

27^{ème} Cours francophone de Biologie de la Peau ; 13^{ème} Colloque thématique
LYON CoBiP 2021

Lieu : *Réunion virtuelle par Webex*

Organisateur : *Marek HAFTEK, Directeur de Recherches CNRS émérite*
Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI) UMR 5305
CNRS

Adresse postale : Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Lyon 1 ; 69373 Lyon

Courriel : Marek.Haftek@univ-lyon1.fr

Courriel de contact : **cobip.lyon@gmail.com**

Comité Scientifique :

Marek HAFTEK, MD, PhD, dermatologue et directeur de recherche au émérite au CNRS

Jérôme LAMARTINE, PhD, professeur de génétique à l'Université de Lyon

Audrey NOSBAUM, MD, dermatologue-allergologue, maître de conférences – praticien hospitalier
à l'Université de Lyon

Aurore ROSIERES, PhD, immunologiste, maître de conférences à l'Université de Lyon

Marc VOCANSON, PhD, immunologiste, Chercheur INSERM

Coordination logistique :

Zofia HAFTEK-TERREAU, PhD, ingénieur Ecole Normale Supérieure, IGFL

Nos partenaires :

L'Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL1)

Les Hospices Civils de Lyon (HCL)

L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

Le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

27^{ème} Cours francophone de Biologie de la Peau ; 13^{ème} Colloque thématique
LYON CoBiP 2021

SOMMAIRE

N° page

Mercredi 17 Mars

Caractérisation de biomarqueurs à partir de données omiques : approche méthodologique illustrée <u>Marine-Alexia LEFEVRE, Simon DE BERNARD, Pierre-Emmanuel JOUVE, Jean-François NICOLAS, Laurent BUFFAT, Julien NOURIKYAN et Marc VOCANSON</u>	5
La protéolyse comme source de biomarqueurs de la cicatrisation <u>Catherine MOALI</u>	7
Sénescence prématurée des fibroblastes dermiques : implication des microARNs dans la Progeria <u>Patrice ROLL</u>	10
Autophagie et mort cellulaire <u>Aurore ROZIERES</u>	13
Différenciation kératinocytaire, atopie et sénescence <u>Michel SIMON</u>	14
Interactions neuro-immunes cutanées : implication dans la dermatite atopique <u>Nicolas GAUDENZIO</u>	16
Transcriptomique de la peau sensible <u>Adeline BATAILLE – SAVATTIER, Christelle LE GALL – IANOTTO, Laurent MISERY</u>	19

Jeudi 18 Mars

Rôle des mastocytes et des IgE dans l'inflammation cutanée <u>Laurent REBER</u>	22
Biomarqueurs de la dermatite atopique <u>Thomas BIEBER</u>	24
Microbiome cutané et l'inflammation <u>Marc G.J. FEUILLOLEY</u>	25
Constellation psoriasis : quoi de spécifique ? <u>Michel GILLIET</u>	28
Développement de la glande sébacée <u>Bénédictte OULES</u>	29
Capacité régénératrice et expansion ex vivo de précurseurs épidermiques : effecteurs moléculaires et biomarqueurs <u>Nicolas FORTUNEL</u>	32
Biomarqueurs de radiosensibilité cutanée <u>Jérôme LAMARTINE</u>	34
Histoire d'eau ou l'interprétation quantique du rôle de l'eau dans le vivant <u>Laurent VANDANJON</u>	37

Vendredi 19 Mars

Fonctionnalisation des biomatériaux <u>Jean-Daniel MALCOR</u>	41
Tétraspansines et mélanome <u>Ingrid MASSE, Gaël RUNEL et Noémie LOPEZ-RAMIREZ</u>	44
Applications cliniques des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux <u>Céline AUXENFANS, Lucille CAPIN, Adeline DESANLIS</u>	45
Marqueurs lipidiques dans la peau <u>Iuliana POPA</u>	49

Mercredi 17 mars 2021

Caractérisation de biomarqueurs à partir de données omiques : approche méthodologique illustrée

Marine-Alexia LEFEVRE (1), Simon DE BERNARD (2), Pierre-Emmanuel JOUVE (2), Jean-François NICOLAS (1), Laurent BUFFAT (2), Julien NOURIKYAN (2), Marc VOCANSON (1)

(1) CIRI-Centre International de Recherche en Infectiologie, Equipe « Immunologie de l'Allergie cutanée et Vaccination », Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon;(2) AltraBio SAS, 30 rue Pré Gaudry, 69007 Lyon, France

courriel : marc.vocanson@inserm.fr; julien.nourikyan@altrabio.com

L'omique fait référence à différentes technologies permettant de suivre un grand nombre de molécules de façon non ciblée. Parmi ces molécules, on retrouve notamment l'ADN (génomique), l'ARN (transcriptomique), les protéines (protéomique), les métabolites (métabolomique),... Ces approches permettent, à présent, de caractériser l'effet de molécules/traitements sur différentes cellules, de caractériser des mécanismes moléculaires pathologiques, d'évaluer de nouveaux modèles de peaux, d'étudier le microbiote d'individus, ...

Cette vision globale, non biaisée, de l'ensemble des voies impactées a conduit en une utilisation grandissante des approches omiques pour l'identification de biomarqueurs à des fins de diagnostic, de monitoring, de suivi de réponse, de pronostic, de safety, ...

La caractérisation de biomarqueurs à partir de données omiques requiert toutefois, afin d'être robuste, l'utilisation de méthodologies analytiques particulières, spécifiques et complexes. Après le traitement de ces données afin de les rendre comparables au sein d'une étude donnée, différents types d'analyses peuvent être réalisés :

- Les analyses non supervisées consistant en la visualisation, sans a priori, de la structuration des données générées au sein de l'étude. Elles permettent d'identifier, en plus des effets biologiques souhaités, des effets lots, des effets patients, ... qui devront être pris en compte et corrigés. Parmi ces approches, on retrouve notamment les analyses en composantes principales, les clustering hiérarchiques, les heat-maps ;

- Les analyses statistiques différentielles permettant d'identifier les entités moléculaires différentiellement exprimées de manière significative entre 2 conditions. Ces approches peuvent être réalisées au niveau de l'entité moléculaire ainsi qu'au niveau de groupes d'entités moléculaires telles que des voies biologiques ;
- Les analyses par classifieur qui permettent, via des approches de machine-learning telles que les forêts aléatoires, d'identifier des signatures moléculaires capables de discriminer différents groupes d'intérêt.

Ces différentes approches seront présentées et illustrées sur la base d'un cas concret : le diagnostic de l'eczéma allergique de contact (EAC) à partir de données transcriptomiques. Depuis plusieurs années, l'équipe « Immunologie de l'Allergie Cutanée et Vaccination » du Centre International de Recherche en infectiologie (CIRI) à Lyon, travaille sur la compréhension de la physiopathologie de l'EAC, ainsi que sur le développement de nouvelles méthodes diagnostiques ou thérapeutiques de cette maladie. Dans ce contexte, l'équipe a récemment caractérisé les signatures moléculaires de patch-tests positifs à différents allergènes de contact (nickel, méthylisothiazolinone, hydroperoxyde de linalool, amerchol...) ainsi que divers produits chimiques irritants mais dénués de pouvoir allergisant (SLS, acide nonanoïque, cantharidine). Les résultats montrent que l'analyse moléculaire des lésions cutanées pourrait permettre de délivrer aux patients suspectés d'allergie un diagnostic plus fiable que la méthode actuelle, basée sur une lecture visuelle de l'inflammation cutanée.

La protéolyse comme source de biomarqueurs de la cicatrisation

Catherine MOALI

Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (UMR 5305, Lyon)
Courriel : catherine.moali@ibcp.fr

La nécessité de disposer de biomarqueurs reflétant l'état physiopathologique de la peau n'est pas évidente au premier abord car la peau est un organe externe qui présente souvent des signes extérieurs faciles à observer en cas de dérèglement. Cependant, l'état du derme et de l'hypoderme peut être difficile à caractériser par une inspection superficielle et, dans certains cas, il serait bénéfique de disposer d'indicateurs prédictifs de l'évolution d'une pathologie cutanée (par exemple pour mieux dépister les carcinomes agressifs). Les biomarqueurs tissulaires ou circulants ont donc toute leur place en biologie cutanée pour révéler des processus annonciateurs d'une dérive plus grave ou rendre compte de l'état des couches inférieures de la peau.

Au cours de cette présentation, nous nous intéresserons à la cicatrisation cutanée et à deux de ses dérives pathologiques : la fibrose (ex : cicatrices hypertrophiques, chéloïdes ou fibrose induite par les formes sévères d'épidermolyse bulleuse dystrophique) et les plaies chroniques (ex : ulcères veineux, ulcères de pression ou pied diabétique). La cicatrisation est un processus de remodelage tissulaire intensif qui peut durer plusieurs semaines, voire plusieurs mois ou années, et fait appel à de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Parmi ceux-ci, les protéases extracellulaires jouent un rôle essentiel en contribuant à la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire, en activant ou en inactivant des facteurs de croissance et des cytokines et en contrôlant l'état d'activation des récepteurs cellulaires [1].

Ces protéases sont très souvent dérégulées, soit en termes d'expression soit en termes d'activité, dans les plaies fibrotiques et les plaies chroniques. Par exemple, les MMPs (Matrix Metalloproteinases) sont connues pour contribuer fortement à retarder la fermeture des plaies chroniques en dégradant des composants essentiels de la matrice extracellulaire du tissu de granulation et en inhibant des voies de signalisation pro-cicatrisantes comme celle du TGF- β [2]. Elles ont également été impliquées dans la sclérodermie, une forme de fibrose généralisée affectant la peau et les organes internes [3]. D'autres métallo-protéases (BTPs, ADAMTS2, 3 et 14, méprines) sont considérées comme plus spécifiquement pro-fibrotiques car elles favorisent le dépôt des fibres de collagène (les composants essentiels du derme normal et fibrotique) et le maintien d'un taux élevé de TGF- β actif dans différentes situations de réparation tissulaire [4-6].

