIM-3 or 2B4 expression after 6 to 12 months. Our results question the environmental signals that participate in modulating the level of ICR expression and thereby the functions of skin Trm cells. It was recently suggested that acquisition of a specific inhibitory program could be associated with affinity/avidity of the initial TCR-pMHC interactions between Trm cell precursors and antigen-presenting cells.⁵¹ Here, we showed that the persisting allergen in the skin not only amplified the number of CD8⁺ Trm cells populating the epidermis but also maintained PD-1 and TIM-3 expression, which is reminiscent of recent work describing the presence of clonally expanded Trm cell–like PD-1⁺CD8⁺ cells in the synovial fluid of patients with chronic juvenile idiopathic arthritis.⁵⁶ However, beyond antigen persistence, it will be interesting to determine whether hair follicle–derived IL-15 or IL-7 cytokines⁵⁷ or TGF-β,⁵⁸ which were reported to be instrumental for Trm cell differentiation, are also susceptible to modulate the ICR program on skin Trm cells, especially because we have observed that these 3 cytokines are synthesized during the resolution of the DNFB inflammation (data not shown). Finally, it will also be important to determine the respective role of epidermal Langerhans cells, dendritic epidermal T cells, regulatory cells T, or innate lymphoid cells in the control of Trm cell reactivation through ICR acquisition, ligation, or both.

In conclusion, our results provide important information for considering the unique nature of allergen-induced CD8⁺ Trm cells and the mechanisms that preserve their unwanted reactivation and the subsequent development of chronic or severe skin allergy. The development of strategies targeting reactivation of skin Trm cells *in situ* through their ICRs should open new avenues to treat ACD.

We thank T. Andrieu, S. Dussurgey, and C. Chamot (Plateaux techniques de cytométrie en flux et d'imagerie/microscopie, US8/UMS3444 Bio-SciencesGerland, Lyon Sud), as well as D. Resnikoff (Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est), for their assistance with flow cytometry and microscopy.

Key messages

- High numbers of hapten-specific CD8⁺ Trm cells accumulate at the sites of healed eczema lesions in response to the long-term persistence of hapten moieties in the skin.
- CD8⁺ Trm cells are key for the chronicity, severity, and recurrence of the pathology.
- However, these cells express several inhibitory receptors, such as PD-1 or TIM-3, which keep them in check to preserve skin integrity and avoid the development of severe immunopathology.

REFERENCES

- Ariotti S, Hogenbirk MA, Dijkgraaf FE, Visser LL, Hoekstra ME, Song JY, et al. T cell memory. Skin-resident memory CD8(+) T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* 2014;346:101-5.
- Bergsbaken T, Bevan MJ. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8(+) T cells responding to infection. *Nat Immunol* 2015;16:406-14.
- Cheuk S, Schlums H, Gallais Serezal I, Martini E, Chiang SC, Marquardt N, et al. CD49a expression defines tissue-resident CD8+ T cells poised for cytotoxic function in human skin. *Immunity* 2017;46:287-300.
- Naik S, Bouladoux N, Linehan JL, Han SJ, Harrison OJ, Wilhelm C, et al. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* 2015;520:104-8.
- Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* 2009;10:524-30.
- Steinert EM, Schenkel JM, Fraser KA, Beura LK, Manlove LS, Igyarto BZ, et al. Quantifying memory CD8 T cells reveals regionalization of immunosurveillance. *Cell* 2015;161:737-49.
- Jiang X, Clark RA, Liu L, Wagers AJ, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 2012;483:227-31.
- Schenkel JM, Fraser KA, Vezys V, Masopust D. Sensing and alarm function of resident memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol* 2013;14:509-13.
- Park CO, Kupper TS. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat Med* 2015;21:688-97.
- Clark RA. Resident memory T cells in human health and disease. *Sci Transl Med* 2015;7:269rv1.
- Shiohara T, Mizukawa Y. Fixed drug eruption: a disease mediated by self-inflicted responses of intraepidermal T cells. *Eur J Dermatol* 2007;17:201-8.
- Clark RA, Watanabe R, Teague JE, Schlapbach C, Tawa MC, Adams N, et al. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med* 2012;4:117ra7.
- Watanabe R, Gehad A, Yang C, Scott LL, Teague JE, Schlapbach C, et al. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Sci Transl Med* 2015;7:279ra39.
- Moed H, Boersma DM, Tensen CP, Flier J, Jonker MJ, Stoof TJ, et al. Increased CCL27-CCR10 expression in allergic contact dermatitis: implications for local skin memory. *J Pathol* 2004;204:39-46.
- Scheper RJ, von Blomberg M, Boerrigter GH, Bruynzeel D, van Dinther A, Vos A. Induction of immunological memory in the skin. Role of local T cell retention. *Clin Exp Immunol* 1983;51:141-8.
- Gaide O, Emerson RO, Jiang X, Gulati N, Nizza S, Desmarais C, et al. Common clonal origin of central and resident memory T cells following skin immunization. *Nat Med* 2015;21:647-53.
- Schmidt JD, Ahlstrom MG, Johansen JD, Dyring-Andersen B, Agerbeck C, Nielsen MM, et al. Rapid allergen-induced interleukin-17 and interferon-gamma secretion by skin-resident memory CD8+ T cells. *Contact Dermatitis* 2017;76:218-27.
- Brunner PM, Emerson RO, Tipton C, Garcet S, Khattri S, Coats I, et al. Non-leisional atopic dermatitis skin shares similar T-cell clones with lesional tissues. *Allergy* 2017;72:2017-25.
- Vocanson M, Hennino A, Rozieres A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2009;64:1699-714.

20. Garrigue JL, Nicolas JF, Fragnals R, Benezra C, Bour H, Schmitt D. Optimization of the mouse ear swelling test for in vivo and in vitro studies of weak contact sensitizers. *Contact Dermatitis* 1994;30:231-7.
21. Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol* 2013;31:137-61.
22. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015;15:486-99.
23. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010;236:219-42.
24. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity* 2016;44:989-1004.
25. Morris AB, Adams LE, Ford ML. Influence of T cell coinhibitory molecules on CD8(+) recall responses. *Front Immunol* 2018;9:1810.
26. Cho JH, Sprent J. TCR tuning of T cell subsets. *Immunol Rev* 2018;283:129-37.
27. Dougall WC, Kurtulus S, Smyth MJ, Anderson AC. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2017;276:112-20.
28. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev* 2017;276:80-96.
29. Cai G, Freeman GJ. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol Rev* 2009;229:244-58.
30. Nowak EC, Lines JL, Varn FS, Deng J, Sarde A, Mabaera R, et al. Immunoregulatory functions of VISTA. *Immunol Rev* 2017;276:66-79.
31. Mackay LK, Stock AT, Ma JZ, Jones CM, Kent SJ, Mueller SN, et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:7037-42.
32. Martin S, Ortmann B, Pflugfelder U, Birsner U, Weltzien HU. Role of hapten-anchoring peptides in defining hapten-epitopes for MHC-restricted cytotoxic T cells. Cross-reactive TNP-determinants on different peptides. *J Immunol* 1992;149:2569-75.
33. Khan TN, Mooster JL, Kilgore AM, Osborn JF, Nolz JC. Local antigen in non-lymphoid tissue promotes resident memory CD8+ T cell formation during viral infection. *J Exp Med* 2016;213:951-66.
34. Mackay LK, Wakim L, van Vliet CJ, Jones CM, Mueller SN, Bannard O, et al. Maintenance of T cell function in the face of chronic antigen stimulation and repeated reactivation for a latent virus infection. *J Immunol* 2012;188:2173-8.
35. Muschawekch A, Buchholz VR, Fellenzer A, Hessel C, Konig PA, Tao S, et al. Antigen-dependent competition shapes the local repertoire of tissue-resident memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 2016;213:3075-86.
36. Peng H, Jiang X, Chen Y, Sojka DK, Wei H, Gao X, et al. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest* 2013;123:1444-56.
37. Rouzaire P, Luci C, Blasco E, Bienvenu J, Walzer T, Nicolas JF, et al. Natural killer cells and T cells induce different types of skin reactions during recall responses to haptens. *Eur J Immunol* 2012;42:80-8.
38. Hartwig T, Pantelyushin S, Croxford AL, Kulig P, Becher B. Dermal IL-17-producing gammadelta T cells establish long-lived memory in the skin. *Eur J Immunol* 2015;45:3022-33.
39. Kohlmeier JE, Cookenham T, Roberts AD, Miller SC, Woodland DL. Type I interferons regulate cytolytic activity of memory CD8(+) T cells in the lung airways during respiratory virus challenge. *Immunity* 2010;33:96-105.
40. Soudja SM, Ruiz AL, Marie JC, Lauvau G. Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity* 2012;37:549-62.
41. Raue HP, Beadling C, Haun J, Slifka MK. Cytokine-mediated programmed proliferation of virus-specific CD8(+) memory T cells. *Immunity* 2013;38:131-9.
42. Mascré G, Dekoninck S, Drogat B, Youssef KK, Brohee S, Sotiropoulou PA, et al. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature* 2012;489:257-62.
43. Sada A, Jacob F, Leung E, Wang S, White BS, Shalloway D, et al. Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin. *Nat Cell Biol* 2016;18:619-31.
44. Roy E, Neufeld Z, Cerone L, Wong HY, Hodgson S, Livet J, et al. Bimodal behaviour of interfollicular epidermal progenitors regulated by hair follicle position and cycling. *EMBO J* 2016;35:2658-70.
45. Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Bosnjak L, Kim M, Jones C, et al. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis* 2006;194(suppl 1):S11-8.
46. Davies B, Prier JE, Jones CM, Gebhardt T, Carbone FR, Mackay LK. Cutting edge: tissue-resident memory T cells generated by multiple immunizations or localized deposition provide enhanced immunity. *J Immunol* 2017;198:2233-7.
47. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpreville V, et al. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol* 2015;194:3475-86.
48. Enamorado M, Iborra S, Priego E, Cueto FJ, Quintana JA, Martínez-Cano S, et al. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8(+) T cells. *Nat Commun* 2017;8:16073.
49. Pallett LJ, Davies J, Colbeck EJ, Robertson F, Hansi N, Easom NJW, et al. IL-2(high) tissue-resident T cells in the human liver: sentinels for hepatotropic infection. *J Exp Med* 2017;214:1567-80.
50. Wakim LM, Woodward-Davis A, Liu R, Hu Y, Villadamos J, Smyth G, et al. The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. *J Immunol* 2012;189:3462-71.
51. Yoshizawa A, Bi K, Keskin DB, Zhang G, Reinhold B, Reinherz EL. TCR-pMHC encounter differentially regulates transcriptomes of tissue-resident CD8 T cells. *Eur J Immunol* 2018;48:128-50.
52. Shwetank, Abdelsamed HA, Frost EL, Schmitz HM, Mockus TE, Youngblood BA, et al. Maintenance of PD-1 on brain-resident memory CD8 T cells is antigen independent. *Immunol Cell Biol* 2017;95:953-9.
53. Boldison J, Chu CJ, Copland DA, Lait PJ, Khera TK, Dick AD, et al. Tissue-resident exhausted effector memory CD8+ T cells accumulate in the retina during chronic experimental autoimmune uveoretinitis. *J Immunol* 2014;192:4541-50.
54. Kumar BV, Ma W, Miron M, Granot T, Guyer RS, Carpenter DJ, et al. Human tissue-resident memory T cells are defined by core transcriptional and functional signatures in lymphoid and mucosal sites. *Cell Rep* 2017;20:2921-34.
55. Hombink P, Helbig C, Backer RA, Piet B, Oja AE, Stark R, et al. Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8+ lung-resident memory T cells. *Nat Immunol* 2016;17:1467-78.
56. Petrelli A, Mijnheer G, van Konijnenburg DPH, van der Wal MM, Giovannone B, Mocholi E, et al. PD-1+CD8+ T cells are clonally expanding effectors in human chronic inflammation. *J Clin Invest* 2018;128:4669-81.
57. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, et al. Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nat Med* 2015;21:1272-9.
58. Mohammed J, Beura LK, Bobr A, Astry B, Chicoine B, Kashem SW, et al. Stromal cells control the epithelial residence of DCs and memory T cells by regulated activation of TGF-beta. *Nat Immunol* 2016;17:414-21.

METHODS

Allergens

DNFB, DNBS (the soluble equivalent of DNFB), and OXA allergens were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). DNFB and OXA were diluted in acetone/olive oil vehicle (4:1 vol/vol) for epicutaneous application.

H-2Kb-restricted DNP-conjugated ovalbumin octapeptides (SIIC^DFEKL or SIIK^DFEKL) were synthesized by using standard Fmoc chemistry, with DNP-cysteine (C^D; 1717 CheMall, Mundelein, IL) or DNP-lysine (K^D; 1717 CheMall Corporation) placed in position 4.^{E1} DNP peptides were solubilized in dimethyl sulfoxide (Sigma)/water vehicle (3:1 vol/vol) for epicutaneous application.

mAbs used for immunofluorescence staining

Mouse anti-CD3–Alexa Fluor (AF) 700 (clone 17A2), anti-CD4–AF488 (clone RM4-5), anti-CD8b–AF647 (clone YST156.7.7), and anti-TCRγδ–PE (clone GLE) mAbs were purchased from BioLegend (Fell, Germany); anti-DNP–purified (polyclonal) and chicken–anti-rabbit secondary mAb AF488 were purchased from Life Technologies (Saint-Aubin, France).

mAbs and dextramers used for FACS staining

Mouse anti-CD45 (clone 104), anti-TCRαβ (clone H57-597), anti-CD4 (clone GK1.5 or RM4-5), anti-CD8β (clone H35-17.2), anti-CD69 (clone H1.2F3), anti-CD103 (clone M290), anti-granzyme-B (clone NGZB), anti-Ki67 (clone B56), anti-PD-1 (clone J43), anti-TIM-3 (clone 215008), anti-2B4 (clones REA388 or m2B4[B6]458.1), anti-TIGIT (clone GIGD7), anti-LAG-3 (clone C9B7W), anti-CD5 (clone 53-7.3), anti-CTLA-4 (clone UC10-4F10-11), anti-BTLA (clone 6F7), anti-CD160 (clone CNX46-3), anti-VISTA (clone MIH63), and anti-CD5 (clone 53-7.3) mAbs were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), Miltenyi Biotec (Bergish Gladbach, Germany), eBioscience (now Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), BioLegend, and R&D Systems (Lille, France).

Fluorescent H-2Kb-restricted SIIC^DFEKL or SIIK^DFEKL dextramers were synthesized by Immudex (Copenhagen, Denmark). Cell viability was analyzed by using a Fixable Viability Dye, purchased from eBioscience (San Diego, Calif). Intracellular staining was performed with BD Cytotfix/Cytoperm solutions (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Cell culture

Cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L HEPES, 50 μmol/L β-mercaptoethanol (all from Life Technologies, Carlsbad, Calif), and 10% FCS (Lonza, Basel, Switzerland).

Mouse strains and generation of iDTR mice

Female C57BL/6 mice were purchased from Charles Rivers Laboratories (L'Arbresle, France). CD3ε-knockout and Cre-iDTR mice were kindly provided by B. M. Malissen (Centre d'Immunologie, Marseille-Luminy, France) and A. Waisman (Institute for Genetics, Cologne, Germany). DTR expression in iDTR animals is inhibited by using a STOP cassette, which is flanked by 2 loxP sites that are removable by using Cre recombinase.^{E2} They were backcrossed with CD4-Cre animals^{E3} to obtain CD4-Cre/iDTR animals in which all CD4⁺ and CD8⁺ T cells express iDTR.

All experiments were conducted at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES, SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud UMS344/US8, France) under specific pathogen-free conditions with mice between 2 and 4 months of age.

BMDC generation and antigen pulse

BMDCs were generated *in vitro* from C57BL/6 bone marrow progenitors with GM-CSF, as previously described.^{E4} BMDCs were collected at day 7 of culture and pulsed with DNBS (1.4 mmol/L) for 15 minutes at 37°C (pH = 8) in the dark. To pulse BMDC with SIIC^DFEKL or SIIK^DFEKL

peptide, the latter was added on day 6 of the BMDC culture, at a final concentration of 5 μmol/L, and incubated overnight at 37°C in a CO₂ 5% atmosphere.

Depletion of CD8⁺ T cells by anti-CD8 mAbs and DT

Acute depletion (routinely >95%, as estimated by using FACS) of circulating CD8⁺ T cells was obtained by injecting mice intraperitoneally with 20 μg of anti-CD8b (H35, homemade) mAbs in 200 μL of 1× PBS at indicated time points before ear painting. For maintenance of cell depletion, injections were repeated every other day with one quarter of the initial dose of mAbs. Mice were given a maximum of 2 intraperitoneal injections of 1 μg of DT (Calbiochem/Millipore, San Diego, Calif) in 100 μL of 1× PBS at indicated time points before ear challenge to deplete cells expressing iDTR.

Generation of mice with iDTR CD8⁺ Trm cells

Lymphopenic CD3ε^{-/-} animals were transferred intravenously 1 month before induction of CHS to DNFB with CD45⁺CD8⁺ (0.5 × 10⁶) and CD45⁺CD4⁺ (1 × 10⁶) T cells that were FACS sorted from naive iDTR and wild-type C57BL/6 animals, respectively.

CHS to DNP peptide

Mice were immunized by means of subcutaneous injection of 0.5 × 10⁶ DNP peptide-pulsed BMDCs, and ear challenge was performed with 2 × 10 μL of 10 μmol/L DNP peptide. Dimethyl sulfoxide/water vehicle was applied on the contralateral ear. Unspecific skin recruitment (prime-and-pull strategy) of DNP peptide-specific CD8⁺ T cells was obtained by challenging DNP peptide-immunized animals with 2 × 5 μL of 1% OXA.

Flow cytometric analysis

Flow cytometric experiments were conducted on dLN, spleen, or skin cells harvested from sensitized animals. Isolated single-cell suspensions were stained with fluorescently labeled mAbs, and fixable viability staining was performed to exclude dead cells from the analysis. Stained cells were analyzed on a LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed by using FlowJo software (TreeStar, Ashland, Ore).

Total cell numbers were calculated based on numbers of viable cells determined by means of trypan blue exclusion during the isolation process. In some experiments the numbers of skin Trm cell subsets present in the epidermis and dermis of allergic animals were estimated by using AccuCheck Counting Beads (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturer's protocol.

DNFB-specific T-cell responses

Epidermal, dermal, and dLN cells of animals with DNFB allergy stained with anti-CD4, anti-CD8, and anti-CD45 mAbs were sorted on a BD Biosciences FACSAria and next tested for their capacity to produce IFN-γ, IL-4, or IL-17A by means of ELISpot (IFN-γ, R46A2, BD Pharmingen, San Jose, Calif; IL-4, SEL421, R&D Systems; and IL-17A eBio17CK15A5, eBioscience, San Diego, Calif) in response to an overnight *in vitro* restimulation with DNBS-pulsed BMDCs.^{E4} Sorted T cells (5 × 10³ or 10 × 10³) were plated with BMDCs. In some experiments rat anti-PD-1 (RMP1-14, 50 μg/mL), anti-TIM-3 (RMT3-23, 50 μg/mL), or respective IgG_{2a} isotype (2A3, 100 μg/mL) were added to the cocultures.

DNP peptide-specific T-cell responses

Epidermal cells (1 × 10⁵) from animals with DNP peptide allergy were cocultured overnight with DNP peptide-pulsed or unpulsed BMDCs (5 × 10⁵). The following day, stimulated cells were stained with fluorescent mAbs directed to CD45, CD8, IFN-γ, granzyme-B and PD-1 makers and analyzed by using FACS.

Skin cell isolation

For epidermal and dermal cell isolation, anterior and posterior layers of ear biopsy specimens were separated and incubated for 1 hour at 37°C floating with the interior side down on Dispase II (1.2 U/mL; Roche, Diagnostics, Meylan, France). Epidermal and dermal layers were diced into small pieces, incubated for 45 minutes at 37°C in collagenase type 1 (121.9 CDU/mL; Sigma-Aldrich) and DNase (2 KU/mL; Sigma-Aldrich) and passed through a 100- μ m cell strainer to obtain single-cell suspensions (Thermo Fisher Scientific). Cell viability was determined by using trypan blue exclusion.

Preparation and immunofluorescence staining of epidermal sheets

Mice were anesthetized to allow hair removal through application of depilatory cream (Veet-Reckitt Benckiser, Massy, France) for 1 minute before the skin was thoroughly washed with distilled water. After this, the mice were killed by means of cervical dislocation, and the ears were cut proximally. The ventral and dorsal leaves were separated along the cartilage and incubated 2 hours at 37°C floating on 20 mmol/L EDTA (Sigma-Aldrich) with the epidermal side up. After incubation, epidermal sheets were harvested, washed with PBS, and fixed in ice-cold acetone for 20 minutes, followed by 2 $\times$ 5-minute washes in PBS. To block unspecific binding sites, the epidermal sheets were placed in blocking solution containing 2% BSA and incubated for 1 hour at 37°C.

After incubation, the blocking solution was removed, and the epidermal sheets were incubated with anti-DNP mAbs diluted in fresh blocking solution for 2 hours at 37°C followed by 3 $\times$ 5-minute washes in PBS. Next, the epidermal sheets were incubated for 2 hours at 37°C in fresh blocking solution containing secondary antibody, followed by 3 $\times$ 5-minute washes in PBS. Finally, the epidermal sheets were incubated overnight at 4°C in fresh blocking solution containing directly labeled anti-CD8b and anti-TCR $\gamma\delta$, respectively.

The next day, the epidermal sheets were washed 3 times for 5 minutes in PBS before counterstaining with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 1 μ g/mL; Sigma-Aldrich) diluted in Fluoromount medium (DAKO, Les Ulis, France). Epidermal sheets were stored at 4°C in the dark before images were acquired.

Acquisition of light sheet pictures

Image acquisition of epidermal sheets stained with fluorescently labeled antibodies was performed on a LightSheet Z.1 microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) with 20 $\times$ /1.0NA water-immersion detection optics and 2-sided 10 $\times$ /0.2 illumination optics equipped with 2 PCO EDGE 4.2 cameras with scientific complementary metal-oxide-semiconductor sensor (square pixels of 6.5 $\times$ 6.5- μ m side length, 1920 $\times$ 1920-pixel resolution, 4-channel images, 16-bit dynamic range; PCO AG, Kelheim, Germany). For all 3-dimensional data sets, a z -interval of 0.5 μ m with a zoom of 0.80 was applied. Volumetric images have a size of 553.2 $\times$ 553.2 $\times$ 1000 μ m (1920 $\times$ 1920 $\times$ 500 pixels). Directly before acquisition, the epidermal sheets were immersed in 1% low-melting-point agarose 1% (Sigma-Aldrich) prewarmed at 37°C and immediately loaded into a 1-mL syringe. After solidification of the agarose, the syringe was introduced into the acquisition chamber containing 1 $\times$ PBS, and images were acquired. Image acquisition was performed in triplicates. All acquired light sheet fluorescence microscopy raw data images were processed with ZEN 2011 imaging software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Images were deconvoluted by using classic maximum likelihood estimation with 20 iterations and theoretical point-spread function on Huygens software (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, The Netherlands). Threshold segmentation was performed with Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland) for each fluorescence channel. The total volume of the imaged tissue was calculated based on the DAPI channel. In all images we determined the mean fluorescence intensity (MFI) and the volume of DNP patterns.

Preparation and immunofluorescence staining of frozen skin sections

Mouse ear biopsy specimens were embedded in OCT medium (Sakura, Leiden, The Netherlands) and snap-frozen in liquid nitrogen. Frozen

sections (5 μ m) were prepared, allowed to dry, and stored at -80°C until further use. Sections were fixed for 20 minutes with ice-cold acetone (Sigma-Aldrich), rehydrated with PBS, and permeabilized with Triton X-100 (0.1%; Sigma-Aldrich) before blockade with a solution of BSA (1%; Sigma-Aldrich) and normal goat serum (10%; Sigma-Aldrich). Subsequently, sections were incubated for 2 hours at room temperature in a wet chamber with a mixture of primary mAbs (see list above) diluted in blocking solution at a previously determined optimal concentration. After thoroughly washing with PBS, fluorescently labeled secondary antibodies diluted in blocking solution at a previously determined optimal concentration were added to the sections and incubated for 1.5 hours at room in a wet chamber. Sections were washed thoroughly with PBS, and Fluoromount medium (DAKO) containing DAPI (1 μ g/mL; Sigma-Aldrich) was added before placing coverslips. Image acquisition of the frozen sections stained with fluorescently labeled antibodies was performed with a Confocal spectral Zeiss LSM710 microscope.

Acquisition and processing of immunofluorescence pictures

Image acquisition of whole frozen sections was performed on an LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss Microscopy) equipped with an inverted stand with 20 $\times$ /NA = 0.5 air objective and numeric zoom of 0.6. Acquired images have a size of 708.3 $\times$ 708.3 μ m. All acquired raw data images were processed with ZEN 2011 imaging software (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Image analysis

Acquired images were analyzed by using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Ms). Briefly, epidermal and dermal surfaces (in square micrometers) were measured by using the ROI manager based on nuclear staining with DAPI. Thresholds were applied on split channels of used fluorophores with respective staining (DAPI, AF488, PE, AF647, and AF700) and converted into binary pictures. Numbers of DAPI $^{+}$ and AF700 $^{+}$, PE $^{+}$ or AF647 $^{+}$ cells were determined by using the automated "Analyze particle" method for events larger than 10 μm^2 .

Statistics

Statistics were calculated with GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, Calif) by using the 2-tailed Mann-Whitney U test, or multiple groups were compared by using 1-way ANOVA.

Study approval

Animal experimental procedures were conducted with the approval of and in accordance with the guidelines for animal experiments of a local ethics committee (CECCAPP, Lyon, France) and the French Ministry of Research (APAFIS#8832-201607011455243 v5).

REFERENCES

1. Martin S, von Bonin A, Fessler C, Pflugfelder U, Weltzien HU. Structural complexity of antigenic determinants for class I MHC-restricted, hapten-specific T cells. Two qualitatively differing types of H-2Kb-restricted TNP epitopes. *J Immunol* 1993;151:678-87.
2. Buch T, Heppner FL, Tertilt C, Heinen TJ, Kremer M, Wunderlich FT, et al. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2005;2:419-26.
3. Wolfer A, Bakker T, Wilson A, Nicolas M, Ioannidis V, Littman DR, et al. Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol* 2001;2:235-41.
4. Vanbervliet B, Akdis M, Vocanson M, Rozieres A, Benetiere J, Rouzaire P, et al. Histamine receptor H1 signaling on dendritic cells plays a key role in the IFN- γ /IL-17 balance in T cell-mediated skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:943-53, e1-10.

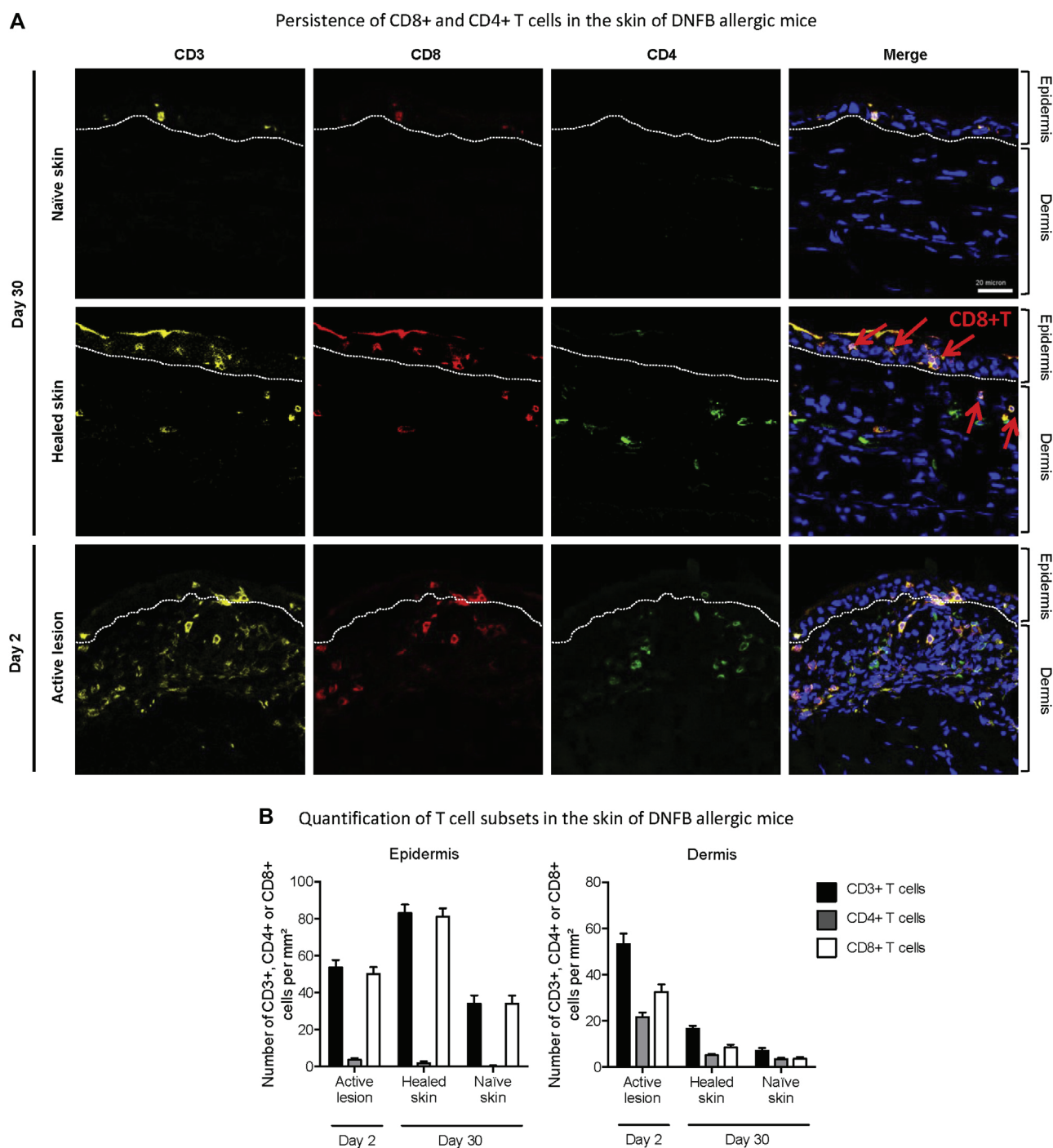


FIG E1. Location and quantification of CD8⁺ and CD4⁺ T cells in healed skin of CHS to DNFB. **A**, Frozen sections obtained from healed and naive skin of mice with DNFB allergy at day 30 after induction of skin inflammation were stained with fluorescent anti-CD3 (yellow), anti-CD8 (red), and anti-CD4 (green) mAbs before analysis with confocal microscopy. The epidermal-dermal junction is indicated by the white dotted line. Red arrows indicate the location of CD8⁺ T cells in merged pictures. As a control, skin from active CHS lesions at day 2 (ie, 2 days after induction of the skin inflammation) was analyzed. **B**, Histograms depict mean $\pm$ SEM cell numbers of CD3⁺ (black), CD4⁺ (grey), and CD8⁺ (white) T cells present in the epidermis (left) and dermis (right) of skin sections. Results are representative of 2 independent experiments. Three slides of each animal were analyzed, and 3 animals per group and time point were used.

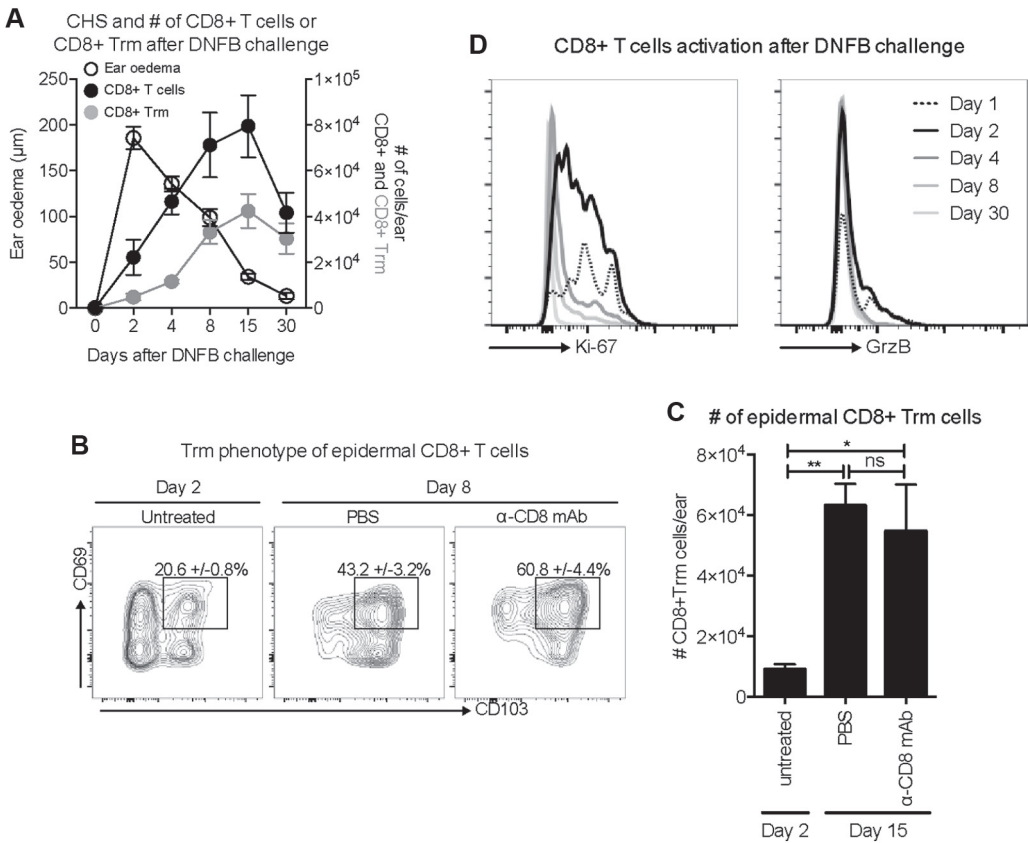


FIG E2. Epidermal CD8⁺ Trm cells accumulate from CD8⁺ early effector T cells during resolution of skin inflammation. **A**, Afflux of epidermal CD8⁺ Trm cells during the course of CHS to DNFB. The number of epidermal CD8⁺ T cells or CD8⁺CD69⁺CD103⁺ Trm cells (mean ± SEM cell numbers/ear) determined by using FACS during the course of a CHS response to DNFB (mean ± SEM ear edema [in micrometers]). **B** and **C**, CD8⁺ T cells infiltrating the skin during CHS-induced inflammation are the source of Trm cells. DNFB-sensitized animals were depleted of circulating CD8⁺ T cells at day 2 after DNFB challenge. Mean ± SEM percentages (Fig E2, **B**) and mean ± SEM numbers (Fig E2, **C**) of epidermal CD8⁺ Trm cells were analyzed by using FACS at day 8 and day 15 after challenge. As a control, cells from undepleted mice were also analyzed. **D**, Epidermal CD8⁺ T cells proliferate and express cytotoxic markers. Expression of Ki-67 and granzyme B (*GrzB*) on epidermal viable CD8⁺ T cells was determined by using FACS throughout the course of CHS inflammation to DNFB (days 1-30). All results are representative of 2 or 3 independent experiments with 4 to 5 mice per group. *ns*, Not significant. **P* < .05 and ***P* < .01, 1-way ANOVA.