Ainsi, les protéases par elles-mêmes représentent des biomarqueurs potentiels qui peuvent dans certains cas être prédictifs du résultat de la cicatrisation [7]. Elles sont également très intéressantes pour leur capacité à générer des fragments de protéolyse pouvant être fortement augmentés ou diminués dans les situations pathologiques. Les situations très inflammatoires telles que les plaies

chroniques sont particulièrement propices et il a été montré qu'environ 50 % des protéines identifiées dans un modèle d'inflammation cutanée étaient présentes sous forme de produits de clivage stables [8]. Un exemple intéressant est un peptide issu de la thrombine, une protéase de la cascade de coagulation elle-même sujette à la dégradation par d'autres protéases, qui est détecté dans les exsudats de plaies et semble spécifique des ulcères infectés qui ne cicatrisent pas [9]. La fibrose est également un contexte favorable à la protéolyse. L'exemple le plus connu concerne les produits de maturation et/ou de dégradation des collagènes, tels que les N- et C-propeptides des collagènes I et III ou le domaine C5 de la chaîne $\alpha 3$ du collagène VI, qui sont des biomarqueurs circulants bien établis de la fibrose de la peau [10] et des autres organes.

Dans la dernière partie de l'exposé, nous décrivons les approches de protéomique qui commencent à être utilisées pour analyser spécifiquement les fragments de protéolyse dans les plaies et découvrir de nouveaux biomarqueurs. La technique TAILS (Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates) semble particulièrement pertinente car elle permet d'enrichir les peptides N- ou C-terminaux des fragments et donc de déterminer précisément où ont lieu les clivages protéolytiques et potentiellement d'identifier les protéases impliquées. Elle a déjà été utilisée avec succès pour la mise en évidence de biomarqueurs potentiellement prédictifs de la qualité de la cicatrisation [11]. Une fois les biomarqueurs identifiés, il est possible de les détecter de façon sensible et spécifique par deux types de méthodes. L'ELISA est la méthode traditionnelle mais elle nécessite de développer des anticorps spécifiques des fragments (« anti-néo-épitopes ») qui ne sont pas toujours faciles à obtenir. Une approche alternative de sensibilité équivalente et présentant en plus la possibilité de multiplexage (pour détecter et quantifier simultanément plusieurs biomarqueurs dans le même échantillon) est l'utilisation de la protéomique ciblée (techniques connues sous le nom de MRM (Multiple Reaction Monitoring) et PRM (Parallel Reaction Monitoring)) [11, 12]. Ces différentes approches seront illustrées par des exemples.

En résumé, nous n'en sommes probablement qu'au début de l'exploration du potentiel de la protéolyse comme source de biomarqueurs de la cicatrisation et les différentes approches en cours de développement nous aideront à aller plus loin dans leur caractérisation et leur validation.

Références bibliographiques

1. Moali C *et al.* Extracellular and cell surface proteases in wound healing: new players are still emerging. *Eur J Dermatol* 2009, 19:552-564.
2. Krishnaswamy VR *et al.* Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017, 1864:2220-2227.
3. Peng WJ *et al.* Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. *J Clin Immunol* 2012, 32:1409-1414.
4. Bekhouche M *et al.* Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF-beta signaling as primary targets. *FASEB J* 2016, 30:1741-1756.
5. Broder C *et al.* Metalloproteinases meprin alpha and meprin beta are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc Natl Acad Sci USA*

27^{ème} Cours francophone de Biologie de la Peau ; 13^{ème} Colloque thématique
LYON CoBiP 2021

- 2013, 110:14219-14224.
6. Muir AM *et al.* BMP1-like proteinases are essential to the structure and wound healing of skin. *Matrix Biol* 2016, 56:114-131.
 7. Patel S *et al.* Biomarkers for wound healing and their evaluation. *J Wound Care* 2016, 25:46-55.
 8. Auf dem Keller U *et al.* Systems-level analysis of proteolytic events in increased vascular permeability and complement activation in skin inflammation. *Sci Signal* 2013, 6:rs2.
 9. Saravanan R *et al.* Proteolytic signatures define unique thrombin-derived peptides present in human wound fluid in vivo. *Sci Rep* 2017, 7:13136.
 10. Juhl P *et al.* Association of metabolites reflecting type III and VI collagen formation with modified Rodnan skin score in systemic sclerosis - a cross-sectional study. *Biomarkers* 2019, 24:373-378.
 11. Sabino F *et al.* Comparative Degradomics of Porcine and Human Wound Exudates Unravels Biomarker Candidates for Assessment of Wound Healing Progression in Trauma Patients. *J Invest Dermatol* 2018, 138:413-422.
 12. Lemoine J *et al.* The current status of clinical proteomics and the use of MRM and MRM(3) for biomarker validation. *Expert Rev Mol Diagn* 2012, 12:333-342.

Sénescence prématurée des fibroblastes dermiques : implication des microARNs dans la Progeria

Patrice ROLL

Professeur, Chef de Service de Biologie Cellulaire, Hôpital d'Enfants de la Timone ;

264 Rue St. Pierre, 13385 Marseille Cedex 05, France

courriel: patrice.roll@ap-hm.fr

La **Progeria de Hutchinson-Gilford** (HGPS, OMIM # 176670) est une maladie génétique très rare (incidence : 1 sur 4 à 8 millions) caractérisée par un vieillissement prématuré et accéléré d'apparition précoce. Le premier signe clinique survenant classiquement après la première année de vie (12-18 mois), est un retard de croissance staturo-pondéral d'aggravation progressive. Il s'accompagne de nombreux autres symptômes comme des altérations osseuses, un faciès dysmorphique, des atteintes musculaires, une lipodystrophie/atrophie...*(1)* Les atteintes cutanées, également au premier plan, s'aggravent avec l'âge des patients, et sont caractérisés par une peau fine et ridée dépourvue de poils, avec absence de graisse sous-cutanée, une alopecie, et des lésions sclérodermiformes associées à des zones de dépigmentation. En grandissant, ces patients souffrent d'ostéoporose et d'athérosclérose. Ils décèdent vers l'âge de 14 ans, principalement d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral. Dans sa forme classique, cette maladie est due à une **mutation de novo** (1824C>T, p.G608G, dans la majorité des cas) **du gène LMNA** codant les protéines lamines de type A (2, 3). Les lamines sont des filaments intermédiaires qui sont exprimées dans le noyau des cellules eucaryotes et qui interagissent avec de nombreux partenaires. Elles forment un réseau filamenteux plus ou moins dense participant à la constitution de la matrice nucléaire dont la *lamina nucléaire*, structure localisée à la périphérie du noyau en interaction avec l'enveloppe nucléaire. Cette organisation confère au noyau un support structural et participe, entre autre, à l'organisation de la chromatine et au contrôle du « métabolisme » de l'ADN (4).

La Progeria appartient aux **laminopathies** qui regroupent les pathologies liées aux lamines ou à leurs partenaires. Les laminopathies sont héréditaires ou acquises, pouvant alors être d'origine iatrogène (traitement par les inhibiteurs de protéase du VIH par exemple) ou néoplasiques. Les laminopathies héréditaires sont des pathologies rares dues à des mutations soit directement du gène *LMNA* (laminopathies primaires), soit d'un gène codant une protéine impliquée dans la maturation des lamines, telle que *ZMPSTE24*, ou d'une protéine partenaire des lamines (laminopathies secondaires). On distingue les laminopathies tissu-spécifiques des laminopathies systémiques (touchant plusieurs tissus/organes), dont fait partie la Progeria.

Dans la Progeria, la mutation responsable active un site cryptique d'épissage dans l'exon 11 de

LMNA, engendrant la synthèse d'une protéine anormale appelée « **progérine** ». La progérine est une prélamine A (précurseur de la lamine A) tronquée, qui reste anormalement farnésylée et ancrée dans l'enveloppe nucléaire, contrairement à la lamine A sauvage qui est soluble. La progérine s'accumule dans les noyaux de nombreux tissus et organes au fur et à mesure du vieillissement du patient. Cette accumulation induit progressivement de très nombreuses anomalies nucléaires, dont d'importantes anomalies morphologiques et mécaniques, des agrégats protéiques nucléoplasmiques aberrants, une décondensation de l'hétérochromatine périphérique, des anomalies du marquage épigénétique de l'ADN, une dérégulation de nombreuses voies de signalisation et d'expression de gènes telles que celle de p53, ainsi que des anomalies de réparation de l'ADN, ou l'accumulation cellulaire de ROS à l'origine d'un stress oxydant (5). Ces anomalies sont à l'origine de l'apparition d'une **sénescence cellulaire prématurée** contribuant au vieillissement prématuré et accéléré des patients.

Les modifications chromatiniennes qui apparaissent au cours de la Progeria sont à l'origine de modifications profondes de l'expression génique participant aux altérations des fonctions cellulaires. Elles sont potentiellement à l'origine d'altérations de l'expression des **microARNs (miARNs)** dans les cellules des patients. Les miARNs sont des petits ARNs non codants (19 à 25 nucléotides) impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Ils s'hybrident classiquement sur la partie 3'UTR d'ARNm cibles, provoquant leur dégradation ou l'inhibition de leur synthèse protéique. Il existe à ce jour près de 2650 miARNs prédits chez l'Homme (<http://www.mirbase.org/>) parmi lesquels un certain nombre déjà décrits comme impliqués dans la régulation de grandes voies de signalisation et fonctions cellulaires.

A ce jour, peu de travaux ont été réalisés pour étudier le rôle des miRNAs dans la Progeria (6). L'un des rares miARNs étudiés, **miR-9**, cible les transcrits de la prélamine A et de la progérine. Il inhibe ainsi l'expression de la progérine dans les neurones des patients où il est fortement exprimé, expliquant le développement cognitif normal observé dans la Progeria (7).

Les travaux de notre équipe intitulée « *Vieillesse, Prénylation et Cancer* », au sein de l'Unité INSERM/Aix Marseille Université 1251 « *Marseille Medical Genetics* » (Dir : N. Lévy) visent 1/ à identifier et évaluer des approches thérapeutiques dans la Progeria et les syndromes apparentés et 2/ à identifier de nouveaux mécanismes physiopathologiques dans ces maladies rares du vieillissement, avec pour objectif secondaire de transférer nos découvertes dans le domaine du vieillissement physiologique et des pathologies associées. Dans ce cadre, l'un de nos objectifs est de mieux comprendre le **rôle des miARNs** dans ces syndromes.

Dans ce but, nous avons réalisé une étude consistant à établir un profil d'expression de miARNs (miRNome) à partir de cultures primaires de fibroblastes dermiques de patients atteints de Progeria. Nous avons identifié 14 miARNs dérégulés chez les patients : 8 surexprimés et 6 sous-exprimés. Parmi ces miARNs dérégulés, nous en avons étudié deux d'une même famille (miR-376a-3p and miR-376b-3p), surexprimés dans les fibroblastes dermiques de patients, en

raison de leur lien possible avec les mécanismes physiologiques potentiellement impactés et le phénotype clinique dans cette maladie. Nous avons montré par des études *in vitro* utilisant des approches par transfection de miARNs (mimics) ou d'antimiRs, que ces 2 miARNs sont probablement impliqués dans la physiopathologie de la maladie. En effet, ces miARNs inhibent à la fois l'autophagie, réduisant ainsi la dégradation de la progérine dans les cellules des patients, et le cycle cellulaire et la prolifération, en induisant une sénescence cellulaire prématurée.

Ces premiers résultats permettent de mieux comprendre le rôle de miARNs dans la Progeria, dont certains pourraient représenter à terme de nouvelles cibles thérapeutiques dans cette maladie génétique au pronostic très sombre.

Références bibliographiques

1. S. Gonzalo, R. Kreienkamp, P. Askjaer, Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res. Rev.* **33**, 18–29 (2017).
2. A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, P. Cau, C. Navarro, J. Amiel, I. Boccaccio, S. Lyonnet, C. L. Stewart, A. Munnich, M. Le Merrer, N. Lévy, Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*. **300**, 2055 (2003).
3. M. Eriksson, W. T. Brown, L. B. Gordon, M. W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M. R. Erdos, C. M. Robbins, T. Y. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A. B. Csoka, M. Boehnke, T. W. Glover, F. S. Collins, Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*. **423**, 293–298 (2003).
4. R. de Leeuw, Y. Gruenbaum, O. Medalia, Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends Cell Biol.* **28**, 34–45 (2018).
5. P. Cau, C. Navarro, K. Harhour, P. Roll, S. Sigaudy, E. Kaspi, S. Perrin, A. De Sandre-Giovannoli, N. Lévy, Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* **29**, 125–147 (2014).
6. D. Frankel, V. Delecourt, K. Harhour, A. De Sandre-Giovannoli, N. Lévy, E. Kaspi, P. Roll, MicroRNAs in hereditary and sporadic premature aging syndromes and other laminopathies. *Aging Cell*. **17**, e12766 (2018).
7. X. Nissan, S. Blondel, C. Navarro, Y. Maury, C. Denis, M. Girard, C. Martinat, A. De Sandre-Giovannoli, N. Lévy, M. Peschanski, Unique Preservation of Neural Cells in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Is Due to the Expression of the Neural-Specific miR-9 MicroRNA. *Cell Rep.* **2**, 1–9 (2012).

Autophagie et mort cellulaire

Aurore ROZIERES

INSERM U 1111 et Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon
courriel : aurore.roziers@univ-lyon1.fr

La peau représente une barrière physique servant de première barrière de défense contre les différents éléments de l'environnement extérieur comme les pathogènes, les stress mécaniques, les stress chimiques ou autres. Le microenvironnement cutané est ainsi déterminé par de nombreux facteurs tels que le pH, la température, l'humidité, le niveau de sébum, le stress oxydatif, l'alimentation, les cellules immunitaires résidentes et l'exposition infectieuse, la peau doit ainsi faire face à de nombreuses contraintes environnementales. En effet, elle se caractérise comme un organe avec un fort taux de renouvellement cellulaire associé à un environnement pauvre en nutriment pour lequel le maintien la balance survie cellulaire et mort cellulaire représente un élément clé du maintien de l'homéostasie cutanée. Parmi les mécanismes associés au maintien de cette balance homéostatique, l'autophagie se place un mécanisme clé. En effet, l'autophagie est une voie catabolique essentielle de la cellule permettant la dégradation et le recyclage d'éléments cytosoliques par la voie lysosomale. Il existe trois types d'autophagie : la macroautophagie, microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperones qui diffèrent essentiellement par le mécanisme impliqué pour l'apport du matériel au lysosome. La macroautophagie est, à l'heure actuelle, le mécanisme le mieux décrit dans les cellules eucaryotes. En effet, la macroautophagie, communément appelée autophagie, permet la séquestration d'importantes portions du cytoplasme dans des vésicules à double membrane, les autophagosomes. Ce contenu cytoplasmique est, suite à la fusion des autophagosomes avec des lysosomes, dégradé au sein d'autolysosomes. Outre, son rôle dans le maintien de l'intégrité cellulaire et de survie, l'autophagie participe à la dégradation des pathogènes/antigènes et à la diversité du répertoire peptique présenté dans un processus nommé dans ce cas précis xénophagie (Munz et al. 2016). Dans les cellules mammifères, la régulation de l'autophagie implique des dizaines de protéines, dont les protéines ATG (AuTophagy-related). La fonction spécifique de l'autophagie dans la fonction cutanée est un élément encore peu décrit. En effet, des données récentes de la littérature ont permis de mettre en évidence le rôle de nombreuses protéines associées à la fonction autophagique comme ATG5, ATG7, ATG16L1... dans la biologie des cellules cutanées comme les kératinocytes, les mélanocytes et les cellules immunitaires et des défauts de cette fonction sont associées à de nombreuses pathologies humaines cutanées incluant des pathologie, auto-immunes ou encore des cancers. Ces études mettent en avant : i) autophagie est un mécanisme majeur du contrôle de la balance survie cellulaire/mort cellulaire des cellules cutanées et maintien de l'intégrité cutanée ; ii) spécialisation fonctionnelle de l'autophagie dépendante du type cellulaire ouvrant ainsi un nouveau champ d'application dans le domaine de la biologie cutanée.

Différenciation kératinocytaire, atopie et sénescence

Michel SIMON

INSERM-Université Toulouse III, U1056, Toulouse
courriel : michel.simon@inserm.fr

La différenciation kératinocytaire est un phénomène orienté au cours duquel les kératinocytes issus de l'assise basale expriment séquentiellement un grand nombre de protéines spécifiques, comme la cornéodesmosine ou les membres de la famille des « S100-fused type proteins ». Tout au long de leur migration vers la surface, de 3 à 4 semaines chez l'homme, ils subissent une série de remaniements structuraux pour se transformer en kératinocytes épineux puis granuleux. Ces derniers contiennent dans leur cytoplasme de nombreux granules, dits de kératohyaline, et des structures tubulo-vésiculaires issues de l'appareil de Golgi, les corps lamellaires. L'étape ultime, la cornification, est un véritable processus de mort cellulaire programmée qui aboutit à l'empilement de cornéocytes constituant la couche la plus superficielle dite couche cornée. Celle-ci permet à l'épiderme de remplir sa fonction vitale de barrière multiple entre l'individu et son environnement grâce à sa grande résistance mécanique et sa capacité à adsorber une partie des espèces réactives de l'oxygène (ROS), limiter les déperditions hydriques, réduire la pénétration du rayonnement UV et empêcher celle des allergènes et des micro-organismes. Outre la disparition du noyau et des organelles cellulaires, la cornification se caractérise par l'élaboration d'une véritable coque protéique péricellulaire, l'enveloppe cornée, la transformation des desmosomes en cornéodesmosomes et l'agrégation des filaments intermédiaires de kératines en une matrice fibreuse compacte. Cette dernière est facilitée par la filaggrine. Le contenu des corps lamellaires est pour sa part déversé dans les espaces intercellulaires : lipides responsables de l'étanchéité de la couche cornée, peptides anti-microbiens, protéases et inhibiteurs de protéases, etc. Pour assurer efficacement sa fonction, la couche cornée reste hydratée quelle que soit l'humidité ambiante, grâce au Facteur Naturel d'Hydratation. Celui-ci est formé de la combinaison de molécules hygroscopiques et en particulier d'acides aminés et de deux de leurs dérivés, l'acide pyrrolidone carboxylique et l'acide urocanique. Ce dernier contribue aussi à la photo-protection. Ces acides aminés sont issus principalement de la dégradation totale de la filaggrine consécutive à sa dissociation de la matrice fibreuse.

Au cours de cet exposé, a) je rappellerai les bases moléculaires du programme d'expression génique qu'est la différenciation du kératinocyte en pointant certains des marqueurs de chaque étape, b) je décrirai les principales modifications de ce programme de différenciation observées dans l'épiderme des patients atopiques avec l'objectif d'identifier des bio-

marqueurs de la maladie, et c) je discuterai des observations récentes concernant le vieillissement de la peau.

Bibliographie

Revue Générale

- Elias PM. Primary role of barrier dysfunction in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Exp Dermatol*, 27(8):847-851, 2018.
- Le Lamer M, Pellerin L, Reynier M, Cau L, Pendaries V, Leprince C, Méchin MC, Serre G, Paul C, Simon M. Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis. *Biol Chem*, 396:1163-1179, 2015.
- Henry J, Toulza E, Hsu CY, Pellerin L, Balica S, Mazereeuw-Hautier J, Paul C, Serre G, Jonca N, Simon M. Update on the epidermal differentiation complex. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 17:1517-32, 2012.
- Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(4):328-40, 2005.
- Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 121:231-240, 2003.
- Rawlings AV and Matts PJ. Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol*, 124:1099-11, 2005.

Travaux originaux récents

- Reynier M, Allart S, Goudouneche D, Moga A, Serre G, Simon M, Leprince C. The actin-based motor myosin Vb is crucial to maintain the epidermal barrier integrity. *J Invest Dermatol*, 139:1430-1438, 2019.
- Tsoi LC, Rodriguez E, Degenhardt F, Baurecht H, Wehkamp U, Volks N, Szymczak S, Swindell WR, Sarkar MK, Raja K, Shao S, Patrick M, Gao Y, Uppala R, Perez White BE, Getsios S, Harms PW, Maverakis E, Elder JT, Franke A, Gudjonsson JE, Weidinger S. Atopic Dermatitis Is an IL-13-Dominant Disease with Greater Molecular Heterogeneity Compared to Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 139:1480-1489, 2019.
- Hu L, Mauro TM, Dang E, Man G, Zhang J, Lee D, Wang G, Feingold KR, Elias PM, Man MQ. Epidermal Dysfunction Leads to an Age-Associated Increase in Levels of Serum Inflammatory Cytokines. *J Invest Dermatol*, 137:1277-1285, 2017.
- Shibagaki N, Suda W, Clavaud C, Bastien P, Takayasu L, Iioka E, Kurokawa R, Yamashita N, Hattori Y, Shindo C, Breton L, Hattori M. Aging-related changes in the diversity of women's skin microbiomes associated with oral bacteria. *Sci Rep*, 7:10567, 2017.
- Pellerin L, Henry J, Hsu CY, Balica S, Jean-Decoster C, Méchin MC, Hansmann B, Rodriguez E, Weidinger S, Schmitt AM, Serre G, Paul C, Simon M. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and non-lesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 131:1094-1102, 2013.