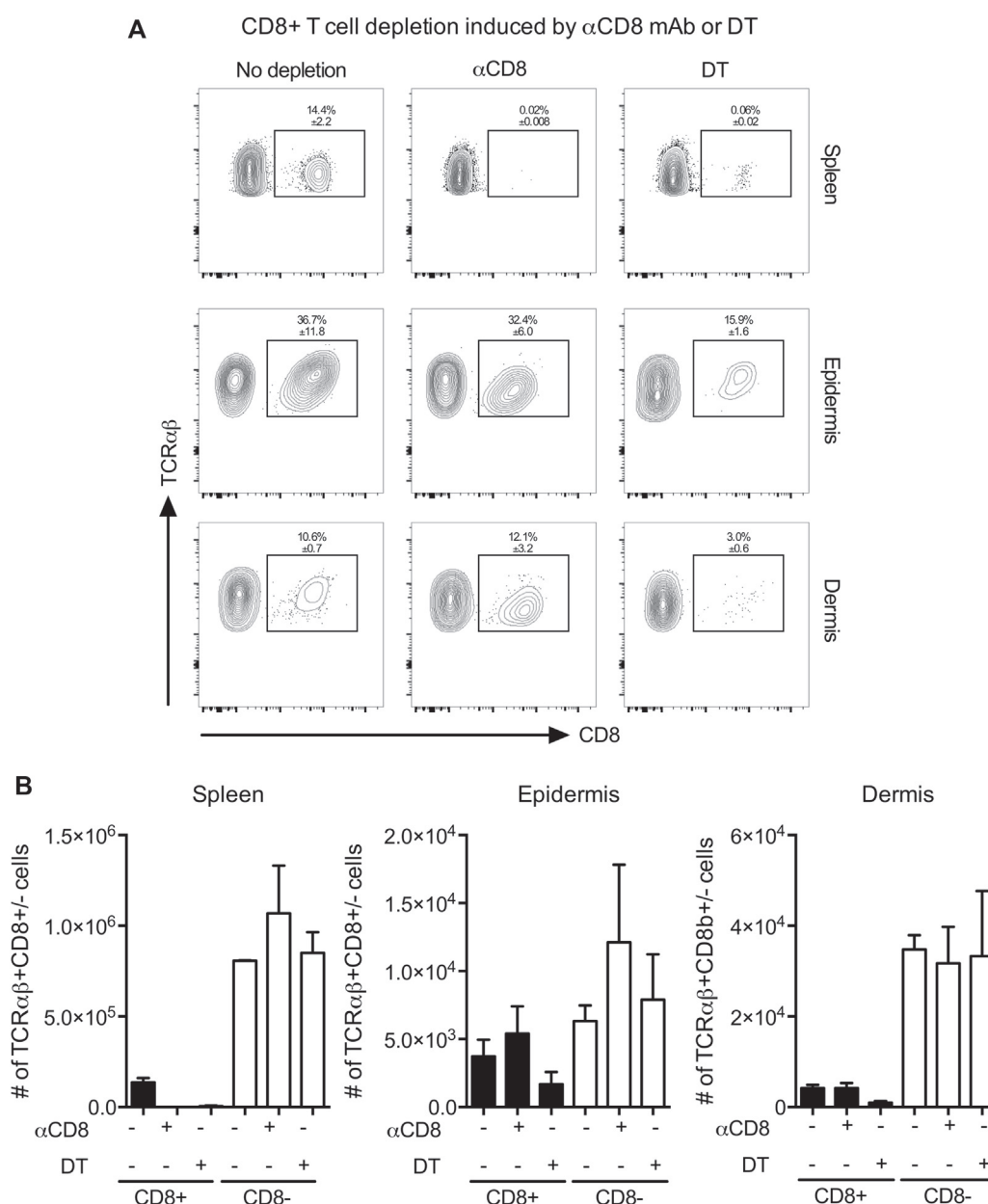


FIG E3. Depletion of skin CD8⁺ Trm cells prevents DNFB-induced eczema flares. Lymphopenic CD3e^{-/-} mice were reconstituted with iDTR-CD8⁺ and wild-type CD4⁺ T cells isolated by means of FACS sorting from iDTR/CD4cre and C57BL/6 mice, respectively, before sensitization (day -5) and challenge (day 0) with DNFB. At day 30, reconstituted mice with DNFB allergy were intraperitoneally injected with DT or anti-CD8 mAb, and healed skin lesions were analyzed by means of FACS for the presence of CD8⁺ and non-CD8⁺ T cells in the epidermis and dermis. As a control, circulating cells from the spleens of the same mice were analyzed. Figures on representative FACS dot plots (**A**) and histograms (**B**) depict mean $\pm$ SEM values (percentages [Fig E3, A] or numbers [Fig E3, B] among TCRαβ⁺ cells per tissue) of CD8⁺ and CD8⁻ T cells. All results are representative of 2 independent experiments with 4 to 5 mice per group.

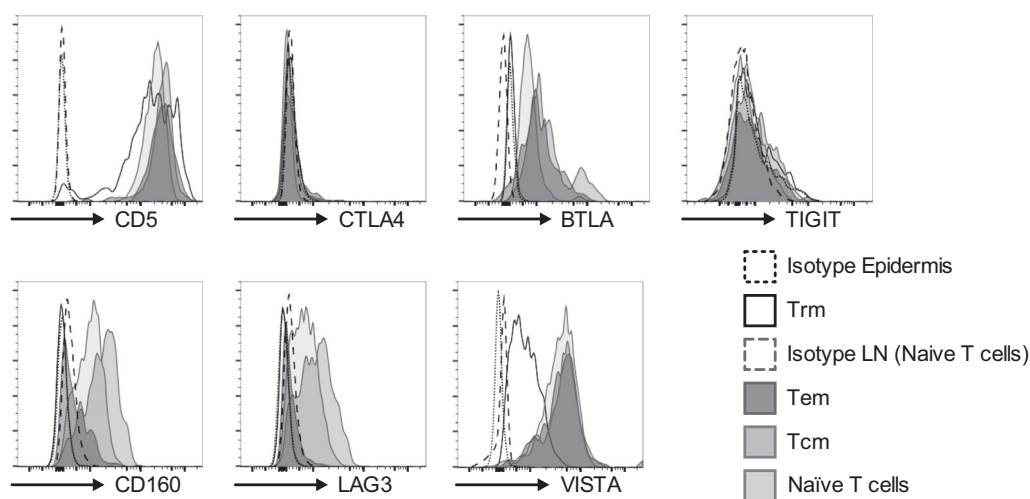


FIG E4. ICR phenotype of epidermal and dLN CD8⁺ memory T-cell subsets. Expression of LAG-3, CD5, TIGIT, CTLA-4, VISTA, CD160, and BTLA by CD8⁺ Trm cells (*solid black line*) isolated from the epidermis of mice with DNFB allergy at day 30 was determined by means of FACS. As a control, CD8⁺ Tem (*dark gray histograms*), central memory T (*Tcm*; *medium gray histograms*), or naïve (*light gray histograms*) cells collected from respective dLNs were analyzed. Representative histograms are shown, with isotype controls (*dotted black and gray lines*, respectively, for epidermis and dLNs) for each ICR. Results are representative of 3 independent experiments with 4 to 5 mice per group.

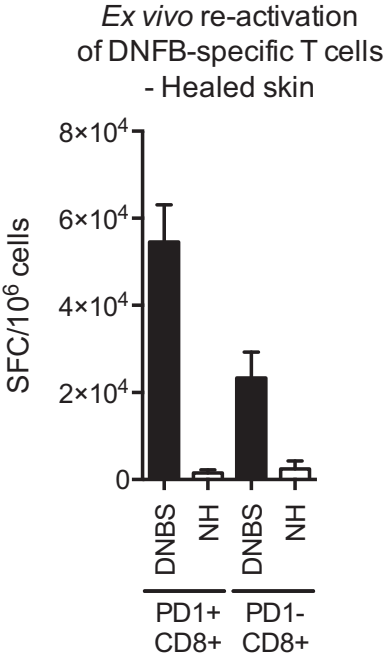


FIG E5. DNFB-specific T-cell response in PD-1⁺ and PD-1⁻ CD8⁺ Trm cell subsets. PD-1⁺ and PD-1⁻ CD8⁺ Trm cells present in the epidermis in animals with DNFB allergy were FACS sorted at day 30 and reactivated overnight by means of coculture with haptenized (DNBS; 0.4 mmol/L) or nonhaptenized (*NH*) BMDCs. The following day, the number of specific T cells producing IFN- γ was determined by using the ELISpot assay. Results are expressed as mean $\pm$ SEM numbers of spot-forming cells/10⁶ CD8⁺ T cells. Results are representative of 3 independent experiments with 10 pooled mice per group.

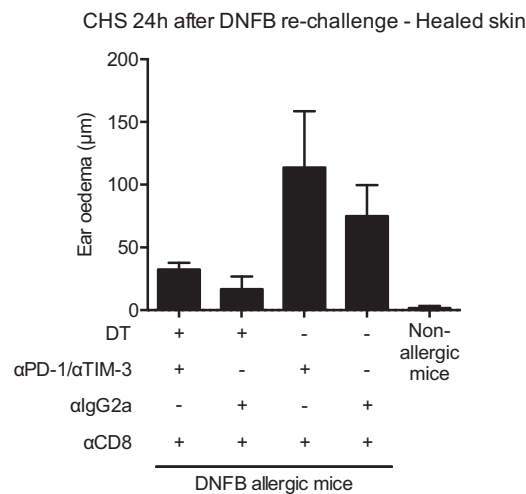


FIG E6. CHS response to low DNFB doses during ICR blockade in the absence of CD8⁺ skin Trm cells. CHS to DNFB was induced at day 0 in CD3ε^{-/-} mice reconstituted with iDTR-CD8⁺ and wild-type CD4⁺ T cells. At day 30, ICR blockade was initiated, as in Fig 4, by using anti-PD-1/anti-TIM-3 mAb intraperitoneal injection, and 1 day after DT and/or anti-CD8 mAbs intraperitoneal injection, mice were rechallenged with DNFB. As a control, nonallergic mice were challenged with DNFB. The following day, CHS reactions were determined by measuring mean ± SEM ear thickness (in micrometers). Results are representative of 2 independent experiments with 4 to 5 mice per group.

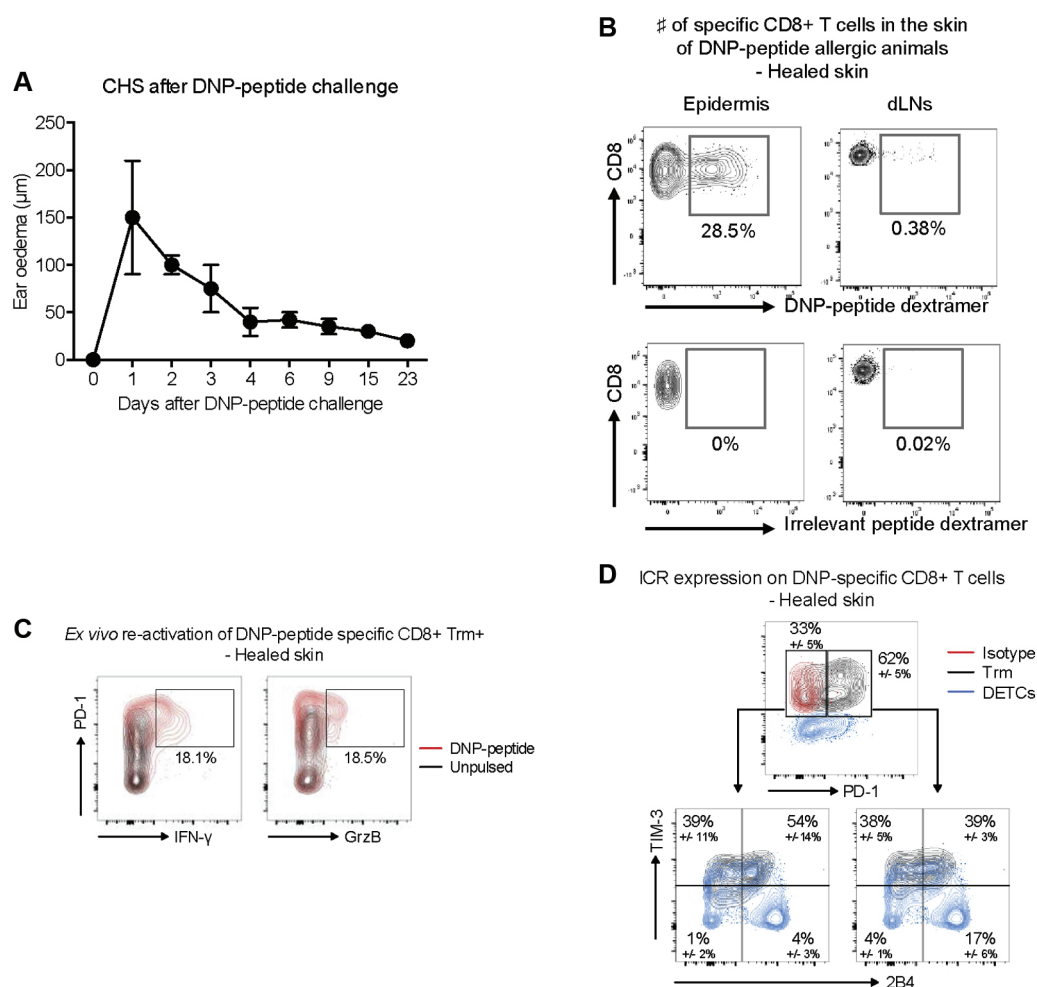


FIG E7. Persistence of allergen-specific Trm cells in a model of DNP peptide-induced CHS. **A**, CHS response to DNP peptide. Naive C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally with DNP peptide-pulsed BMDCs and challenged 5 days later with the DNP peptide in dimethyl sulfoxide. As a control, vehicle was applied on the contralateral ear. CHS reactions were determined by measuring mean $\pm$ SD ear thickness (in micrometers) at indicated time points after challenge. **B**, Detection of specific CD8⁺ Trm cells by using DNP peptide dextramers. The presence of CD8⁺ dextramer-positive Trm cells in the epidermis was examined by means of FACS at day 30. As a control, CD8⁺ T cells from dLNs were analyzed. **C**, Ex vivo reactivation of specific Trm cells. Epidermal cells isolated from healed lesions were reactivated overnight with pulsed (DNP peptide, 5 μ M/L) or unpulsed BMDCs. The following day, coexpression of PD-1 and IFN- γ or granzyme B (*GrzB*) on viable CD8⁺ Trm cells was analyzed by means of FACS. **D**, ICR expression by DNP-specific epidermal CD8⁺ Trm cells. TIM-3 and 2B4 expression (mean $\pm$ SD percentage) on gated epidermal PD-1⁺ and PD-1⁻ CD8⁺ dextramer-positive Trm cells. As controls, isotype staining for PD-1 and ICR expression on dendritic epidermal T cells (DETCs) is shown. All results are representative of 2 or 3 independent experiments with 4 to 5 mice per group.



A Perspective on the Interplay of Ultraviolet-Radiation, Skin Microbiome and Skin Resident Memory TCR $\alpha\beta$ + Cells

VijayKumar Patra^{1,2,3†}, Léo Laoubi^{1†}, Jean-François Nicolas^{1,4}, Marc Vocanson^{1*} and Peter Wolf^{3*}

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, Lyon, France, ² Center for Medical Research, Medical University of Graz, Graz, Austria, ³ Research Unit for Photodermatology, Department of Dermatology, Medical University of Graz, Graz, Austria, ⁴ Allergy and Clinical Immunology Department, Lyon Sud University Hospital, Pierre-Bénite, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Günther F.L. Hofbauer,
Universität Zürich, Switzerland

Reviewed by:

Oleg E. Akilov,
University of Pittsburgh, United States
Salvador Gonzalez,
University of Alcalá, Spain

*Correspondence:

Marc Vocanson
marc.vocanson@inserm.fr
Peter Wolf
peter.wolf@medunigraz.at

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Dermatology,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 28 February 2018

Accepted: 11 May 2018

Published: 30 May 2018

Citation:

Patra V, Laoubi L, Nicolas J-F,
Vocanson M and Wolf P (2018) A
Perspective on the Interplay of
Ultraviolet-Radiation, Skin Microbiome
and Skin Resident Memory TCR $\alpha\beta$ +
Cells. *Front. Med.* 5:166.
doi: 10.3389/fmed.2018.00166

The human skin is known to be inhabited by diverse microbes, including bacteria, fungi, viruses, archaea, and mites. This microbiome exerts a protective role against infections by promoting immune development and inhibiting pathogenic microbes to colonize skin. One of the factors having an intense effect on the skin and its resident microbes is ultraviolet-radiation (UV-R). UV-R can promote or inhibit the growth of microbes on the skin and modulate the immune system which can be either favorable or harmful. Among potential UV-R targets, skin resident memory T cells (T_{RM}) stand as well positioned immune cells at the forefront within the skin. Both $CD4^+$ or $CD8^+$ $\alpha\beta$ T_{RM} cells residing permanently in peripheral tissues have been shown to play prominent roles in providing accelerated and long-lived specific immunity, tissue homeostasis, wound repair. Nevertheless, their response upon UV-R exposure or signals from microbiome are poorly understood compared to resident TCR $\gamma\delta$ cells. Skin T_{RM} survive for long periods of time and are exposed to innumerable antigens during lifetime. The interplay of T_{RM} with skin residing microbes may be crucial in pathophysiology of various diseases including psoriasis, atopic dermatitis and polymorphic light eruption. In this article, we share our perspective about how UV-R may directly shape the persistence, phenotype, specificity, and function of skin T_{RM} ; and moreover, whether UV-R alters barrier function, leading to microbial-specific skin T_{RM} , disrupting the healthy balance between skin microbiome and skin immune cells, and resulting in chronic inflammation and diseased skin.

Keywords: skin microbiome, ultraviolet-radiation, skin resident memory T cells, inflammation, immune suppression, photomedicine, phototherapy

INTRODUCTION

Skin Microbiome

Human skin with its large surface (1) harbors a wide variety of microbes, which include bacteria, fungi (2), viruses (3, 4), archaea (5, 6) and skin mites (4, 7, 8). These microbes exist in either a mutualistic and/or competitive relationship with each other (microbe-microbe) (9) and the host (10–13). Commensals make up for most of the microbiome followed by opportunistic and/or

pathogenic microbes. The diverse physical nature of the skin with its variable water content, pH, lipids and sebum quantity among others crucially influence the diversity of the microbiome. However, it is intriguing that myriads of microbes reside on the skin surface (**Figure 1**) as well as in sub-epidermal compartments (14), despite the robust nature of the skin's immune system to rapidly detect and neutralize any foreign intruders (15). Many common cutaneous conditions such as atopic dermatitis (AD), psoriasis and rosacea are associated with dysbiosis of skin microbiome, most commonly driven by commensal species. A recent review highlights the latest findings regarding the microbial interactions with the immune system and microbial composition in health and diseases such as AD, acne, chronic wound infections, and primary immunodeficiencies (16).

Ultraviolet-Radiation (UV-R)

UV-R is one of the most prominent external factor affecting the skin (17) and the microbiome (8, 18, 19). UV-R mediated

immune suppression was first discovered by Kripke et al. (20). This was further confirmed and proved to be T-cell mediated by using contact hypersensitivity (CHS) models in mice (21) and in humans (22–24). The initial key events that are prominently involved in immune suppression after UV-irradiation are DNA damage (25), formation of reactive biophospholipids like platelet activating factor (26) and isomerization of inactive *trans*- to active *cis*-urocanic acid (UCA) (27). A study conducted by Kubica et al. (28) used caspase-14 deficient mice which are known to have reduced levels of UCA and observed significant alterations in the skin microbiome. It is intriguing that caspase-14 is involved in proteolysis of filaggrin which is the major source of UCA in the skin and mutations in filaggrin are linked to the development of AD which is in turn linked to an altered microbial landscape (29). Certain skin commensals such as *Micrococcus luteus* can degrade *cis*-UCA to its *trans* isoform (30) and thus potentially diminish immune suppression. An early report from our group suggests that *cis*-UCA can indeed

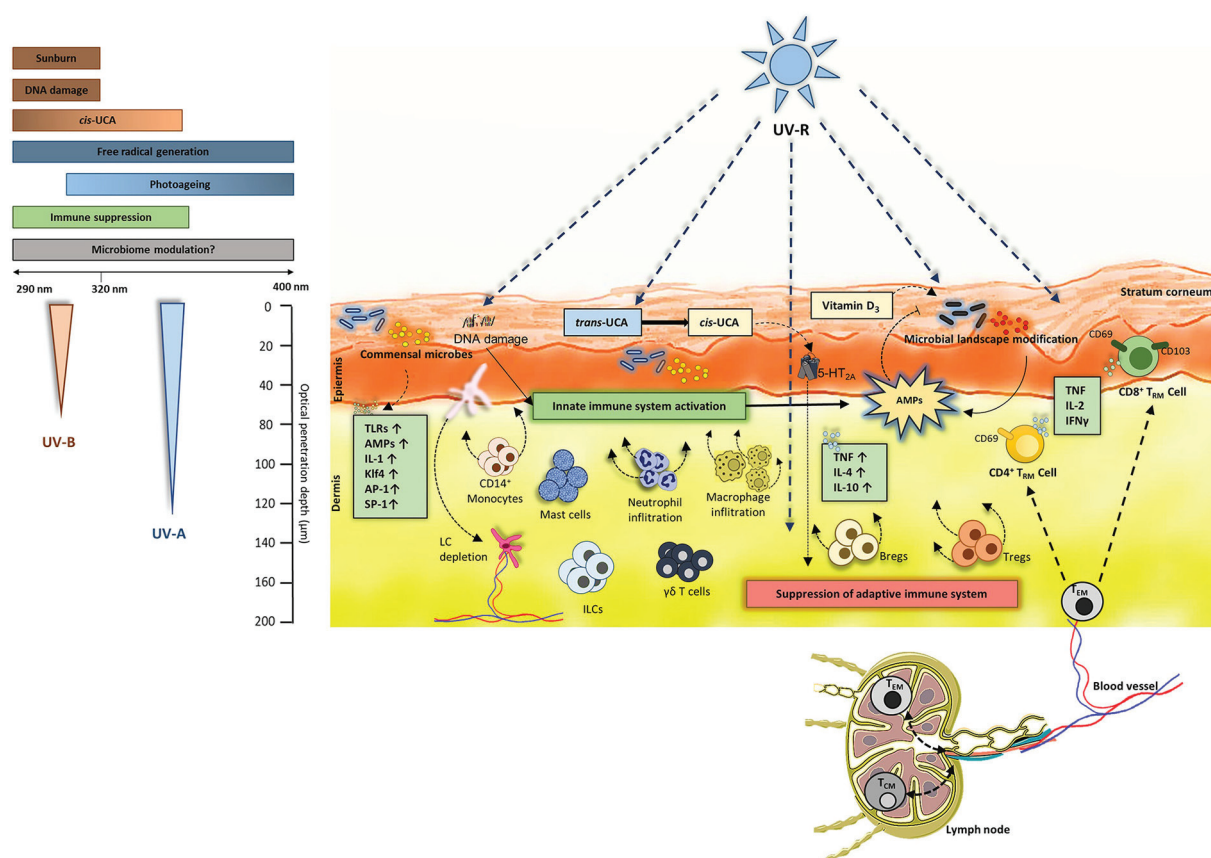


FIGURE 1 | UV-induced events in the skin: Both UV-B (290–320 nm) and UV-A (320–400 nm) penetrate the skin. UV-B causes sunburn and DNA damage and is also known to induce immune suppression. UV-B and UV-A (to some extent) converts *trans*-UCA to *cis*-UCA and generates free radicals. Commensal microbiome colonizes the skin and can induce production of various cytokines, antimicrobial peptides (AMPs) and activate toll-like receptors (TLRs). The effects of UV-B and UV-A on skin microbiome is not fully understood. Overall, UV-R is known to activate innate immunity by production of AMPs and by stimulating innate cells like macrophages, mast cells, innate lymphoid cells (ILCs) and skin resident $\gamma\delta$ T cells. On the other hand, UV-R induces an immune suppressive environment in the skin by inducing production of TNF, IL-4, IL-10. As overall result, regulatory T cells (Tregs) and B cells (Bregs) are induced leading to functional immune suppression and subsequent inhibition of effector T cells present in the skin. Regarding $\text{TCR}\alpha\beta^+$ lymphocytes, effector memory T cells (T_{EM}) can circulate between the blood, lymph and skin where they receive environmental signals. Also, the dermis is populated by CD4^+ T_{RM} (CD69^+ CD103^+) whereas the epidermis is composed of CD8^+ T_{RM} (CD69^+ CD103^+). These T_{RM} populations can produce TNF- α , IL-2 and IFN- γ depending on the microenvironment. Nevertheless, the UV effect on these T_{RM} remains to be uncovered.

directly modulate skin microbiome (31). Since UV-R suppresses the immune reaction to antigens of infectious microbes such as *M. lepraemurium*, *bovis BCG*, *C. albicans*, *B. burgdorferi*, and *Schistosoma mansoni* (32–34) it can be speculated that exposure to UV-R could enhance susceptibility to infections, however clinical evidence of increased infections after UV-R is very low. This could be due to the fact that UV-R suppresses adaptive immunity but activates innate immunity (35). One of the important innate key players are antimicrobial peptides (AMPs). These are small proteins typically ranging from 10 to 50 amino acid residues that have potential to neutralize invading microorganisms (36) and mediate adaptive immune response (37–39). Dysregulation in AMP expression could be linked to many diseases, including photosensitive conditions like polymorphic light eruption (PLE) (40), where AMPs may be key mediators to maintain homeostasis between host immune system and microbiome. UV-R exposure also leads to infiltration of macrophages and neutrophils (41–43), induces emigration of Langerhans cells (LC) from the skin into the draining lymph nodes (44–46) and affects mast cells. Furthermore, regulatory T cells (Tregs) and B cells (Bregs) are recruited and activated (47, 48). All these cells and UV-induced events are known to be involved in immune suppression (49) (Figure 1). It has been known for a long time that UV-induced immune suppression is mediated by T cells (21, 50), however, the exact role of UV effects on the more recently described TRM and immune function are largely unexplored.

Skin-Resident Memory T Cells (TRM)

Among all the immune cells present in the skin, such as dendritic cells, macrophages, $\gamma\delta$ T cells and NK cells, TRM (51) are now considered as key players of immunity (52–54) (Figure 1). They have been described in various tissues such as skin, lung, gut, liver and brain (55–57). TRM, along with effector and central memory T cells (58), are either CD4⁺ or CD8⁺ T cells that are derived from naïve specific T cells which were activated upon a previous immune response. Thus, TRM share a common clonal origin with central memory T cells (59) but diverge in terms of dynamics, phenotype, and function. The major characteristics of TRM are their capacity to survive and stay poised in the skin for a long time (60) as well as play a key role for pathogen clearance and immune alert (53). In other words, TRM do not recirculate in the lymph or blood but rather patrol in the skin. CD8⁺ TRM are more localized in epidermis whereas CD4⁺ TRM populate preferentially the dermis (61). This non-recirculating pattern is conferred by the expression of CD69 which blocks sphingosine-1-phosphate receptor (S1P1), a receptor normally allowing lymph entrance. Moreover, a significant part of skin TRM express CD103, the α -chain of the integrin $\alpha E\beta 7$ which interacts with E-cadherin expressed by keratinocytes. Once arrived in the skin, killer-cell lectin like receptor G1 (KLRG1)-TRM precursors receive key signals for their establishment in the tissue. Among them, TGF- β is a critical signal integrated by TRM via TGF- β RII (52) and required for their residency. TGF- β can notably be produced by keratinocytes which thus play a role on TRM retention (62). TGF- β alone is not sufficient for skin TRM establishment, but rather acts in combination with other cytokines expressed in the

skin such as TNF- α and interleukin (IL)-33 (63). Moreover, hair follicles seem to play a role on the recruitment and establishment of skin TRM notably through the production of IL-15 and IL-7 (Figure 2) (64). Apart from cytokines, lipids available in the skin are key for TRM maintenance (65). Functionally, TRM allow a faster immune response upon pathogen entry through the production of alarmins such as IFN- γ and chemokines to recruit neutrophils, monocytes as well as circulating memory T cells on the site. TRM are also able to proliferate locally after a recall response to maintain themselves (66). Finally, TRM are able to be strongly cytotoxic (67).

UV-INDUCED IMPACT ON SKIN TRM

At least $1-2 \times 10^{10}$ resident T cells comprising TRM populate the human skin (68, 69), and it is highly logical that they experience similar impacts from UV-R as the other immune cells. These sentinel cells have numerous essential functions within the skin for cutaneous immunity and repair along with wound healing, antimicrobial responses and local tissue inspection (68, 70–72). The impact of UV-R on immune response mediated by T cells such as CD4⁺, CD8⁺, and Tregs has been previously described (73–75), however, the effects of UV-R on shaping the persistence, phenotype and specificity of skin TRM are poorly understood. It is therefore important to understand the interaction between the skin TRM and UV-R in mediating UV-induced immune suppression. It is thought that after an acute UV-exposure, the damaged keratinocytes release ATP (76) and ATP-mediated IL-1 (77) in an accelerated way; furthermore, this extracellular ATP is thought to be involved in adaptive immune responses (78, 79). Moreover, UV-R upregulates CD69 expression on TCR $\gamma\delta$ cells (77) and could exert a similar effect on skin TRM for which CD69 is crucial for their residency in the tissue. Besides, in the absence of $\gamma\delta$ T cells, there was reduced DNA repair of UV-induced lesions in mice, suggesting the role of these $\gamma\delta$ T cells in the repair (77). Such a role for TRM has been demonstrated in acute wounds (71) but needs to be addressed in the case of UV-induced damage. TRM may have long been unknown targets of UV-phototherapy in diseases which are now understood as TRM cell-mediated (80). Patients with cutaneous T cell lymphoma (mycosis fungoides) are known to have malignant T cells that lack L-selectin and CCR7 expression, a phenotype that is similar to TRM (81). The common treatment modality for these patients include phototherapy (82) and low-dose radiation. However, the effects of phototherapy on TRM is completely uncharacterized (83).

INFLUENCE OF SKIN MICROBIOME ON SKIN TRM

The skin is exposed to a large number of microbes throughout the lifetime, of which only a minor proportion is pathogenic. It has been suggested that the primary purpose of the immune cell memory is to maintain the immune homeostasis with the commensal microbes (84). Recent studies in various mouse models and in humans show that the composition of the

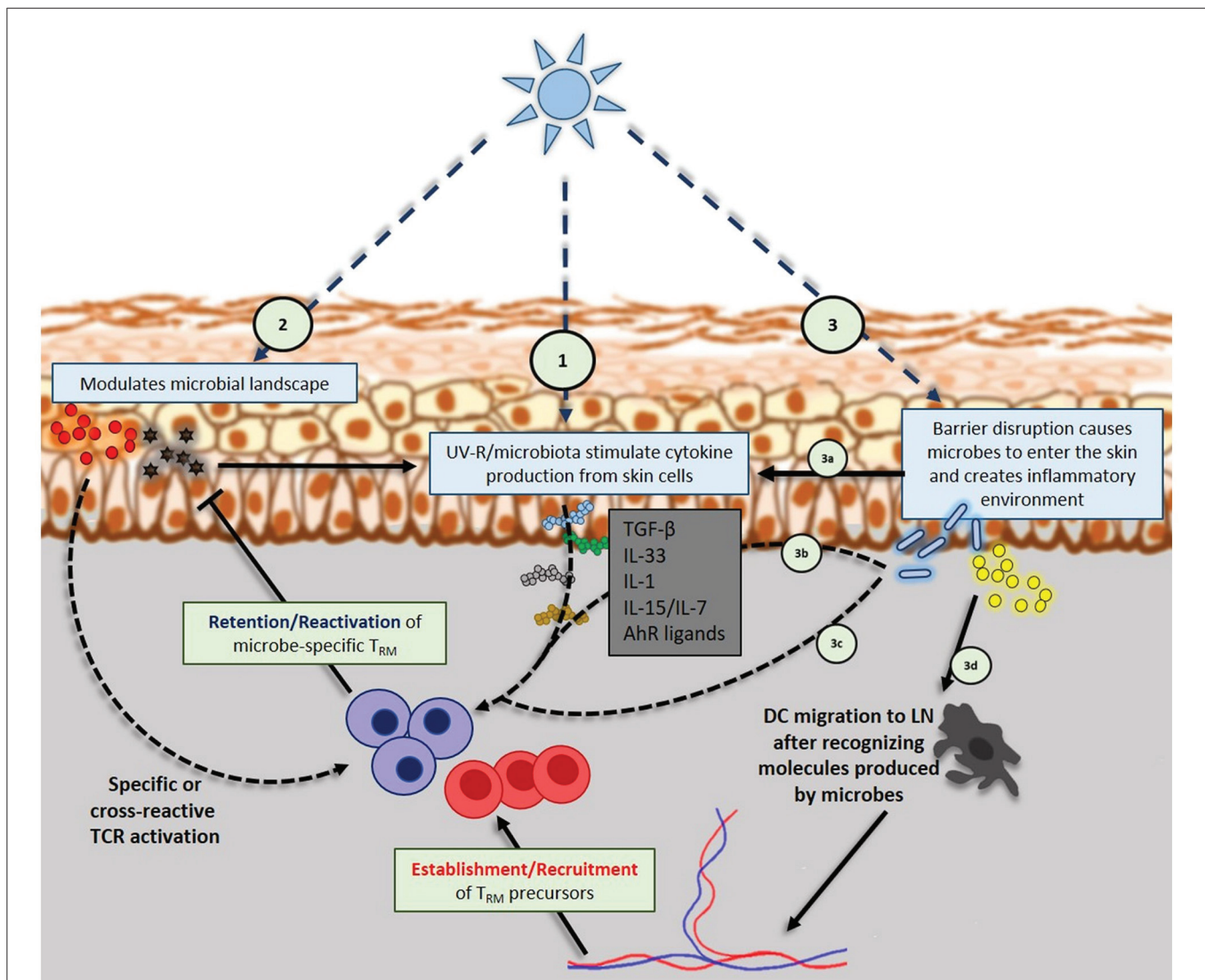


FIGURE 2 | Interplay of UV-R, skin microbiome and skin resident memory $\text{TCR}\alpha\beta^+$ cells: (1) UV-R induces keratinocytes and other skin cells to produce inflammatory or regulatory cytokines that will influence T_{RM} phenotype, retention and reactivation. (2) UV-R modulates microbial landscape, eventually releasing microbial antigens into the skin that will be up taken by dendritic cells (DC) that will specifically activate T_{RM} (regulatory or effector). Microbial antigens can also trigger the production of inflammatory cytokines by keratinocytes that further activate T_{RM} . (3) High doses of UV-R can cause barrier disruption that will allow skin resident microbes to enter the skin; danger signals from barrier disruption (3a) and microbes entered into the skin (3b) will trigger cytokines production by keratinocytes, DCs, ILCs, NK and $\text{TCR}\gamma\delta$ cells. Those cytokines will take part in shaping T_{RM} phenotype and activation. Entered microbes can also activate skin T_{RM} in a specific manner (3c) or be uptaken by DCs (3d) in order to activate naïve specific T cells in draining lymph nodes that will be recruited on the site.

skin microbiome is crucial in mediating appropriate immune responses toward a pathogen and in maintaining the normal immune status in the skin (10, 11, 15, 28, 85–87). Whether certain species of commensal microbiome influence the type of T_{RM} within the skin is not known, but a lot can be learnt from the gut. In one of the studies using mice, commensal specific memory T cells were found in the intestines (88) and similar T_{RM} cells could exist in the skin as well. Both memory CD4^+ and CD8^+ T cells can act against infections with influenza virus (55, 89), lymphocytic choriomeningitis virus (90, 91), herpes simplex virus (92), mycobacterium tuberculosis (93) and parasites (94).