Interactions neuro-immunes cutanées : implication dans la dermatite atopique

Nicolas GAUDENZIO

Principal Investigator ERC & ATIP-Avenir ; UMR 1056 INSERM - University of Toulouse (UDEAR)

Hôpital Purpan, Place du Dr Baylac TSA 40031, 31059 Toulouse cedex 9, France.

courriel : nicolas.gaudenzio@inserm.fr; www.immception.comwww.immception.com

La dermatite atopique est une pathologie inflammatoire chronique de la peau affectant 15% des enfants et 7% des adultes. Elle est caractérisée par un prurit et des lésions inflammatoires cutanées causées par une hypersensibilité anormale à des substances environnementales habituellement inoffensives (1). L'étiologie de la dermatite atopique est multifactorielle, impliquant facteurs génétiques, environnementaux, réponse immune de type 2 exacerbée et dérégulation de la fonction barrière de la peau (2-4). Un déficit de la barrière épidermique dès les premiers mois de vie favorise le développement de la dermatite atopique (2,3). Les mutations de gènes impliqués dans cette fonction barrière tel que le gène de la *Filaggrine* (4,5) n'intéressent qu'une minorité de patients. D'autres facteurs contribuent probablement à la perte de la fonction barrière de la peau, au développement d'une forte réponse immune de type 2 avec production d'IgE et IgG₁ spécifiques d'allergènes (comme l'acarien *Dermatophagoides farinae*) et méritent d'être étudiés (6-7).

Relations entre nociception, neurones sensitifs et dermatite atopique.

La peau est innervée par un réseau intriqué de neurones sensitifs nociceptifs (nocicepteurs) (8) dont la fonction première est la transmission de signaux de température, de douleur et de prurit à la moelle épinière et au cerveau dans le but d'induire une réponse comportementale appropriée de défense (prévention d'éventuelles lésions tissulaires) ou de grattage (pour retirer d'éventuels irritants à la surface de la peau). Un travail récent de classification des sous-types de neurones sensitifs, basé sur la technique de séquençage d'ARN a permis d'identifier une sous-population unique de nocicepteurs peptidergiques exprimant le canal ionique « transient receptor potential vanilloid 1 » (TRPV1) et le gène *Tac1* (9), codant pour le précurseur commun de deux neuropeptides : la substance P et la neurokinine A (10). Ces nocicepteurs peptidergiques pourraient être impliqués dans la dermatite atopique par le biais du déclenchement du prurit et du réflexe de grattage mais leur rôle exact n'est que partiellement compris (11). Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'on retrouve de grandes quantités de neuropeptides, en particulier la substance P, dans le sérum des patients en comparaison à des sujets

sains, leur taux étant corrélé à la gravité clinique de la maladie (11). Par ailleurs, des données récentes ont montré que les nocicepteurs, en plus de leur rôle de transmission sensitive, sont aussi de puissants régulateurs de la réponse inflammatoire (12).

Relation entre réponse des mastocytes aux neuropeptides et dermatite atopique.

Les mastocytes sont des cellules du système immunitaire inné impliquées dans différentes pathologies allergiques, dont la dermatite atopique (13,14). Des travaux récents ont montré que les mastocytes cutanés arborent une signature transcriptionnelle spécifique de gènes codants pour des neurorécepteurs de la famille des Mas-related G protein-coupled receptors (MRGPR) (15,16), dont « Mrgprb2 », le récepteur aux molécules cationiques telles que la SP (16), grâce auquel les mastocytes pourraient communiquer avec certains nocicepteurs. Le récepteur MRGPRX2 (orthologue humain de Mrgprb2) est aussi le principal récepteur aux molécules cationiques des mastocytes cutanés humains (17). N. Gaudenzio et son équipe ont récemment montré que l'activation des mastocytes, médiée par MRGPRX2 chez l'homme ou Mrgprb2 chez la souris, entraîne un profil de dégranulation mastocytaire rapide suivie du développement d'une réaction inflammatoire locale intense *in vivo* (18). Par ailleurs, des taux élevés de chymase (une protéase libérée majoritairement par les mastocytes de la peau et impliquée dans la dégradation des jonctions étanches (19)) sont retrouvés dans le sérum de patients atteints de dermatite atopique en comparaison à celui de patients psoriasiques (20).

Résultats expérimentaux récents : Les mastocytes et les neurones sensitifs interagissent au niveau de la peau pour réguler le développement de la dermatite atopique.

N. Gaudenzio et son équipe ont récemment démontré que des allergènes domestiques de type « acariens », tels que *Dermatophagoides farinae*, ont la capacité d'activer directement les nocicepteurs peptidergiques de la peau exprimant TRPV1, via leur activité cystéine-protéase. Ainsi activées, ces fibres nerveuses vont libérer de la substance P qui activera les mastocytes en se liant à leur récepteur Mrgprb2. Suite à leur activation, les mastocytes vont libérer des médiateurs pro-inflammatoires qui permettront l'initiation d'une réponse immunitaire de type 2 pathogénique et le développement de sévères lésions cutanées ressemblant à de la dermatite atopique humaine. Ces travaux démontrent que les mastocytes et les nocicepteurs forment au niveau de la peau des « unités sensibles » capables de détecter la présence d'acarien et de déclencher le développement d'une dermatite atopique (21). Ils suggèrent aussi fortement que les interactions neuro-immunes pourraient devenir de nouvelles cibles potentielle dans le traitement et/ou la prévention de la dermatite atopique.

Bibliographie

1. Leung DYM, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* (London, England). 2003;361:151–60.
2. Marichal T, Gaudenzio N, Abbas S El, Sibilano R, Zurek O, Starkl P, et al. Guanine nucleotide exchange factor RABGEF1 regulates keratinocyte-intrinsic signaling to maintain skin homeostasis. *J*

- Clin Invest. 2016;126:4497–515.
3. Kubo A, Nagao K, Amagai M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest.* 2012;122:440–7.
 4. Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2006;38:441–6.
 5. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WHI, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:R2–6.
 6. Sager N, Feldmann A, Schilling G, Kreitsch P, Neumann C. House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and lymphokine profile in the allergen patch test. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;89:801–10.
 7. Langer K, Breuer K, Kapp A, Werfel T. Staphylococcus aureus-derived enterotoxins enhance house dust mite-induced patch test reactions in atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2007;16:124–9.
 8. LaMotte RH, Dong X, Ringkamp M. Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15:19–31.
 9. Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lonnerberg P, Lou D, et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci.* 2015;18:145–53.
 10. Nawa H, Kotani H, Nakanishi S. Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature.* 312:729–34.
 11. Salomon J, Baran E. The role of selected neuropeptides in pathogenesis of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2007;0:070905200526009.
 12. Kashem SW, Riedl MS, Yao C, Honda CN, Vulchanova L, Kaplan DH. Nociceptive Sensory Fibers Drive Interleukin-23 Production from CD301b+ Dermal Dendritic Cells and Drive Protective Cutaneous Immunity. *Immunity.* 2015;43:515–26.
 13. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6:135–42.
 14. Hofmann AM, Abraham SN. New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:679–86.
 15. Bulfone-Paus S, Nilsson G, Draber P, Blank U, Levi-Schaffer F. Positive and Negative Signals in Mast Cell Activation. *Trends Immunol.* 2017;38:657–67.
 16. McNeil BD, Pundir P, Meeker S, Han L, Udem BJ, Kulka M, et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature.* 2015;519:237–41.
 17. Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC, Schleimer RP. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology.* 2008;123:398–410.
 18. Gaudenzio N, Sibilano R, Marichal T, Starkl P, Reber LL, Cenac N, et al. Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. *J Clin Invest.* 2016;126:3981–98.
 19. Bankova LG, Lezcano C, Pejler G, Stevens RL, Murphy GF, Austen KF, et al. Mouse mast cell proteases 4 and 5 mediate epidermal injury through disruption of tight junctions. *J Immunol.* 2014;192:2812–20.
 20. Badertscher K, Bronnimann M, Karlen S, Braathen LR, Yawalkar N. Mast cell chymase is increased in chronic atopic dermatitis but not in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2005;296:503–6.
 21. Nadine Serhan, Lilian Basso et al. and Nicolas Gaudenzio. House dust mites activate nociceptor-mast cell clusters to drive type 2 skin inflammation. *Nature Immunology.* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0493-z>.

Transcriptomique de la peau sensible

Adeline BATAILLE – SAVATTIER, Christelle LE GALL – IANOTTO, Laurent MISERY.

Laboratoire Interactions Epithéliums-Neurones (LIEN), Université de Bretagne Occidentale, Brest, France
courriel : ade.bataille@gmail.com

La peau sensible est un syndrome défini par la manifestation de sensations désagréables (sensations de picotement, de brûlure, de douleur, de prurit) en réponse à un stimulus qui, en général, n'induit pas ce genre de sensations (Misery et al., 2017). La peau sensible réagit de façon excessive à différents facteurs tels que : des facteurs physiques (les rayons ultraviolets, la température), des facteurs chimiques (comme les cosmétiques ou l'eau), des facteurs environnementaux (la pollution), des facteurs psychologiques (stress, émotions) ou des facteurs hormonaux (comme les cycles menstruels) (Farage et al., 2006; Primavera and Berardesca, 2005; Saint-Martory et al., 2008). L'étude de ce syndrome devient essentielle parce qu'il affecte approximativement 60-70% des femmes et 50-60% des hommes (Farage, 2019).

Les nombreuses publications existantes sont essentiellement des études épidémiologiques. Cependant, des études récentes mettent en évidence une neuropathie des petites fibres chez les patients ayant une peau sensible (Buhé et al., 2016; Huet et al., 2018). Seulement deux études transcriptomiques ont été publiées à ce jour (Kim et al., 2014; Yang et al., 2017). Une comparaison de peaux sensibles à des peaux « non sensibles » permet la mise en évidence de gènes différentiellement exprimés. Ainsi, une dérégulation de la transcription dans certaines voies de signalisation comme la voie PI3K – Akt ainsi que les voies de l'adhérence cellulaire et des récepteurs de la matrice extracellulaire est mise en évidence (Yang et al., 2017). Il a aussi été montré un dysfonctionnement de la contraction musculaire et de l'homéostasie métabolique liée à une carence de l'adiponectine (Kim et al., 2014). Ces résultats fournissent des indices intéressants pour une meilleure compréhension de la pathophysiologie des peaux sensibles. Dans une revue générale, nous avons discuté des résultats obtenus par ces deux études et de possibles voies physiopathologiques suggérées par ces travaux et pouvant être impliquées dans la pathogénèse des peaux sensibles (Bataille et al., 2019).

En conclusion, les peaux sensibles sont multifactorielles. L'identification de voies potentiellement impliquées dans la pathogénèse des peaux sensibles sont des clés essentiellement pour une meilleure compréhension de ce syndrome et ainsi trouver des traitements thérapeutiques adaptés.

Références :

- Bataille, A., Le Gall-Ianotto, C., Genin, E., Misery, L., 2019. Sensitive Skin: Lessons From Transcriptomic Studies. *Front. Med.* 6, 115. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00115>
- Buhé, V., Vié, K., Guéré, C., Natalizio, A., Lhéritier, C., Le Gall-Ianotto, C., Huet, F., Talagas, M., Lebonvallet, N., Marcorelles, P., Carré, J.-L., Misery, L., 2016. Pathophysiological Study of Sensitive Skin. *Acta Derm. Venereol.* 96, 314–318.
<https://doi.org/10.2340/00015555-2235>
- Farage, M.A., 2019. The Prevalence of Sensitive Skin. *Front. Med.* 6, 98.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00098>

27^{ème} Cours francophone de Biologie de la Peau ; 13^{ème} Colloque thématique
LYON CoBiP 2021

- Farage, M.A., Katsarou, A., Maibach, H.I., 2006. Sensory, clinical and physiological factors in sensitive skin: a review. *Contact Dermatitis* 55, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2006.00886.x>
- Huet, F., Dion, A., Batardière, A., Nedelec, A.S., Le Caër, F., Bourgeois, P., Brenaut, E., Misery, L., 2018. Sensitive skin can be small fibre neuropathy: results from a case-control quantitative sensory testing study. *Br. J. Dermatol.* 179, 1157–1162. <https://doi.org/10.1111/bjd.17082>
- Kim, E.J., Lee, D.H., Kim, Y.K., Kim, M.-K., Kim, J.Y., Lee, M.J., Choi, W.W., Eun, H.C., Chung, J.H., 2014. Decreased ATP synthesis and lower pH may lead to abnormal muscle contraction and skin sensitivity in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 76, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.09.008>
- Misery, L., Ständer, S., Szepietowski, J.C., Reich, A., Wallengren, J., Evers, A.W.M., Takamori, K., Brenaut, E., Le Gall-Ianotto, C., Fluhr, J., Berardesca, E., Weisshaar, E., 2017. Definition of Sensitive Skin: An Expert Position Paper from the Special Interest Group on Sensitive Skin of the International Forum for the Study of Itch. *Acta Derm. Venereol.* 97, 4–6. <https://doi.org/10.2340/00015555-2397>
- Primavera, G., Berardesca, E., 2005. Sensitive skin: mechanisms and diagnosis. *Int. J. Cosmet. Sci.* 27, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00243.x>
- Saint-Martory, C., Roguedas-Contios, A.M., Sibaud, V., Degouy, A., Schmitt, A.M., Misery, L., 2008. Sensitive skin is not limited to the face. *Br. J. Dermatol.* 158, 130–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08280.x>
- Yang, L., Lyu, L., Wu, W., Lei, D., Tu, Y., Xu, D., Feng, J., He, L., 2017. Genome-wide identification of long non-coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing in subjects with sensitive skin. *Oncotarget* 8, 114894–114910. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23147>

Jeudi 18 mars 2021

Rôle des mastocytes et des IgE dans l'inflammation cutanée

Laurent REBER

ATIP-Avenir team "Asthma, Allergy & Immunotherapy", Center for Physiopathology Toulouse-Purpan (CPTP)

INSERM UMR1043 - CNRS UMR5282 - Université Toulouse III, CHU Purpan - BP 3028

31024 Toulouse Cedex 3, France

courriel : laurent.reber@inserm.fr

Les anticorps de type IgE sont la classe la moins abondante d'anticorps dans le sang (jusqu'à 100000x moins abondants que les IgG). Cependant, ces anticorps sont présents en quantité plus importante chez les sujets allergiques et jouent un rôle clé dans le déclenchement des réactions allergiques (Balbino, Conde et al., 2018) (Gould & Sutton, 2008).

Les mastocytes sont des cellules immunitaires présentes dans de nombreux tissus, et notamment ceux exposés à l'environnement comme la peau (Kalesnikoff & Galli, 2008). Ces cellules ont la particularité de posséder de nombreux granules cytoplasmiques remplis de médiateurs préformés, et notamment des protéases (chymases, tryptases) et de l'histamine. Les mastocytes sont particulièrement connus pour leur rôle dans les maladies allergiques. En effet, les mastocytes expriment le récepteur de haute affinité aux anticorps de type IgE, le FcεRI. Chez les sujets allergiques, des IgE reconnaissant l'allergène sont en permanence liés à ce récepteur à la surface des mastocytes. En cas de ré-exposition à l'allergène, la liaison de l'allergène à ces IgE à la surface des mastocytes entraîne l'activation du récepteur FcεRI. Ceci aboutit à la libération de l'histamine et des autres médiateurs contenus dans les granules cytoplasmiques, un mécanisme connu sous le nom de dégranulation et qui est responsable des symptômes immédiats de l'allergie (Kalesnikoff & Galli, 2008) (Galli, Tsai et al., 2008).

Lors de ce cours, nous évoquerons comment cette propriété des IgE et des mastocytes est utilisée dans le diagnostic de certaines pathologies inflammatoires et allergiques au niveau de la peau. Nous discuterons ensuite le rôle potentiel des IgE et des mastocytes dans plusieurs maladies inflammatoires cutanées : dermatite atopique, urticaire chronique spontané, mastocytose et certaines allergies.

Les IgE, les mastocytes et l'histamine sont des cibles thérapeutiques de choix dans ces diverses

pathologies. Un anticorps thérapeutique anti-IgE (omalizumab) est par exemple utilisé dans le traitement de l'urticaire chronique spontané (Chang, Chen et al., 2015). Son mécanisme d'action dans cette pathologie sera en particulier évoqué.

Finalement, nous discuterons de l'utilité physiologique du système IgE/mastocytes au niveau de la peau. En effet, des données expérimentales chez la souris indiquent que les mastocytes et les IgE pourraient aider à limiter les effets inflammatoires et toxiques de certains composants de venins et de produits irritants, ce qui représenterait un système de défense ancestral (Galli, Starkl et al., 2017) (Reber, Sibilano et al., 2017).

Références

- Balbino B, Conde E, Marichal T, Starkl P, Reber LL (2018) Approaches to target IgE antibodies in allergic diseases. *Pharmacol Ther* 191: 50-64
- Chang TW, Chen C, Lin CJ, Metz M, Church MK, Maurer M (2015) The potential pharmacologic mechanisms of omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 135: 337-42
- Galli SJ, Starkl P, Marichal T, Tsai M (2017) Mast Cells and IgE can Enhance Survival During Innate and Acquired Host Responses to Venoms. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 128: 193-221
- Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM (2008) The development of allergic inflammation. *Nature* 454: 445-54
- Gould HJ, Sutton BJ (2008) IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8: 205-17
- Kalesnikoff J, Galli SJ (2008) New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 9: 1215-23
- Reber LL, Sibilano R, Starkl P, Roers A, Grimbaldston MA, Tsai M, Gaudenzio N, Galli SJ (2017) Imaging protective mast cells in living mice during severe contact hypersensitivity. *JCI Insight* 2

Biomarqueurs de la dermatite atopique

Thomas BIEBER

Professor Thomas Bieber, M.D, Ph.D., Prof. h.c.

Master of Drug Regulatory Affairs (M.D.R.A.)

Chair, Department of Dermatology and Allergy, University Hospital of Bonn, Campus
Venusberg1, 53127 Bonn, Germany

Christine Kühne-Center for Allergy Research and Education (CK-CARE)

courriel : Thomas.Bieber@ukbonn.de



billet
Alain Rémond

Ave, Coronavirus!

Ce n'est pas tous les jours que ce billet peut s'enorgueillir d'un scoop. Ne croyez pas pour autant que je prenne la grosse tête : je dois ce scoop à un lecteur, que je salue bien bas. Et que me révèle ce scoop ? Eh bien, tout simplement, la véritable origine du coronavirus. Je parle de l'origine géographique. Alors que nous sommes tous persuadés qu'il nous arrive de Chine, il se trouve qu'il vient en réalité d'Italie. Et ce lecteur le prouve. Il me renvoie en effet au 37^e album d'Astérix, *Astérix et la Transitalique*, publié en octobre 2017. En voici l'intrigue : pour prouver le bon état des voies romaines, un certain Lactus Bifidus, responsable des dites voies, décide d'organiser, encouragé par César, une grande course de chars, ouverte à tous les peuples de l'empire, qui traverserait toute l'Italie, du nord au sud. Obélix et Astérix s'inscrivent, le premier comme pilote en chef, le second comme copilote. Mais le super-favori, programmé pour gagner la course, est un grand champion qui porte toujours un masque et qui s'appelle... Coronavirus. Parfaitement, mesdames et messieurs : Coronavirus. En réalité, dans le civil, il s'appelle Testus Stérone, Coronavirus étant en quelque sorte son nom d'artiste. Et quand il enlève son masque, il a la tête d'Alain Prost. Ainsi donc, en octobre 2017, Coronavirus faisait son entrée en scène, lançant son char sur les routes italiennes. La « *Transitalique* », hélas, est devenue une épreuve mondiale.

tiré de La Croix du 5/02/2020

Microbiome cutané et l'inflammation

Marc G.J. FEUILLOLEY

Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment LMSM EA4312, University of Rouen Normandy,