Furthermore, microbial and/or antigen-specific memory CD4^+ and CD8^+ T_{RM} cells produce vast amount of effector cytokines in response to microbes and antigens (95–97) and CD4^+ and CD8^+ T_{RM} cells can populate and persist in multiple tissue sites long after the microbe or the antigen has been neutralized (98, 99). In the skin, CD8^+ T_{RM} can be generated following an infection (92, 100, 101) and CD4^+ IL-17-producing T_{RM} cells were identified in the skin of the mice when they were infected by *C. albicans* (part of skin mycobiome) (102). Besides, another study showed that laboratory SPF (specific-pathogen free) mice had lower non-circulating T cells in the skin and

other tissues compared to pet store mice (103). In terms of T-cell memory, SPF-raised mice have a similar adaptive immunity like newborn humans and pet store mice show the profile of memory T cells, similarly observed in adult humans (104). Several studies show a compartmentalization of microbe-specific memory T cells. When humans were injected intradermally with purified protein-derivative from *M. tuberculosis*, antigen-specific T cells were observed only in the skin but not in the blood (105). HSV2 specific CD8⁺ T cells were found in genital skin but not at other body sites (106). Variability within the skin microbiome (16) could be a reason for compartmentalization of TRM. Skin TRM persists for long periods of time and are exposed to the microbiome and microbial antigens from the skin during their lifetime. Microbial-specific responses could be a part of the healthy immune balance between the skin microbiome and host immune system and further provide reinforced local immunity. Very interestingly a recent study demonstrated that non-invasive *S. epidermidis* allows specific CD8⁺ TRM establishment through non-conventional MHC-Ib H2-M3 peptide presentation. Those H2-M3 restricted CD8⁺ TRM were shown to play an important role in tissue repair and wound healing (107).

PERSPECTIVE

Skin microbiome and TRM reside in the upper layers of the skin. Both UV-A and UV-B radiation can penetrate those upper layers (only UV-A particularly reaches the dermis) and imminently impact all the microbes and immune cells (Figure 1).

Does UV-R Directly Shape the Persistence, Phenotype, Specificity and Function of Skin TRM?

UV-R is known to induce production of various cytokines in the skin such as TNF- α (108) or IL-33 (109–111) which are known to be involved in maintaining the phenotype of TRM (52, 64, 112). Besides, a study published in 2016 (62) linked UV-B exposure and TRM retention. Authors demonstrated that UV-B exposure decreased $\alpha\beta 6$ and $\alpha\beta 8$ integrins expression by keratinocytes. Those integrins were required for active TGF- β production which then maintained CD103 expression on TRM allowing their retention in the skin long time after a lymphocytic choriomeningitis viral infection. Hence, the ability of UV-R (notably UV-B) to dose-dependently influence the retention and phenotype of skin TRM by modulating the cutaneous cytokine environment (Figure 2), certainly may at least contribute to the efficacy of suberythral phototherapy, which has been used for decades to improve pathologies such as psoriasis, atopic dermatitis and other inflammatory diseases (113–116). However, beyond cytokines, it is also possible that TRM persistence depends on TCR-specific signals. The discovery of commensal-specific TRM in the gastrointestinal tract of mice (88) implies that there may be a large number of commensal-specific TRM residing in the skin as well, in addition to $\gamma\delta$ T cells, innate lymphoid cells and pathogen-specific TRM. Moreover, the skin microbiome is constantly changing within

the individual throughout lifetime (117) and contributes to skin TRM diversity and function (107). Interestingly, UV-R is known to influence the skin microbiome landscape (8, 18, 19, 31). UV may in a dose dependent fashion affect skin microbiome and may shape the repertoire diversity of effector or regulatory TRM. Important remaining questions are the contribution of TRM to the local immune response against (i) non-specific, commensal microbes which could invade the skin upon a skin barrier damage and (ii) invading pathogenic microbes. The first question queries upon their role in chronic pathologies such as psoriasis, atopic dermatitis or PLE. The second question concerns the capacity of TRM to provide a heterologous protection against diverse infections (118) (Figure 2).

Does UV-R Alter Skin Barrier Function, Further Activating Microbe-Specific Skin TRM and Causing Chronic Inflammation?

Commensal microbes are known to improve innate and adaptive responses by producing small molecules which act as mediators between the host and microbes (119). Recently it has been reported that commensal skin microbiome can modulate gene expression of various cytokines, TLRs and AMPs in total skin cells (120). In the skin *Staphylococcus aureus* is known to promote skin inflammation by producing phenol-soluble modulins (PSMs) (121) which can stimulate IL-1-type (IL-36 α and IL-1 α) cytokine production (122) and IL-17 from dermal $\gamma\delta$ T cells (123). Moreover, *S. aureus* secretes proteases which are involved in skin barrier damage, promoting bacterial penetration into the skin which could ultimately generate *S. aureus*-specific TRM cells. A robust accumulation of commensal-specific T cells under defined conditions may lead to worsening pathogenic conditions such as psoriasis (124, 125). Psoriasis and AD are intriguing examples of possible TRM interplay with commensal microbes. An inflammatory environment exists in these chronic diseases which may lead to severe barrier disruptions through the patient's life. This could eventually lead commensal microbes to penetrate the skin, produce microbial-antigens, and finally lead to specific TRM recruitment and establishment at the inflammatory site. In this context, both allergen-specific TRM and commensal microbe-specific TRM are in place. Whether commensal-specific TRM cells portray a regulatory role or participate in the inflammatory loop is not known. Commensal-specific TRM may also play a role in PLE, an inflammatory skin condition in which itchy skin lesions of diverse morphology occur when the skin is exposed to sunlight. In this disease microbes residing on upper layers may be driven to induce the production of AMPs and express commensal associate molecular patterns (126) which could play a role in pathophysiology of the disease. Furthermore, the capacity of UV-R to cause a barrier defect (127) may contribute to this phenomenon. Patients developing PLE may have skin inhabiting or newly generated commensal-specific TRM that get activated. An inflammatory microenvironment may lead to changes in microbial landscape, further increase specific TRM activation and booster the inflammatory loop.

CONCLUSION

The specificity of adaptive immune system is complexly linked to the establishment and the persistence of the T_{RM} which recognize previously encountered antigen via specific T cell receptors (TCRs). These specific T_{RM} are generated and kept as a pool of heterogenous population with respect to the numerous microbes and microbe-associated antigens that they encounter during the lifetime of individual. With recent discoveries about potential functions of skin microbiome to educate and modulate host-immune responses, it is important to identify how these microbes influence the skin T_{RM} . Specifically targeting those T_{RM} , directly or via microbiome may allow to develop novel treatment strategies, acting like or even better than phototherapy, but with an improved risk-safety profile.

REFERENCES

- Gallo RL. Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes. *J Invest Dermatol.* (2017) **137**:1213–1214. doi: 10.1016/j.jid.2016.11.045
- Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* (2013) **498**:367–70. doi: 10.1038/nature12171
- Meyers JM, Munger K. The viral etiology of skin cancer. *J Invest Dermatol.* (2014) **134**:E29–32. doi: 10.1038/skinbio.2014.6
- Hannigan GD, Meisel JS, Tyldsley AS, Zheng Q, Hodgkinson BP, Sanmiguel AJ, et al. The human skin double-stranded DNA virome: topographical and temporal diversity, genetic enrichment, and dynamic associations with the host microbiome. *MBio* (2015) **6**:e01578–01515. doi: 10.1128/mBio.01578-15
- Horz HP. (2015). Archaeal lineages within the human microbiome: absent, rare or elusive? *Life* **5**:1333–45. doi: 10.3390/life5021333
- Moissl-Eichinger C, Probst AJ, Birarda G, Auerbach A, Koskinen K, Wolf P, et al. Human age and skin physiology shape diversity and abundance of Archaea on skin. *Sci Rep.* (2017) **7**:4039. doi: 10.1038/s41598-017-04197-4
- Grice EA, Kong HH, Renaud G, Young AC, Program NCS, Bouffard GG, et al. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* (2008) **18**:1043–50. doi: 10.1101/gr.075549.107
- Patra V, Byrne SN, Wolf P. The skin microbiome: is it affected by UV-induced immune suppression? *Front Microbiol.* (2016) **7**:1235. doi: 10.3389/fmicb.2016.01235
- Martin R, Bermudez-Humaran LG, Langella P. Gnotobiotic rodents: an *In Vivo* model for the study of microbe-microbe interactions. *Front Microbiol.* (2016) **7**:409. doi: 10.3389/fmicb.2016.00409
- Naik S, Bouladoux N, Linehan JL, Han SJ, Harrison OJ, Wilhelm C, et al. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* (2015) **520**:104–8. doi: 10.1038/nature14052
- Nakamizo S, Egawa G, Honda T, Nakajima S, Belkaid Y, Kabashima K. Commensal bacteria and cutaneous immunity. *Semin Immunopathol.* (2015) **37**:73–80. doi: 10.1007/s00281-014-0452-6
- Grice EA, Dawson TL Jr. Host-microbe interactions: Malassezia and human skin. *Curr Opin Microbiol.* (2017) **40**:81–7. doi: 10.1016/j.mib.2017.10.024
- Kuhbacher A, Burger-Kentischer A, Rupp S. Interaction of Candida Species with the skin. *Microorganisms* (2017) **5**:32. doi: 10.3390/microorganisms5020032
- Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB, Nagarajan H, Zengler K, Gallo RL. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nat Commun.* (2013) **4**:1431. doi: 10.1038/ncomms2441
- Belkaid Y, Segre JA. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science* (2014) **346**:954–959. doi: 10.1126/science.1260144
- Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* (2018) **16**:143–55. doi: 10.1038/nrmicro.2017.157
- Lee CH, Wu SB, Hong CH, Yu HS, Wei YH. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: the implication in UV-based phototherapy. *Int J Mol Sci.* (2013) **14**:6414–35. doi: 10.3390/ijms14036414
- Patra V, Halwachs B, Madhusudan N, Wolf P. 523 Ultraviolet-radiation (UV-R) affects the skin microbial load and influences the expression of antimicrobial peptides (AMPs) in mice. *J Invest Dermatol.* (2016) **136**:S249. doi: 10.1016/j.jid.2016.06.546
- Assarsson M, Duvetorp A, Dienus O, Soderman J, Seifert O. Significant Changes in the Skin Microbiome in Patients with Chronic Plaque Psoriasis after Treatment with Narrowband Ultraviolet B. *Acta Derm Venereol.* (2017) **98**:428–36. doi: 10.2340/00015555-2859.
- Kripke ML, Lofgreen JS, Beard J, Jessup JM, Fisher MS. *In vivo* immune responses of mice during carcinogenesis by ultraviolet irradiation. *J Natl Cancer Inst.* (1977) **59**:1227–30. doi: 10.1093/jnci/59.4.1227
- Elmets CA, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Wood PJ, Streilein JW. Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J Exp Med.* (1983) **158**:781–94. doi: 10.1084/jem.158.3.781
- Cooper KD, Oberhelman L, Hamilton TA, Baadsgaard O, Terhune M, Levee G, et al. UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR+ epidermal macrophage induction, and Langerhans cell depletion. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1992) **89**:497–501. doi: 10.1073/pnas.89.1.8497
- Kelly DA, Young AR, McGregor JM, Seed PT, Potten CS, Walker SL. Sensitivity to sunburn is associated with susceptibility to ultraviolet radiation-induced suppression of cutaneous cell-mediated immunity. *J Exp Med.* (2000) **191**:561–6. doi: 10.1084/jem.191.3.561
- Wolf P, Hoffmann C, Quehenberger F, Grinschgl S, Kerl H. Immune protection factors of chemical sunscreens measured in the local contact hypersensitivity model in humans. *J Invest Dermatol.* (2003) **121**:1080–7. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12361.x
- Applegate LA, Ley RD, Alcalay J, Kripke ML. Identification of the molecular target for the suppression of contact hypersensitivity by ultraviolet radiation. *J Exp Med.* (1989) **170**:1117–31. doi: 10.1084/jem.170.4.1117
- Wolf P, Nghiem DX, Walterscheid JP, Byrne S, Matsumura Y, Matsumura Y, et al. Platelet-activating factor is crucial in psoralen and ultraviolet A-induced immune suppression, inflammation, and apoptosis. *Am J Pathol.* (2006) **169**:795–805. doi: 10.2353/ajpath.2006.060079
- De Fabo EC, Noonan FP. Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation *in vivo*. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J Exp Med.* (1983) **158**:84–98. doi: 10.1084/jem.158.1.84

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VP and LL: conceived the ideas and drafted the manuscript; VP: drafted the figures; J-FN, MV, and PW: corrected and contributed to the draft. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

Ph.D. student VP received funding from the Austrian Science Fund FWF (W1241) and the Medical University of Graz through the Ph.D. Program Molecular Fundamentals of Inflammation (DK-MOLIN). VP was supported by René Touraine Foundation during a research stay in Lyon. LL Ph.D. fellowship is funded by DBV Technologies (Montrouge, France).

28. Kubica M, Hildebrand F, Brinkman BM, Goossens D, Del Favero J, Vercammen K, et al. The skin microbiome of caspase-14-deficient mice shows mild dysbiosis. *Exp Dermatol*. (2014) **23**:561–7. doi: 10.1111/exd.12458
29. Mcaleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol*. (2013) **131**:280–91. doi: 10.1016/j.jaci.2012.12.668
30. Hug DH, Dunkerson DD, Hunter JK. The degradation of L-histidine and trans- and cis-urocanic acid by bacteria from skin and the role of bacterial cis-urocanic acid isomerase. *J Photochem Photobiol B* (1999) **50**:66–73. doi: 10.1016/S1011-1344(99)00072-X
31. Patra V, Bashir M, Somlapura M, Kofeler HC, Peiber T, Wolf P. Isomerization of urocanic acid by ultraviolet radiation and its role in modulation of skin microbiome, antimicrobial peptides, and immune function. *J Invest Dermatol*. (2017) **137**:S261–S261. doi: 10.1016/j.jid.2017.07.595
32. Jeevan A, Evans R, Brown EL, Kripke ML. Effect of local ultraviolet irradiation on infections of mice with *Candida albicans*, *Mycobacterium bovis* BCG, and *Schistosoma mansoni*. *J Invest Dermatol*. (1992) **99**:59–64. doi: 10.1111/1523-1747.ep12611853
33. Cestari TF, Kripke ML, Baptista PL, Bakos L, Bucana CD. Ultraviolet radiation decreases the granulomatous response to lepromin in humans. *J Invest Dermatol*. (1995) **105**:8–13. doi: 10.1111/1523-1747.ep12312309
34. Brown EL, Ullrich SE, Pride M, Kripke ML. The effect of UV irradiation on infection of mice with *Borrelia burgdorferi* *Photochem Photobiol*. (2001) **73**:537–44. doi: 10.1562/0031-8655(2001)073<0537:TEOUIO>2.0.CO;2
35. Glaser R, Navid F, Schuller W, Jantschitsch C, Harder J, Schroder JM, et al. UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes *in vitro* and *in vivo*. *J Allergy Clin Immunol*. (2009) **123**:1117–23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.01.043
36. Brandwein M, Bentwich Z, Steinberg D. Endogenous antimicrobial peptide expression in response to bacterial epidermal colonization. *Front Immunol*. (2017) **8**:1637. doi: 10.3389/fimmu.2017.01637
37. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnikova E, Shakhov A, Chertov O, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* (2002). **298**:1025–29. doi: 10.1126/science.1075565
38. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol*. (2007) **127**:594–604. doi: 10.1038/sj.jid.5700599
39. Navid F, Boniotti M, Walker C, Ahrens K, Proksch E, Sparwasser T, et al. Induction of regulatory T cells by a murine beta-defensin. *J Immunol*. (2012) **188**:735–43. doi: 10.4049/jimmunol.1100452
40. Patra V, Mayer G, Gruber-Wackernagel A, Horn M, Lembo S, Wolf P. Unique profile of antimicrobial peptide expression in polymorphic light eruption lesions compared to healthy skin, atopic dermatitis, and psoriasis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. (2017) **34**:137–144. doi: 10.1111/phpp.12355
41. Cooper KD, Fox P, Neises G, Katz SI. Effects of ultraviolet radiation on human epidermal cell alloantigen presentation: initial depression of Langerhans cell-dependent function is followed by the appearance of T6-Dr+ cells that enhance epidermal alloantigen presentation. *J Immunol*. (1985) **134**:129–37.
42. Cooper KD, Neises GR, Katz SI. Antigen-presenting OKM5+ melanophages appear in human epidermis after ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol*. (1986) **86**:363–70. doi: 10.1111/1523-1747.ep12285600
43. Cooper KD, Duraiswamy N, Hammerberg C, Allen ED, Kimbrough-Green C, Dillon W, et al. Neutrophils, differentiated macrophages, and monocyte/macrophage antigen presenting cells infiltrate murine epidermis after UV injury. *J Invest Dermatol*. (1993) **101**:155–63. doi: 10.1111/1523-1747.ep12363639
44. Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol*. (1980) **124**:445–53.
45. Noonan FP, Bucana C, Sauder DN, De Fabo EC. Mechanism of systemic immune suppression by UV irradiation *in vivo*. II. The UV effects on number and morphology of epidermal Langerhans cells and the UV-induced suppression of contact hypersensitivity have different wavelength dependencies. *J Immunol*. (1984) **132**:2408–16.
46. Achachi A, Vocanson M, Bastien P, Peguet-Navarro J, Grande S, Goujon C, et al. UV radiation induces the epidermal recruitment of dendritic cells that compensate for the depletion of langerhans cells in human skin. *J Invest Dermatol*. (2015) **135**:2058–67. doi: 10.1038/jid.2015.118
47. Schwarz A, Noordegraaf M, Maeda A, Torii K, Clausen BE, Schwarz T. Langerhans cells are required for UVR-induced immunosuppression. *J Invest Dermatol*. (2010) **130**:1419–27. doi: 10.1038/jid.2009.429
48. Liu X, Huang H, Gao H, Wu X, Zhang W, Yu B, et al. Regulatory B cells induced by ultraviolet B through toll-like receptor 4 signalling contribute to the suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *Contact Dermatitis* (2018) **78**:117–30. doi: 10.1111/cod.12913
49. Hart PH, Grimbaldston MA, Finlay-Jones JJ. Sunlight, immunosuppression and skin cancer: role of histamine and mast cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. (2001) **28**:1–8. doi: 10.1046/j.1440-1681.2001.03392.x
50. Schwarz T. The dark and the sunny sides of UVR-induced immunosuppression: photoimmunology revisited. *J Invest Dermatol*. (2010) **130**:49–54. doi: 10.1038/jid.2009.217
51. Klonowski KD, Williams KJ, Marzo AL, Blair DA, Lingenheld EG, Lefrancois L. Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration *in vivo*. *Immunity* (2004) **20**:551–62.
52. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon ML, et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol*. (2013) **14**:1294–301. doi: 10.1038/ni.2744
53. Ariotti S, Hogenbirk MA, Dijkgraaf FE, Visser LL, Hoekstra ME, Song JY, et al. T cell memory. Skin-resident memory CD8+ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* (2014) **346**:101–5. doi: 10.1126/science.1254803
54. Schenkel JM, Fraser KA, Beura LK, Pauken KE, Vezys V, Masopust D. T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* (2014) **346**:98–101. doi: 10.1126/science.1254536
55. Teijaro JR, Turner D, Pham Q, Wherry EJ, Lefrancois L, Farber DL. Cutting edge: tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection. *J Immunol*. (2011) **187**:5510–4. doi: 10.4049/jimmunol.1102243
56. Wakim LM, Woodward-Davis A, Liu R, Hu Y, Villadangos J, Smyth G, et al. The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. *J Immunol*. (2012) **189**:3462–71. doi: 10.4049/jimmunol.1201305
57. Fernandez-Ruiz D, Ng WY, Holz LE, Ma JZ, Zaid A, Wong YC, et al. Liver-resident memory CD8+ T cells form a front-line defense against malaria liver-stage infection. *Immunity* (2016) **45**:889–902. doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.011
58. Gehad A, Teague JE, Matos TR, Huang V, Yang C, Watanabe R, et al. A primary role for human central memory cells in tissue immunosurveillance. *Blood Adv*. (2018) **2**:292–8. doi: 10.1182/bloodadvances.2017011346
59. Gaide O, Emerson RO, Jiang X, Gulati N, Nizza S, Desmarais C, et al. Common clonal origin of central and resident memory T cells following skin immunization. *Nat Med*. (2015) **21**:647–53. doi: 10.1038/nm.3860
60. Jiang X, Clark RA, Liu L, Wagers AJ, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* (2012) **483**:227–31. doi: 10.1038/nature10851
61. Gebhardt T, Whitney PG, Zaid A, Mackay LK, Brooks AG, Heath WR, et al. Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. *Nature* (2011) **477**:216–219. doi: 10.1038/nature10339
62. Mohammed J, Beura LK, Bobr A, Astry B, Chicoine B, Kashem SW, et al. Stromal cells control the epithelial residence of DCs and memory T cells by regulated activation of TGF-beta. *Nat Immunol*. (2016) **17**:414–21. doi: 10.1038/ni.3396
63. Skon CN, Lee JY, Anderson KG, Masopust D, Hogquist KA, Jameson SC. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol*. (2013) **14**:1285–93. doi: 10.1038/ni.2745
64. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, et al. Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident

- memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nat Med.* (2015) **21**:1272–9. doi: 10.1038/nm.3962
65. Pan Y, Tian T, Park CO, Lofft SY, Mei S, Liu X, et al. Survival of tissue-resident memory T cells requires exogenous lipid uptake and metabolism. *Nature* (2017) **543**:252–6. doi: 10.1038/nature21379
 66. Park SL, Zaid A, Hor JL, Christo SN, Prier JE, Davies B, et al. Local proliferation maintains a stable pool of tissue-resident memory T cells after antiviral recall responses. *Nat Immunol.* (2018) **19**:183–91. doi: 10.1038/s41590-017-0027-5
 67. Cheuk S, Schlums H, Gallais Serezal I, Martini E, Chiang SC, Marquardt N, et al. CD49a expression defines tissue-resident CD8⁺ T cells poised for cytotoxic function in human skin. *Immunity* (2017) **46**:287–300. doi: 10.1016/j.immuni.2017.01.009
 68. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, et al. The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *J Immunol.* (2006) **176**:4431–9. doi: 10.4049/jimmunol.176.7.4431
 69. Schaerli P, Ebert LM, Moser B. Comment on The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *J Immunol.* (2006) **177**:1375–6; author reply 1376–7. doi: 10.4049/jimmunol.177.3.1375
 70. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* (2001) **294**:605–9. doi: 10.1126/science.1063916
 71. Toulon A, Breton L, Taylor KR, Tenenhaus M, Bhavsar D, Lanigan C, et al. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med.* (2009) **206**:743–50. doi: 10.1084/jem.20081787
 72. Macleod AS, Hemmers S, Garijo O, Chabod M, Mowen K, Witherden DA, et al. Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function. *J Clin Invest.* (2013) **123**:4364–74. doi: 10.1172/JCI70064
 73. Li-Weber M, Treiber MK, Giaisi M, Palfi K, Stephan N, Parg S, et al. Ultraviolet irradiation suppresses T cell activation via blocking TCR-mediated E. R. K., and NF- κ B signaling pathways. *J Immunol.* (2005) **175**:2132–43. doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2132
 74. Rana S, Byrne SN, Macdonald LJ, Chan CY.-Y., Halliday GM. Ultraviolet B suppresses immunity by inhibiting effector and memory T cells. *Am J Pathol.* (2008) **172**:993–1004. doi: 10.2353/ajpath.2008.070517
 75. Schwarz T. 25 years of UV-induced immunosuppression mediated by T cells-from disregarded T suppressor cells to highly respected regulatory T cells. *Photochem Photobiol* (2008) **84**:10–8. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00223.x
 76. Takai E, Tsukimoto M, Harada H, Kojima S. Involvement of P2Y6 receptor in p38 MAPK-mediated COX-2 expression in response to UVB irradiation of human keratinocytes. *Radiat Res.* (2011) **175**:358–66. doi: 10.1667/RR2375.1
 77. Macleod AS, Rudolph R, Corriden R, Ye I, Garijo O, Havran WL. Skin-resident T cells sense ultraviolet radiation-induced injury and contribute to DNA repair. *J Immunol.* (2014) **192**:5695–702. doi: 10.4049/jimmunol.1303297
 78. Corriden R, Insel PA. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal.* (2010) **3**:re1. doi: 10.1126/scisignal.3104re1
 79. 78. Skin Cancer Foundation. *Actinic keratosis (AK)*. New York, NY: Skin Cancer Foundation. (2014) Available online at: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/actinic-keratosis> (Accessed Jan 23, 2018).
 80. Park CO, Kupper TS. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat Med.* (2015) **21**:688–97. doi: 10.1038/nm.3883
 81. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood* (2010) **116**:767–71. doi: 10.1182/blood-2009-11-251926
 82. Vieyra-Garcia PA, Wei T, Naym DG, Fredholm S, Fink-Puches R, Cerroni L, et al. STAT3/5-dependent IL9 overexpression contributes to neoplastic cell survival in mycosis fungoides. *Clin Cancer Res.* (2016) **22**:3328–39. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1784
 83. Clark RA. Resident memory T cells in human health and disease. *Sci Transl Med.* (2015) **7**:269rv261. doi: 10.1126/scitranslmed.3010641
 84. Mcfall-Ngai M. Adaptive immunity: care for the community. *Nature* (2007) **445**:153. doi: 10.1038/445153a
 85. Nakatsuji T, Gallo RL. Dermatological therapy by topical application of non-pathogenic bacteria. *J Invest Dermatol.* (2014) **134**:11–4. doi: 10.1038/jid.2013.379
 86. Nakatsuji T, Chen TH, Narala S, Chun KA, Two AM, Yun T, et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci Transl Med.* (2017) **9**:eah4680. doi: 10.1126/scitranslmed.eah4680
 87. Schroder T, Ibrahim S. The microbiome and autoimmunity. *Internist* (2017) **58**:449–55. doi: 10.1007/s00108-017-0221-4
 88. Hand TW, Dos Santos LM, Bouladoux N, Molloy MJ, Pagan AJ, Pepper M, et al. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. *Science* (2012) **337**:1553–6. doi: 10.1126/science.1220961
 89. Teijaro JR, Njau MN, Verhoeven D, Chandran S, Nadler SG, Hasday J, et al. Costimulation modulation uncouples protection from immunopathology in memory T cell responses to influenza virus. *J Immunol.* (2009) **182**:6834–43. doi: 10.4049/jimmunol.0803860
 90. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol.* (2004) **78**:5535–45. doi: 10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004
 91. Remakus S, Sigal LJ. Memory CD8⁺ T cell protection. *Adv Exp Med Biol.* (2013) **785**:77–86. doi: 10.1007/978-1-4614-6217-0_9
 92. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol.* (2009) **10**:524–30. doi: 10.1038/ni.1718
 93. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol.* (2007) **8**:369–77. doi: 10.1038/ni1449
 94. Anthony RM, Urban JF, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher J.-L., et al. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med.* (2006) **12**:955–60. doi: 10.1038/nm1451
 95. Ellefsen K, Harari A, Champagne P, Bart PA, Sekaly RP, Pantaleo G. Distribution and functional analysis of memory antiviral CD8 T cell responses in HIV-1 and cytomegalovirus infections. *Eur J Immunol.* (2002) **32**:3756–64. doi: 10.1002/1521-4141(200212)32:12<3756::AID-IMMU3756>3.0.CO;2-E
 96. Pedron B, Guerin V, Cordeiro DJ, Masmoudi S, Dalle JH, Sterkers G. Development of cytomegalovirus and adenovirus-specific memory CD4 T-cell functions from birth to adulthood. *Pediatr Res.* (2011) **69**:106–11. doi: 10.1203/PDR.0b013e318204e469
 97. Wang A, Chandran S, Shah SA, Chiu Y, Paria BC, Aghamolla T, et al. The stoichiometric production of IL-2 and IFN- γ mRNA defines memory T cells that can self-renew after adoptive transfer in humans. *Sci Transl Med.* (2012) **4**:149ra120. doi: 10.1126/scitranslmed.3004306
 98. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* (2001) **291**:2413–7. doi: 10.1126/science.1058867
 99. Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* (2001) **410**:101–5. doi: 10.1038/35065111
 100. Liu L, Zhong Q, Tian T, Dubin K, Athale SK, Kupper TS. Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. *Nat Med.* (2010) **16**:224–7. doi: 10.1038/nm.2078
 101. Clark RA, Watanabe R, Teague JE, Schlapbach C, Tawa MC, Adams N, et al. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med.* (2012) **4**:117ra117. doi: 10.1126/scitranslmed.3003008
 102. Park CO, Fu X, Jiang X, Pan Y, Teague JE, Collins N, et al. Staged development of long-lived T-cell receptor alphabeta TH17 resident memory T-cell population to *Candida albicans* after skin infection. *J Allergy Clin Immunol.* (2017) **S0091-6749**:31737–2. doi: 10.1016/j.jaci.2017.09.042
 103. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* (2016) **532**:512. doi: 10.1038/nature17655

104. Reese TA, Bi K, Kambal A, Filali-Mouhim A, Beura LK, Burger MC, et al. Sequential infection with common pathogens promotes human-like immune gene expression and altered vaccine response. *Cell Host Microbe* (2016) **19**:713–9. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.003
105. Gonzalez PA, Prado CE, Leiva ED, Carreno LJ, Bueno SM, Riedel CA, et al. Respiratory syncytial virus impairs T cell activation by preventing synapse assembly with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2008) **105**:14999–5004. doi: 10.1073/pnas.0802555105
106. Zhu J, Koelle DM, Cao J, Vazquez J, Huang ML, Hladik F, et al. Virus-specific CD8⁺ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. *J Exp Med*. (2007) **204**:595–603. doi: 10.1084/jem.20061792
107. Linehan JL, Harrison OJ, Han SJ, Byrd AL, Vujkovic-Cvijin I, Villarino AV, et al. Non-classical immunity controls microbiota impact on skin immunity and tissue repair. *Cell* (2018) **172**:784–96 e718. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.033
108. Wolf P, Maier H, Mullegger RR, Chadwick CA, Hofmann-Wellenhof R, Soyer HP, et al. Topical treatment with liposomes containing T4 endonuclease V protects human skin *in vivo* from ultraviolet-induced upregulation of interleukin-10 and tumor necrosis factor- α . *J Invest Dermatol*. (2000) **114**:149–56. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00839.x
109. Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor β /smad pathway in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol*. (2002) **119**:499–506. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01834.x
110. Byrne SN, Beaugie C, O'sullivan C, Leighton S, Halliday GM. The immune-modulating cytokine and endogenous Alarmin interleukin-33 is upregulated in skin exposed to inflammatory UVB radiation. *Am J Pathol*. (2011) **179**:211–22. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.010
111. Meehansan J, Komine M, Tsuda H, Tominaga S, Ohtsuki M. Ultraviolet B irradiation induces the expression of IL-33 mRNA and protein in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. (2012) **65**:72–4. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.10.004
112. Kim MT, Harty JT. Impact of inflammatory cytokines on effector and memory CD8⁺ T cells. *Front Immunol*. (2014) **5**:295. doi: 10.3389/fimmu.2014.00295
113. Vallat VP, Gilleaudeau P, Battat L, Wolfe J, Nabeya R, Heftler N, et al. PUVA bath therapy strongly suppresses immunological and epidermal activation in psoriasis: a possible cellular basis for remittive therapy. *J Exp Med*. (1994) **180**:283–96. doi: 10.1084/jem.180.1.283
114. Krueger JG, Wolfe JT, Nabeya RT, Vallat VP, Gilleaudeau P, Heftler NS, et al. Successful ultraviolet B treatment of psoriasis is accompanied by a reversal of keratinocyte pathology and by selective depletion of intraepidermal T cells. *J Exp Med*. (1995) **182**:2057–68. doi: 10.1084/jem.182.6.2057
115. Ozawa M, Ferenczi K, Kikuchi T, Cardinale I, Austin LM, Coven TR, et al. 312-nanometer ultraviolet B light (narrow-band UVB) induces apoptosis of T cells within psoriatic lesions. *J Exp Med*. (1999) **189**:711–8. doi: 10.1084/jem.189.4.711
116. Patrizi A, Raone B, Ravaioli GM. Management of atopic dermatitis: safety and efficacy of phototherapy. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. (2015) **8**:511–20. doi: 10.2147/CCID.S87987
117. Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. (2015) **26**:26050. doi: 10.3402/mehd.v26.26050
118. Su LF, Kidd BA, Han A, Kotzin JJ, Davis MM. Virus-specific CD4⁺ memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity* (2013) **38**:373–83. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.021
119. Donia MS, Fischbach MA. Human Microbiota. Small Molecules Human Microbiota *Science* (2015) **349**:1254766. doi: 10.1126/science.1254766
120. Meisel JS, Sfyroera G, Bartow-Mckenney C, Gimblet C, Bugayev J, Horwinski J, et al. Commensal microbiota modulate gene expression in the skin. *Microbiome* (2018) **6**:20. doi: 10.1186/s40168-018-0404-9
121. Nakagawa S, Matsumoto M, Katayama Y, Oguma R, Wakabayashi S, Nygaard T, et al. *Staphylococcus aureus* virulent psm α peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL-17-dependent skin inflammation. *Cell Host Microbe* (2017) **22**:667–77 e665. doi: 10.1016/j.chom.2017.10.008
122. Liu H, Archer NK, Dillen CA, Wang Y, Ashbaugh AG, Ortines RV, et al. *Staphylococcus aureus* epicutaneous exposure drives skin inflammation via IL-36-mediated T cell responses. *Cell Host Microbe* (2017) **22**:653–66 e655. doi: 10.1016/j.chom.2017.10.006
123. Williams MR, Nakatsuji T, Gallo RL. *Staphylococcus aureus*: master manipulator of the skin. *Cell Host Microbe* (2017) **22**:579–81. doi: 10.1016/j.chom.2017.10.015
124. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. (2006) **3**:390–407. doi: 10.1038/ncpgasthep0528
125. Belkaid Y, Bouladoux N, Hand TW. Effector and memory T cell responses to commensal bacteria. *Trends Immunol*. (2013) **34**:299–306. doi: 10.1016/j.it.2013.03.003
126. Patra V, Wolf P. Microbial elements as the initial triggers in the pathogenesis of polymorphic light eruption? *Exp Dermatol*. (2016) **25**:999–1001. doi: 10.1111/exd.13162
127. Biniek K, Levi K, Dauskardt RH. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2012) **109**:17111–6. doi: 10.1073/pnas.1206851109

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Patra, Laoubi, Nicolas, Vocanson and Wolf. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