Normandie Université, 55 rue Saint Germain 27000 Evreux, France

Courriel : marc.feuilloy@univ-rouen.fr

Le microbiote cutané est le second du corps humain en masse comme en diversité. Distribué dans le stratum corneum de l'épiderme, mais aussi dans les annexes cutanées telles que le follicule pileux et les glandes sébacées ou sudoripares il forme une interface vivante entre l'environnement et le milieu intérieur. Soumis à l'influence des facteurs environnementaux (température, hygrométrie, ultra-violets, cosmétiques, polluants atmosphériques...) et liées à l'hôte (comportement, alimentation, immunité innée et adaptative, hormones et neurohormones, régions et caractéristiques physico-chimiques de la peau ...), le microbiote cutané est une structure dynamique dont on est encore loin d'avoir défini la nature exacte. Les premières études du microbiome cutané réalisées par Grice et al.¹ démontraient la présence 19 phyla et plus de 500 espèces bactériennes avec une majorité de microorganismes appartenant aux genres *Corynebacterium*, *Propionibacterium* (aujourd'hui *Cutibacterium*) et *Staphylococcus*. En plus des bactéries, ce microbiote comporte une large population fongique (essentiellement des espèces du genre *Malassezia*), un important virome formé aussi bien de virus ADN (Papilloma et herpes virus) que de bactériophages, et même comme démontré récemment une population d'archées représentant jusqu'à 4,2% de l'ensemble^{2,3}. La composition de ce microbiote varie très fortement selon les zones cutanées et leurs caractéristiques (sèche, humide, grasse). S'ajoute à cette situation une forte variabilité inter-individuelle³. On s'éloigne donc de plus en plus de la vision rassurante et simpliste des flores commensales et transitoires, bénéfiques et opportunistes, d'autant que certaines espèces comme *Staphylococcus aureus* font partie des deux catégories, que le portage sain d'espèces pathogènes (*Neisseria meningitidis*, Papillomavirus...) concerne une part importante d'individus et que des espèces dites « commensales » comme *Staphylococcus epidermidis* s'avèrent pouvoir acquérir un comportement pathogène sous l'effet de facteurs locaux³⁻⁵. De fait, une des propriétés longtemps ignorée des microorganismes est l'existence d'une régulation fine, et donc d'une variation dans le temps de leur virulence et de leur activité inflammatoire. Ainsi, la présence, comme démontrée par analyse métagénomique, n'est pas synonyme d'activité, et seules des analyses métatranscriptomiques, voire métabolomiques et physiologiques seront en mesure de

fournir une image réelle des molécules microbiennes capables d'agir sur l'inflammation cutanée.

Les premières indications d'un lien entre inflammation cutanée et microbiote sont anciennes et sont même à l'origine du terme « endotoxine » pour désigner le lipopolysaccharide (LPS) présent dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ces bactéries, comme les *Pseudomonas*, peuvent représenter jusqu'à 60% de la microflore cutanée des zones humides telles que le plis du coude (fosse cubitale)⁶. Utilisé souvent au singulier, le terme « LPS » devrait réellement l'être au pluriel, car une même bactérie exprime simultanément plusieurs formes du LPS et peut en changer la structure en quelques minutes. Ceci est d'autant plus important que, si la plupart des LPS sont capables d'être reconnus par les récepteurs de type « *myeloid differentiation factor 2 / Toll-like 4* » (MD2/TLR4) et d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires, d'autres se lient préférentiellement à des récepteurs de type TLR2, voire ne présentent aucune activité inflammatoire⁷. En fait les récepteurs TLR2, sont généralement plus spécialisés dans la reconnaissance de l'acide lipotéichoïque exprimé dans la membrane des bactéries à Gram positifs, voire avec les TLR1 à la liaison de lipopeptides d'origine fongique. D'autres récepteurs de type Toll (TLR5) détectent la flagelline qui forme le flagelle des bactéries mobiles ainsi que les acides nucléiques d'origine bactériens et viraux (TLRs 3,7,8,9). Une autre catégorie de récepteurs, NOD 1 et 2, reconnaissent le peptidoglycane qui entre dans la composition de la membrane des bactéries à Gram positif comme à Gram négatif⁸. L'ensemble de ces récepteurs est donc capable de lier différentes molécules ou fragments de molécules qui forment l'enveloppe des microorganismes et d'induire une réponse inflammatoire. Le microbiote est aussi une source de toxines et de peptides capables d'activer directement ou indirectement la réponse mastocytaire. Toutefois, malgré le million de microorganismes présents en moyenne à la surface de la peau, celle-ci est par chance rarement en état d'inflammation chronique. On connaît encore très mal les mécanismes impliqués dans l'établissement de cette tolérance immunitaire mais des études récentes indiquent qu'elle serait étroitement liée à la sélection pendant la période néonatale d'une population de lymphocytes T régulateurs^{9,10}.

On commence en revanche à comprendre plus précisément les liens étroits existants entre la Substance P, médiateur peptidique bien connu de l'inflammation cutanée, et le microbiote. Ceci repose sur la démonstration au cours des 20 dernières années de la capacité des bactéries à détecter des hormones et neurohormones. Il a ainsi été démontré que des souches cutanées de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus* ou *P. fluorescens* sont capables de détecter la Substance P libérée dans la peau par les fibres sensorielles de type C et d'y réagir par une augmentation massive de leur virulence et/ou de la production de biofilm^{11,12}. Dans le processus d'inflammation neurogène, la libération de Substance P peut être accompagnée de celle de Calcitonine-Related-Peptide (CGRP), et *S. epidermidis* est aussi capable de répondre à ce peptide dès des concentrations femtomolaires^{13,14}. Stimulant la vasodilatation des capillaires et une extravasation plasmatique, la Substance P comme le CGRP peuvent induire une augmentation locale de peptides natriuretiques d'origine

plasmatique et libérés par les cellules endothéliales qui sont aussi capables d'agir sur le développement et la virulence de bactéries cutanées telles *C. acnes* et *S. aureus*¹⁵. Enfin très récemment, il a été démontré que l'adrénaline et la noradrénaline libérées par les terminaisons nerveuses sympathiques, particulièrement abondantes dans la peau, peuvent agir aussi sur la physiologie de *C. acnes* qui pourrait ainsi servir de relais dans les effets du stress psychologique dans l'acné¹⁶. Le mécanisme d'action des hormones et neurohormones au niveau bactérien a été aujourd'hui en partie caractérisé^{13,17}. L'ensemble de ces travaux a conduit à intégrer pleinement le microbiote bactérien dans l'inflammation neurogène¹⁸, voire dans des perturbations cutanées telles que le syndrome de peau sensible. En revanche, tout reste à explorer dans ce domaine en ce qui concerne les rôles potentiels des microbiotes fongiques, archéens ou viraux.

Références :

1. Grice et al., *Genome Res*, 8:1043, 2008
2. Probst et al., *PLoS ONE*, 8:e65388, 2013
3. Byrd et al., *Nature Rev Microbiol*, 16: 143, 2018
4. Yazdankhah & Caugant *J Med Microbiol*, ;53:821, 2004
5. Dong et al., *Cytokine*, 123:154761, 2019
6. Kong & Segre. *J Invest Dermatol*, 132: 933, 2012
7. Breton et al., *J Lipid Res*, 58: 543, 2017
8. Mitchell et al., *J Endocrinol*, 193:323, 2007
9. Belkaid & Harrison. *Immunity*, 46: 562, 2017
10. Scharschmidt. *Dermatol Clin*, 35: 1, 2017
11. Hillion et al. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3:910, 2014
12. N'Diaye et al. *Sci Rep*, 6:35379, 2016
13. N'Diaye et al. *Front Endocrinol*, 8:1, 2017
14. N'Diaye et al., *Front Microbiol*, 8:15, 2017
15. Gannesen et al. *Front Microbiol*, 9:2912, 2018
16. Borrel et al. *Front Medicine*, 6 :155, 2019
17. N'Diaye et al. *Sci Rep*, 9:1304, 2019
18. Feuilleley. *Semin Immunopathol*, 40:281, 2018

Constellation psoriasis : quoi de spécifique ?

Michel GILLIET

Professeur, Chef du Service de dermatologie et vénéréologie
Hôpital Beaumont - Bureau BT 04-446,
Av de Beaumont 29, CH-1011 Lausanne, Suisse

Courriel : michel.gilliet@chuv.ch

Au cours de la dernière décennie, la prise en charge du psoriasis a connu un changement de paradigme. Grâce aux connaissances croissantes sur la pathogénèse du psoriasis, des traitements ciblés à l'aide d'anticorps monoclonaux ont été mis au point. Ces anticorps, qui ciblent la voie pathogène TNF/IL-23/IL-17, se sont avérés sûrs et efficaces dans la prise en charge de la plupart des patients atteints de psoriasis en plaques chronique modéré à sévère. Récemment, des études moléculaires et génétiques sur le psoriasis pustuleux et érythrodermique ont permis d'identifier des voies inflammatoires supplémentaires, ce qui prouve que le psoriasis est une maladie hétérogène et souligne la nécessité d'une caractérisation personnalisée de la maladie pour optimiser le traitement. Je passerai en revue ces avancées, ferai le point sur l'arsenal thérapeutique actuellement disponible, discuterai des perspectives d'avenir et des promesses de la médecine personnalisée dans le domaine du psoriasis.

Développement de la glande sébacée

Bénédicte OULES

Service de Dermatologie, Hôpital Cochin-Tarnier, AP-HP, 89 Rue d'Assas, 75006 Paris
Équipe de Biologie Cutanée, Institut Cochin, Inserm U1016-CNRS UMR8104-Faculté de médecine Paris Descartes, 24
Rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris
courriel : benedicte.oules@gmail.com

Le développement normal et le bon fonctionnement des glandes sébacées (GS) contribuent à l'homéostasie cutanée. Ainsi, des altérations du nombre ou du métabolisme des GS sont impliquées dans un certain nombre de maladies cutanées, notamment au cours de l'acné, la dermatose inflammatoire la plus fréquente¹.

Les GS sont des glandes holocrines multilobulées dont la principale fonction est de sécréter du sébum, une substance huileuse composée d'un mélange de lipides et de débris cellulaires. Le rôle du sébum est de participer au rôle de barrière de l'épiderme, notamment en contribuant aux fonctions d'imperméabilisation, de thermorégulation, de régulation du pH, de protection vis-à-vis des radiations UV et du stress oxydant, et de défense antimicrobienne. Par ailleurs, il assouplit et lubrifie la peau et les poils^{2,3}.

Les GS sont présentes sur toute la surface cutanée à l'exception des paumes et des plantes. Elles constituent, avec le follicule pileux, l'unité pilo-sébacée, la principale annexe associée à l'épiderme. Néanmoins, les GS peuvent également se développer indépendamment de l'unité pilo-sébacée en s'abouchant directement à l'épiderme (glandes de Meibomius au niveau des paupières, grains de Fordyce au niveau des muqueuses, glandes sébacées aréolaires). La taille et la densité des GS varie en fonction de la localisation et du type d'unité pilo-sébacée (de petite taille au sein des follicules terminaux et lanugineux et de grande taille au sein des follicules sébacés qui prédominent dans les régions séborrhéiques du visage et du tronc)^{4,5}.