6 Références

- Abdel-Gadir, A., Schneider, L., Casini, A., Charbonnier, L.M., Little, S. V., Harrington, T., Umetsu, D.T., Rachid, R., and Chatila, T.A. (2018). Oral immunotherapy with omalizumab reverses the Th2 cell-like programme of regulatory T cells and restores their function. *Clin. Exp. Allergy* 48, 825–836.
- Ahadome, S.D., Mathew, R., Reyes, N.J., Mettu, P.S., Cousins, S.W., Calder, V.L., and Saban, D.R. (2016). Classical dendritic cells mediate fibrosis directly via the retinoic acid pathway in severe eye allergy. *JCI Insight* 1.
- Akdis, C.A., and Blaser, K. (2001). Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 103, 131–136.
- Akdis, M., and Akdis, C.A. (2014). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 621–631.
- Albanesi, C., Madonna, S., Gisondi, P., and Girolomoni, G. (2018). The interplay between keratinocytes and immune cells in the pathogenesis of psoriasis. *Front. Immunol.* 9, 1.
- Alberca-Custodio, R.W., Faustino, L.D., Gomes, E., Nunes, F.P.B., de Siqueira, M.K., Labrada, A., Almeida, R.R., Câmara, N.O.S., da Fonseca, D.M., and Russo, M. (2020). Allergen-Specific Immunotherapy With Liposome Containing CpG-ODN in Murine Model of Asthma Relies on MyD88 Signaling in Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 11, 692.
- Albert, M.L., Jegathesan, M., and Darnell, R.B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 2, 1010–1017.
- Alcantara-Hernandez, M., Leylek, R., Wagar, L.E., Davis, M.M., Nolan, G.P., and Correspondence, J.I. (2017). High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity* 47.
- Alexandra-Chloé Villani, *, †, Rahul Satija, *, Gary Reynolds, S.S., Karthik Shekhar, James Fletcher, Morgane Griesbeck, Andrew Butler, S.Z., Suzan Lazo, Laura Jardine, David Dixon, Emily Stephenson, E.N., Ida Grundberg, David McDonald, Andrew Filby, Weibo Li, P.L.D.J., Orit Rozenblatt-Rosen, Andrew A. Lane, M.H., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* (80-.). 356, 283.
- Alignani, D., Maletto, B., Liscovsky, M., Rópolo, A., Morón, G., and Pistoresi-Palencia, M.C. (2005). Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *J. Leukoc. Biol.* 77, 898–905.
- Amu, S., Saunders, S.P., Kronenberg, M., Mangan, N.E., Atzberger, A., and Fallon, P.G. (2010). Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125.
- Anagnostou, K., Islam, S., King, Y., Foley, L., Pasea, L., Bond, S., Palmer, C., Deighton, J., Ewan, P., and Clark, A. (2014). Assessing the efficacy of oral immunotherapy for the desensitisation of peanut allergy in children (STOP II): A phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 383, 1297–1304.
- Anderson, D.A., Dutertre, C.-A., Ginhoux, F., and Murphy, K.M. (2020). Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 1–15.
- Angelini, F., Pacciani, V., Corrente, S., Silenzi, R., Di Pede, A., Polito, A., Riccardi, C., Di Cesare, S., Yammine, M.L., Rossi, P., et al. (2011). Dendritic cells modification during sublingual immunotherapy in children with allergic symptoms to house dust mites. *World J. Pediatr.* 7, 24–30.
- Annunziato, F., Romagnani, C., and Romagnani, S. (2015). The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 626–635.
- Asarjoo, A., Nilsson, C., Lidholm, J., Glaumann, S., Östblom, E., Hedlin, G., Van Hage, M., Lilja, G., and Wickman, M. (2012). Peanut component Ara h 8 sensitization and tolerance to peanut. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 468–472.
- Aslam, A., Chan, H., Warrell, D.A., Misbah, S., and Ogg, G.S. (2010). Tracking Antigen-Specific T-Cells during Clinical Tolerance Induction in Humans. *PLoS One* 5.
- Bailey, D.P. (2006). Interleukin-10 induces apoptosis in developing mast cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 80, 581–589.
- Baker, M.G., and Sampson, H.A. (2018). Phenotypes and endotypes of food allergy: A path to better understanding the pathogenesis and prognosis of food allergy. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 120, 245–253.
- Balbino, B., Sibilano, R., Starkl, P., Marichal, T., Gaudenzio, N., Karasuyama, H., Bruhns, P., Tsai, M., Reber, L.L., and Galli, S.J. (2017). Pathways of immediate hypothermia and leukocyte infiltration in an adjuvant-free mouse model of anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 584–596.e10.
- Ballester, M., Jeanbart, L., De Titta, A., Nembrini, C., Marsland, B.J., Hubbell, J.A., and Swartz, M.A. (2015). Nanoparticle conjugation enhances the immunomodulatory effects of intranasally delivered CpG in house dust mite-allergic mice. *Sci. Rep.* 5, 14274.
- Balossini, V., Monzani, A., Rapa, A., Vivenza, D., Caristo, E., and Oderda, G. (2009). Interleukin-10 and transforming growth factor-β1 in cord blood: Relationship with paternal allergy and cesarean section. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* 98, 812–816.
- Bandelier, C., Leimgruber, A., Wassenberg, J., Bart, P.A., and Spertini, F. (2008). Allergies alimentaires rares. *Rev. Med. Suisse* 4, 1024–1029.
- Bandyopadhyay, M., and Larregina, A.T. (2020). Keratinocyte-Polyamines and Dendritic Cells: A Bad Duet for Psoriasis. *Immunity* 53, 16–18.
- Bar-El Dadon, S., and Reifen, R. (2020). Epigenetics in Food Allergies. In *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, (Elsevier), pp. 403–409.
- Barclay, A.N. (2009). Signal regulatory protein alpha (SIRPα)/CD47 interaction and function. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 47–52.
- Bartnikas, L.M., Gurish, M.F., Burton, O.T., Leisten, S., Janssen, E., Oettgen, H.C., Beaupré, J., Lewis, C.N., Austen, K.F., Schulte, S., et al. (2013). Epicutaneous sensitization results in IgE-dependent intestinal mast cell expansion and food anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 451–460.e6.
- Bauer, R., Scheibelhofer, S., Kern, K., Gruber, C., Stepanoska, T., Thalhamer, T., Hauser-Kronberger, C., Alinger, B., Zoegg, T., Gabler, M., et al. (2006). Generation of hypoallergenic DNA vaccines by forced ubiquitination: Preventive and therapeutic effects in a mouse model of allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 269–276.

- Bauer, T., Zagórska, A., Jurkin, J., Yasmin, N., Köffel, R., Richter, S., Gesslbauer, B., Lemke, G., and Strobl, H. (2012). Identification of Axl as a downstream effector of TGF- β 1 during Langerhans cell differentiation and epidermal homeostasis. *J. Exp. Med.* 209, 2033–2047.
- Bedoret, D., Singh, A.K., Shaw, V., Hoyte, E.G., Hamilton, R., DeKruyff, R.H., Schneider, L.C., Nadeau, K.C., and Umetsu, D.T. (2012). Changes in antigen-specific T-cell number and function during oral desensitization in cow's milk allergy enabled with omalizumab. *Mucosal Immunol.* 5, 267–276.
- Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 488–495.
- Bégin, P., and Nadeau, K.C. (2015). Changes in peanut-specific T-cell clonotype with oral immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1636–1638.e3.
- Bégin, P., Chan, E.S., Kim, H., Wagner, M., Cellier, M.S., Favron-Godbout, C., Abrams, E.M., Ben-Shoshan, M., Cameron, S.B., Carr, S., et al. (2020). CSACI guidelines for the ethical, evidence-based and patient-oriented clinical practice of oral immunotherapy in IgE-mediated food allergy. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 16.
- Béke, G., Dajnoki, Z., Kapitány, A., Gáspár, K., Medgyesi, B., Pólska, S., Hendrik, Z., Péter, Z., Töröcsik, D., Bíró, T., et al. (2018). Immunotopographical differences of human skin. *Front. Immunol.* 9, 424.
- Bélanger, S., and Crotty, S. (2016). Dances with cytokines, featuring TFH cells, IL-21, IL-4 and B cells. *Nat. Immunol.* 17, 1135–1136.
- Bell, B.D., Kitajima, M., Larson, R.P., Stoklasek, T.A., Dang, K., Sakamoto, K., Wagner, K.U., Reizis, B., Hennighausen, L., and Ziegler, S.F. (2013). The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat. Immunol.* 14, 364–371.
- Bellinghausen, I., Metz, G., Enk, A.H., Christmann, S., Knop, J., and Saloga, J. (1997). Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur. J. Immunol.* 27, 1131–1139.
- Benito-Villalvilla, C., Soria, I., Luis Subiza, J., Palomares, O., Benito-Villalvilla, C., Palomares, O., Soria, I., and Subiza, J.L. (2018). Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to mannan. *Allergo J Int* 27, 256–262.
- Bennett, C.L., Van Rijn, E., Jung, S., Inaba, K., Steinman, R.M., Kapsenberg, M.L., and Clausen, B.E. (2005). Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J. Cell Biol.* 169, 569–576.
- Bennich, H.H., Ishizaka, K., Johansson, S.G.O., Rowe, D.S., Stanworth, D.R., and Terry, W.D. (1968). Immunoglobulin E. A new class of human immunoglobulin. *Immunochemistry* 5, 327–328.
- Berin, M.C. (2015). Pathogenesis of IgE-mediated food allergy. *Clin. Exp. Allergy* 45, 1483–1496.
- Berin, M.C., and Wang, W. (2013). Reduced severity of peanut-induced anaphylaxis in TLR9-deficient mice is associated with selective defects in humoral immunity. *Mucosal Immunol.* 6, 114–121.
- Berin, M.C., Zheng, Y., Domaradzki, M., Li, X.M., and Sampson, H.A. (2006). Role of TLR4 in allergic sensitization to food proteins in mice. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 61, 64–71.
- Bernard, M., Carrasco, C., Laoubi, L., Guiraud, B., Rozières, A., Goujon, C., Duplan, H., Bessou-Touya, S., Nicolas, J.-F., Vocanson, M., et al. (2017). IL-1 β induces thymic stromal lymphopoietin and an atopic dermatitis-like phenotype in reconstructed healthy human epidermis. *J. Pathol.* 242, 234–245.
- Beyer, K., Morrow, E., Li, X.M., Bardina, L., Bannon, G.A., Burks, A.W., and Sampson, H.A. (2001). Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 1077–1081.
- Biermé, P., Nowak-Węgrzyn, A., and Caubet, J.C. (2017). Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies. *Curr. Opin. Pediatr.* 29, 697–703.
- Bigley, V., McGovern, N., Milne, P., Dickinson, R., Pagan, S., Cookson, S., Haniffa, M., and Collin, M. (2015). Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c + dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141 high XCR1 + dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 97, 627–634.
- Bilaver, L.A., Kester, K.M., Smith, B.M., and Gupta, R.S. (2016). Socioeconomic disparities in the economic impact of childhood food allergy. *Pediatrics* 137, e20153678–e20153678.
- Bindslev-Jensen, C., de Kam, P.-J., van Twuijver, E., Boot, D.B., El Gelta, R., Mose, A.P., Tannert, L.K., and Opstelten, D.-J. (2017). SCIT-treatment With a Chemically Modified, Aluminum Hydroxide Adsorbed Peanut Extract (HAL-MPE1) Was Generally Safe And Well Tolerated And Showed Immunological Changes In Peanut Allergic Patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, AB191.
- Bird, J.A., Sánchez-Borges, M., Ansotegui, I.J., Ebisawa, M., and Ortega Martell, J.A. (2018a). Skin as an immune organ and clinical applications of skin-based immunotherapy. *World Allergy Organ. J.* 11, 38.
- Bird, J.A., Spergel, J.M., Jones, S.M., Rachid, R., Assa'ad, A.H., Wang, J., Leonard, S.A., Laubach, S.S., Kim, E.H., Vickery, B.P., et al. (2018b). Efficacy and Safety of AR101 in Oral Immunotherapy for Peanut Allergy: Results of ARC001, a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Clinical Trial. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 6, 476–485.e3.
- Blamoutier, P., Blamoutier, J., and Guibert, L. (1959). Treatment of pollinosis with pollen extracts by the method of cutaneous quadrille ruling. *Press. Med.*
- Blázquez, A.B., and Berin, M.C. (2008). Gastrointestinal Dendritic Cells Promote Th2 Skewing via OX40L. *J. Immunol.* 180, 4441–4450.
- Blázquez, A.B., and Berin, M.C. (2017). Microbiome and food allergy. *Transl. Res.* 179, 199–203.
- Blumberg, G., Groes, L., and Dahl, R. (2011). SQ-standardized house dust mite immunotherapy as an immunomodulatory treatment in patients with asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 178–185.
- Bobr, A., Igyarto, B.Z., Haley, K.M., Li, M.O., Flavell, R.A., and Kaplan, D.H. (2012). Autocrine/paracrine TGF- β 1 inhibits Langerhans cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10492–10497.
- Bohle, B., Kinaciyan, T., Gerstmayr, M., Radakovics, A., Jahn-Schmid, B., and Ebner, C. (2007). Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J. Allergy Clin. Immunol.*

- De Boissieu, D., Waguët, J.C., and Dupont, C. (2003). The atopy patch test for detection of cow's milk allergy with digestive symptoms. *J. Pediatr.* **142**, 203–205.
- Bollampalli, V.P., Harumi Yamashiro, L., Feng, X., Bierschenk, D., Gao, Y., Blom, H., Henriques-Normark, B., Nylén, S., and Rothfuchs, A.G. (2015). BCG Skin Infection Triggers IL-1R-MyD88-Dependent Migration of EpCAM^{low} CD11b^{high} Skin Dendritic cells to Draining Lymph Node During CD4⁺ T-Cell Priming. *PLOS Pathog.* **11**, e1005206.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **196**, 1627–1638.
- Bonnet, B., Vigneron, J., Levacher, B., Vazquez, T., Pitoiset, F., Brimaud, F., Churlaud, G., Klatzmann, D., and Bellier, B. (2016). Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell-Mediated Control of Experimental Food Allergy. *J. Immunol.* **197**, 188–198.
- Boonpiyathad, T., Meyer, N., Moniuszko, M., Sokolowska, M., Eljaszewicz, A., Wirz, O.F., Tomasiak-Lozowska, M.M., Bodzenta-Lukaszyk, A., Ruxrungtham, K., and van de Veen, W. (2017). High-dose bee venom exposure induces similar tolerogenic B-cell responses in allergic patients and healthy beekeepers. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **72**, 407–415.
- Boonpiyathad, T., Sokolowska, M., Morita, H., Rückert, B., Kast, J.I., Wawrzyniak, M., Sangasapaviliya, A., Pradubpongsa, P., Fuengthong, R., Thantiworasit, P., et al. (2019a). Der p 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **74**, 976–985.
- Boonpiyathad, T., van de Veen, W., Wirz, O., Sokolowska, M., Rückert, B., Tan, G., Sangasapaviliya, A., Pradubpongsa, P., Fuengthong, R., Thantiworasit, P., et al. (2019b). Role of Der p 1-specific B cells in immune tolerance during 2 years of house dust mite-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, 1077–1086.e10.
- Bosteels, C., Neyt, K., Vanheerswynghe, M., van Helden, M.J., Sichien, D., Debeuf, N., De Prijck, S., Bosteels, V., Vandamme, N., Martens, L., et al. (2020). Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity* **52**, 1039–1056.e9.
- Bourdely, P., Anselmi, G., Vaivode, K., Ramos, R.N., Missolo-Koussou, Y., Hidalgo, S., Tosselo, J., Nuñez, N., Richer, W., Vincent-Salomon, A., et al. (2020). Transcriptional and Functional Analysis of CD1c⁺ Human Dendritic Cells Identifies a CD163⁺ Subset Priming CD8⁺CD103⁺ T Cells. *Immunity* **53**, 335–352.e8.
- Brand, A., Diener, N., Zahner, S.P., Tripp, C., Backer, R.A., Karram, K., Jiang, A., Mellman, I., Stoitzner, P., and Clausen, B.E. (2020). E-Cadherin is Dispensable to Maintain Langerhans Cells in the Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **140**, 132–142.e3.
- Bretscher, P.A. (2014). On the Mechanism Determining the Th1/Th2 Phenotype of an Immune Response, and its Pertinence to Strategies for the Prevention, and Treatment, of Certain Infectious Diseases. *Scand. J. Immunol.* **79**, 361–376.
- Briseño, C.G., Satpathy, A.T., Davidson, J.T., Ferris, S.T., Durai, V., Bagadia, P., O'Connor, K.W., Theisen, D.J., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2018). Notch2-dependent DC2s mediate splenic germinal center responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 10726–10731.
- Brough, H.A., Santos, A.F., Makinson, K., Penagos, M., Stephens, A.C., Douiri, A., Fox, A.T., Du Toit, G., Turcanu, V., and Lack, G. (2013a). Peanut protein in household dust is related to household peanut consumption and is biologically active. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 630–638.
- Brough, H.A., Makinson, K., Penagos, M., Maleki, S.J., Cheng, H., Douiri, A., Stephens, A.C., Turcanu, V., and Lack, G. (2013b). Distribution of peanut protein in the home environment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 623–629.
- Brough, H.A., Simpson, A., Makinson, K., Hankinson, J., Brown, S., Douiri, A., Belgrave, D.C.M., Penagos, M., Stephens, A.C., McLean, W.H.I., et al. (2014). Peanut allergy: Effect of environmental peanut exposure in children with filaggrin loss-of-function mutations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 867–875.e1.
- Brough, H.A., Liu, A.H., Sicherer, S., Makinson, K., Douiri, A., Brown, S.J., Stephens, A.C., Irwin McLean, W.H., Turcanu, V., Wood, R.A., et al. (2015). Atopic dermatitis increases the effect of exposure to peanut antigen in dust on peanut sensitization and likely peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 164–170.e4.
- Brown, C.C., Gudjonson, H., Pritykin, Y., Deep, D., Lavallée, V.-P., Mendoza, A., Fromme, R., Mazutis, L., Ariyan, C., Leslie, C., et al. (2019). Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. *Cell* **179**, 846–863.e24.
- Buchanan, A.D., Green, T.D., Jones, S.M., Scurlock, A.M., Christie, L., Althage, K.A., Steele, P.H., Pons, L., Helm, R.M., Lee, L.A., et al. (2007). Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 199–205.
- Bunyavanich, S., Rifas-Shiman, S.L., Platts-Mills, T.A., Workman, L., Sordillo, J.E., Camargo, C.A., Gillman, M.W., Gold, D.R., and Litonjua, A.A. (2014). Peanut, milk, and wheat intake during pregnancy is associated with reduced allergy and asthma in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 1373–1382.
- Burks, A.W., Jones, S.M., Wood, R.A., Fleischer, D.M., Sicherer, S.H., Lindblad, R.W., Stablein, D., Henning, A.K., Vickery, B.P., Liu, A.H., et al. (2012). Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in Children. *N. Engl. J. Med.* **367**, 233–243.
- Burks, A.W., Wood, R.A., Jones, S.M., Sicherer, S.H., Fleischer, D.M., Scurlock, A.M., Vickery, B.P., Liu, A.H., Henning, A.K., Lindblad, R., et al. (2015). Sublingual immunotherapy for peanut allergy: Long-term follow-up of a randomized multicenter trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 1240–1248.e3.
- Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., and Hogquist, K.A. (2007). Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **204**, 3147–3156.
- Burton, O.T., Darling, A.R., Zhou, J.S., Noval-Rivas, M., Jones, T.G., Gurish, M.F., Chatila, T.A., and Oettgen, H.C. (2013). Direct effects of IL-4 on mast cells drive their intestinal expansion and increase susceptibility to anaphylaxis in a murine model of food allergy. *Mucosal Immunol.* **6**, 740–750.
- Burton, O.T., Logsdon, S.L., Zhou, J.S., Medina-Tamayo, J., Abdel-Gadir, A., Noval Rivas, M., Koleoglou, K.J., Chatila, T.A., Schneider, L.C., Rachid, R., et al. (2014). Oral immunotherapy induces IgG antibodies that act through FcγRIIb to suppress IgE-mediated hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 1310–1317.e6.
- Burton, O.T., Tamayo, J.M., Stranks, A.J., Koleoglou, K.J., and Oettgen, H.C. (2018a). Allergen-specific IgG antibody signaling through FcγRIIb promotes food tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 189–201.e3.
- Burton, O.T., Epp, A., Fanny, M.E., Miller, S.J., Stranks, A.J., Teague, J.E., Clark, R.A., van de Rijn, M., and Oettgen, H.C.

- (2018b). Tissue-Specific Expression of the Low-Affinity IgG Receptor, FcγRIIb, on Human Mast Cells. *Front. Immunol.* 9, 6.
- Cabanillas, B., Maleki, S.J., Cheng, H., and Novak, N. (2018). Differences in the Uptake of Ara h 3 from Raw and Roasted Peanut by Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 177, 35–39.
- Cabezas-Cruz, A., Hodžić, A., Román-Carrasco, P., Mateos-Hernández, L., Duscher, G.G., Sinha, D.K., Hemmer, W., Swoboda, I., Estrada-Peña, A., and De La Fuente, J. (2019). Environmental and molecular drivers of the α-Gal syndrome. *Front. Immunol.* 10.
- Cady, C.T., Powell, M.S., Harbeck, R.J., Giclas, P.C., Murphy, J.R., Katial, R.K., Weber, R.W., Hogarth, P.M., Johnson, S., Bonvini, E., et al. (2010). IgG antibodies produced during subcutaneous allergen immunotherapy mediate inhibition of basophil activation via a mechanism involving both FcγRIIA and FcγRIIB. *Immunol. Lett.* 130, 57–65.
- Caillot, N., Bouley, J., Jain, K., Mariano, S., Luce, S., Horiot, S., Airouche, S., Beuraud, C., Beauvallet, C., Devillier, P., et al. (2017). Sialylated Fetuin-A as a candidate predictive biomarker for successful grass pollen allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 759–770.e13.
- Capucha, T., Koren, N., Nassar, M., Heyman, O., Nir, T., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Zelentova, K., Eli-Berchoer, L., Zenke, M., et al. (2018). Sequential BMP7/TGF-β1 signaling and microbiota instruct mucosal Langerhans cell differentiation. *J. Exp. Med.* 215, 481–500.
- Caruso, M., Cibella, F., Emma, R., Campagna, D., Tringali, G., Amaradio, M.D., and Polosa, R. (2018). Basophil biomarkers as useful predictors for sublingual immunotherapy in allergic rhinitis. *Int. Immunopharmacol.* 60, 50–58.
- Caslin, H.L., Kiwanuka, K.N., Haque, T.T., Taruselli, M.T., MacKnight, H.P., Paranjape, A., and Ryan, J.J. (2018). Controlling Mast Cell Activation and Homeostasis: Work Influenced by Bill Paul That Continues Today. *Front. Immunol.* 9, 868.
- Ceppek, K.L., Shaw, S.K., Parker, C.M., Russell, G.J., Morrow, J.S., Rimm, D.L., and Brenner, M.B. (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the αEβ7 integrin. *Nature* 372, 190–193.
- Chavakis, T., Mitroulis, I., and Hajishengallis, G. (2019). Hematopoietic progenitor cells as integrative hubs for adaptation to and fine-tuning of inflammation. *Nat. Immunol.* 20, 802–811.
- Chen, X. (2005). BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25- responder T cells than C57BL/6 mice. *J. Leukoc. Biol.* 78, 114–121.
- Chen, J., Namiki, S., Toma-Hirano, M., Miyatake, S., Ishida, K., Shibata, Y., Arai, N., Arai, K. ichi, and Kamogawa-Schifter, Y. (2008). The role of CD11b in phagocytosis and dendritic cell development. *Immunol. Lett.* 120, 42–48.
- Chen, W.J., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF-β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Chinthrajah, R.S., Hernandez, J.D., Boyd, S.D., Galli, S.J., and Nadeau, K.C. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 984–997.
- Cho, Y., Kwon, D., and Kang, S.-J. (2017). The Cooperative Role of CD326 + and CD11b + Dendritic Cell Subsets for a Hapten-Induced Th2 Differentiation. *J. Immunol.* 199, 3137–3146.
- Choi, I.W., Kim, Y.S., Kim, D.K., Choi, J.H., Seo, K.H., Im, S.Y., Kwon, K.S., Lee, M.S., Ha, T.Y., and Lee, H.K. (2003). Platelet-activating factor-mediated NF-κB dependency of a late anaphylactic reaction. *J. Exp. Med.* 198, 145–151.
- Chopin, M., Seillet, C., Chevrier, S., Wu, L., Wang, H., Morse, H.C., Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2013). Langerhans cells are generated by two distinct PU.1-dependent transcriptional networks. *J. Exp. Med.* 210, 2967–2980.
- Chorro, L., Sarde, A., Li, M., Woollard, K.J., Chambon, P., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Barbaroux, J.B., Groves, R., and Geissmann, F. (2009). Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J. Exp. Med.* 206, 3089–3100.
- Chow, A., Toomre, D., Garrett, W., and Mellman, I. (2002). Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* 418, 988–994.
- Chu, C.C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Grys, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., et al. (2012). Resident CD141 (BDCA3) + dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med.* 209, 935–945.
- Chu, D., Mohammed-Ali, Z., Jiménez-Saiz, R., Walker, T., Goncharova, S., Llop-Guevara, A., Kong, J., Gordon, M., Barra, N., Gillgrass, A., et al. (2014). T helper cell IL-4 drives intestinal Th2 priming to oral peanut antigen, under the control of OX40L and independent of innate-like lymphocytes.
- Chu, D.K., Wood, R.A., French, S., Fiocchi, A., Jordana, M., Wasserman, S., Brožek, J.L., and Schünemann, H.J. (2019). Oral immunotherapy for peanut allergy (PACE): a systematic review and meta-analysis of efficacy and safety. *Lancet* 393, 2222–2232.
- Chua, K.Y., Kuo, L.C., and Huang, C.H. (2009). DNA vaccines for the prevention and treatment of allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9, 50–54.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X.H., et al. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* 17, 983–988.
- Churlaud, G., Pitoiset, F., Jebbawi, F., Lorenzon, R., Bellier, B., Rosenzweig, M., and Klatzmann, D. (2015). Human and mouse CD8+CD25+FOXP3+ regulatory T cells at steady state and during interleukin-2 therapy. *Front. Immunol.* 6, 171.
- Clark, A.T., and Ewan, P.W. (2003). Interpretation of tests for nut allergy in one thousand patients, in relation to allergy or tolerance. *Clin. Exp. Allergy* 33, 1041–1045.
- Clausen, B.E., and Kel, J.M. (2010). Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? *Immunol. Cell Biol.* 88, 351–360.
- Clausen, B.E., and Stoltzner, P. (2015). Functional Specialization of Skin Dendritic Cell Subsets in Regulating T Cell Responses. *Front. Immunol.* 6, 534.
- Clinton, P.M., Kemeny, D.M., Youlten, L.J.F., and Lessof, M.H. (1989). Histamine Release from Peripheral Blood Leukocytes with Purified Bee Venom Allergens: Effect of Hyperimmune Beekeeper Plasma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 89, 43–48.
- Cohen, S.G. (2008). Food allergens: Landmarks along a historic trail. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121.
- Conejero, L., Khoulili, S.C., Martínez-Cano, S., Izquierdo, H.M., Brandi, P., and Sancho, D. (2017). Lung CD103+ dendritic cells

restrain allergic airway inflammation through IL-12 production. *JCI Insight* 2.

Cooke, R.A., Barnard, J.H., Hebal, S., and Stull, A. (1935). Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever). *J. Exp. Med.* 62, 733–750.

Corthsy, B. (2009). Secretory immunoglobulin A: Well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 31, 174–179.

Cosmi, L., Santarlasci, V., Angeli, R., Liotta, F., Maggi, L., Frosali, F., Rossi, O., Falagiani, P., Riva, G., Romagnani, S., et al. (2006). Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon- γ - and interleukin-10-production. *Clin. Exp. Allergy* 36, 261–272.

Cox, L., Larenas-Linnemann, D., Lockey, R.F., and Passalacqua, G. (2010). Speaking the same language: The World Allergy Organization Subcutaneous Immunotherapy Systemic Reaction Grading System. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125.

Cox, L.S., Sanchez-Borges, M., and Lockey, R.F. (2017). World Allergy Organization Systemic Allergic Reaction Grading System: Is a Modification Needed? *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 5, 58-62.e5.

Cuppari, C., Manti, S., Salpietro, A., Alterio, T., Arrigo, T., Leonardi, S., and Salpietro, C. (2015). Mode of delivery and risk for development of atopic diseases in children. *Allergy Asthma Proc.* 36, 344–351.

Cytlak, U., Resteu, A., Pagan, S., Green, K., Milne, P., Maisuria, S., McDonald, D., Hulme, G., Filby, A., Carpenter, B., et al. (2020). Differential IRF8 Transcription Factor Requirement Defines Two Pathways of Dendritic Cell Development in Humans. *Immunity* 53, 353-370.e8.

Czernielewski, J.M., and Demarchez, M. (1987). Further evidence for the self-reproducing capacity of langerhans cells in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 88, 17–20.

Czernielewski, J., Vaigot, P., and Prunieras, M. (1985). Epidermal Langerhans cells - a cycling cell population. *J. Invest. Dermatol.* 84, 424–426.

Dall'Antonia, F., Pavkov-Keller, T., Zangger, K., and Keller, W. (2014). Structure of allergens and structure based epitope predictions. *Methods* 66, 3–21.

Dang, A.T., Chundi, P.K., Mousa, N.A., Beyer, A.I., Chansakulporn, S., Venter, C., Mersha, T.B., and Assa'ad, A.H. (2020). The effect of age, sex, race/ethnicity, health insurance, and food specific serum immunoglobulin E on outcomes of oral food challenges. *World Allergy Organ. J.* 13, 100100.

Dantzer, J.A., and Wood, R.A. (2018). The use of omalizumab in allergen immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* 48, 232–240.

Dantzer, J.A., and Wood, R.A. (2019). Next-Generation Approaches for the Treatment of Food Allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 19, 5.

Dawicki, W., Li, C., Town, J., Zhang, X., and Gordon, J.R. (2017). Therapeutic reversal of food allergen sensitivity by mature retinoic acid-differentiated dendritic cell induction of LAG3 + CD49b – Foxp3 – regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1608-1620.e3.

Dawod, B., Haidl, I.D., Azad, M.B., Marshall, J.S., Scotia, N., and Graphical Abstract, C. (2020). Toll-like receptor 2 impacts the development of oral tolerance in mouse pups via a milk-dependent mechanism.

de Vries, V.C., Pino-Lagos, K., Nowak, E.C., Bennett, K.A., Oliva, C., and Noelle, R.J. (2011). Mast Cells Condition Dendritic Cells to Mediate Allograft Tolerance. *Immunity* 35, 550–561.

Deckers, J., Sichien, D., Plantinga, M., Van Moorleghem, J., Vanheerswynghels, M., Hoste, E., Malissen, B., Dombrowicz, D., Guilliams, M., De Bosscher, K., et al. (2017). Epicutaneous sensitization to house dust mite allergen requires interferon regulatory factor 4-dependent dermal dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*

Diesner, S.C., Bergmayr, C., Pfitzner, B., Assmann, V., Krishnamurthy, D., Starkl, P., Endesfelder, D., Rothballer, M., Welzl, G., Rattei, T., et al. (2016). A distinct microbiota composition is associated with protection from food allergy in an oral mouse immunization model. *Clin. Immunol.* 173, 10–18.

Dioszeghy, V., Mondoulet, L., Dhelft, V., Ligouis, M., Puteaux, E., Benhamou, P.-H., and Dupont, C. (2011). Epicutaneous Immunotherapy Results in Rapid Allergen Uptake by Dendritic Cells through Intact Skin and Downregulates the Allergen-Specific Response in Sensitized Mice. *J. Immunol.* 186, 5629–5637.

Dioszeghy, V., Mondoulet, L., Dhelft, V., Ligouis, M., Puteaux, E., Dupont, C., and Benhamou, P.-H. (2014). The regulatory T cells induction by epicutaneous immunotherapy is sustained and mediates long-term protection from eosinophilic disorders in peanut-sensitized mice. *Clin. Exp. Allergy* 44, 867–881.

Dioszeghy, V., Mondoulet, L., Puteaux, E., Dhelft, V., Ligouis, M., Plaquet, C., Dupont, C., and Benhamou, P.-H. (2016). Differences in phenotype, homing properties and suppressive activities of regulatory T cells induced by epicutaneous, oral or sublingual immunotherapy in mice sensitized to peanut. *Cell. Mol. Immunol.*

Dioszeghy, V., Mondoulet, L., Laoubi, L., Dhelft, V., Plaquet, C., Bouzereau, A., Dupont, C., and Sampson, H. (2018). Antigen Uptake by Langerhans Cells Is Required for the Induction of Regulatory T Cells and the Acquisition of Tolerance During Epicutaneous Immunotherapy in OVA-Sensitized Mice. *Front. Immunol.* 9, 1951.

Djurup, R., Malling, H.J., Søndergaard, I., and Weeke, B. (1985). The IgE and IgG subclass antibody response in patients allergic to yellow jacket venom undergoing different regimens of venom immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76, 46–55.

Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., et al. (2009). Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells. *Immunity* 31, 823–833.

Dreschler, K., Bratke, K., Petermann, S., Bier, A., Thamm, P., Kuepper, M., Virchow, J.C., and Lommatzsch, M. (2011). Impact of immunotherapy on blood dendritic cells in patients with Hymenoptera venom allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 487-494.e3.

Del Duca, E., Pavel, A.B., Dubin, C., Song, T., Wallace, E.B., Peng, X., Estrada, Y.D., Xu, H., Maari, C., Jack, C., et al. (2019). Major Differences in Expression of Inflammatory Pathways in Skin from Different Body Sites of Healthy Individuals. *J. Invest. Dermatol.* 139, 2228-2232.e10.

Dudeck, A., Dudeck, J., Scholten, J., Petzold, A., Surianarayanan, S., Köhler, A., Peschke, K., Vöhringer, D., Waskow, C., Krieg, T., et al. (2011). Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity* 34, 973–984.