Les GS comportent une couche cellulaire externe faite de cellules progénitrices

proliférantes, tandis que les sébocytes différenciés riches en vacuoles lipidiques se concentrent progressivement au centre de la glande. Ce sont ces cellules qui, en mourant, vont libérer le sébum qui va circuler dans le canal sébacé, puis dans la zone jonctionnelle et l'infundibulum avant d'atteindre la surface de l'épiderme. Le temps de maturation est estimé à 7 à 14 jours que ce soit chez l'homme ou chez la souris^{2,6}.

Chez l'homme, les GS commencent à se développer vers la 12^{ème} semaine de vie embryonnaire, tandis que la sécrétion sébacée débute entre la 13^{ème} et la 16^{ème} semaine. Le développement des GS est étroitement couplé avec la morphogénèse du follicule pileux comme le montre l'alopecie cicatricielle survenant chez les souris *asebia* qui ont des GS hypoplasiques du fait d'une mutation du gène de la SCD1 (stearoyl CoA desaturase-1)⁷.

Depuis plus d'une trentaine d'années, plusieurs cherchent à comprendre comment l'épiderme et ses annexes se développent et sont maintenus^{8,9}. La formation des GS est contrôlée par plusieurs voies de signalisation qui interagissent de façon complexe. L'identité et la localisation des cellules souches et progéniteurs sébacés reste un sujet non complètement élucidé. Ainsi, il a été montré grâce à des modèles murins transgéniques que plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des GS et des canaux sébacés, parmi lesquels SOX9, Lef1, GATA6, cMYC, JunB, TFAM ou bien encore la signalisation de l'EGFR.

Initialement, les cellules exprimant BLIMP1 ont été prises pour des progéniteurs de la GS¹⁰, cependant de nombreux travaux ont par la suite montré que BLIMP1 marquait en fait des cellules différenciées dans de nombreux compartiments épidermiques¹¹.

SOX9 est, par contre, le premier facteur de transcription nécessaire à l'établissement des GS durant la morphogénèse de l'unité pilo-sébacée¹². Au cours du développement embryonnaire, des progéniteurs positifs pour LRIG1 vont émerger à partir des cellules souches exprimant SOX9, se localiser à la partie supérieure de l'unité pilo-sébacée et participer au maintien de l'infundibulum, de la zone jonctionnelle et des GS¹³. LRIG1 est une protéine transmembranaire marqueur des cellules souches de l'épiderme humain qui régule négativement la voie de signalisation ErbB/EGF¹⁴ et est, par ailleurs, régulé indirectement par la β -caténine via le facteur de transcription cMyc^{15,16}. Plus récemment, le rôle des cellules exprimant le facteur de transcription GATA6, également issues des cellules souches positives pour SOX9, a été montré dans la maintenance et la différenciation de la zone jonctionnelle, des canaux sébacés et de la partie supérieure des GS^{17,18}. La morphogénèse correcte des GS dépend également d'un bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale puisque l'absence du facteur de transcription TFAM entraîne une hypoplasie sébacée majeure¹⁹. Par ailleurs, la formation de GS

ectopiques a été montrée à la suite de l'inactivation de JunB²⁰ ou à l'expression du transgène Δ NLef1²¹ dans les kératinocytes exprimant K14. Enfin, à l'âge adulte, le renouvellement homéostatique des GS repose également sur les cellules souches exprimant LGR6²².

S'il est dorénavant admis que les GS se développent à partir d'un certain nombre de progéniteurs engagés dans la différenciation sébacée²³, il reste à déterminer comment ces populations interagissent, si elles sont fonctionnellement et phénotypiquement différentes, et si ces données sont également applicables aux GS chez l'homme.

Références

1. Bologna, J. L., Jorizzo, J. & Schaffer, J. (2012).
2. Zouboulis, C. C. *et al. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **17**, 319–334 (2016).
3. Schneider, M. R. & Paus, R. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **42**, 181–185 (2010).
4. Saurat, J.-H., Lachapelle, J.-M., Lipsker, D. & Thomas, L. (2017).
5. Kaniakakis, J. *Eur. J. Dermatology* **12**, 390–400 (2002).
6. Frances, D. & Niemann, C. *Dev. Biol.* **363**, 138–146 (2012).
7. Sundberg, J. P. *et al. Am. J. Pathol.* **156**, 2067–75 (2000).
8. Solanas, G. & Benitah, S. A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 737–48 (2013).
9. Donati, G. & Watt, F. M. *Cell Stem Cell* **16**, 465–476 (2015).
10. Horsley, V. *et al. Cell* **126**, 597–609 (2006).
11. Magnúsdóttir, E. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14988–93 (2007).
12. Nowak, J. A., Polak, L., Pasolli, H. A. & Fuchs, E. *Cell Stem Cell* **3**, 33–43 (2008).
13. Page, M. E., Lombard, P., Ng, F., Göttgens, B. & Jensen, K. B. *Cell Stem Cell* **13**, 471–482 (2013).
14. Laederich, M. B. *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 47050–47056 (2004).
15. Jensen, K. B. *et al. Cell Stem Cell* **4**, 427–439 (2009).
16. Jensen, K. B. & Watt, F. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11958–63 (2006).
17. Donati, G. *et al. Nat. Cell Biol.* **19**, 603–613 (2017).
18. Oulès, B. *et al. EMBO J.* e100526 (2019).
19. Kloepper, J. E. *et al. J. Invest. Dermatol.* **135**, 679–689 (2015).
20. Singh, K. *et al. Nat. Commun.* **9**, 3425 (2018).
21. Petersson, M. *et al. EMBO J.* **30**, 3004–3018 (2011).
22. Snippert, H. J. *et al. Science (80-.).* **327**, 1385–1389 (2010).
23. Andersen, M. S. *et al. Nat. Cell Biol.* **21**, 924–932 (2019).

Capacité régénératrice et expansion ex vivo de précurseurs épidermiques : effecteurs moléculaires et biomarqueurs

Nicolas O. FORTUNEL

Laboratoire de Génomique et Radiobiologie de la Kératinopoïèse
Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives CEA/DRF/IBFJ/IRCM ;
2, rue Gaston Crémieux, 91057 Evry Cedex
courriel : nicolas.fortunel@cea.fr

L'épiderme interfolliculaire est naturellement doté d'une grande capacité de renouvellement et de régénération, qui est assurée grâce à la présence de cellules souches et de progéniteurs kératinocytaires au sein de sa couche basale. Dans la peau humaine, il est généralement admis que ces deux compartiments cellulaires exercent des fonctions complémentaires. Les cellules souches constituent les garants à long terme de l'intégrité de l'épiderme, alors que leur descendance directe qui correspond à la population des progéniteurs assure une production continue de kératinocytes qui alimente sur le court terme la dynamique de renouvellement des couches différenciées de l'épiderme. Cet ensemble comprenant les cellules souches et les progéniteurs peut être désigné par le terme plus général de 'précurseurs'. Le potentiel d'organogenèse des précurseurs kératinocytaires est exploité pour la bio-ingénierie d'organoïdes cutanés tridimensionnels destinés au secteur de la R&D industrielle, et de substituts de peau destinés au domaine clinique de la médecine régénératrice [1]. Notamment, le développement de stratégies de greffes autologues de substituts de peau produits en culture est historiquement exemplifié par le traitement des grands brûlés [2,3], et plus récemment par une approche combinant thérapie cellulaire et génique pour la régénération de l'épiderme entier d'un patient atteint d'une génodermatose [4].

La notion de 'biomarqueur' est centrale pour le domaine de la biologie des précurseurs de l'épiderme humain et ses applications dans celui de la bio-ingénierie des organoïdes et substituts cutanés. En premier lieu, la recherche de critères phénotypiques finement discriminants permettant d'identifier et trier à partir d'échantillons de peau différentes sous-populations de précurseurs enrichies en cellules souches ou en progéniteurs [5,6] est susceptible de contributions majeures pour progresser dans la connaissance de l'identité moléculaire et des propriétés fonctionnelles spécifiques de ces cellules [7]. Un second aspect important concerne notre aptitude à promouvoir l'expansion de précurseurs kératinocytaires en culture, qui constitue une étape nécessaire pour les approches de reconstruction cutanée [8]. Dans ce contexte, la notion de biomarqueur s'applique notamment à objectiver le résultat biologique de l'expansion cellulaire, en terme de quantification des précurseurs, mais aussi sur un plan qualitatif, les propriétés et fonctionnalités des cellules obtenues ne devant pas être altérées [8,9].

L'exposé s'appuiera en particulier sur des concepts et résultats scientifiques issus des travaux du laboratoire.

Références :

1. Alexaline MM, Trouillas M, Nivet M, Bourreau E, Leclerc T, Duhamel P, Martin MT, Doucet C, Fortunel NO, Lataillade JJ. Bioengineering a human plasma-based epidermal substitute with efficient grafting capacity and high content in clonogenic cells. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Jun;4(6):643-54. doi: 10.5966/sctm.2014-0155.
2. Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med.* 1984 Aug 16;311(7):448-51.
3. Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, Carsin H, Barrandon Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation.* 2000 Dec 15;70(11):1588-98.
4. Hirsch T, Rothoefl T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klausegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quaglino D, Morgante M, Bicciato S, Bondanza S, De Luca M. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature.* 2017 Nov 16;551(7680):327-332. doi: 10.1038/nature24487.
5. Li A, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3902-7.
6. Fortunel NO, Hatzfeld JA, Rosemary PA, Ferraris C, Monier MN, Haydont V, Longuet J, Brethon B, Lim B, Castiel I, Schmidt R, Hatzfeld A. Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations. *J Cell Sci.* 2003 Oct 1;116(Pt 19):4043-52.
7. Fortunel NO, Cadio E, Vaigot P, Chadli L, Moratille S, Bouet S, Roméo PH, Martin MT. Exploration of the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis at the single-cell level using parallel clonal microcultures of keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2010 Apr;19(4):387-92. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.01046.x.
8. Fortunel NO, Chadli L, Coutier J, Lemaître G, Auvré F, Domingues S, Bouissou-Cadio E, Vaigot P, Cavallero S, Deleuze JF, Roméo PH, Martin MT. KLF4 inhibition promotes the expansion of keratinocyte precursors from adult human skin and of embryonic-stem-cell-derived keratinocytes. *Nat Biomed Eng.* 2019 Dec;3(12):985-997. doi: 10.1038/s41551-019-0464-6.
9. Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G, Martin MT. Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):965-74.