- Dudeck, J., Medyukhina, A., Fröbel, J., Svensson, C.-M.M., Kotrba, J., Gerlach, M., Gradtke, A.-C.C., Schröder, B., Speier, S., Figge, M.T., et al. (2017). Mast cells acquire MHC II from dendritic cells during skin inflammation. *J. Exp. Med.* *210*, 783.
- Dudeck, J., Fröbel, J., Kotrba, J., Lehmann, C.H.K., Dudziak, D., Speier, S., Nedospasov, S.A., Schraven, B., and Dudeck, A. (2019). Engulfment of mast cell secretory granules on skin inflammation boosts dendritic cell migration and priming efficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* *143*, 1849–1864.e4.
- Dunkin, D., Berin, M.C., and Mayer, L. (2011). Allergic sensitization can be induced via multiple physiologic routes in an adjuvant-dependent manner. *J. Allergy Clin. Immunol.* *128*.
- Dunkin, D., Berin, M.C., Mondoulet, L., Tobar, S., Yeretssian, G., Tordesillas, L., Iuga, A., Larcher, T., Guillespie, V., Benhamou, P.H., et al. (2017). Epicutaneous Tolerance Induction to a Bystander Antigen Abrogates Colitis and Ileitis in Mice. *Inflamm. Bowel Dis.* *23*, 1972–1982.
- Dupont, C., Kalach, N., Soulaines, P., Legoué-Morillon, S., Piloquet, H., and Benhamou, P.-H. (2010). Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: A pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 1165–1167.
- Durai, V., and Murphy, K.M. (2016). Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity* *45*, 719–736.
- Durham, S.R., Ying, S., Varney, V.A., Jacobson, M.R., Sudderick, R.M., Mackay, L.S., Kay, A.B., and Hamid, Q.A. (1996). Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4⁺ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for Interferon- γ . *J. Allergy Clin. Immunol.* *97*, 1356–1365.
- Dutertre, C.-A., Becht, E., Irac, S.E., Khalilnezhad, A., Narang, V., Khalilnezhad, S., Ng, P.Y., van den Hoogen, L.L., Leong, J.Y., Lee, B., et al. (2019). Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* *51*, 573–589.e8.
- Eastman, A.J., Xu, J., Bermik, J., Potchen, N., den Dekker, A., Neal, L.M., Zhao, G., Malachowski, A., Schaller, M., Kunkel, S., et al. (2019). Epigenetic stabilization of DC and DC precursor classical activation by TNF α contributes to protective T cell polarization. *Sci. Adv.* *5*, eaaw9051.
- Eaton, L.H., Mellody, K.T., Pilkington, S.M., Dearman, R.J., Kimber, I., and Griffiths, C.E.M. (2018). Impaired Langerhans cell migration in psoriasis is due to an altered keratinocyte phenotype induced by interleukin-17. *Br. J. Dermatol.* *178*, 1364–1372.
- Eberlein-König, B., Ullmann, S., Thomas, P., and Przybilla, B. (1995). Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization. *Clin. Exp. Allergy* *25*, 704–712.
- Ebner, S., Nguyen, V.A., Forstner, M., Wang, Y.H., Wolfram, D., Liu, Y.J., and Romani, N. (2007). Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *119*, 982–990.
- Eckl-Dorna, J., Villazala-Merino, S., Linhart, B., Karaulov, A. V., Zhernov, Y., Khaitov, M., Niederberger-Leppin, V., and Valenta, R. (2019). Allergen-specific antibodies regulate secondary allergen-specific immune responses. *Front. Immunol.* *10*, 3131.
- Edelson, B.T., Wumesh, K.C., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripherally CD103⁺ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α ⁺ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 823–836.
- Eder, W., Klimecki, W., Yu, L., Von Mutius, E., Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Nowak, D., and Martinez, F.D. (2005). Opposite effects of CD14/260 on serum IgE levels in children raised in different environments. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 601–607.
- Egbuniwe, I.U., Karagiannis, S.N., Nestle, F.O., and Lacy, K.E. (2015). Revisiting the role of B cells in skin immune surveillance. *Ege, M.J., Bieli, C., Frei, R., van Strien, R.T., Riedler, J., Üblagger, E., Schram-Bijkerk, D., Brunekreef, B., van Hage, M., Scheynius, A., et al. (2006). Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. J. Allergy Clin. Immunol. 117, 817–823.*
- Eggesbø, M., Botten, G., Stigum, H., Nafstad, P., and Magnus, P. (2003). Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy? *J. Allergy Clin. Immunol.* *112*, 420–426.
- Eichenberger, H., and Storck, H. (1966). Co-seasonal desensitization of pollinosis with the scarification method of Blamoutier. *Allergy* *21*, 261–267.
- Eickhoff, S., Brewitz, A., Gerner, M.Y., Klauschen, F., Komander, K., Hemmi, H., Garbi, N., Kaisho, T., Germain, R.N., and Kastenmüller, W. (2015). Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell* *162*, 1322–1337.
- Elizur, A., Rajuan, N., Goldberg, M.R., Leshno, M., Cohen, A., and Katz, Y. (2012). Natural course and risk factors for persistence of IgE-mediated cow's milk allergy. *J. Pediatr.* *161*.
- Engeroff, P., and Vogel, M. (2019). The role of IgE receptors in the control of allergic reaction. *Rev. Fr. Allergol.* *59*, 204–206.
- Enrique, E., Pineda, F., Malek, T., Bartra, J., Basagaña, M., Tella, R., Castelló, J.V., Alonso, R., De Mateo, J.A., Cerdá-Trias, T., et al. (2005). Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: A randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 1073–1079.
- Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P., Negrin, R.S., Fathman, C.G., and Strober, S. (2005). Only the CD62L⁺ subpopulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* *105*, 2220–2226.
- Everts, B., Tussiwand, R., Dreesen, L., Fairfax, K.C., Huang, S.C.C., Smith, A.M., O'Neill, C.M., Lam, W.Y., Edelson, B.T., Urban, J.F., et al. (2016). Migratory CD103⁺ dendritic cells suppress helminth-driven type 2 immunity through constitutive expression of IL-12. *J. Exp. Med.* *213*, 35–51.
- Fainaru, O., Woolf, E., Lotem, J., Yarmus, M., Brenner, O., Goldenberg, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Levanon, D., Jung, S., et al. (2004). Runx3 regulates mouse TGF- β -mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *EMBO J.* *23*, 969–979.
- Faith, J.J., Ahern, P.P., Ridaura, V.K., Cheng, J., and Gordon, J.I. (2014). Identifying gut microbe-host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* *6*.
- Fan, D.C., Wang, X.D., Wang, C.S., Wang, Y., Cao, F.F., and Zhang, L. (2016). Suppression of immunotherapy on group 2 Innate lymphoid cells in allergic rhinitis. *Chin. Med. J. (Engl.)* *129*, 2824–2828.

- Fanucchi, M. V., Schelegle, E.S., Baker, G.L., Evans, M.J., McDonald, R.J., Gershwin, L.J., Raz, E., Hyde, D.M., Plopper, C.G., and Miller, L.A. (2004). Immunostimulatory oligonucleotides attenuate airways remodeling in allergic monkeys. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 1153–1157.
- Feldman, L., Thacher, J., van Hage, M., Melén, E., Pershagen, G., Carl Wickman, M., To, T., Protudjer, J.L., and Bergström, A. (2017). Secondhand Smoke Exposure in Early Life and Food-Related Symptoms through Adolescence: Population-Based Prospective Cohort Study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, AB388.
- Fenton, T.M., Jørgensen, P.B., Niss, K., Rubin, S.J.S., Mörbé, U.M., Riis, L.B., Da Silva, C., Plumb, A., Vandamme, J., Jakobsen, H.L., et al. (2020). Immune Profiling of Human Gut-Associated Lymphoid Tissue Identifies a Role for Isolated Lymphoid Follicles in Priming of Region-Specific Immunity. *Immunity* 52, 557–570.e6.
- Fernández-Rivas, M., Garrido Fernández, S., Nadal, J.A., De Durana, M.D.A.D., García, B.E., González-Mancebo, E., Martín, S., Barber, D., Rico, P., and Tabar, A.I. (2009). Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 64, 876–883.
- Feuille, E., and Nowak-Węgrzyn, A. (2016). Oral Immunotherapy for Food Allergies. *Ann. Nutr. Metab.* 68, 19–31.
- Finkelman, F.D. (2007). Anaphylaxis: Lessons from mouse models. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 506–515.
- Finkelman, F.D., Khodoun, M. V., and Strait, R. (2016). Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1674–1680.
- Fleischer, D.M., Conover-Walker, M.K., Matsui, E.C., and Wood, R.A. (2005). The natural history of tree nut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 1087–1093.
- Fleischer, D.M., Burks, A.W., Vickery, B.P., Scurlock, A.M., Wood, R.A., Jones, S.M., Sicherer, S.H., Liu, A.H., Stablein, D., Henning, A.K., et al. (2013). Sublingual immunotherapy for peanut allergy: A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131.
- Fleischer, D.M., Sicherer, S., Greenhawt, M., Campbell, D., Chan, E., Muraro, A., Halken, S., Katz, Y., Ebisawa, M., Eichenfield, L., et al. (2015). Consensus communication on early peanut introduction and the prevention of peanut allergy in high-risk infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 258–261.
- Fleischer, D.M., Greenhawt, M., Sussman, G., Bégin, P., Nowak-Węgrzyn, A., Petroni, D., Beyer, K., Brown-Whitehorn, T., Hebert, J., Hourihane, J.O., et al. (2019). Effect of Epicutaneous Immunotherapy vs Placebo on Reaction to Peanut Protein Ingestion Among Children With Peanut Allergy. *JAMA*.
- Fleischer, D.M., Shreffler, W.G., Campbell, D.E., Green, T.D., Anvari, S., Assa'ad, A., Bégin, P., Beyer, K., Bird, J.A., Brown-Whitehorn, T., et al. (2020). Long-term, open-label extension study of the efficacy and safety of epicutaneous immunotherapy for peanut allergy in children: PEOPLE 3-year results. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Flicker, S., Marth, K., Kofler, H., and Valenta, R. (2009). Placental transfer of allergen-specific IgG but not IgE from a specific immunotherapy-treated mother. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124.
- Flinsenberger, T.W.H., Compeer, E.B., Koning, D., Klein, M., Amelung, F.J., Van Baarle, D., Boelens, J.J., and Boes, M. (2012). Fcγ receptor antigen targeting potentiates cross-presentation by human blood and lymphoid tissue BDCA-3+ dendritic cells. *Blood* 120, 5163–5172.
- Flinterman, A.E., Knol, E.F., Lencer, D.A., Bardina, L., den Hartog Jager, C.F., Lin, J., Pasmans, S.G.M.A., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Sampson, H.A., van Hoffen, E., et al. (2008). Peanut epitopes for IgE and IgG4 in peanut-sensitized children in relation to severity of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121.
- Fonseca, D.M., Paula, M.O., Wowk, P.F., Campos, L.W., Gembre, A.F., Turato, W.M., Ramos, S.G., Dias-Baruffi, M., Barboza, R., Gomes, E., et al. (2011). IFN-γ-mediated efficacy of allergen-free immunotherapy using mycobacterial antigens and CpG-ODN. *Immunol. Cell Biol.* 89, 777–785.
- Foong, R.X., and Brough, H. (2017). The role of environmental exposure to peanut in the development of clinical allergy to peanut. *Clin. Exp. Allergy* 47, 1232–1238.
- Forsström, B., Bislawska Axnäs, B., Rockberg, J., Danielsson, H., Bohlin, A., and Uhlen, M. (2015). Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One* 10.
- Fox, A.T., Sasieni, P., du Toit, G., Syed, H., and Lack, G. (2009). Household peanut consumption as a risk factor for the development of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 417–423.
- Francis, J.N., Till, S.J., and Durham, S.R. (2003). Induction of IL-10+CD4+CD25+T cells by grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 1255–1261.
- Frazier, A.L., Camargo, C.A., Malspeis, S., Willett, W.C., and Young, M.C. (2014). Prospective study of peripregnancy consumption of peanuts or tree nuts by mothers and the risk of peanut or tree nut allergy in their offspring. *JAMA Pediatr.* 168, 156–162.
- Frei, R., Ferstl, R., Konieczna, P., Ziegler, M., Simon, T., Rugeles, T.M., Mailand, S., Watanabe, T., Lauener, R., Akdis, C.A., et al. (2013). Histamine receptor 2 modifies dendritic cell responses to microbial ligands. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132.
- Freiberger, S.N., Zehnder, M., Gafvelin, G., Grönlund, H., Kündig, T.M., and Johansen, P. (2016). IgG4 but not IgG1 antibody production after intralymphatic immunotherapy with recombinant MAT-Feld1 in human. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 1366–1370.
- Freidl, R., Gstoettner, A., Baranyi, U., Swoboda, I., Stolz, F., Focke-Tejkl, M., Wekerle, T., van Ree, R., Valenta, R., and Linhart, B. (2017). Blocking antibodies induced by immunization with a hypoallergenic parvalbumin mutant reduce allergic symptoms in a mouse model of fish allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1897–1905.e1.
- Fu, S., Yopp, A.C., Mao, X., Chen, D., Zhang, N., Chen, D., Mao, M., Ding, Y., and Bromberg, J.S. (2004). CD4+ CD25+ CD62+ T-Regulatory Cell Subset Has Optimal Suppressive and Proliferative Potential. *Am. J. Transplant.* 4, 65–78.
- Fujimoto, Y., Aono, K., and Azuma, Y.T. (2019). The clarified role of interleukin-19 in the inflammatory bowel disease and hypersensitivity: Insights from animal models and humans. *J. Vet. Med. Sci.* 81, 1067–1073.
- Fujimura, T., Lum, S.Z.C., Nagata, Y., Kawamoto, S., and Oyoshi, M.K. (2019). Influences of maternal factors over offspring allergies and the application for food allergy. *Front. Immunol.* 10, 1933.
- Furumoto, Y., Nunomura, S., Terada, T., Rivera, J., and Ra, C. (2004). The FcεRIβ immunoreceptor tyrosine-based activation

motif exerts inhibitory control on MAPK and I κ B kinase phosphorylation and mast cell cytokine production. *J. Biol. Chem.* 279, 49177–49187.

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

Gallagher, G. (2010). Interleukin-19: Multiple roles in immune regulation and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 345–352.

Gallo, R.L. (2017). Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. *J. Invest. Dermatol.* 137, 1213–1214.

Gamradt, P., Laoubi, L., Nosbaum, A., Mutez, V., Lenief, V., Grande, S., Redoulès, D., Schmitt, A.-M., Nicolas, J.-F., and Vocanson, M. (2019). Inhibitory checkpoint receptors control CD8⁺ resident memory T cells to prevent skin allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 143, 2147–2157.e9.

Gao, Y., Nish, S.A., Jiang, R., Hou, L., Licona-Limón, P., Weinstein, J.S., Zhao, H., and Medzhitov, R. (2013). Control of T Helper 2 Responses by Transcription Factor IRF4-Dependent Dendritic Cells. *Immunity* 39, 722–732.

Garaczi, E., Szabó, K., Francziszti, L., Csiszovszki, Z., Lorincz, O., Toke, E.R., Molnár, L., Bitai, T., Jánossy, T., Bata-Csörgo, Z., et al. (2013). DermAll nanomedicine for allergen-specific immunotherapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9, 1245–1254.

Garcia-Vallejo, J.J., and van Kooyk, Y. (2013). The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. *Trends Immunol.* 34, 482–486.

Gauchat, J.F., Lebman, D.A., Coffman, R.L., Gascan, H., and de Vries, J.E. (1990). Structure and expression of germline ϵ transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J. Exp. Med.* 172, 463–473.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* (80-.). 327, 656–661.

Gell, P., and Coombs, R. (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. Blackwell Sci. Oxford.

Gepp, B., Lengger BMA, N., Möbs, C., Pfützner, W., Radauer, C., Bohle, B., and Breiteneder, H. (2016). Monitoring the epitope recognition profiles of IgE, IgG 1, and IgG 4 during birch pollen immunotherapy.

Gern, J.E., Reardon, C.L., Hoffjan, S., Nicolae, D., Li, Z., Roberg, K.A., Neaville, W.A., Carlson-Dakes, K., Adler, K., Hamilton, R., et al. (2004). Effects of dog ownership and genotype on immune development and atopy in infancy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 307–314.

Gerrard, J.W., and Perelmutter L (1986). IgE-mediated allergy to peanut, cow's milk, and egg in children with special reference to maternal diet - PubMed.

Ghigo, C., Mondor, I., Jorquera, A., Nowak, N.J., Wienert, S., Zahner, S.P., Clausen, B.E., Luche, H., Malissen, B., Klauschen, F., et al. (2013). Multicolor fate mapping of langerhans cell homeostasis. *J. Exp. Med.* 210, 1657–1664.

Gillespie, S.R., DeMartino, R.R., Zhu, J., Chong, H.J., Ramirez, C., Shelburne, C.P., Bouton, L.A., Bailey, D.P., Gharse, A., Mirmonsef, P., et al. (2004). IL-10 Inhibits Fc ϵ RI Expression in Mouse Mast Cells. *J. Immunol.* 172, 3181–3188.

Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubreau, M., Dai, X.M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* 7, 265–273.

Givens, B.E., Geary, S.M., and Salem, A.K. (2018). Nanoparticle-based CpG-oligonucleotide therapy for treating allergic asthma. *Immunotherapy* 10, 595–604.

Giacometti, L., and Montagna, W. (1967). Langerhans cells: Uptake of tritiated thymidine. *Science* (80-.). 157, 439–440.

Glovsky, M., Ghekiere, L., and Rejzek, E. (1991). Effect of maternal immunotherapy on immediate skin test reactivity, specific rye I IgG and IgE antibody, and total IgE of the children - PubMed.

Godoy, G.J., Paira, D.A., Olivera, C., Breser, M.L., Sanchez, L.R., Motrich, R.D., and Rivero, V.E. (2020). Differences in T regulatory cells between mouse strains frequently used in immunological research: Treg cell quantities and subpopulations in NOD, B6 and BALB/c mice. *Immunol. Lett.* 223, 17–25.

Goleva, E., Berdyshev, E., and Leung, D.Y.M. (2019). Epithelial barrier repair and prevention of allergy. *J. Clin. Invest.* 1, 1463–1474.

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Oral Tolerance. *Immunity* 29, 464–475.

Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* 47, 582–596.e6.

Gowthaman, U., Chen, J.S., Zhang, B., Flynn, W.F., Lu, Y., Song, W., Joseph, J., Gertie, J.A., Xu, L., Collet, M.A., et al. (2019). Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science* (80-.). 365, eaaw6433.

Grajales-Reyes, G.E., Iwata, A., Albring, J., Wu, X., Tussiwand, R., Kc, W., Kretzer, N.M., Briseño, C.G., Durai, V., Bagadia, P., et al. (2015). Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8 α + conventional DC clonogenic progenitor. *Nat. Immunol.* 16, 708–717.

Grant, C.R., Liberal, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., and Longhi, M.S. (2015). Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and yet-unanswered questions. *Autoimmun. Rev.* 14, 105–116.

Greenhawt, M. (2018). Environmental exposure to peanut and the risk of an allergic reaction. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 120, 476–481.e3.

Greenhawt, M., Dunn Galvin, A., Chalil, J., Chang, R., Prinz, G., Marino, K., McCrone, J., and Green, T. (2019). Perceptions among peanut-allergic children: a survey. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 123, S16.

Gregorio, J., Meller, S., Conrad, C., Nardo, A. Di, Homey, B., Lauerma, A., Arai, N., Gallo, R.L., DiGiovanni, J., and Gilliet, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J. Exp. Med.* 207, 2921–2930.

Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfroi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C., Viola, A., Odom, S., Rivera, J., Colombo, M.P., et al. (2008).

CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Mast Cell Degranulation and Allergic Responses through OX40-OX40L Interaction. *Immunity* 29, 771–781.

Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: Positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 659–702.

Grindebacke, H., Wing, K., Andersson, A.C., Suri-Payer, E., Rak, S., and Rudin, A. (2004). Defective suppression of Th2 cytokines by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in birch allergies during birch pollen season. *Clin. Exp. Allergy* 34, 1364–1372.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinario, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 1097–1101.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., De Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.

Guaraldi, F., and Salvatori, G. (2012). Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 94.

Gueguen, C., Bouley, J., Moussu, H., Luce, S., Duchateau, M., Chamot-Rooke, J., Pallardy, M., Lombardi, V., Nony, E., Baron-Bodo, V., et al. (2016). Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 545–558.

Guermontprez, P., Gerber-Ferder, Y., Vaivode, K., Bourdely, P., and Helft, J. (2019). Origin and development of classical dendritic cells. pp. 1–54.

Guilliams, M., Crozat, K., Henri, S., Tamoutounour, S., Grenot, P., Devilard, E., Bovis, B. de, Alexopoulou, L., Dalod, M., and Malissen, B. (2010). Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103⁺ dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *Blood* 115, 1958–1968.

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014a). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571–578.

Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2014b). The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 94–108.

Guilliams, M., Dutertre, C.-A., Scott, C.L.L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prijck, S., et al. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* 45, 669–684.

Gupta, R., Holdford, D., Bilaver, L., Dyer, A., Holl, J.L., and Meltzer, D. (2013). The Economic Impact of Childhood Food Allergy in the United States. *JAMA Pediatr.* 167, 1026.

Gutiérrez-Martínez, E., Planès, R., Anselmi, G., Reynolds, M., Menezes, S., Adiko, A.C., Saveanu, L., and Guermontprez, P. (2015). Cross-presentation of cell-associated antigens by MHC class I in dendritic cell subsets. *Front. Immunol.* 6, 1.

Guttman-Yassky, E., Lowes, M.A., Fuentes-Duculan, J., Whynot, J., Novitskaya, I., Cardinale, I., Haider, A., Khatcherian, A., Carucci, J.A., Bergman, R., et al. (2007). Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1210–1217.

Guttman-Yassky, E., Zhou, L., and Krueger, J.G. (2019). The skin as an immune organ: Tolerance versus effector responses and applications to food allergy and hypersensitivity reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, 362–374.

Hacker, C., Kirsch, R.D., Ju, X.S., Hieronymus, T., Gust, T.C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S.M., Rose-John, S., Yokota, Y., et al. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat. Immunol.* 4, 380–386.

Hakimi, J., Seals, C., Kondas, J., Pettine, L., Danho, W., and Kochan, J. (1990). The alpha subunit of the human IgE receptor (FcεRI) is sufficient for high affinity IgE binding - PubMed. *J Biol Chem.*

Halim, T.Y.F., Hwang, Y.Y., Scanlon, S.T., Zaghoulani, H., Garbi, N., Fallon, P.G., and McKenzie, A.N.J. (2016). Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. *Nat. Immunol.* 17, 57–64.

Halken, S. (2004). Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr. Allergy Immunol.* 15, 9–32.

Hamada, A., Torre, C., Drancourt, M., and Ghigo, E. (2019). Trained Immunity Carried by Non-immune Cells. *Front. Microbiol.* 9, 3225.

Hamid, Q.A., Schotman, E., Jacobson, M.R., Walker, S.M., and Durham, S.R. (1997). Increases in IL-12 messenger RNA⁺ cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, 254–260.

Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M.A., Germain, R.N., and Lambrecht, B.N. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* 15, 410–416.

Han, H., Thelen, T.D., Comeau, M.R., and Ziegler, S.F. (2014). Thymic stromal lymphopoietin-mediated epicutaneous inflammation promotes acute diarrhea and anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 124, 5442–5452.

Hanakawa, S., Kitoh, A., Shibuya, R., Dainichi, T., Nomura, T., Honda, T., Egawa, G., Otsuka, A., Nakajima, S., Fujita, M., et al. (2019). Percutaneous sensitization is limited by in situ inhibition of cutaneous dendritic cell migration through skin-resident regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, 1343–1353.e8.

Hand, S., Darke, C., Thompson, J., Stingl, C., Rolf, S., Jones, K.P., and Davies, B.H. (2004). Human leucocyte antigen polymorphisms in nut-allergic patients in South Wales. *Clin. Exp. Allergy* 34, 720–724.

Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human Tissues Contain CD141^{hi} Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103⁺ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* 37, 60–73.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194, 769–779.

Hayashi, T., and Raz, E. (2006). TLR9-Based Immunotherapy for Allergic Disease. *Am. J. Med.* 119, 897.e1–897.e6.

Hayashi, T., Rao, S.P., Takabayashi, K., Van Uden, J.H., Kornbluth, R.S., Baird, S.M., Taylor, M.W., Carson, D.A., Catanzaro,

A., and Raz, E. (2001). Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 69, 6156–6164.

Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., Broide, D.H., Carson, D.A., and Raz, E. (2004). Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 114, 270–279.

He, J.S., Subramaniam, S., Narang, V., Srinivasan, K., Saunders, S.P., Carbajo, D., Wen-Shan, T., Hidayah Hamadee, N., Lum, J., Lee, A., et al. (2017). IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nat. Commun.* 8.

Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J.J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., et al. (2001). Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor- β 1-dependent cells. *Int. Immunol.* 13, 695–704.

Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Williams, M., De Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., et al. (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 207, 189–206.

Hervé, P.-L., Dhelft, V., Plaquet, C., Rousseaux, A., Bouzereau, A., Gaulme, L., Tilleul, S., Ligouis, M., Donne, N., Lambert, P.-H., et al. (2019). Epidermal micro-perforation potentiates the efficacy of epicutaneous vaccination.

Hess, C., Winkler, A., Lorenz, A.K., Holeccka, V., Blanchard, V., Eiglmeier, S., Schoen, A.L., Bitterling, J., Stoeck, A.D., Petzold, D., et al. (2013). T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. *J. Clin. Invest.* 123, 3788–3796.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α + dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* (80-.). 322, 1097–1100.

Hill, D.A., and Spergel, J.M. (2018). The atopic march. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 120, 131–137.

Hintzen, G., Ohl, L., del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Pabst, O., Kocks, J.R., Kregel, J., Hardtke, S., and Förster, R. (2006). Induction of Tolerance to Innocuous Inhaled Antigen Relies on a CCR7-Dependent Dendritic Cell-Mediated Antigen Transport to the Bronchial Lymph Node. *J. Immunol.* 177, 7346–7354.

Hirata, H., Arima, M., Cheng, G., Honda, K., Asakura, T., Fukushima, F., Yamaguchi, B., Yoshida, N., and Fukuda, T. (2003). Effects of CD80 and CD86 on cytokine production in patients with wasp-venom allergy who receive venom immunotherapy. *Cytokine* 24, 1–6.

Hirota, T., Nakayama, T., Tamari, M., Sato, S., Yanagida, N., Ebisawa, M., Matsui, T., Sugiura, S., Ito, K., Takaoka, Y., et al. (2017). Association study of childhood food allergy with genome-wide association studies—discovered loci of atopic dermatitis and eosinophilic esophagitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 1713–1716.

Hirsch, A.G., Pollak, J., Glass, T.A., Poulsen, M.N., Bailey-Davis, L., Mowery, J., and Schwartz, B.S. (2017). Early-life antibiotic use and subsequent diagnosis of food allergy and allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy* 47, 236–244.

Hissong, B.D., Byrne, G.I., Padilla, M.L., and Carlin, J.M. (1995). Upregulation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide, and interleukin-1. *Cell. Immunol.* 160, 264–269.

Hjelholt, A., Christiansen, G., Sørensen, U.S., and Birkelund, S. (2013). IgG subclass profiles in normal human sera of antibodies specific to five kinds of microbial antigens. *Pathog. Dis.* 67, 206–213.

Ho, M.H.K., Wong, W.H.S., Heine, R.G., Hosking, C.S., Hill, D.J., and Allen, K.J. (2008). Early clinical predictors of remission of peanut allergy in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 731–736.

Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209, 1167–1181.

Hoffmann, H.J. (2016). News in Cellular Allergy: A Review of the Human Mast Cell and Basophil Granulocyte Literature from January 2013 to May 2015. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 168, 253–262.

Hole, C.R., Wager, C.M.L., Castro-Lopez, N., Campuzano, A., Cai, H., Wozniak, K.L., Wang, Y., and Wormley, F.L. (2019). Induction of memory-like dendritic cell responses in vivo. *Nat. Commun.* 10, 2955.

HONDA, T., and KABASHIMA, K. (2016). Novel concept of iSALT (inducible skin-associated lymphoid tissue) in the elicitation of allergic contact dermatitis. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 92, 20–28.

Hong, C.H., Lin, S.H., Clausen, B.E., and Lee, C.H. (2020). Selective AhR knockout in langerin-expressing cells abates Langerhans cells and polarizes Th2/Tr1 in epicutaneous protein sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 12980–12990.

Hoover, J.K., Eggink, L.L., and Cote, R. (2019). Stories From the Dendritic Cell Guardhouse. *Front. Immunol.* 10.

Hoof, I., Schulten, V., Layhadi, J.A., Stranzl, T., Christensen, L.H., Herrera de la Mata, S., Seumois, G., Vijayanand, P., Lundegaard, C., Niss, K., et al. (2020). Allergen-specific IgG+ memory B cells are temporally linked to IgE memory responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 146, 180–191.

Hoth, M., and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353–356.

Hourihane, J., Kilburn, S., Dean, P., and Warner, J. (1997). Clinical characteristics of peanut allergy.

Hourihane, J.O.B., Dean, T.P., and Warner, J.O. (1996). Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: Results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *Br. Med. J.* 313, 518–521.

Hourihane, J.O.B., Aiken, R., Briggs, R., Gudgeon, L.A., Grimshaw, K.E.C., DunnGalvin, A., and Roberts, S.R. (2007). The impact of government advice to pregnant mothers regarding peanut avoidance on the prevalence of peanut allergy in United Kingdom children at school entry. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1197–1202.

Howell, W.M., Turner, S.J., Hourihane, J.O.B., Dean, T.P., and Warner, J.O. (1998). HLA class II DRB1, DQB1 and DPB1 genotypic associations with peanut allergy: Evidence from a family-based and case-control study. *Clin. Exp. Allergy* 28, 156–162.

HuangFu, T.Q., Lim, L.H., and Chua, K.Y. (2006). Efficacy evaluation of Der p 1 DNA vaccine for allergic asthma in an experimental mouse model. *Vaccine* 24, 4576–4581.

Huber, B. (2006). 100 years of allergy: Clemens von Pirquet - His idea of allergy and its immanent concept of disease. *Wien. Klin.*

- Huber, S., Schramm, C., Lehr, H.A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P.R., Neurath, M.F., and Blessing, M. (2004). Cutting Edge: TGF- β Signaling Is Required for the In Vivo Expansion and Immunosuppressive Capacity of Regulatory CD4⁺ CD25⁺ T Cells. *J. Immunol.* 173, 6526–6531.
- Huber, S., Lang, R., Steiner, M., Aglas, L., Ferreira, F., Wallner, M., Hawranek, T., and Gadermaier, G. (2018). Does clinical outcome of birch pollen immunotherapy relate to induction of blocking antibodies preventing IgE from allergen binding? A pilot study monitoring responses during first year of AIT. *Clin. Transl. Allergy* 8, 39.
- Hunger, R.E., Porcelli, S.A., and Modlin, R.L. (2004). Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* 113.
- Iborra, S., Martínez-López, M., Khouili, S.C., Enamorado, M., Cueto, F.J., Conde-Garrosa, R., del Fresno, C., and Sancho, D. (2016). Optimal Generation of Tissue-Resident but Not Circulating Memory T Cells during Viral Infection Requires Crosspriming by DNGR-1⁺ Dendritic Cells. *Immunity* 45, 847–860.
- Igea, J.M. (2013). The history of the idea of allergy.
- Igyártó, B.Z., Haley, K., Ortnier, D., Bobr, A., Gerami-Nejad, M., Edelson, B.T., Zurawski, S.M., Malissen, B., Zurawski, G., Berman, J., et al. (2011). Skin-Resident Murine Dendritic Cell Subsets Promote Distinct and Opposing Antigen-Specific T Helper Cell Responses. *Immunity* 35, 260–272.
- Ihara, F., Sakurai, D., Yonekura, S., Iinuma, T., Yagi, R., Sakurai, T., Ito, T., Matsuura, A., Morimoto, Y., Arai, T., et al. (2018). Identification of specifically reduced Th2 cell subsets in allergic rhinitis patients after sublingual immunotherapy. 73, 1823–1832.
- Inaba, K., Swiggard, W.J., Inaba, M., Meltzer, J., Mirza, A., Sasagawa, T., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (1995). Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell. Immunol.* 163, 148–156.
- Investigators, T.P.G. of C. (2018). AR101 Oral Immunotherapy for Peanut Allergy. *N. Engl. J. Med.* 379, 1991–2001.
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., and Hornbrook, M.M. (1966). Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J. Immunol.* 97, 840–853.
- Ito, S., Hirobe, S., Kuwabara, Y., Nagao, M., Saito, M., Quan, Y.S., Kamiyama, F., Fujisawa, T., and Okada, N. (2020). Immunogenicity of Milk Protein-Containing Hydrophilic Gel Patch for Epicutaneous Immunotherapy for Milk Allergy. *Pharm. Res.* 37.
- Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X.F., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y.J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J. Exp. Med.* 202, 1213–1223.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987–995.
- Jain, V. V., Businga, T.R., Kitagaki, K., George, C.L., O'Shaughnessy, P.T., and Kline, J.N. (2003). Mucosal immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides reverses a murine model of chronic asthma induced by repeated antigen exposure. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 285.
- Jamet, A., Botturi, K., Diquet, B., and Mollimard, M. (2006). Histamine : le rôle du médiateur. *Rev. Fr. d'Allergologie d'Immunologie Clin.* 46, 474–479.
- Jandl, C., Liu, S.M., Cañete, P.F., Warren, J., Hughes, W.E., Vogelzang, A., Webster, K., Craig, M.E., Uzel, G., Dent, A., et al. (2017). IL-21 restricts T follicular regulatory T cell proliferation through Bcl-6 mediated inhibition of responsiveness to IL-2. *Nat. Commun.* 8, 1–14.
- Jappe, U., Schwager, C., Schromm, A.B., Roldán, N.G., Stein, K., Heine, H., and Duda, K.A. (2019). Lipophilic allergens, different modes of allergen-lipid interaction and their impact on asthma and allergy. *Front. Immunol.* 10, 122.
- Jelding-Dannemand, E., Malby Schoos, A.M., and Bisgaard, H. (2015). Breast-feeding does not protect against allergic sensitization in early childhood and allergy-associated disease at age 7 years. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 1302-1308.e13.
- Jenmalm, M.C., and Björkstén, B. (2000). Cord blood levels of immunoglobulin G subclass antibodies to food and inhalant allergens in relation to maternal atopy and the development of atopic disease during the first 8 years of life. *Clin. Exp. Allergy* 30, 34–40.
- Jenny Valladeau, * Odile Ravel, *, Colette Dezutter-Dambuyant, †, Kevin Moore, ‡, Monique Kleijmeer, §, Ying Liu, ‡, Vale, et al. (2000). Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules. *Immunity*.
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151–155.
- Jiménez-Saiz, R., Chu, D.K., Mandur, T.S., Walker, T.D., Gordon, M.E., Chaudhary, R., Koenig, J., Saliba, S., Galipeau, H.J., Utley, A., et al. (2017). Lifelong memory responses perpetuate humoral T H 2 immunity and anaphylaxis in food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140.
- Jiménez-Saiz, R., Ellenbogen, Y., Koenig, J., Gordon, M.E., Walker, T.D., Rosace, D., Spill, P., Bruton, K., Kong, J., Monteiro, K., et al. (2018). IgG1 + B cell immunity predates IgE responses in epicutaneous sensitization to foods. *Allergy*.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H., and Lee, J.O. (2007). Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* 130, 1071–1082.
- Joffre, O.P., Sancho, D., Zelenay, S., Keller, A.M., and Reis E Sousa, C. (2010). Efficient and versatile manipulation of the peripheral CD4⁺ T-cell compartment by antigen targeting to DNGR-1/CLEC9A. *Eur. J. Immunol.* 40, 1255–1265.
- Johansson, S.G., Bennich, H., and Wide, L. (1968). A new class of immunoglobulin in human serum. *Immunology* 14, 265–272.
- Johansson, S.G.O., Hourihane, J.O., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M.L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., et al. (2001). A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56, 813–824.
- Johnson-Weaver, B.T., Sempowski, G.D., and Staats, H.F. (2019). Nasal peanut+ CpG immunotherapy enhances peanut-specific <sc>IFN</sc>- γ in Th2 cells and <sc>IL</sc>-10 in non-Th2 cells in mice. *Allergy* 74, 2220–2223.

- Johnston, L.K., Chien, K.B., and Bryce, P.J. (2014). The Immunology of Food Allergy. *J. Immunol.* 192, 2529–2534.
- Jones, S.M., Pons, L., Roberts, J.L., Scurlock, A.M., Perry, T.T., Kulis, M., Shreffler, W.G., Steele, P., Henry, K.A., Adair, M., et al. (2009). Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124.
- Jones, S.M., Agbotounou, W.K., Fleischer, D.M., Burks, A.W., Pesek, R.D., Harris, M.W., Martin, L., Thebault, C., Ruban, C., and Benhamou, P.-H.H. (2016). Safety of epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy: A phase 1 study using the Viaskin patch. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1258–1261.e10.
- Jones, S.M., Sicherer, S.H., Burks, A.W., Leung, D.Y.M.M., Lindblad, R.W., Dawson, P., Henning, A.K., Berin, M.C., Chiang, D., Vickery, B.P., et al. (2017). Epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy in children and young adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1242–1252.e9.
- Jönsson, F., Mancardi, D.A., Kita, Y., Karasuyama, H., Iannascoli, B., Van Rooijen, N., Shimizu, T., Daëron, M., and Bruhns, P. (2011). Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 121, 1484–1496.
- Joseph, C.L.M., Zoratti, E.M., Ownby, D.R., Havstad, S., Nicholas, C., Nageotte, C., Misiak, R., Enberg, R., Ezell, J., and Johnson, C.C. (2016). Exploring racial differences in IgE-mediated food allergy in the WHEALS birth cohort. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 116, 219–224.e1.
- Jun, J.C., Jones, M.B., Oswald, D.M., Sim, E.S., Jonnalagadda, A.R., Kreisman, L.S.C., and Cobb, B.A. (2017). T cell-intrinsic TLR2 stimulation promotes IL-10 expression and suppressive activity by CD45Rb^{hi} T cells. *PLoS One* 12.
- Junker, F., Gordon, J., and Qureshi, O. (2020). Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. *Front. Immunol.* 11, 1393.
- Jurkin, J., Krump, C., Köffel, R., Fieber, C., Schuster, C., Brunner, P.M., Borek, I., Eisenwort, G., Lim, C., Mages, J., et al. (2017). Human skin dendritic cell fate is differentially regulated by the monocyte identity factor Kruppel-like factor 4 during steady state and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1873–1884.e10.
- Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczyk, M., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2003). IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 33, 1205–1214.
- Kambayashi, T., and Koretzky, G.A. (2007). Proximal signaling events in Fc ϵ RI-mediated mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 544–552.
- Kamphorst, A.O., Guernonprez, P., Dudziak, D., and Nussenzweig, M.C. (2010). Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J. Immunol.* 185, 3426–3435.
- Kang, L.J., Vu, K.N., Koleva, P.T., Field, C.J., Chow, A., Azad, M.B., Becker, A.B., Mandhane, P.J., Moraes, T.J., Sears, M.R., et al. (2020). Maternal psychological distress before birth influences gut immunity in mid-infancy. *Clin. Exp. Allergy* 50, 178–188.
- Kang, S.W., Kim, S.H., Lee, N., Lee, W.-W., Hwang, K.-A., Shin, M.S., Lee, S.-H., Kim, W.-U., and Kang, I. (2012). 1,25-Dihydroxyvitamin D 3 Promotes FOXP3 Expression via Binding to Vitamin D Response Elements in Its Conserved Noncoding Sequence Region. *J. Immunol.* 188, 5276–5282.
- Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., and Thevenin, F. (2001). Population study of food allergy in France. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 133–140.
- Kaplan, D.H. (2017). Ontogeny and function of murine epidermal Langerhans cells. *Nat. Immunol.* 18, 1068–1075.
- Kaplan, D.H., Kissenpfennig, A., and Clausen, B.E. (2008). Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models. *Eur. J. Immunol.* 38, 2369–2376.
- Kashem, S.W., Riedl, M.S., Yao, C., Honda, C.N., Vulchanova, L., and Kaplan, D.H. (2015a). Nociceptive Sensory Fibers Drive Interleukin-23 Production from CD301b⁺ Dermal Dendritic Cells and Drive Protective Cutaneous Immunity. *Immunity* 43, 515–526.
- Kashem, S.W., Igyártó, B.Z., Gerami-Nejad, M., Kumamoto, Y., Mohammed, J., Jarrett, E., Drummond, R.A., Zurawski, S.M., Zurawski, G., Berman, J., et al. (2015b). *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. *Immunity* 42, 356–366.
- Kashem, S.W., Haniffa, M., and Kaplan, D.H. (2017). Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 469–499.
- Kashyap, M., Thornton, A.M., Norton, S.K., Barnstein, B., Macey, M., Brenzovich, J., Shevach, E., Leonard, W.J., and Ryan, J.J. (2008). Cutting Edge: CD4 T Cell-Mast Cell Interactions Alter IgE Receptor Expression and Signaling. *J. Immunol.* 180, 2039–2043.
- Kaufman, G.N., Massoud, A.H., Dembele, M., Yona, M., Piccirillo, C.A., and Mazer, B.D. (2015). Induction of regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: A bridge between adaptive and innate immunity. *Front. Immunol.* 6, 1.
- Kearley, J., Barker, J.E., Robinson, D.S., and Lloyd, C.M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J. Exp. Med.* 202, 1539–1547.
- Kearley, J., Robinson, D.S., and Lloyd, C.M. (2008). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122.
- Keet, C.A., Frischmeyer-Guerrero, P.A., Wessel, F., Thyagarajan, A., Schroeder, J.T., Hamilton, R.G., Boden, S., Steele, P., Driggers, S., Burks, A.W., et al. (2012). The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *Rev. Port. Imunoalergologia* 20, 66–67.
- Kelly, C., and Gangur, V. (2009). Sex Disparity in Food Allergy: Evidence from the PubMed Database. *J. Allergy.*
- Kennedy Norton, S., Barnstein, B., Brenzovich, J., Bailey, D.P., Kashyap, M., Speiran, K., Ford, J., Conrad, D., Watowich, S., Moralle, M.R., et al. (2008). IL-10 Suppresses Mast Cell IgE Receptor Expression and Signaling In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* 180, 2848–2854.
- Kerzl, R., Simonowa, A., Ring, J., Ollert, M., and Mempel, M. (2007). Life-threatening anaphylaxis to kiwi fruit: Protective sublingual allergen immunotherapy effect persists even after discontinuation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 507–508.
- Khodoun, M. V., Strait, R., Armstrong, L., Yanase, N., and Finkelman, F.D. (2011). Identification of markers that distinguish IgE- from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12413–12418.
- Kim, E.H., and Burks, A.W. (2020). Food allergy immunotherapy: OIT and EPIT. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*

- Kim, A.S., Doherty, T.A., Karta, M.R., Das, S., Baum, R., Rosenthal, P., Beppu, A., Miller, M., Kurten, R., and Broide, D.H. (2016a). Regulatory B cells and T follicular helper cells are reduced in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 1192-1195.e5.
- Kim, B.S., Miyagawa, F., Cho, Y.-H., Bennett, C.L., Clausen, B.E., and Katz, S.I. (2009). Keratinocytes function as accessory cells for presentation of endogenous antigen expressed in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2805-2817.
- Kim, B.S., Kim, I.K., Park, Y.J., Kim, Y.S., Kim, Y.J., Chang, W.S., Lee, Y.S., Kweon, M.N., Chung, Y., and Kang, C.Y. (2010). Conversion of Th2 memory cells into Foxp3+ regulatory T cells suppressing Th2-mediated allergic asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8742-8747.
- Kim, E.H., Bird, J.A., Kulis, M., Laubach, S., Pons, L., Shreffler, W., Steele, P., Kamilaris, J., Vickery, B., and Burks, A.W. (2011). Sublingual immunotherapy for peanut allergy: Clinical and immunologic evidence of desensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 640-646.e1.
- Kim, E.H., Yang, L., Ye, P., Guo, R., Li, Q., Kulis, M.D., and Burks, A.W. (2019). Long-term sublingual immunotherapy for peanut allergy in children: Clinical and immunologic evidence of desensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **144**, 1320-1326.e1.
- Kim, K.S., Hong, S.W., Han, D., Yi, J., Jung, J., Yang, B.G., Lee, J.Y., Lee, M., and Surh, C.D. (2016b). Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* (80-.). **351**, 858-863.
- Kim, S.-H., Kim, S.-H., Chung, S.-J., Kim, J.-H., Lee, S.-Y., Kim, B.-K., Lim, K.-W., and Chang, Y.-S. (2018a). Changes in basophil activation during immunotherapy with house dust mite and mugwort in patients with allergic rhinitis. *Asia Pac. Allergy* **8**.
- Kim, T.G., Kim, S.H., Park, J., Choi, W., Sohn, M., Na, H.Y., Lee, M., Lee, J.W., Kim, S.M., Kim, D.Y., et al. (2018b). Skin-Specific CD301b + Dermal Dendritic Cells Drive IL-17-Mediated Psoriasis-Like Immune Response in Mice. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 844-853.
- Kinaciyan, T., Nagl, B., Faustmann, S., Frommlet, F., Kopp, S., Wolkersdorfer, M., Wöhr, S., Bastl, K., Huber, H., Berger, U., et al. (2018). Efficacy and safety of 4 months of sublingual immunotherapy with recombinant Mal d 1 and Bet v 1 in patients with birch pollen-related apple allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 1002-1008.
- Kissenpfennig, A., Ait-Yahia, S., Clair-Moninot, V., Stössel, H., Badell, E., Bordat, Y., Pooley, J.L., Lang, T., Prina, E., Coste, I., et al. (2005a). Disruption of the langerin/CD207 Gene Abolishes Birbeck Granules without a Marked Loss of Langerhans Cell Function. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 88-99.
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., et al. (2005b). Dynamics and function of langerhans cells in vivo: Dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating langerhans cells. *Immunity* **22**, 643-654.
- Kitajima, M., and Ziegler, S.F. (2013). Cutting Edge: Identification of the Thymic Stromal Lymphopoietin-Responsive Dendritic Cell Subset Critical for Initiation of Type 2 Contact Hypersensitivity. *J. Immunol.* **191**, 4903-4907.
- Kitano, M., Yamazaki, C., Takumi, A., Ikeno, T., Hemmi, H., Takahashi, N., Shimizu, K., Fraser, S.E., Hoshino, K., Kaisho, T., et al. (2016). Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 1044-1049.
- Kitawaki, T., Kadowaki, N., Sugimoto, N., Kambe, N., Hori, T., Miyachi, Y., Nakahata, T., and Uchiyama, T. (2006). IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *Int. Immunol.* **18**, 1789-1799.
- Kitzmüller, C., Jahn-Schmid, B., Kinaciyan, T., and Bohle, B. (2019). Sublingual immunotherapy with recombinant Mal d 1 downregulates the allergen-specific Th2 response. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **74**, 1579-1581.
- Kleij, H.P.M., Warmenhoven, H.J.M., Ree, R., Versteeg, S.A., Pieters, R.H.H., Dreskin, S.C., Knulst, A.C., Hoffen, E., Opstelten, D.J.E., Koppelman, S.J., et al. (2019). Chemically modified peanut extract shows increased safety while maintaining immunogenicity. *Allergy* **74**, 986-995.
- Klicznik, M.M., Szenes-Nagy, A.B., Campbell, D.J., and Gratz, I.K. (2018). Taking the lead – how keratinocytes orchestrate skin T cell immunity. *Immunol. Lett.* **200**, 43-51.
- Klimek, L., Willers, J., Hammann-Haenni, A., Pfaar, O., Stocker, H., Mueller, P., Renner, W.A., and Bachmann, M.F. (2011). Assessment of clinical efficacy of CYT003-QbG10 in patients with allergic rhinoconjunctivitis: A phase IIb study. *Clin. Exp. Allergy* **41**, 1305-1312.
- Kobayashi, T., Glatz, M., Horiuchi, K., Kawasaki, H., Akiyama, H., Kaplan, D.H., Kong, H.H., Amagai, M., and Nagao, K. (2015). Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity* **42**, 756-766.
- Kobayashi, T., Shimabukuro-Demoto, S., Tsutsui, H., and Toyama-Sorimachi, N. (2019). Type I interferon limits mast cell-mediated anaphylaxis by controlling secretory granule homeostasis. *PLoS Biol.* **17**.
- Kodama, M., Asano, K., Oguma, T., Kagawa, S., Tomomatsu, K., Wakaki, M., Takihara, T., Ueda, S., Ohmori, N., Ogura, H., et al. (2010). Strain-Specific Phenotypes of Airway Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness Induced by Epicutaneous Allergen Sensitization in BALB/c and C57BL/6 Mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **152**, 67-74.
- Kolfschoten, M.V.D.N., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W.K., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., Den Bleker, T.H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L.A., et al. (2007). Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* (80-.). **317**, 1554-1557.
- Komata, T., Söderström, L., Borres, M.P., Tachimoto, H., and Ebisawa, M. (2007). The predictive relationship of food-specific serum IgE concentrations to challenge outcomes for egg and milk varies by patient age. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1272-1274.
- Komlósi, Z.I., Kovács, N., Sokolowska, M., van de Veen, W., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2020). Mechanisms of Subcutaneous and Sublingual Aeroallergen Immunotherapy: What Is New? *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **40**, 1-14.
- Koplin, J.J., Allen, K.J., and Tang, M.L.K. (2019). Important risk factors for the development of food allergy and potential options for prevention. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **15**, 147-152.
- Korenfeld, D., Gorvel, L., Munk, A., Man, J., Schaffer, A., Tung, T., Mann, C., and Klechevsky, E. (2017). A type of human skin dendritic cell marked by CD5 is associated with the development of inflammatory skin disease. *JCI Insight* **2**.
- Korotchenko, E., Moya, R., Scheibhofer, S., Joubert, I.A., Horejs-Hoeck, J., Hauser, M., Calzada, D., Iraola, V., Carnés, J., and Weiss, R. (2019). Laser facilitated epicutaneous immunotherapy with depigmented house dust mite extract alleviates allergic responses in a mouse model of allergic lung inflammation. *Allergy* **14**, 1164.

- Kotzerke, K., Mempel, M., Aung, T., Wulf, G.G., Urlaub, H., Wenzel, D., Schön, M.P., and Braun, A. (2013). Immunostimulatory activity of murine keratinocyte-derived exosomes. *Exp. Dermatol.* 22, 650–655.
- Koushki, K., Varasteh, A.R., Shahbaz, S.K., Sadeghi, M., Mashayekhi, K., Ayati, S.H., Moghadam, M., and Sankian, M. (2020). Dc-specific aptamer decorated gold nanoparticles: A new attractive insight into the nanocarriers for allergy epicutaneous immunotherapy. *Int. J. Pharm.* 584, 119403.
- Krempski, J.W., Iijima, K., Kobayashi, T., and Kita, H. (2019). Oral tolerance to peanut allergy is mediated by CTLA-4-positive regulatory T cells. *J. Immunol.* 202.
- Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., and Amagai, M. (2009). External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.* 206, 2937–2946.
- Kucuksezer, U.C., Ozdemir, C., Cevhertas, L., Ogulur, I., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2020). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and allergen tolerance. *Allergol. Int.*
- Kukkonen, A.K., Pelkonen, A.S., Mäkinen-Kiljunen, S., Voutilainen, H., and Mäkelä, M.J. (2015). Ara h 2 and Ara 6 are the best predictors of severe peanut allergy: A double-blind placebo-controlled study. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 1239–1245.
- Kulis, M.D., Smeekens, J.M., Kavanagh, K., and Jorgensen, M.J. (2020). Peanut applied to the skin of nonhuman primates induces antigen-specific IgG but not IgE. *Immunity, Inflamm. Dis.*
- Kumamoto, Y., Denda-Nagai, K., Aida, S., Higashi, N., and Irimura, T. (2009). MGL2+ dermal dendritic cells are sufficient to initiate contact hypersensitivity in vivo. *PLoS One* 4.
- Kumamoto, Y., Linehan, M., Weinstein, J.S., Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Iwasaki, A. (2013). CD301b+ dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity* 39, 733–743.
- Kumamoto, Y., Hirai, T., Wong, P.W., Kaplan, D.H., and Iwasaki, A. (2016). CD301B+ dendritic cells suppress T follicular helper cells and antibody responses to protein antigens. *Elife* 5.
- Kumar, M.N.K., Zhou, C., and Wu, M.X. (2016). Laser-facilitated epicutaneous immunotherapy to IgE-mediated allergy. *J. Control. Release* 235, 82–90.
- Lack, G. (2012). Update on risk factors for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1187–1197.
- Lack, G., Fox, D., Northstone, K., and Golding, J. (2003). Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N. Engl. J. Med.* 348, 977–985.
- Lahoud, M.H., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Wan, S.S., Vremec, D., Lee, C.-N., Phipson, B., Shi, W., Smyth, G.K., Lew, A.M., et al. (2011). Targeting Antigen to Mouse Dendritic Cells via Clec9A Induces Potent CD4 T Cell Responses Biased toward a Follicular Helper Phenotype. *J. Immunol.* 187, 842–850.
- Lange, C., Scholl, M., Melms, A., and Bischof, F. (2011). CD62Lhigh Treg cells with superior immunosuppressive properties accumulate within the CNS during remissions of EAE. *Brain. Behav. Immun.* 25, 120–126.
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Arch. Für Pathol. Anat. Und Physiol. Und Für Klin. Med.* 44, 325–337.
- Lao-Araya, M., Steveling, E., Scadding, G.W., Durham, S.R., and Shamji, M.H. (2014). Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 1193–1195.e4.
- Larsen, J.M., Bang-Berthelsen, C.H., Qvortrup, K., Sancho, A.I., Hansen, A.H., Andersen, K.I.H., Thacker, S.S.N., Eiwegger, T., Upton, J., and Bøgh, K.L. (2020). Production of allergen-specific immunotherapeutic agents for the treatment of food allergy. *Crit. Rev. Biotechnol.* 40, 881–894.
- Lau, M.Y.Z., Dharmage, S.C., Burgess, J.A., Win, A.K., Lowe, A.J., Lodge, C., Perret, J., Hui, J., Thomas, P.S., Morrison, S., et al. (2017). The interaction between farming/rural environment and TLR2, TLR4, TLR6 and CD14 genetic polymorphisms in relation to early- and late-onset asthma. *Sci. Rep.* 7, 1–9.
- Laurence Ardouin, A., Luche, H., Chelbi, R., Henri, S., Dalod, M., Malissen, B., Ardouin, L., Carpentier, S., Shawket, A., de Ric Montanana Sanchis, F., et al. (2016). Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. *Immunity* 45, 305–318.
- Lee, J.B., Chen, C.Y., Liu, B., Mugge, L., Angkasekwina, P., Facchinetti, V., Dong, C., Liu, Y.J., Rothenberg, M.E., Hogan, S.P., et al. (2016). IL-25 and CD4+ TH2 cells enhance type 2 innate lymphoid cell-derived IL-13 production, which promotes IgE-mediated experimental food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1216–1225.e5.
- Lehmann, C.H.K., Baranska, A., Heidkamp, G.F., Heger, L., Neubert, K., Lühr, J.J., Hoffmann, A., Reimer, K.C., Brückner, C., Beck, S., et al. (2017). DC subset-specific induction of T cell responses upon antigen uptake via Fcγ receptors in vivo. *J. Exp. Med.* 214, 1509–1528.
- Lelouard, H., Fallet, M., De Bovis, B., Méresse, S., and Gorvel, J. (2012). Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology* 142, 592–601.e3.
- León, B., López-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity* 26, 519–531.
- Leonard, S.A., Caubet, J.C., Kim, J.S., Groetch, M., and Nowak-Wegrzyn, A. (2015). Baked milk- and egg-containing diet in the management of milk and egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 3, 13–23.
- Leung, D.Y.M., Calatroni, A., Zaramela, L.S., LeBeau, P.K., Dyjack, N., Brar, K., David, G., Johnson, K., Leung, S., Ramirez-Gama, M., et al. (2019). The nonlesional skin surface distinguishes atopic dermatitis with food allergy as a unique endotype. *Sci. Transl. Med.* 11.
- Leung, N.Y.H., Wai, C.Y.Y., Shu, S.A., Chang, C.C., Chu, K.H., and Leung, P.S.C. (2017). Low-Dose Allergen-Specific Immunotherapy Induces Tolerance in a Murine Model of Shrimp Allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 174, 86–96.
- Lew, D.B., Michael, C.F., Overbeck, T., Robinson, W.S., Rohman, E.L., Lehman, J.M., Patel, J.K., Eiseman, B., Lemessurier, K.S., Samarasinghe, A.E., et al. (2017). Beneficial effects of prebiotic *saccharomyces cerevisiae* mannan on allergic asthma mouse models. *J. Immunol. Res.* 2017.
- Lewis, K.L., Caton, M.L., Bogunovic, M., Greter, M., Grajkowska, L.T., Ng, D., Klinakis, A., Charo, I.F., Jung, S., Gommerman, J.L., et al. (2011). Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine.

Immunity 35, 780–791.

- Leyva-Castillo, J.M., Hener, P., Michea, P., Karasuyama, H., Chan, S., Soumelis, V., and Li, M. (2013). Skin thymic stromal lymphopoietin initiates Th2 responses through an orchestrated immune cascade. *Nat. Commun.* 4, 1–12.
- Liao, S.L., Tsai, M.H., Yao, T.C., Hua, M.C., Yeh, K.W., Chiu, C.Y., Su, K.W., Huang, S.Y., Kao, C.C., Lai, S.H., et al. (2017). Caesarean Section is associated with reduced perinatal cytokine response, increased risk of bacterial colonization in the airway, and infantile wheezing. *Sci. Rep.* 7.
- Lim, K.P.H., Milne, P., Poidinger, M., Duan, K., Lin, H., McGovern, N., Abhyankar, H., Zinn, D., Burke, T.M., Eckstein, O.S., et al. (2020). Circulating CD1c+ myeloid dendritic cells are potential precursors to LCH lesion CD1a+CD207+ cells. *Blood Adv.* 4, 87–99.
- Ling, E.M., Smith, T., Nguyen, X.D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V.A., and Robinson, D.S. (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363, 608–615.
- Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* 207, 353–363.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17, 975–982.
- Liu, G.Y., Liu, Y., Lu, Y., Qin, Y.R., Di, G.H., Lei, Y.H., Liu, H.X., Li, Y.Q., Wu, C., Hu, X.W., et al. (2016). Short-term memory of danger signals or environmental stimuli in mesenchymal stem cells: Implications for therapeutic potential. *Cell. Mol. Immunol.* 13, 369–378.
- Liu, X., Feng, B.S., Kong, X., Xu, H., Li, X., Yang, P.C., and Liu, Z. (2013a). Food-cooking processes modulate allergenic properties of Hen's egg white proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 160, 134–142.
- Liu, Z.Q., Wu, Y., Song, J.P., Liu, X., Liu, Z., Zheng, P.Y., and Yang, P.C. (2013b). Tolerogenic CX3CR1+ B cells suppress food allergy-induced intestinal inflammation in mice. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 68, 1241–1248.
- Lombardi, V., Beuraud, C., Neukirch, C., Moussu, H., Morizur, L., Horiot, S., Luce, S., Wambre, E., Linsley, P., Chollet-Martin, S., et al. (2016). Circulating innate lymphoid cells are differentially regulated in allergic and nonallergic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 305–308.
- Longo, G., Barbi, E., Berti, I., Meneghetti, R., Pittalis, A., Ronfani, L., and Ventura, A. (2008). Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 343–347.
- Loo, E.X.L., Sim, J.Z.T., Loy, S.L., Goh, A., Chan, Y.H., Tan, K.H., Yap, F., Gluckman, P.D., Godfrey, K.M., Van Bever, H., et al. (2017). Associations between caesarean delivery and allergic outcomes: Results from the GUSTO study. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 118, 636–638.
- Looney, T.J., Lee, J.Y., Roskin, K.M., Hoh, R.A., King, J., Glanville, J., Liu, Y., Pham, T.D., Dekker, C.L., Davis, M.M., et al. (2016). Human B-cell isotype switching origins of IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 579–586.e7.
- López-Expósito, I., Song, Y., Järvinen, K.M., Srivastava, K., and Li, X.M. (2009). Maternal peanut exposure during pregnancy and lactation reduces peanut allergy risk in offspring. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 1039–1046.
- Vander Lugt, B., Riddell, J., Khan, A.A., Hackney, J.A., Lesch, J., DeVoss, J., Weirauch, M.T., Singh, H., and Mellman, I. (2017). Transcriptional determinants of tolerogenic and immunogenic states during dendritic cell maturation. *J. Cell Biol.* 216, 779–792.
- Lundberg, K., Rydnert, F., Broos, S., Andersson, M., Greiff, L., and Lindstedt, M. (2016a). C-type Lectin Receptor Expression on Human Basophils and Effects of Allergen-Specific Immunotherapy. *Scand. J. Immunol.* 84, 150–157.
- Lundberg, K., Rydnert, F., Broos, S., Andersson, M., Greiff, L., and Lindstedt, M. (2016b). Allergen-Specific Immunotherapy Alters the Frequency, as well as the FcR and CLR Expression Profiles of Human Dendritic Cell Subsets. *PLoS One* 11, e0148838.
- Luo, Y., Cai, X., Liu, S., Wang, S., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Bufler, P., Norris, D., Dinarello, C.A., and Fujita, M. (2014). Suppression of antigen-specific adaptive immunity by IL-37 via induction of tolerogenic dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 15178–15183.
- Luo, Y., Wang, S., Liu, X., Wen, H., Li, W., and Yao, X. (2019). Langerhans cells mediate the skin-induced tolerance to ovalbumin via Langerin in a murine model. *Allergy* 74, 1738–1747.
- Lupinek, C., Hochwallner, H., Johansson, C., Mie, A., Rigler, E., Scheynius, A., Alm, J., and Valenta, R. (2019). Maternal allergen-specific IgG might protect the child against allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, 536–548.
- Luu, M., Monning, H., and Visekruna, A. (2020). Exploring the Molecular Mechanisms Underlying the Protective Effects of Microbial SCFAs on Intestinal Tolerance and Food Allergy. *Front. Immunol.* 11.
- Macey, M.R., Sturgill, J.L., Morales, J.K., Falanga, Y.T., Morales, J., Norton, S.K., Yerram, N., Shim, H., Fernando, J., Gifillan, A.M., et al. (2010). IL-4 and TGF- β 1 Counterbalance One Another while Regulating Mast Cell Homeostasis. *J. Immunol.* 184, 4688–4695.
- Machado, Y., Duinkerken, S., Hoepfänger, V., Mayr, M., Korotchenko, E., Kurtaj, A., Pablos, I., Steiner, M., Stoecklinger, A., Lübbers, J., et al. (2017). Synergistic effects of dendritic cell targeting and laser-microporation on enhancing epicutaneous skin vaccination efficacy. *J. Control. Release* 266, 87–99.
- Magnan, A., Marin, V., Mély, L., Birnbaum, J., Romanet, S., Bongrand, P., and Vervloet, D. (2001). Venom immunotherapy induces monocyte activation. *Clin. Exp. Allergy* 31, 1303–1309.
- Mäkinen-Kiljunen, S., and Mussalo-Rauhamaa, H. (2002). Casein, an important house dust allergen. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 57, 1084–1085.
- Malbec, O., Roget, K., Schiffer, C., Iannascoli, B., Dumas, A.R., Arock, M., and Daéron, M. (2007). Peritoneal Cell-Derived Mast Cells: An In Vitro Model of Mature Serosal-Type Mouse Mast Cells. *J. Immunol.* 178, 6465–6475.
- Malissen, B., Tamoutounour, S., and Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 417–428.
- Maloney, J.M., Rudengren, M., Ahlstedt, S., Bock, S.A., and Sampson, H.A. (2008). The use of serum-specific IgE measurements

- for the diagnosis of peanut, tree nut, and seed allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 145–151.
- Mann-Chandler, M.N., Kashyap, M., Wright, H. V., Norozian, F., Barnstein, B.O., Gingras, S., Parganas, E., and Ryan, J.J. (2005). IFN- γ Induces Apoptosis in Developing Mast Cells. *J. Immunol.* 175, 3000–3005.
- Martinet, J., Couderc, L., Renosi, F., Bobée, V., Marguet, C., and Boyer, O. (2016). Diagnostic Value of Antigen-Specific Immunoglobulin E Immunoassays against Ara h 2 and Ara h 8 Peanut Components in Child Food Allergy.
- Martínez-Cingolani, C., Grandclaudeon, M., Jeanmougin, M., Jouve, M., Zollinger, R., and Soumelis, V. (2014). Human blood BDCA-1 dendritic cells differentiate into Langerhans-like cells with thymic stromal lymphopoietin and TGF- β . *Blood* 124, 2411–2420.
- Martínez-López, M., Iborra, S., Conde-Garrosa, R., and Sancho, D. (2015). Batf3-dependent CD103⁺ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania major* infection in mice. *Eur. J. Immunol.* 45, 119–129.
- Martino, D., Joo, J.E., Sexton-Oates, A., Dang, T., Allen, K., Saffery, R., and Prescott, S. (2014). Epigenome-wide association study reveals longitudinally stable DNA methylation differences in CD4⁺ T cells from children with IgE-mediated food allergy. *Epigenetics* 9, 998–1006.
- Martino, D.J., Bosco, A., McKenna, K.L., Hollams, E., Mok, D., Holt, P.G., and Prescott, S.L. (2012). T-cell activation genes differentially expressed at birth in CD4⁺ T-cells from children who develop IgE food allergy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 191–200.
- Mascarell, L., Saint-Lu, N., Moussu, H., Zimmer, A., Louise, A., Lone, Y., Ladant, D., Leclerc, C., Tourdot, S., Van Overtvelt, L., et al. (2011). Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunol.* 4, 638–647.
- Mashayekhi, M., Sandau, M.M., Dunay, I.R., Frickel, E.M., Khan, A., Goldszmid, R.S., Sher, A., Ploegh, H.L., Murphy, T.L., Sibley, L.D., et al. (2011). CD8 α ⁺ Dendritic Cells Are the Critical Source of Interleukin-12 that Controls Acute Infection by *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. *Immunity* 35, 249–259.
- Matjeka, T., Summerfield, V., Noursadeghi, M., and Chain, B.M. (2012). Chemical toxicity to keratinocytes triggers dendritic cell activation via an IL-1 α path. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129.
- Matsui, K., and Nishikawa, A. (2005). Percutaneous application of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces an increase in mast cell numbers in the dermis of mice. *Clin. Exp. Allergy* 35, 382–387.
- Matsui, K., Tofukuji, S., and Ikeda, R. (2015). CCL17 production by mouse langerhans cells stimulated with *Staphylococcus aureus* cell wall components. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 317–320.
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1⁺ Macrophages to CD103⁺ Dendritic Cells. *Immunity* 40, 248–261.
- Mc Dermott, R., Ziyhan, U., Spehner, D., Bausinger, H., Lipsker, D., Mommaas, M., Cazenave, J.P., Raposo, G., Goud, B., De la Salle, H., et al. (2002). Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates. *Mol. Biol. Cell* 13, 317–335.
- McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., et al. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489–3497.
- McLeod, J.J.A., Baker, B., and Ryan, J.J. (2015). Mast cell production and response to IL-4 and IL-13. *Cytokine* 75, 57–61.
- Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2008). Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 1455–1463.
- Mekori, Y.A., and Hershko, A.Y. (2012). T Cell-Mediated Modulation of Mast Cell Function: Heterotypic Adhesion-Induced Stimulatory or Inhibitory Effects. *Front. Immunol.* 3, 6.
- Melén, E., Nyberg, F., Lindgren, C.M., Berglund, N., Zucchelli, M., Nordling, E., Hallberg, J., Svartengren, M., Morgenstern, R., Kere, J., et al. (2008). Interactions between glutathione S-Transferase P1, tumor necrosis factor, and traffic-related air pollution for development of childhood allergic disease. *Environ. Health Perspect.* 116, 1077–1084.
- Mempel, M., Rakoski, J., Ring, J., and Ollert, M. (2003). Severe anaphylaxis to kiwi fruit: Immunologic changes related to successful sublingual allergen immunotherapy [3]. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 1406–1409.
- Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* 3, 1135–1141.
- Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 935–947.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.
- Mercedes Gomez de Agüero, Vocanson, M., Hacini-Rachinel, F.F., Taillardet, M., Sparwasser, T., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaiserlian, D., Dubois, B., Agüero, M.G. de, et al. (2012). Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8⁺ T cells and activating Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Clin. ...* 122.
- Meulenbroek, L.A.P.M., de Jong, R.J., den Hartog Jager, C.F., Monsuur, H.N., Wouters, D., Nauta, A.J., Knippels, L.M.J., van Neerven, R.J.J., Ruiter, B., Leusen, J.H.W., et al. (2013). IgG Antibodies in Food Allergy Influence Allergen–Antibody Complex Formation and Binding to B Cells: A Role for Complement Receptors. *J. Immunol.* 191, 3526–3533.
- Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jojic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., et al. (2012). Deciphering the transcriptional network of the DC lineage. *Nat. Immunol.* 13, 888–899.
- Mills, C.D., and Ley, K. (2014). M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. *J. Innate Immun.* 6, 716–726.
- Mirotti, L., Florsheim, E., Rundqvist, L., Larsson, G., Spinozzi, F., Leite-De-Moraes, M., Russo, M., and Alcocer, M. (2013). Lipids are required for the development of Brazil nut allergy: The role of mouse and human iNKT cells. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 68, 74–83.
- Misharin, A.V., Cuda, C.M., Saber, R., Turner, J.D., Gierut, A.K., Haines, G.K., Berdnikovs, S., Filer, A., Clark, A.R., Buckley, C.D., et al. (2014). Nonclassical Ly6C⁺ Monocytes Drive the Development of Inflammatory Arthritis in Mice. *Cell Rep.* 9, 591–604.

- Mitroulis, I., Ruppova, K., Wang, B., Chen, L.-S., Grzybek, M., Grinenko, T., Eugster, A., Troullinaki, M., Palladini, A., Kourtzelis, I., et al. (2018). Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell* 172, 147-161.e12.
- Mitsias, D.I., Xepapadaki, P., Makris, M., and Papadopoulos, N.G. (2020). Immunotherapy in allergic diseases — improved understanding and innovation for enhanced effectiveness. *Curr. Opin. Immunol.* 66, 1–8.
- Mittag, D., Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B.K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W.M., Koppelman, S.J., Knulst, A.C., Helbling, A., Hefle, S.L., et al. (2004). Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1410–1417.
- Mithamsiri, W., Pradubpongsa, P., Sangasapaviliya, A., and Boonpiyathad, T. (2018). Decreased CRTH2 expression and response to allergen re-stimulation on innate lymphoid cells in patients with allergen-specific immunotherapy. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* 10, 662–674.
- Mizutani, H., Black, R., and Kupper, T.S. (1991). 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.
- Möbs, C., Ipsen, H., Mayer, L., Slotosch, C., Petersen, A., Würtzen, P.A., Hertl, M., and Pfützner, W. (2012). Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130.
- Mohammed, J., Gunderson, A.J., Khong, H.H., Koubek, R.D., Udey, M.C., and Glick, A.B. (2013). TGFβ1 overexpression by keratinocytes alters skin dendritic cell homeostasis and enhances contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 133, 135–143.
- Mohammed, J., Beura, L.K., Bobr, A., Astry, B., Chicoine, B., Kashem, S.W., Welty, N.E., Igyártó, B.Z., Wijeyesinghe, S., Thompson, E.A., et al. (2016). Stromal cells control the epithelial residence of DCs and memory T cells by regulated activation of TGF-β. *Nat. Immunol.*
- Moitra, S., Datta, A., Mondal, S., Hazra, I., Faruk, S.M.O., Das, P.K., Basu, A.K., Tripathi, S.K., and Chaudhuri, S. (2017). Modulation of regulatory T cells by intranasal allergen immunotherapy in an experimental rat model of airway allergy. *Int. Immunopharmacol.* 47, 9–19.
- Mondoulet, Dioszeghy, V., Ligouis, M., Dhelft, V., Dupont, C., and Benhamou, P.-H. (2009). Epicutaneous immunotherapy on intact skin using a new delivery system in a murine model of allergy. *Clin. Exp. Allergy* 40, 659–667.
- Mondoulet, Dioszeghy, V., Puteaux, E., Ligouis, M., Dhelft, V., Letourneur, F., Dupont, C., and Benhamou, P.-H. (2012a). Intact skin and not stripped skin is crucial for the safety and efficacy of peanut epicutaneous immunotherapy (EPIT) in mice. *Clin. Transl. Allergy* 2, 22.
- Mondoulet, L., Dioszeghy, V., Vanoirbeek, J. a. J., Nemery, B., Dupont, C., and Benhamou, P.-H.P.-H. (2011). Epicutaneous Immunotherapy Using a New Epicutaneous Delivery System in Mice Sensitized to Peanuts. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 154, 299–309.
- Mondoulet, L., Dioszeghy, V., Larcher, T., Ligouis, M., Dhelft, V., Puteaux, E., Cherel, Y., Letourneur, F., Dupont, C., and Benhamou, P.-H. (2012b). Epicutaneous Immunotherapy (EPIT) Blocks the Allergic Esophago-Gastro-Enteropathy Induced by Sustained Oral Exposure to Peanuts in Sensitized Mice. *PLoS One* 7, e31967.
- Mondoulet, L., Dioszeghy, V., Puteaux, E., Ligouis, M., Dhelft, V., Plaquet, C., Dupont, C., and Benhamou, P.-H. (2015). Specific epicutaneous immunotherapy prevents sensitization to new allergens in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1546-1557.e4.
- Mondoulet, L., Dioszeghy, V., Busato, F., Plaquet, C., Dhelft, V., Bethune, K., Leclere, L., Daviaud, C., Ligouis, M., Sampson, H., et al. (2019). Gata3 hypermethylation and Foxp3 hypomethylation are associated with sustained protection and bystander effect following epicutaneous immunotherapy in peanut-sensitized mice. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 74, 152–164.
- Mondoulet et al. (2012c). Epicutaneous Immunotherapy Compared with Sublingual Immunotherapy in Mice Sensitized to Pollen (Phleum pratense). *ISRN Allergy* 2012.
- Moneret-Vautrin, D.-A. (2008). Épidémiologie de l'allergie alimentaire. *Rev. Française d'Allergologie d'Immunologie Clin.* 48, 171–178.
- De Monte, A., Olivieri, C.V., Vitale, S., Bailleux, S., Castillo, L., Giordanengo, V., Maryanski, J.L., Segura, E., and Doglio, A. (2016). CD1c-related DCs that express CD207/langerin, but are distinguishable from Langerhans cells, are consistently present in human tonsils. *Front. Immunol.* 7, 25.
- van Montfoort, N., 't Hoen, P.A.C., Mangsbo, S.M., Camps, M.G.M., Boross, P., Melief, C.J.M., Ossendorp, F., and Verbeek, J.S. (2012). Fcγ Receptor IIb Strongly Regulates Fcγ Receptor-Facilitated T Cell Activation by Dendritic Cells. *J. Immunol.* 189, 92–101.
- Morita, H., Kubo, T., Rückert, B., Ravindran, A., Soyka, M.B., Rinaldi, A.O., Sugita, K., Wawrzyniak, M., Wawrzyniak, P., Motomura, K., et al. (2019). Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid. *J. Allergy Clin. Immunol.* 143, 2190-2201.e9.
- Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S.P., Belkaid, Y., and Merad, M. (2014). Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* (80-.). 343.
- Mosley, Y.Y.C., Lu, F., and HogenEsch, H. (2017). Differences in innate IFNγ and IL-17 responses to Bordetella pertussis between BALB/c and C57BL/6 mice: role of γδT cells, NK cells, and dendritic cells. *Immunol. Res.* 65, 1139–1149.
- Mothes, N., Heinzkill, M., Drachenberg, K.J., Sperr, W.R., Krauth, M.T., Majlesi, Y., Semper, H., Valent, P., Niederberger, V., Kraft, D., et al. (2003). Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: Reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin. Exp. Allergy* 33, 1198–1208.
- Moutel, S., Beugnet, A., Schneider, A., Lombard, B., Loew, D., Amigorena, S., Perez, F., and Segura, E. (2020). Surface LSP-1 Is a Phenotypic Marker Distinguishing Human Classical versus Monocyte-Derived Dendritic Cells. *IScience* 23.
- Mudde, G.C., van Reijssen, F.C., and Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M. (1992). IgE-Positive Langerhans cells and TH2 allergen-specific T cells in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 99, S103.
- Murakami-Satsutani, N., Ito, T., Nakanishi, T., Inagaki, N., Tanaka, A., Vien, P.T.X., Kibata, K., Inaba, M., and Nomura, S. (2014). IL-33 Promotes the Induction and Maintenance of Th2 Immune Responses by Enhancing the Function of OX40 Ligand. *Allergol.*

Int. 63, 443–455.

- Muraro, A., Fernandez-Rivas, I. M., Beyer, K., Cardona, V., Clark, A., Eller, E., Hourihane, B., Jutel, M., Sheikh, A., Agache, I., et al. (2018). The urgent need for a harmonized severity scoring system for acute allergic reactions. *Allergy* 73, 1792–1800.
- Nabeshima, Y., Hiragun, T., Morita, E., Mihara, S., Kameyoshi, Y., and Hide, M. (2005). IL-4 modulates the histamine content of mast cells in a mast cell/fibroblast co-culture through a Stat6 signaling pathway in fibroblasts. *FEBS Lett.* 579, 6653–6658.
- Nagao, K., Kobayashi, T., Moro, K., Ohyama, M., Adachi, T., Kitashima, D.Y., Ueha, S., Horiuchi, K., Tanizaki, H., Kabashima, K., et al. (2012). Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat. Immunol.* 13, 744–752.
- Nagao, M., Hiraguchi, Y., Hosoki, K., Tokuda, R., Usui, T., Masuda, S., Yamaguchi, M., and Fujisawa, T. (2008). Allergen-induced basophil CD203c expression as a biomarker for rush immunotherapy in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 146 Suppl 1, 47–53.
- Nagashima, M., Koyanagi, M., and Arimura, Y. (2019). Comparative Analysis of Bone Marrow-derived Mast Cell Differentiation in C57BL/6 and BALB/c Mice. *Immunol. Invest.* 48, 303–320.
- Naik, S., Bouladoux, N., Linehan, J.L., Han, S.J., Harrison, O.J., Wilhelm, C., Conlan, S., Himmelfarb, S., Byrd, A.L., Deming, C., et al. (2015). Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* 520, 104–108.
- Naik, S., Larsen, S.B., Gomez, N.C., Alaverdyan, K., Sendoel, A., Yuan, S., Polak, L., Kulukian, A., Chai, S., and Fuchs, E. (2017). Inflammatory memory sensitizes skin epithelial stem cells to tissue damage. *Nature* 550, 475–480.
- Nakajima, S., Igyártó, B.Z., Honda, T., Egawa, G., Otsuka, A., Hara-Chikuma, M., Watanabe, N., Ziegler, S.F., Tomura, M., Inaba, K., et al. (2012). Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1048–55.e6.
- Nakano, H., Free, M.E., Whitehead, G.S., Maruoka, S., Wilson, R.H., Nakano, K., and Cook, D.N. (2012). Pulmonary CD103 + dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens. *Mucosal Immunol.* 5, 53–65.
- Naoko Kanda, K.T. (1999). Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 282–288.
- Narisety, S.D., Skripak, J.M., Steele, P., Hamilton, R.G., Matsui, E.C., Burks, A.W., and Wood, R.A. (2009). Open-label maintenance after milk oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 610–612.
- Narisety, S.D., Frischmeyer-Guerrero, P.A., Keet, C.A., Gorelik, M., Schroeder, J., Hamilton, R.G., and Wood, R.A. (2015). A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1275–1282.e6.
- Narita, S.I., Goldblum, R.M., Watson, C.S., Brooks, E.G., Estes, D.M., Curran, E.M., and Midoro-Horiuti, T. (2007). Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators. *Environ. Health Perspect.* 115, 48–52.
- Natsuaki, Y., Egawa, G., Nakamizo, S., Ono, S., Hanakawa, S., Okada, T., Kusuba, N., Otsuka, A., Kitoh, A., Honda, T., et al. (2014). Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat. Immunol.* 15, 1064–1069.
- Nelson, H.S., Lahr, J., Rule, R., Bock, A., and Leung, D. (1997). Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, 744–751.
- Netea, M.G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L.B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L.A.B., van der Meer, J.W.M., Mhlanga, M.M., Mulder, W.J.M., et al. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*
- NIAD-Sponsored Expert Panel, J.A., Boyce, J.A., Assa'ad, A., Burks, A.W., Jones, S.M., Sampson, H.A., Wood, R.A., Plaut, M., Cooper, S.F., Fenton, M.J., et al. (2010). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAD-sponsored expert panel. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, S1–58.
- Nicolas Kalach, MD, P., A. B., Pascale Soulaïnes, M., A., Delphine de Boissieu, M., A., And, Christophe Dupont, MD, P., and A. C. (2005). A pilot study of the usefulness and safety of a ready-to-use atopy patch test. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Niggemann, B., and Beyer, K. (2016). Time for a new grading system for allergic reactions? *Allergy* 71, 135–136.
- Nikolic, T., and Roep, B.O. (2013). Regulatory multitasking of tolerogenic dendritic cells - lessons taken from vitamin D3-treated tolerogenic dendritic cells. *Front. Immunol.* 4.
- Nikolic, T., Woittiez, N.J.C., van der Slik, A., Laban, S., Joosten, A., Gysemans, C., Mathieu, C., Zwaginga, J.J., Koeleman, B., and Roep, B.O. (2017). Differential transcriptome of tolerogenic versus inflammatory dendritic cells points to modulated T1D genetic risk and enriched immune regulation. *Genes Immun.* 18, 176–183.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V (2006). Fcγ Receptors: Old Friends and New Family Members. *Immunity* 24, 19–28.
- Noti, M., Kim, B.S., Siracusa, M.C., Rak, G.D., Kubo, M., Moghaddam, A.E., Sattentau, Q.A., Comeau, M.R., Spergel, J.M., and Artis, D. (2014). Exposure to food allergens through inflamed skin promotes intestinal food allergy through the thymic stromal lymphopoietin-basophil axis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133.
- Nouri-Aria, K.T., Pilette, C., Jacobson, M.R., Watanabe, H., and Durham, S.R. (2005). IL-9 and c-Kit+ mast cells in allergic rhinitis during seasonal allergen exposure: Effect of immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 73–79.
- Novak, N., Koch, S., Allam, J.-P., and Bieber, T. (2010). Dendritic cells: Bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 50–59.
- Novak, N., Mete, N., Bussmann, C., Maintz, L., Bieber, T., Akdis, M., Zumkehr, J., Jutel, M., and Akdis, C. (2012). Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130.
- Noval Rivas, M., Burton, O.T., Wise, P., Zhang, Y.Q., Hobson, S.A., Garcia Lloret, M., Chehoud, C., Kuczynski, J., Desantis, T., Warrington, J., et al. (2013). A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 201–212.
- Noval Rivas, M., Burton, O.T., Oettgen, H.C., and Chatila, T. (2016). IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 801–811.e9.
- Nowak-Węgrzyn, A., Szajewska, H., and Lack, G. (2017). Food allergy and the gut. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 241–

- Nutsch, K., Chai, J.N., Ai, T.L., Russler-Germain, E., Feehley, T., Nagler, C.R., and Hsieh, C.S. (2016). Rapid and Efficient Generation of Regulatory T Cells to Commensal Antigens in the Periphery. *Cell Rep.* 17, 206–220.
- O'Brien, E., Dolinoy, D.C., and Mancuso, P. (2014). Bisphenol A at concentrations relevant to human exposure enhances histamine and cysteinyl leukotriene release from bone marrow-derived mast cells. *J. Immunotoxicol.* 11, 84–89.
- O'Hehir, R.E., Gardner, L.M., De Leon, M.P., Hales, B.J., Biondo, M., Douglass, J.A., Rolland, J.M., and Sandrini, A. (2009). House dust mite sublingual immunotherapy: The role for transforming growth factor- β and functional regulatory T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 936–947.
- Ochi, H., De Jesus, N.H., Hsieh, F.H., Austen, K.F., and Boyce, J.A. (2000). IL-4 and -5 prime human mast cells for different profiles of IgE-dependent cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10509–10513.
- Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118, 240–249.
- Oefner, C.M., Winkler, A., Hess, C., Lorenz, A.K., Holeciska, V., Huxdorf, M., Schommartz, T., Petzold, D., Bitterling, J., Schoen, A.L., et al. (2012). Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1647–1655.e13.
- Ogawa, Y., and Grant, J.A. (2007). Mediators of Anaphylaxis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 27, 249–260.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., and Förster, R. (2004). CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21, 279–288.
- Ohsaki A1, Venturelli N1, Buccigrosso TM2, Osganian SK2, Lee J1,3, Blumberg RS4,5,6, Oyoshi MK7, 3. (2018). Maternal IgG immune complexes induce food allergen-specific tolerance in offspring. *J. Exp. Med.* 215, 91–113.
- Okayama, Y., Kirshenbaum, A.S., and Metcalfe, D.D. (2000). Expression of a Functional High-Affinity IgG Receptor, Fc γ RI, on Human Mast Cells: Up-Regulation by IFN- γ . *J. Immunol.* 164, 4332–4339.
- Okumura, K., Saito, M., Yoshizawa, Y., Ito, Y., Isogai, E., Araki, K., and Wakabayashi, Y. (2020). Pak1 maintains epidermal stem cells by regulating Langerhans cells and is required for skin carcinogenesis. *Oncogene* 39, 4756–4769.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. (2008). Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10113–10118.
- Ordovas-Montanes, J., Dwyer, D.F., Nyquist, S.K., Buchheit, K.M., Vukovic, M., Deb, C., Wadsworth, M.H., Hughes, T.K., Kazer, S.W., Yoshimoto, E., et al. (2018). Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells. *Nature* 560, 649–654.
- Orengo, J.M., Radin, A.R., Kamat, V., Badithe, A., Ben, L.H., Bennett, B.L., Zhong, S., Birchard, D., Limnander, A., Rafique, A., et al. (2018). Treating cat allergy with monoclonal IgG antibodies that bind allergen and prevent IgE engagement. *Nat. Commun.* 9.
- Orgel, K., Burk, C., Smeekens, J., Suber, J., Hardy, L., Guo, R., Burks, A.W., and Kulis, M. (2018). Blocking antibodies induced by peanut oral and sublingual immunotherapy suppress basophil activation and are associated with sustained unresponsiveness. *Clin. Exp. Allergy*.
- Oriel, R.C., and Wang, J. (2019). Diagnosis and Management of Food Allergy. *Pediatr. Clin. North Am.* 66, 941–954.
- Osborne, N.J., Koplin, J.J., Martin, P.E., Gurrin, L.C., Lowe, A.J., Matheson, M.C., Ponsonby, A.-L.L., Wake, M., Tang, M.L.K., Dharmage, S.C., et al. (2011). Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 668–676.e2.
- Ouchi, T., Kubo, A., Yokouchi, M., Adachi, T., Kobayashi, T., Kitashima, D.Y., Fujii, H., Clausen, B.E., Koyasu, S., Amagai, M., et al. (2011). Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J. Exp. Med.* 208, 2607–2613.
- Ouchi, T., Nakato, G., and Udey, M.C. (2016). EpCAM Expressed by Murine Epidermal Langerhans Cells Modulates Immunization to an Epicutaneously Applied Protein Antigen. *J. Invest. Dermatol.* 136, 1627–1635.
- Ouweland, K., Santegoets, S.J.A.M., Bruynzeel, D.P., Scheper, R.J., de Gruij, T.D., and Gibbs, S. (2008). CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur. J. Immunol.* 38, 3050–3059.
- Oyoshi, M.K., Larson, R.P., Ziegler, S.F., and Geha, R.S. (2010). Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a TH2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126.
- Pajno, G.B., Fernandez-Rivas, M., Arasi, S., Roberts, G., Akdis, C.A., Alvaro-Lozano, M., Beyer, K., Bindslev-Jensen, C., Burks, W., Ebisawa, M., et al. (2018). EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: IgE-mediated food allergy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 799–815.
- Palaniyandi, S., Watanabe, K., Ma, M., Tachikawa, H., Kodama, M., and Aizawa, Y. (2004). Inhibition of mast cells by interleukin-10 gene transfer contributes to protection against acute myocarditis in rats. *Eur. J. Immunol.* 34, 3508–3515.
- Palladino, C., Narzt, M.S., Bublin, M., Schreiner, M., Humeniuk, P., Gschwandtner, M., Hafner, C., Hemmer, W., Hoffmann-Sommergruber, K., Mildner, M., et al. (2018). Peanut lipids display potential adjuvanticity by triggering a pro-inflammatory response in human keratinocytes. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 1746–1749.
- Palma-Carlos, A.G. (1967). Traitement co-saisonnier des pollinoses au Portugal par la méthode des quadrillages cutanés. *Rev. Fr. d'Allergie* 7, 92–95.
- Palomares, F., Gomez, F., Bogas, G., Campo, P., Perkins, J.R., Diaz-Perales, A., Rodriguez, M.J., Prieto, A., Barber, D., Torres, M.J., et al. (2018). Immunological Changes Induced in Peach Allergy Patients with Systemic Reactions by Pru p 3 Sublingual Immunotherapy. *Mol. Nutr. Food Res.* 62.
- Papathoma, E., Triga, M., Fouzas, S., and Dimitriou, G. (2016). Cesarean section delivery and development of food allergy and atopic dermatitis in early childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.* 27, 419–424.
- Park, H.-Y., Light, A., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Tarlinton, D.M., and Shortman, K. (2013). Evolution of B Cell Responses to Clec9A-Targeted Antigen. *J. Immunol.* 191, 4919–4925.

- Patil, S.U., Steinbrecher, J., Calatroni, A., Smith, N., Ma, A., Ruiter, B., Virkud, Y., Schneider, M., and Shreffler, W.G. (2019). Early decrease in basophil sensitivity to Ara h 2 precedes sustained unresponsiveness after peanut oral immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **144**, 1310–1319.e4.
- Pautrizel, R., Cabanieu, G., Bricaud, H., and Broustet, P. (1957). Allergenic group specificity & therapeutic consequences in asthma; specific desensitization method by epicutaneous route. *Sem Hop.*
- Peiser, M., Grützkau, A., Wanner, R., and Kolde, G. (2003). CD1a and CD1c cell sorting yields a homogeneous population of immature human Langerhans cells. *J. Immunol. Methods* **279**, 41–53.
- Pelletier, B., Perrin, A., Assoun, N., Plaquet, C., Oreal, N., Gaulme, L., Bouzereau, A., Labernardière, J.-L.J., Ligouis, M., Dioszeghy, V., et al. (2020). Epicutaneous immunotherapy protects cashew sensitized mice from anaphylaxis. *Allergy* **all.14605**.
- Pepper, A.N., Assa'ad, A., Blaiss, M., Brown, E., Chinthrajah, S., Ciaccio, C., Fasano, M.B., Gupta, R., Hong, N., Lang, D., et al. (2020). Consensus report from the Food Allergy Research & Education (FARE) 2019 Oral Immunotherapy for Food Allergy Summit. *J. Allergy Clin. Immunol.* **146**, 244–249.
- Perry, T.T., Matsui, E.C., Kay Conover-Walker, M., and Wood, R.A. (2004). The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 144–149.
- Peters, R.L., Gurrin, L.C., and Allen, K.J. (2012). The predictive value of skin prick testing for challenge-proven food allergy: A systematic review. *Pediatr. Allergy Immunol.* **23**, 347–352.
- Peters, R.L., Allen, K.J., Dharmage, S.C., Tang, M.L.K., Koplin, J.J., Ponsonby, A.L., Lowe, A.J., Hill, D., and Gurrin, L.C. (2013). Skin prick test responses and allergen-specific IgE levels as predictors of peanut, egg, and sesame allergy in infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 874–880.
- Peters, R.L., Allen, K.J., Dharmage, S.C., Koplin, J.J., Dang, T., Tilbrook, K.P., Lowe, A., Tang, M.L.K., and Gurrin, L.C. (2015). Natural history of peanut allergy and predictors of resolution in the first 4 years of life: A population-based assessment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 1257–1266.e2.
- Petry, J., Rahmüller, J., Dühring, L., Lilienthal, G.M., Lehrian, S., Buhre, J.S., Bartsch, Y.C., Epp, A., Lunding, H.B., Moremen, K.W., et al. (2020). Enriched blood IgG sialylation attenuates IgG-mediated and IgG-controlled-IgE-mediated allergic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Pierkes, M., Bellinghausen, I., Hultsch, T., Metz, G., Knop, J., and Saloga, J. (1999). Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN- γ production of T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 326–332.
- Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., and Mellman, I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* **388**, 787–792.
- Plantinga, M., Guillems, M., Vanheerswynghe, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., et al. (2013). Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Allergen. *Immunity* **38**, 322–335.
- Plunkett, C.H., and Nagler, C.R. (2017). The Influence of the Microbiome on Allergic Sensitization to Food. *J. Immunol.* **198**, 581–589.
- Pochard, P., Vickery, B., Cecilia Berin, à M., Grishin, A., Sampson, H.A., Caplan, M., Bottomly, K., Haven, N., and York, N. (2010). Targeting Toll-like receptors on dendritic cells modifies the T H 2 response to peanut allergens in vitro.
- Polukort, S.H., Rovatti, J., Carlson, L., Thompson, C., Ser-Dolansky, J., Kinney, S.R.M., Schneider, S.S., and Mathias, C.B. (2016). IL-10 Enhances IgE-Mediated Mast Cell Responses and Is Essential for the Development of Experimental Food Allergy in IL-10–Deficient Mice. *J. Immunol.* **196**, 4865–4876.
- Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., et al. (2010). Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 α + dendritic cells. *J. Exp. Med.* **207**, 1261–1271.
- Poulin, L.F., Rey, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B.U., Sancho, D., Murphy, K.M., Håkansson, U.K., Moita, L.F., Agace, W.W., Bonnet, D., et al. (2012). DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* **119**, 6052–6062.
- Price, J.G., Idoyaga, J., Salmon, H., Hogstad, B., Bigarella, C.L., Ghaffari, S., Leboeuf, M., and Merad, M. (2015). CDKN1A regulates Langerhans cell survival and promotes treg cell generation upon exposure to ionizing irradiation. *Nat. Immunol.* **16**, 1060–1068.
- Prickett, S.R., Hickey, P.L., Bingham, J., Phan, T., Abramovitch, J., Rolland, J.M., Smith, W.B., Hew, M., and Hehir, R.E.O. (2019). Safety and Tolerability of a Novel Peptide-Based Immunotherapy for Peanut Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, AB431.
- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B.G., McKenzie, A.N.J., Menon, S., Zurawski, G., De Waal Malefyt, R., and De Vries, J.E. (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3730–3734.
- Punnonen, J., Yssel, H., and De Vries, J.E. (1997). The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 792–801.
- Qian, Q., Chowdhury, B.P., Sun, Z., Lenberg, J., Alam, R., Vivier, E., and Gorska, M.M. (2020). Maternal diesel particle exposure promotes offspring asthma through NK cell-derived granzyme B. *J. Clin. Invest.* **140**, 4133–4151.
- Radulovic, S., Jacobson, M.R., Durham, S.R., and Nouri-Aria, K.T. (2008). Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+CD25+ cells in the nasal mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**.
- Re, F., and Strominger, J.L. (2001). Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Differentially Activate Human Dendritic Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 37692–37699.
- Reber, L.L., Hernandez, J.D., and Galli, S.J. (2017). The pathophysiology of anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **140**, 335–348.
- Reinhart, R., and Kaufmann, T. (2018). IL-4 enhances survival of in vitro-differentiated mouse basophils through transcription-independent signaling downstream of PI3K article. *Cell Death Dis.* **9**.
- Renz, H., Allen, K.J., Sicherer, S.H., Sampson, H.A., Lack, G., Beyer, K., and Oettgen, H.C. (2018). Food allergy. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**.

- Rhee, C.S., Libet, L., Chisholm, D., Takabayashi, K., Baird, S., Bigby, T.D., Chul, H.L., Horner, A.A., and Raz, E. (2004). Allergen-independent immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide therapy attenuates experimental allergic rhinitis. *Immunology* 113, 106–113.
- Rial, M.J., Barroso, B., and Sastre, J. (2019). Dupilumab for treatment of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 7, 673–674.
- Richet, C., and Portier, P. (1902). De l'action anaphylactique de certains venins. *Comptes Rendus Hebd. Des Séances Mémoires La Société Biol.* 54, 170–172.
- Rizzetto, L., Kuka, M., De Filippo, C., Cambi, A., Netea, M.G., Beltrame, L., Napolitani, G., Torcia, M.G., D'Oro, U., and Cavalieri, D. (2010). Differential IL-17 Production and Mannan Recognition Contribute to Fungal Pathogenicity and Commensalism. *J. Immunol.* 184, 4258–4268.
- Robertson, I.B., and Rifkin, D.B. (2016). Regulation of the bioavailability of TGF- β and TGF- β -related proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a021907.
- Robinson, L., and Miller, R. (2015). The Impact of Bisphenol A and Phthalates on Allergy, Asthma, and Immune Function: a Review of Latest Findings. *Curr. Environ. Heal. Reports* 2, 379–387.
- Roehr, C.C., Reibel, S., Ziegert, M., Sommerfeld, C., Wahn, U., and Niggemann, B. (2001). Atopy patch tests, together with determination of specific IgE levels, reduce the need for oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 548–553.
- Rogala, B., Jarzab, J., Karawajczyk, M., Jawor, B., and Rogala, E. (1992). Effect of specific immunotherapy on IgE immune complexes in seasonal allergic rhinitis. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 60, 57–62.
- Rogala, B., Jarzab, J., Rymarczyk, B., and Tłuczykont, B. (2004). Allergen specific-IgG4 in circulating immune complexes in patients with inhalant allergy undergoing specific immunotherapy. *Wiad. Lek.* 57, 123–130.
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Bacchetta, R., Battaglia, M., and Gagliani, N. (2018). The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity* 49, 1004–1019.
- Royer, P.-J., Emara, M., Yang, C., Al-Ghoul, A., Tighe, P., Jones, N., Sewell, H.F., Shakib, F., Martinez-Pomares, L., and Ghaemmaghami, A.M. (2010). The Mannose Receptor Mediates the Uptake of Diverse Native Allergens by Dendritic Cells and Determines Allergen-Induced T Cell Polarization through Modulation of IDO Activity. *J. Immunol.* 185, 1522–1531.
- Rudulier, C.D., Tonti, E., James, E., Kwok, W.W., and Larché, M. (2019). Modulation of CRTh2 expression on allergen-specific T cells following peptide immunotherapy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 74, 2157–2166.
- Ruffner, M.A., and Spergel, J.M. (2016). Non-IgE-mediated food allergy syndromes. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 117, 452–454.
- Rutault, K., Agbotounou, W., Peillon, A., Thebault, C., Vincent, F., Martin, L., Ruban, C., Dupont, C., Christophe, Benhamou, P.-H., and Sampson, H.A. (2016). Safety of Viaskin Milk Epicutaneous Immunotherapy (EPIT) in IgE-Mediated Cow's Milk Allergy (CMA) in Children (MILES Study).
- Ryan, J.F., Hovde, R., Glanville, J., Lyu, S.C., Ji, X., Gupta, S., Tibshirani, R.J., Jay, D.C., Boyd, S.D., Chinthrajah, R.S., et al. (2016). Successful immunotherapy induces previously unidentified allergen-specific CD4⁺ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E1286–E1295.
- Ryan, J.J., DeSimone, S., Klisch, G., Shelburne, C., McReynolds, L.J., Han, K., Kovacs, R., Mirmonsef, P., and Huffner, T.F. (1998). IL-4 Inhibits Mouse Mast Cell Fc ϵ RI Expression Through a STAT6-Dependent Mechanism | *The Journal of Immunology*. *J. Immunol.* 161, 6915–6923.
- Saarinén, K.M., Pelkonen, A.S., Mäkelä, M.J., and Savilahti, E. (2005). Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 869–875.
- Sadhu, C., Ting, H.J., Lipsky, B., Hensley, K., Garcia-Martinez, L.F., Simon, S.I., and Staunton, D.E. (2007). CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1395–1403.
- Sakaguchi, S., Mikami, N., Wing, J.B., Tanaka, A., Ichiyama, K., and Ohkura, N. (2020). Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 541–566.
- Sakurai, D., Yamasaki, S., Arase, K., Park, S.Y., Arase, H., Konno, A., and Saito, T. (2004). Fc ϵ R γ -ITAM Is Differentially Required for Mast Cell Function In Vivo. *J. Immunol.* 172, 2374–2381.
- Sampson, H.A. (2005). Food allergy - Accurately identifying clinical reactivity. In *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, Supplement*, (Blackwell Munksgaard), pp. 19–24.
- Sampson, H.A., Shreffler, W.G., Yang, W.H., Sussman, G.L., Brown-Whitehorn, T.F., Nadeau, K.C., Cheema, A.S., Leonard, S.A., Pongracic, J.A., Sauvage-Delebarre, C., et al. (2017). Effect of Varying Doses of Epicutaneous Immunotherapy vs Placebo on Reaction to Peanut Protein Exposure Among Patients With Peanut Sensitivity: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 318, 1798–1809.
- Sánchez-Borges, M., Ansotegui, I., and Cox, L. (2019). World Allergy Organization Grading System for Systemic Allergic Reactions: it Is Time to Speak the Same Language When it Comes to Allergic Reactions. *Curr. Treat. Options Allergy* 6, 388–395.
- Sánchez Acosta, G., Kinaciyan, T., Kitzmüller, C., Möbs, C., Pfützner, W., Bohle, B., Acosta, G.S., Kinaciyan, T., Kitzmüller, C., Möbs, C., et al. (2020). IgE-blocking antibodies following SLIT with recombinant Mal d 1 accord with improved apple allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Sancho-Serra, M. del C., Simarro, M., and Castells, M. (2011). Rapid IgE desensitization is antigen specific and impairs early and late mast cell responses targeting Fc ϵ RI internalization. *Eur. J. Immunol.* 41, 1004–1013.
- Sandvig, K., Kavaliauskienė, S., and Skotland, T. (2018). Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem. Cell Biol.* 150, 107–118.
- Santos, A.F., and Shreffler, W.G. (2017). Road map for the clinical application of the basophil activation test in food allergy. *Clin. Exp. Allergy* 47, 1115–1124.
- Santos, A.F., Douiri, A., Bécares, N., Wu, S.Y., Stephens, A., Radulovic, S., Chan, S.M.H., Fox, A.T., Du Toit, G., Turcanu, V., et al. (2014). Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 645–652.

Santos, A.F., James, L.K., Bahnson, H.T., Shamji, M.H., Couto-Francisco, N.C., Islam, S., Houghton, S., Clark, A.T., Stephens, A., Turcanu, V., et al. (2015). IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1249–1256.

Santos, A.F., Du Toit, G., O'Rourke, C., Becares, N., Couto-Francisco, N., Radulovic, S., Khaleva, E., Basting, M., Harris, K.M., Larson, D., et al. (2020). Biomarkers of severity and threshold of allergic reactions during oral peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.* 146, 344–355.

Sasaki, M., Peters, R.L., Koplin, J.J., Field, M.J., McWilliam, V., Sawyer, S.M., Vuillermin, P.J., Pezic, A., Gurrin, L.C., Douglass, J.A., et al. (2018). Risk Factors for Food Allergy in Early Adolescence: The SchoolNuts Study. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 6, 496–505.

Satitsuksanoa, P., Kennedy, M., Gilis, D., Le Mignon, M., Suratannon, N., Soh, W.T., Wongpiyabovorn, J., Chatchatee, P., Vangveravong, M., Rerkpattanapit, T., et al. (2016). The minor house dust mite allergen Der p 13 is a fatty acid-binding protein and an activator of a TLR2-mediated innate immune response. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 71, 1425–1434.

Sato, T., Kitawaki, T., Fujita, H., Iwata, M., Iyoda, T., Inaba, K., Ohteki, T., Hasegawa, S., Kawada, K., Sakai, Y., et al. (2013). Human CD1c + Myeloid Dendritic Cells Acquire a High Level of Retinoic Acid–Producing Capacity in Response to Vitamin D 3 . *J. Immunol.* 191, 3152–3160.

Satpathy, A.T., KC, W., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2012). Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J. Exp. Med.* 209, 1135–1152.

Satpathy, A.T., Briseño, C.G., Lee, J.S., Ng, D., Manieri, N.A., Kc, W., Wu, X., Thomas, S.R., Lee, W.L., Turkoz, M., et al. (2013). Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens. *Nat. Immunol.* 14, 937–948.

Saulyte, J., Regueira, C., Montes-Martínez, A., Khudyakov, P., and Takkouche, B. (2014). Active or Passive Exposure to Tobacco Smoking and Allergic Rhinitis, Allergic Dermatitis, and Food Allergy in Adults and Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med.* 11.

Sausenthaler, S., Koletzko, S., Schaaf, B., Lehmann, I., Borte, M., Herbarth, O., Von Berg, A., Wichmann, H.E., and Heinrich, J. (2007). Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 530–537.

Savage, J., and Johns, C.B. (2015). Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 35, 45–59.

Savage, J., Sicherer, S., and Wood, R. (2016). The Natural History of Food Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 4, 196–203.

Scadding, G.W., Calderon, M.A., Shamji, M.H., Eifan, A.O., Penagos, M., Dumitru, F., Sever, M.L., Bahnson, H.T., Lawson, K., Harris, K.M., et al. (2017). Effect of 2 years of treatment with sublingual grass pollen immunotherapy on nasal response to allergen challenge at 3 years among patients with moderate to severe seasonal allergic rhinitis: The GRASS randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 317, 615–625.

Schofield, A. (1908). A CASE OF EGG POISONING. *Lancet* 171, 716.

Schöll, I., Untersmayr, E., Bakos, N., Roth-Walter, F., Gleiss, A., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., and Jensen-Jarolim, E. (2005). Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 154–160.

Schreibelt, G., Klinkenberg, L.J.J., Cruz, L.J., Tacke, P.J., Tel, J., Kreutz, M., Adema, G.J., Brown, G.D., Figdor, C.G., and De Vries, I.J.M. (2012). The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* 119, 2284–2292.

Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., Bridts, C.H., and Stevens, W.J. (2001). Wasp venom immunotherapy induces a shift from IL-4-producing towards interferon-gamma-producing CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Clin. Exp. Allergy* 31, 740–746.

Schulten, V., Tripple, V., Seumois, G., Qian, Y., Scheuermann, R.H., Fu, Z., Locci, M., Rosales, S., Vijayanand, P., Sette, A., et al. (2018). Allergen-specific immunotherapy modulates the balance of circulating Tfh and Tfr cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 775–777.e6.

Schulz, C., Perdiguero, E.G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science* (80-.). 335, 86–90.

Schuster, C., Vaculik, C., Fiala, C., Meindl, S., Brandt, O., Imhof, M., Stingl, G., Eppel, W., and Elbe-Bürger, A. (2009). HLA-DR+ leukocytes acquire CD1 antigens in embryonic and fetal human skin and contain functional antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 206, 169–181.

Schuster, C., Mildner, M., Mairhofer, M., Bauer, W., Fiala, C., Prior, M., Eppel, W., Kolbus, A., Tschachler, E., Stingl, G., et al. (2014). Human embryonic epidermis contains a diverse Langerhans cell precursor pool. *Dev.* 141, 807–815.

Schuurhuis, D.H., Ioan-Facsinay, A., Nagelkerken, B., van Schip, J.J., Sedlik, C., Melief, C.J.M., Verbeek, J.S., and Ossendorp, F. (2002). Antigen-Antibody Immune Complexes Empower Dendritic Cells to Efficiently Prime Specific CD8 + CTL Responses In Vivo . *J. Immunol.* 168, 2240–2246.

Schworer, S.A., and Kim, E.H. (2020). Sublingual immunotherapy for food allergy and its future directions. *Immunotherapy* 12, 921–931.

Scurlock, A.M., and Jones, S.M. (2017). Advances in the Approach to the Patient with Food Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*

Secrist, H., Chelen, C.J., Wen, Y., Marshall, J.D., and Umetsu, D.T. (1993). Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T Cells from allergic individuals. *J. Exp. Med.* 178, 2123–2130.

See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* (80-.). 356, eaag3009.

Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 209, 653–660.

Selb, R., Eckl-Dorna, J., Neunkirchner, A., Schmetterer, K., Marth, K., Gamper, J., Jahn-Schmid, B., Pickl, W.F., Valenta, R., and Niederberger, V. (2017). CD23 surface density on B cells is associated with IgE levels and determines IgE-facilitated allergen

uptake, as well as activation of allergen-specific T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 290-299.e4.

Sellge, G., Barkowsky, M., Kramer, S., Gebhardt, T., Sander, L.E., Lorentz, A., and Bischoff, S.C. (2014). Interferon- γ regulates growth and controls Fc γ receptor expression and activation in human intestinal mast cells. *BMC Immunol.* **15**, 27.

Sénéchal, H., Geny, S., Desvaux, F.X., Busson, M., Mayer, C., Aron, Y., Oster, J.P., Bessot, J.C., Peltre, G., Pauli, G., et al. (1999). Genetics and specific immune response in allergy to birch pollen and food Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II allele HLA-DR7. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 395–401.

Seneschal, J., Clark, R.A.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M.M., and Kupper, T.S.S. (2012). Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity* **36**, 873–884.

Senti, G., Graf, N., Haug, S., Rüedi, N., von Moos, S., Sonderegger, T., Johansen, P., and Kündig, T.M. (2009a). Epicutaneous allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 997–1002.

Senti, G., Johansen, P., Haug, S., Bull, C., Gottschaller, C., Müller, P., Pfister, T., Maurer, P., Bachmann, M.F., Graf, N., et al. (2009b). Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: A phase I/IIa clinical trial. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 562–570.

Séré, K., Baek, J.-H.H., Ober-Blöbaum, J., Müller-Newen, G., Tacke, F., Yokota, Y., Zenke, M., Hieronymus, T., Ober-Blö Baum, J., Müller-Newen, G., et al. (2012). Two Distinct Types of Langerhans Cells Populate the Skin during Steady State and Inflammation. *Immunity* **37**, 905–916.

Sérgio, C.A., Bertolini, T.B., Gembre, A.F., Prado, R.Q., and Bonato, V.L.D. (2015). CD11c⁺ CD103⁺ cells of *Mycobacterium tuberculosis*-infected C57BL/6 but not of BALB/c mice induce a high frequency of interferon- γ - or interleukin-17-producing CD4⁺ cells. *Immunology* **144**, 574–586.

Shade, K.T.C., Conroy, M.E., Washburn, N., Kitaoka, M., Huynh, D.J., Laprise, E., Patil, S.U., Shreffler, W.G., and Anthony, R.M. (2020). Sialylation of immunoglobulin E is a determinant of allergic pathogenicity. *Nature* **582**, 1–6.

Shade, K.T.C., Platzer, B., Washburn, N., Mani, V., Bartsch, Y.C., Conroy, M., Pagan, J.D., Bosques, C., Mempel, T.R., Fiebiger, E., et al. (2015). A single glycan on IgE is indispensable for initiation of anaphylaxis. *J. Exp. Med.* **212**, 457–467.

Shakya, A.K., Ingrole, R.S.J., Joshi, G., Uddin, M.J., Anvari, S., Davis, C.M., and Gill, H.S. (2019). Microneedles coated with peanut allergen enable desensitization of peanut sensitized mice. *J. Control. Release* **314**, 38–47.

Shamji, M.H., Ljørring, C., Francis, J.N., A Calderon, M., Larché, M., Kimber, I., Frew, A.J., Ipsen, H., Lund, K., Würtzen, P.A., et al. (2012). Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **67**, 217–226.

Shamji, M.H., Layhadi, J.A., Scadding, G.W., Cheung, D.K.M., Calderon, M.A., Turka, L.A., Phippard, D., and Durham, S.R. (2015). Basophil expression of diamine oxidase: A novel biomarker of allergen immunotherapy response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 913-921.e9.

Shamji, M.H., Layhadi, J.A., Achkova, D., Kouser, L., Perera-Webb, A., Couto-Francisco, N.C., Parkin, R. V., Matsuoka, T., Scadding, G., Ashton-Rickardt, P.G., et al. (2019a). Role of IL-35 in sublingual allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, 1131-1142.e4.

Shamji, M.H., Kappen, J., Abubakar-Waziri, H., Zhang, J., Steveling, E., Watchman, S., Kouser, L., Eifan, A., Switzer, A., Varricchi, G., et al. (2019b). Nasal allergen-neutralizing IgG 4 antibodies block IgE-mediated responses: Novel biomarker of subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, 1067–1076.

Shay, T., Jojic, V., Zuk, O., Rothamel, K., Puyraimond-Zemmour, D., Feng, T., Wakamatsu, E., Benoist, C., Koller, D., and Regev, A. (2013). Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 2946–2951.

Sheng, J., Chen, Q., Soncin, I., Ng, S.L., Karjalainen, K., and Ruedl, C. (2017). A Discrete Subset of Monocyte-Derived Cells among Typical Conventional Type 2 Dendritic Cells Can Efficiently Cross-Present. *Cell Rep.* **21**, 1203–1214.

Sheng, K.C., Pouniotis, D.S., Wright, M.D., Tang, C.K., Lazoura, E., Pietersz, G.A., and Apostolopoulos, V. (2006). Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells. *Immunology* **118**, 372–383.

Shreffler, W.G., Lencer, D.A., Bardina, L., and Sampson, H.A. (2005). IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**, 893–899.

Shreffler, W.G., Castro, R.R., Kucuk, Z.Y., Charlop-Powers, Z., Grishina, G., Yoo, S., Burks, A.W., and Sampson, H.A. (2006). The Major Glycoprotein Allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, Is a Ligand of Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin and Acts as a Th2 Adjuvant In Vitro. *J. Immunol.* **177**, 3677–3685.

Sicherer, S.H., and Sampson, H.A. (2017). Food Allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 41–58.

Sicherer, S.H., Furlong, T.J., Maes, H.H., Desnick, R.J., Sampson, H.A., and Gelb, B.D. (2000). Genetics of peanut allergy: A twin study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, 53–56.

Sicherer, S.H., Muñoz-Furlong, A., and Sampson, H.A. (2003). Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: A 5-year follow-up study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 1203–1207.

Sicherer, S.H., Muñoz-Furlong, A., and Sampson, H.A. (2004). Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 159–165.

Sicherer, S.H., Wood, R.A., Stablein, D., Lindblad, R., Burks, A.W., Liu, A.H., Jones, S.M., Fleischer, D.M., Leung, D.Y.M., and Sampson, H.A. (2010). Maternal consumption of peanut during pregnancy is associated with peanut sensitization in atopic infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 1191–1197.

Simon, T., Gogolák, P., Kis-Tóth, K., Jelinek, I., László, V., and Rajnavölgyi, É. (2012). Histamine modulates multiple functional activities of monocyte-derived dendritic cell subsets via histamine receptor 2. *Int. Immunol.* **24**, 107–116.

Simpson, A., John, S.L., Jury, F., Niven, R., Woodcock, A., Ollier, W.E.R., and Custovic, A. (2006). Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: An interaction between genes and the environment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 386–392.

Singh, D., Ravi, A., and Southworth, T. (2017). CRTH2 antagonists in asthma: Current perspectives. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **9**, 165–173.

- Sirvent, S., Soria, I., Cirauqui, C., Cases, B., Manzano, A.I., Diez-Rivero, C.M., Reche, P.A., López-Relaño, J., Martínez-Naves, E., Cañada, F.J., et al. (2016). Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death ligand 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 558–567.e11.
- Skinner, M.K., and Guerrero-Bosagna, C. (2009). Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Epigenomics* **1**, 111–117.
- Skolnick, H.S., Conover-Walker, M.K., Koerner, C.B., Sampson, H.A., Burks, W., and Wood, R.A. (2001). The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 367–374.
- Skipak, J.M., Matsui, E.C., Mudd, K., and Wood, R.A. (2007). The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 1172–1177.
- Skipak, J.M., Nash, S.D., Rowley, H., Brereton, N.H., Oh, S., Hamilton, R.G., Matsui, E.C., Burks, A.W., and Wood, R.A. (2008). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 1154–1160.
- Smejda, K., Polanska, K., Stelmach, W., Majak, P., and Stelmach, I. (2020). Dog keeping at home before and during pregnancy decreased the risk of food allergy in 1-year-old children. *Postep. Dermatologii i Alergol.* **37**, 255–261.
- Smith, P.K., Masilamani, M., Li, X.M., and Sampson, H.A. (2017). The false alarm hypothesis: Food allergy is associated with high dietary advanced glycation end-products and proglycating dietary sugars that mimic alarmins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 429–437.
- Snapper, C.M., Marcu, K.B., and Zelazowski, P. (1997). The immunoglobulin class switch: Beyond “accessibility.” *Immunity* **6**, 217–223.
- Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1–20.
- Song, Y., Liu, C., Hui, Y., Srivastava, K., Zhou, Z., Chen, J., Miller, R.L., Finkelman, F.D., and Li, X.M. (2014). Maternal allergy increases susceptibility to offspring allergy in association with TH2-biased epigenetic alterations in a mouse model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 1339–1345.e7.
- Soria, I., Alvarez, J., Manzano, A.I., López-Relaño, J., Cases, B., Mas-Fontao, A., Cañada, F.J., Fernández-Caldas, E., Casanovas, M., Jiménez-Barbero, J., et al. (2017). Mite allergoids coupled to nonoxidized mannan from *Saccharomyces cerevisiae* efficiently target canine dendritic cells for novel allergy immunotherapy in veterinary medicine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **190**, 65–72.
- Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., et al. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* **3**, 673–680.
- Soury, D., Barratt, G., Ah-Leung, S., Legrand, P., Chacun, H., and Ponchel, G. (2005). Skin localization of cow's milk proteins delivered by a new ready-to-use atopy patch test. *Pharm. Res.* **22**, 1530–1536.
- Sousa, A.O., Henry, S., Marója, F.M., Lee, H.K., Brum, L., Singh, M., Lagrange, P.H., and Aucouturier, P. (1998). IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* **111**, 48–55.
- Sousa, L., Martín-Sierra, C., Pereira, C., Loureiro, G., Tavares, B., Pedreiro, S., Martinho, A., and Paiva, A. (2018). Subcutaneous immunotherapy induces alterations in monocytes and dendritic cells homeostasis in allergic rhinitis patients. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **14**, 45.
- Speiran, K., Bailey, D.P., Fernando, J., Macey, M., Barnstein, B., Kolawole, M., Curley, D., Watowich, S.S., Murray, P.J., Oskertizian, C., et al. (2009). Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 826–836.
- Spergel, J.M., Elci, O.U., Muir, A.B., Liacouras, C.A., Wilkins, B.J., Burke, D., Lewis, M.O., Brown-Whitehorn, T., and Cianferoni, A. (2020). Efficacy of Epicutaneous Immunotherapy in Children With Milk-Induced Eosinophilic Esophagitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 328–336.e7.
- Srivastava, K.D., Siefert, A., Fahmy, T.M., Caplan, M.J., Li, X.-M., and Sampson, H.A. (2016). Investigation of peanut oral immunotherapy with CpG/peanut nanoparticles in a murine model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 536–543.e4.
- Stefka, A.T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, S.K., Tjota, M.Y., Seo, G.Y., Cao, S., Theriault, B.R., et al. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13145–13150.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**, 1142–1162.
- Steinman, R.M., Lustig, D.S., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: III. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* **139**, 1431–1445.
- Stolk, D.A., de Haas, A., Vree, J., Duinkerken, S., Lübbers, J., van de Ven, R., Ambrosini, M., Kalay, H., Bruijns, S., van der Vliet, H.J., et al. (2020). Lipo-Based Vaccines as an Approach to Target Dendritic Cells for Induction of T- and iNKT Cell Responses. *Front. Immunol.* **11**.
- Storni, F., Cabral-Miranda, G., Roesti, E., Zha, L., Engeroff, P., Zeltins, A., Cragg, M., Vogel, M., and Bachmann, M.F. (2020a). A Single Monoclonal Antibody against the Peanut Allergen Ara h 2 Protects against Systemic and Local Peanut Allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **181**, 334–341.
- Storni, F., Zeltins, A., Balke, I., Heath, M.D., Kramer, M.F., Skinner, M.A., Zha, L., Roesti, E., Engeroff, P., Muri, L., et al. (2020b). Vaccine against peanut allergy based on engineered virus-like particles displaying single major peanut allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **145**, 1240–1253.e3.
- Streilein, J.W. (1983). Skin-Associated Lymphoid Tissues (SALT): Origins and Functions. *J. Invest. Dermatol.* **80**, 12s–16s.
- Strid, J., Hourihane, J., Kimber, I., Callard, R., and Strobel, S. (2005). Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* **35**, 757–766.
- Su, Y., Connolly, M., Marketon, A., and Heiland, T. (2016). CryJ-LAMP DNA Vaccines for Japanese Red Cedar Allergy Induce Robust Th1-Type Immune Responses in Murine Model. *J. Immunol. Res.* **2016**.
- Su, Y., Romeu-Bonilla, E., Anagnostou, A., Fitz-Patrick, D., Hearl, W., and Heiland, T. (2017). Safety and long-term immunological

- effects of CryJ2-LAMP plasmid vaccine in Japanese red cedar atopic subjects: A phase I study. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 2804–2813.
- Subbarayal, B., Schiller, D., Möbs, C., Pfützner, W., Jahn-Schmid, B., Gepp, B., Breiteneder, H., Vieths, S., and Bohle, B. (2015). The diversity of Bet v 1-specific IgG4 antibodies remains mostly constant during the course of birch pollen immunotherapy.
- Sugita, M., Van Der Wel, N., Rogers, R.A., Peters, P.J., and Brenner, M.B. (2000). CD1c molecules broadly survey the endocytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8445–8450.
- Sussman, G., Sussman, A., and Sussman, D. (2010). Oral allergy syndrome. *CMAJ* **182**, 1210–1211.
- Swamy, R.S., Reshamwala, N., Hunter, T., Vissamsetti, S., Santos, C.B., Baroody, F.M., Hwang, P.H., Hoyte, E.G., Garcia, M.A., and Nadeau, K.C. (2012). Epigenetic modifications and improved regulatory T-cell function in subjects undergoing dual sublingual immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **130**, 215–224.e7.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 471–485.
- Syed, A., Garcia, M.A., Lyu, S.C., Bucayu, R., Kohli, A., Ishida, S., Berglund, J.P., Tsai, M., Maecker, H., O’Riordan, G., et al. (2014). Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**.
- Tamoutounour, S., Henri, S., Lelouard, H., de Bovis, B., de Haar, C., Janneke van der Woude, C., Woltman, A.M., Reyat, Y., Bonnet, D., Sichien, D., et al. (2012). CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur. J. Immunol.* **42**, 3150–3166.
- Tamoutounour, S., Williams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* **39**, 925–938.
- Tamoutounour, S., Han, S.J., Deckers, J., Constantinides, M.G., Hurabielle, C., Harrison, O.J., Bouladoux, N., Linehan, J.L., Link, V.M., Vujkovic-Cvijin, I., et al. (2019). Keratinocyte-intrinsic MHCII expression controls microbiota-induced Th1 cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 23643–23652.
- Tan, S.Y., Roediger, B., and Weninger, W. (2015). The role of chemokines in cutaneous immunosurveillance. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 337–346.
- Tanaka, S., Nemoto, Y., Takei, Y., Morikawa, R., Oshima, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Stutte, S., et al. (2020). High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **522**, 971–977.
- Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., and Uddy, M.C. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* **361**, 82–85.
- Thyssen, J.P., Tang, L., Husemoen, L.L.N., Stender, S., Szecsi, P.B., Menné, T., Johansen, J.D., and Linneberg, A. (2015). Filaggrin gene mutations are not associated with food and aeroallergen sensitization without concomitant atopic dermatitis in adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 1375–1378.e1.
- Du Toit, G., Roberts, G., Sayre, P.H., Bahnson, H.T., Radulovic, S., Santos, A.F., Brough, H.A., Phippard, D., Basting, M., Feeney, M., et al. (2015). Randomized Trial of Peanut Consumption in Infants at Risk for Peanut Allergy. *N. Engl. J. Med.* **372**, 803–813.
- Du Toit, G., Tsakok, T., Lack, S., and Lack, G. (2016). Prevention of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 998–1010.
- Toke, E.R., Lorincz, O., Csiszovszki, Z., Somogyi, E., Felföldi, G., Molnár, L., Szipocs, R., Kolonics, A., Malissen, B., Lori, F., et al. (2014). Exploitation of Langerhans cells for in vivo DNA vaccine delivery into the lymph nodes. *Gene Ther.* **21**, 566–574.
- Tomura, M., Hata, A., Matsuoka, S., Shand, F.H.W., Nakanishi, Y., Ikebuchi, R., Ueha, S., Tsutsui, H., Inaba, K., Matsushima, K., et al. (2014). Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci. Rep.* **4**, 6030.
- Tordesillas, L., and Berin, M.C. (2018). Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **55**, 107–117.
- Tordesillas, L., Goswami, R., Benedé, S., Grishina, G., Dunkin, D., Järvinen, K.M., Maleki, S.J., Sampson, H.A., and Berin, M.C. (2014). Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. *J. Clin. Invest.* **124**, 4965–4975.
- Tordesillas, L., Mondoulet, L., Blazquez, A.B., Benhamou, P.-H., Sampson, H.A., and Berin, M.C. (2016). Epicutaneous immunotherapy induces gastrointestinal LAP+ regulatory T cells and prevents food-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **0**.
- Tordesillas, L., Lozano-Ojalvo, D., Dunkin, D., Mondoulet, L., Agudo, J., Merad, M., Sampson, H.A., and Berin, M.C. (2018). PDL2+ CD11b+ dermal dendritic cells capture topical antigen through hair follicles to prime LAP+ Tregs. *Nat. Commun.* **9**, 5238.
- Tortola, L., Rosenwald, E., Abel, B., Blumberg, H., Schäfer, M., Coyle, A.J., Renauld, J.C., Werner, S., Kisielow, J., and Kopf, M. (2012). Psoriasisiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *J. Clin. Invest.* **122**, 3965–3976.
- Toru, H., Ra, C., Nonoyama, S., Suzuki, K., Yata, J., and Nakahata, T. (1996). Induction of the high-affinity IgE receptor (FcεRI) on human mast cells by IL-4. *Int. Immunol.* **8**, 1367–1373.
- Tost, J. (2020). Strengthening epithelial barriers through modulation of the histone code in allergic diseases—a novel approach for preventing the atopic march? *J. Allergy Clin. Immunol.* **146**, 515–517.
- Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R.S., Madan, R., Thorne, P.S., Wills-Karp, M., Gioannini, T.L., Weiss, J.P., et al. (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* **457**, 585–588.
- Tsai, M., Mukai, K., Chinthrajah, R.S., Nadeau, K.C., and Galli, S.J. (2020). Sustained successful peanut oral immunotherapy associated with low basophil activation and peanut-specific IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* **145**, 885–896.e6.
- Tsai, Y.-G., Lai, J.-C., Yang, K.D., Hung, C.-H., Yeh, Y.-J., and Lin, C.-Y. (2014). Enhanced CD46-induced regulatory T cells suppress allergic inflammation after Dermatophagoides pteronyssinus-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 1206–1209.e1.
- Tuokkola, J., Luukkainen, P., Tapanainen, H., Kaila, M., Vaarala, O., Kenward, M.G., Virta, L.J., Veijola, R., Simell, O., Ilonen, J., et al. (2016). Maternal diet during pregnancy and lactation and cow’s milk allergy in offspring. *Eur. J. Clin. Nutr.* **70**, 554–559.
- Tussiwand, R., Lee, W.L., Murphy, T.L., Mashayekhi, M., Kc, W., Albring, J.C., Satpathy, A.T., Rotondo, J.A., Edelson, B.T.,

- Kretzer, N.M., et al. (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 490, 502–507.
- Tussiwand, R., Everts, B., Grajales-Reyes, G.E., Kretzer, N.M., Iwata, A., Bagaitkar, J., Wu, X., Wong, R., Anderson, D.A., Murphy, T.L., et al. (2015). Klf4 Expression in Conventional Dendritic Cells Is Required for T Helper 2 Cell Responses. *Immunity* 42, 916–928.
- Uermösi, C., Zabel, F., Manolova, V., Bauer, M., Beerli, R.R., Senti, G., Kündig, T.M., Saudan, P., and Bachmann, M.F. (2014). IgG-mediated down-regulation of IgE bound to mast cells: a potential novel mechanism of allergen-specific desensitization. *Allergy* 69, 338–347.
- Untersmayr, E. (2015). Acid suppression therapy and allergic reactions. *Allergo J. Int.* 24, 303–311.
- Untersmayr, E., and Jensen-Jarolim, E. (2008). The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1301–1308.
- Utsch, L., Logiantara, A., van Ree, R., and van Rijt, L.S. (2017). Experimental food allergy to peanut enhances the immune response to house dust mite in the airways of mice. *Clin. Exp. Allergy* 47, 121–128.
- Vallery-Radot, P., and Hangeau, J. (1921). Asthme d'origine équine. Essai de désensibilisation par des cutiréactions répétées. *Bull Soc Méd Hôp Paris*.
- Varshney, P., Jones, S.M., Scurlock, A.M., Perry, T.T., Kemper, A., Steele, P., Hiegel, A., Kamilaris, J., Carlisle, S., Yue, X., et al. (2011). A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: Clinical desensitization and modulation of the allergic response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 654–660.
- Vazquez-Ortiz, M., Machinena-Spera, A., Giner, M.T., Alvaro, M., Piquer, M., Dominguez, O., Lozano, J., Jimenez-Feijoo, R., and Plaza, A.M. (2015). Ovalbumin-specific IgE/total IgE ratio improves the prediction of tolerance development in egg-allergic children aged ≥5 years. *Pediatr. Allergy Immunol.* 26, 580–583.
- Van De Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Söllner, S., Akdis, D.G., Rückert, B., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 1204–1212.
- Veldhoen, M. (2017). Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat. Immunol.* 18, 612–621.
- Vendelova, E., Ashour, D., Blank, P., Erhard, F., Saliba, A.-E., Kalinke, U., and Lutz, M.B. (2018). Tolerogenic Transcriptional Signatures of Steady-State and Pathogen-Induced Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 9, 333.
- Venkataraman, D., Soto-Ramírez, N., Kurukulaaratchy, R.J., Holloway, J.W., Karmaus, W., Ewart, S.L., Arshad, S.H., and Erlewyn-Lajeunesse, M. (2014). Filaggrin loss-of-function mutations are associated with food allergy in childhood and adolescence. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 876–882.e4.
- Vickery, B.P., Scurlock, A.M., Kulis, M., Steele, P.H., Kamilaris, J., Berglund, J.P., Burk, C., Hiegel, A., Carlisle, S., Christie, L., et al. (2014). Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 468–475.
- Vickery, B.P., Berglund, J.P., Burk, C.M., Fine, J.P., Kim, E.H., Kim, J.I., Keet, C.A., Kulis, M., Orgel, K.G., Guo, R., et al. (2017). Early oral immunotherapy in peanut-allergic preschool children is safe and highly effective. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 173–181.e8.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.
- Villar, J., and Segura, E. (2020). The More, the Merrier: DC3s Join the Human Dendritic Cell Family. *Immunity* 53, 233–235.
- Vishwanath, M., Nishibu, A., Saeland, S., Ward, B.R., Mizumoto, N., Ploegh, H.L., Boes, M., and Takashima, A. (2006). Development of intravital intermittent confocal imaging system for studying Langerhans cell turnover. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2452–2457.
- Volpe, E., Pattarini, L., Martinez-Cingolani, C., Meller, S., Donnadieu, M.H., Bogiatzi, S.I., Fernandez, M.I., Touzot, M., Bichet, J.C., Rey, F., et al. (2014). Thymic stromal lymphopoietin links keratinocytes and dendritic cell-derived IL-23 in patients with psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134.
- Wachholz, P.A., Soni, N.K., Till, S.J., and Durham, S.R. (2003). Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 915–922.
- Wambre, E., DeLong, J.H., James, E.A., Torres-Chinn, N., Pfützner, W., Möbs, C., Durham, S.R., Till, S.J., Robinson, D., and Kwok, W.W. (2014). Specific immunotherapy modifies allergen-specific CD4+ T-cell responses in an epitope-dependent manner. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 872–879.e7.
- Wambre, E., Bajzik, V., DeLong, J.H., O'Brien, K., Nguyen, Q.A., Speake, C., Gersuk, V.H., DeBerg, H.A., Whalen, E., Ni, C., et al. (2017). A phenotypically and functionally distinct human TH2 cell subpopulation is associated with allergic disorders. *Sci. Transl. Med.* 9.
- Wang, C.M., and Chuang, J.J. (2013). Effect of mite allergen immunotherapy on the altered phenotype of dendritic cells in allergic asthmatic children. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 110, 107–112.
- Wang, B., Hu, J., Liu, Y., Liu, Q., and Li, D. (2020a). Food allergy promotes a Th2/Th17 response that drives house dust mite-induced allergic airway inflammation in humanized mice. *Clin. Exp. Immunol.*
- Wang, S., Charbonnier, L.M., Noval Rivas, M., Georgiev, P., Li, N., Gerber, G., Bry, L., and Chatila, T.A. (2015). MyD88 Adaptor-Dependent Microbial Sensing by Regulatory T Cells Promotes Mucosal Tolerance and Enforces Commensalism. *Immunity* 43, 289–303.
- Wang, W., Lyu, S.-C.C., Ji, X., Gupta, S., Manohar, M., Dhondalay, G.K.R., Chinthrajah, S., Andorf, S., Boyd, S.D., Tibshirani, R., et al. (2020b). Transcriptional changes in peanut-specific CD4+ T cells over the course of oral immunotherapy. *Clin. Immunol.* 219, 108568.
- Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., and Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–760.
- Wang, Y., Bugatti, M., Ulland, T.K., Vermi, W., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2016). Nonredundant roles of keratinocyte-derived IL-34 and neutrophil-derived CSF1 in Langerhans cell renewal in the steady state and during inflammation. *Eur. J. Immunol.* 46, 552–559.

- Wang, Y.H., Ito, T., Wang, Y.H., Homey, B., Watanabe, N., Martin, R., Barnes, C.J., McIntyre, B.W., Gilliet, M., Kumar, R., et al. (2006). Maintenance and Polarization of Human TH2 Central Memory T Cells by Thymic Stromal Lymphopoietin-Activated Dendritic Cells. *Immunity* 24, 827–838.
- Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jèze, G., Guermontprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 9, 676–683.
- Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., and Matsukawa, A. (2004). Innate Immune Response In TH1- And TH2-Dominant Mouse Strains. *Shock* 22, 460–466.
- Watanabe, N., Hanabuchi, S., Marloie-Provost, M.A., Antonenko, S., Liu, Y.J., and Soumelis, V. (2005). Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. *Blood* 105, 4749–4751.
- Weinberger, E.E., Himly, M., Myschik, J., Hauser, M., Altmann, F., Isakovic, A., Scheiblhofer, S., Thalhamer, J., and Weiss, R. (2013). Generation of hypoallergenic neoglycoconjugates for dendritic cell targeted vaccination: A novel tool for specific immunotherapy. *J. Control. Release* 165, 101–109.
- Weiss, R., Scheiblhofer, S., Machado, Y., and Thalhamer, J. (2013). New approaches to transcutaneous immunotherapy: Targeting dendritic cells with novel allergen conjugates. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 13, 669–676.
- Wershil, B.K., Wang, Z.S., Gordon, J.R., and Galli, S.J. (1991). Recruitment of neutrophils during ige-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor- α . *J. Clin. Invest.* 87, 446–453.
- Willart, M.A.M., and Hammad, H. (2010). Alarming dendritic cells for allergic sensitization. *Allergol. Int.* 59, 95–103.
- Woodfolk, J.A., Commins, S.P., Schuyler, A.J., Erwin, E.A., and Platts-Mills, T.A.E. (2015). Allergens, sources, particles, and molecules: Why do we make IgE responses? *Allergol. Int.* 64, 295–303.
- Wu, J., Wu, H., An, J., Ballantyne, C.M., and Cyster, J.G. (2018). Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 6786–6791.
- Wu, X., Briseño, C.G., Durai, V., Albring, J.C., Haldar, M., Bagadia, P., Kim, K.W., Randolph, G.J., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2016). Maf b lineage tracing to distinguish macrophages from other immune lineages reveals dual identity of langerhans cells. *J. Exp. Med.* 213, 2553–2565.
- Xian, M., Feng, M., Dong, Y., Wei, N., Su, Q., and Li, J. (2020). Changes in CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells and Serum Cytokines in Sublingual and Subcutaneous Immunotherapy in Allergic Rhinitis with or without Asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 181, 71–80.
- Xie, M.M., Chen, Q., Liu, H., Yang, K., Koh, B., Wu, H., Maleki, S.J., Hurlburt, B.K., Cook-Mills, J., Kaplan, M.H., et al. (2020). T follicular regulatory cells and IL-10 promote food antigen-specific IgE. *J. Clin. Invest.* 130, 3820–3832.
- Yanagida, N., Sato, S., Asaumi, T., Nagakura, K., Ogura, K., and Ebisawa, M. (2016). Safety and Efficacy of Low-Dose Oral Immunotherapy for Hen's Egg Allergy in Children. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 171, 265–268.
- Yang, P.C., Xing, Z., Berin, C.M., Soderholm, J.D., Feng, B.S., Wu, L., and Yeh, C. (2007). TIM-4 Expressed by Mucosal Dendritic Cells Plays a Critical Role in Food Antigen-Specific Th2 Differentiation and Intestinal Allergy. *Gastroenterology* 133, 1522–1533.
- Yao, Y., Wang, Z.C., Wang, N., Zhou, P.C., Chen, C.L., Song, J., Pan, L., Liao, B., Zhang, X.H., Yang, Y.S., et al. (2019). Allergen immunotherapy improves defective follicular regulatory T cells in patients with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, 118–128.
- Yasmin, N., Bauer, T., Modak, M., Wagner, K., Schuster, C., Köffel, R., Seyerl, M., Stöckl, J., Elbe-Bürger, A., Graf, D., et al. (2013). Identification of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) as an instructive factor for human epidermal Langerhans cell differentiation. *J. Exp. Med.* 210, 2597–2610.
- Yee, C.S.K., and Rachid, R. (2016). The Heterogeneity of Oral Immunotherapy Clinical Trials: Implications and Future Directions. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 16, 1–19.
- Yin, X., Yu, H., Jin, X., Li, J., Guo, H., Shi, Q., Yin, Z., Xu, Y., Wang, X., Liu, R., et al. (2017). Human Blood CD1c + Dendritic Cells Encompass CD5 high and CD5 low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *J. Immunol.* 198, 1553–1564.
- Yoshida, K., Kubo, A., Fujita, H., Yokouchi, M., Ishii, K., Kawasaki, H., Nomura, T., Shimizu, H., Kouyama, K., Ebihara, T., et al. (2014). Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 856–864.
- Youn, C.J., Miller, M., Baek, K.J., Han, J.W., Nayar, J., Lee, S.Y., McElwain, K., McElwain, S., Raz, E., and Broide, D.H. (2004). Immunostimulatory DNA Reverses Established Allergen-Induced Airway Remodeling. *J. Immunol.* 173, 7556–7564.
- Yu, C.I., Becker, C., Metang, P., Marches, F., Wang, Y., Toshiyuki, H., Banchereau, J., Merad, M., and Palucka, A.K. (2014). Human CD141 + Dendritic Cells Induce CD4 + T Cells To Produce Type 2 Cytokines. *J. Immunol.* 193, 4335–4343.
- Yu, W., Freeland, D.M.H., and Nadeau, K.C. (2016). Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 751–765.
- Yu, Y., Kiran Kumar, M.N., and Wu, M.X. (2020). Delivery of allergen powder for safe and effective epicutaneous immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 145, 597–609.
- Zaitsu, M., Narita, S.I., Lambert, K.C., Grady, J.J., Estes, D.M., Curran, E.M., Brooks, E.G., Watson, C.S., Goldblum, R.M., and Midoro-Horiuti, T. (2007). Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor- α and calcium influx. *Mol. Immunol.* 44, 1977–1985.
- Zha, L., Leoratti, F.M.S., He, L., Mohsen, M.O., Cragg, M., Storni, F., Vogel, M., and Bachmann, M.F. (2018). An unexpected protective role of low-affinity allergen-specific IgG through the inhibitory receptor Fc γ RIIb. *J. Allergy Clin. Immunol.* 142, 1529–1536.e6.
- Zhan, Y., Xu, Y., Seah, S., Brady, J.L., Carrington, E.M., Cheers, C., Croker, B.A., Wu, L., Villadangos, J.A., and Lew, A.M. (2010). Resident and Monocyte-Derived Dendritic Cells Become Dominant IL-12 Producers under Different Conditions and Signaling Pathways. *J. Immunol.* 185, 2125–2133.
- Zhang, J., Berenstein, E.H., Evans, R.L., and Siraganian, R.P. (1996). Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes

high affinity IgE receptor-mediated degranulation in a Syk-negative variant of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *J. Exp. Med.* **184**, 71–79.

Zhang, Y., Wu, Z., Li, K., Li, X., Yang, A., Tong, P., and Chen, H. (2019). Allergenicity assessment on thermally processed peanut influenced by extraction and assessment methods. *Food Chem.* **281**, 130–139.

Zimara, N., Florian, C., Schmid, M., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Männel, D.N., Edinger, M., Hutchinson, J.A., Hoffmann, P., and Ritter, U. (2014). Langerhans cells promote early germinal center formation in response to *Leishmania*-derived cutaneous antigens. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2955–2967.

Zimmer, A., Bouley, J., Le Mignon, M., Pliquet, E., Horiot, S., Turfkruyer, M., Baron-Bodo, V., Horak, F., Nony, E., Louise, A., et al. (2012). A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1020–1030.

Zuidmeer-Jongejan, L., Huber, H., Swoboda, I., Rigby, N., Versteeg, S.A., Jensen, B.M., Quaak, S., Akkerdaas, J.H., Blom, L., Asturias, J., et al. (2015). Development of a hypoallergenic recombinant parvalbumin for first-in-man subcutaneous immunotherapy of fish allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **166**, 41–51.