Biomarqueurs de radiosensibilité cutanée

Jérôme LAMARTINE

Pr- Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique (LBTI), CNRS UMR5305 Université Lyon 1.

Courriel : jerome.lamartine@univ-lyon1.fr

La peau, du fait de sa localisation anatomique, est un tissu particulièrement exposé aux stress externes qu'il s'agisse de stress chimiques, thermiques ou radiatifs. Les rayonnements auxquels notre organisme est exposé sont multiples : ils comprennent les rayonnements non-ionisants (électromagnétiques, infrarouges, ultraviolet, lumières des écrans) ou ionisants (rayons X ou gamma) qui sont les plus énergétiques et à priori les plus nocifs pour nos tissus. Nous sommes exposés en permanence à de très faibles doses de rayonnements ionisants d'origine naturelle (rayons cosmiques, radons, radioactivité des roches, alimentation) alors que les expositions à des fortes doses de rayons X ou gamma sont heureusement beaucoup plus rares. Les traitements du cancer par radiothérapie constituent la principale source d'exposition à de fortes doses de radiations ionisantes. Ces traitements sont efficaces mais génèrent des effets secondaires notamment au niveau cutané, premier tissu touché par une irradiation externe. Les effets secondaires cutanés sont généralement bénins et transitoires (rougeurs, desquamation) mais peuvent être plus sévères et persistants (fibroses, nécroses voire carcinomes radio-induits) chez 10 à 15% des patients traités, ce qui démontre une grande variabilité de la sensibilité cutanée aux radiations ionisantes d'un individu à un autre.

Il a été observé lors d'études déjà anciennes [1] une bonne corrélation entre la radiosensibilité clinique des patients et la radiosensibilité des cellules issues de biopsies de ces patients. Le test de référence pour évaluer la radiosensibilité cellulaire consiste à étudier la survie clonogénique des cellules irradiées, notamment les fibroblastes cutanés, à différentes doses de rayons X ou gamma. D'autres approches basées sur l'évaluation de la toxicité cellulaire des radiations (mort apoptotique ou formation d'anomalies chromosomiques) ou le comptage des cassures double-brins de l'ADN après irradiation sont utilisées principalement sur les lymphocytes sanguins. Récemment, l'équipe de Nicolas Foray au CRCL à Lyon a montré que la vitesse de transit de la protéine ATM du cytoplasme au noyau pouvait être corrélée à la survie clonogénique des fibroblastes irradiés et a proposé un test de pronostic basé sur cette observation [2].

Néanmoins, ces diverses méthodes nécessitent l'isolement et la culture des cellules de patients, ce qui est relativement long et complexe et rend ainsi difficile leur utilisation en routine pour du pronostic clinique. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux biomarqueurs moléculaires de radiosensibilité individuelle est un enjeu majeur. En effet, certains marqueurs moléculaires (variants d'ADN ou d'ARN) peuvent être analysables sans culture cellulaire préalable, ce qui permettrait d'identifier rapidement les patients à risque élevé d'effets secondaires graves et de leur proposer des protocoles de radiothérapie plus personnalisés. Le développement des approches de criblage génomique à haut débit (séquençage du génome, analyse du transcriptome, du méthylome, du protéome, du secrétome) laisse espérer que de tels biomarqueurs pourront prochainement être identifiés et utilisés dans des tests de diagnostic de l'hyper-radiosensibilité. Notre équipe contribue à cet effort de recherche en étudiant, par des méthodes d'analyse génomique, des échantillons cellulaires de patients atteints de syndromes génétiques leur conférant une forte radiosensibilité [3] ou de patients issus de la population générale mais ayant développés des séquelles tardives après radiothérapie [4]. L'analyse du transcriptome de fibroblastes cutanés de patients cliniquement radio-sensibles nous a permis d'identifier une signature d'expression génique pouvant potentiellement être utilisée dans un test clinique simple (Dulong et al. En préparation). Au delà des tests pronostics, ces études à large spectre ouvrent des perspectives pour tenter de mieux comprendre les bases moléculaires et cellulaires de la radiosensibilité individuelle, qui est clairement multiparamétrique. Nous devons encore valider les diverses hypothèses mécanistiques que nos travaux récents ont permis de proposer, notamment en ce qui concerne la réparation de l'ADN et la mort cellulaire.

L'identification de nouveaux marqueurs moléculaires de radiosensibilité ouvre la voie à la mise en place de tests de pronostic. Il reste néanmoins plusieurs étapes à franchir pour passer à l'application clinique : détection des biomarqueurs sur des échantillons prélevés de façon non invasive (salive, urine, cheveux par exemple) et validation du caractère prédictif des signatures moléculaires par des études prospectives. Enfin, on peut espérer que l'intégration des données génomiques nous donnera une vision plus précise des mécanismes contribuant à la toxicité cellulaire et tissulaire des radiations ionisantes dans le tissu cutané.

Références :

1. Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1981; 7: 621-9.
2. Pereira S, Bodgi L, Duclos M, Canet A, Ferlazzo ML, Devic C, Granzotto A, Deneuve S, Vogin G, Foray N. Fast and Binary Assay for Predicting Radiosensitivity Based on the Theory

of ATM Nucleo-Shuttling: Development, Validation, and Performance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2018; 100: 353-60.

3. Vulin A, Sedkaoui M, Moratille S, Sevenet N, Soularue P, Rigaud O, Guibbal L, Dulong J, Jeggo P, Deleuze JF, Lamartine J, Martin MT. Severe PATCHED1 Deficiency in Cancer-Prone Gorlin Patient Cells Results in Intrinsic Radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2018; 102: 417-25.

4. investigators Cp, Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, Pereira S, Sonzogni L, Forcheron F, Viau M, Etaix A, Malek K, et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016; 94: 450-60.

Histoire d'eau ou l'interprétation quantique du rôle de l'eau dans le vivant

Laurent VANDANJON

Université Bretagne Sud

Laboratoire de Biotechnologies et Chimie Marines (LBCM), Campus Tohannic, F-56000 Vannes.

Courriel : laurent.vandanjon@univ-ubs.fr

Le monde scientifique s'accorde pour affirmer que la vie provient des océans. Plus précisément, des découvertes récentes [1] semblent prouver la théorie de Michael RUSSEL, astrobiologiste du laboratoire Jet Propulsion (Caltech, USA), selon laquelle la vie serait apparue sur les fonds marins autour des sources hydrothermales. A ces endroits règnent des conditions particulières qui ont pu être reproduites expérimentalement et qui ont permis aux chercheurs d'obtenir des molécules organiques simples au milieu d'un flux de protons issus de réactions d'oxydo-réduction (serpentinisation). Ces réactions ne peuvent se produire que sur la paroi interne de gouttes d'eau. En effet, tout se joue aux interfaces et c'est la tension de surface qui permet à des molécules qui réagissent difficilement de fusionner pour former des molécules plus complexes. On peut donc affirmer dans l'état actuel des connaissances scientifiques que les microgouttes d'eau s'imposent comme de parfaites protocellules et c'est ainsi que serait apparue la vie, il y a 3,5 milliards d'années. D'autre part, l'apparition des premières algues unicellulaires remonte à 1,2 milliards d'années et celle des macroalgues marines à 500-600 millions d'années. Sachons profiter de cette chance de disposer encore à notre époque de ces organismes vivants qui contiennent tout ce dont ont besoin les organismes plus récents dans l'évolution.

En toute logique, il est donc permis de penser que toutes les substances primordiales (les briques élémentaires et l'information) se trouvent dans les algues et dans l'eau (le cycle de l'eau fait que nous buvons de nos jours les mêmes molécules d'eau que les dinosaures). Travaillant depuis de nombreuses années sur la valorisation par bioraffinage des algues, j'ai constaté que la plupart des recherches sont orientées vers l'extraction de molécules à activité biologique et ne s'intéressent

pas vraiment à l'eau cellulaire des algues. Au contraire, on sèche les algues par lyophilisation ou d'autres moyens pour améliorer leur stockage et leur durée de conservation afin d'éliminer l'eau qui est pourtant le constituant majeur de l'algue.

On peut comparer l'eau des algues à la sève des plantes terrestres, c'est un jus riche en nutriments et un véritable concentré d'eau de mer. Or, les bienfaits de l'eau de mer sont connus depuis longtemps ; René QUINTON, physiologiste du début du XX^{ème} siècle, avait déjà remarqué les similitudes entre la composition chimique de l'eau de mer et celle du plasma sanguin humain [2]. Cela l'avait conduit à fabriquer un plasma marin à l'origine de prouesses thérapeutiques à l'époque. Dans le même esprit que Quinton, notre idée est de concevoir un sérum équilibrant et reminéralisant à partir du suc natif d'algues extrait mécaniquement à froid, filtré puis dilué jusqu'à l'isotonie.

Ce sérum étant très riche en eau, il nous est apparu intéressant de mettre à profit les résultats de nos travaux au LBCM [3] sur la structure et les propriétés de l'eau interfaciale pour accroître le potentiel vitalisant des extraits algaux. Nous avons notamment montré l'influence de champs électromagnétiques sur la modification de l'angle de liaison H-O-H et du nombre de liaisons hydrogène par spectrométrie de fluorescence et spectroscopie Infrarouge (FT-IR), ainsi qu'une action sur les nanobulles de gaz et les colloïdes par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Laser Scattering DLS). Plus récemment, nous avons confirmé les résultats obtenus par Pollack [4] concernant la structure de l'eau interfaciale au voisinage de matériaux hydrophiles (Nafion) en observant au microscope la Zone d'Exclusion et son évolution sous l'effet de rayonnements Infrarouges. Nous avons ensuite réalisé des analyses complémentaires en spectroscopie Raman qui nous ont permis de rejoindre les conclusions de Pollack sur une structure des molécules d'eau en « nids d'abeille ». L'interprétation de ces résultats nécessite de s'appuyer sur les modèles de la physique subatomique (électrodynamique quantique). C'est ainsi qu'on peut comprendre que l'eau interfaciale serait un vecteur de transmission de l'information (transfert d'électrons) grâce à un agencement dynamique en domaines de cohérence [5]. Et si certains pouvaient reprocher à cette vision d'être purement théorique, aujourd'hui ce n'est plus le cas. Les preuves expérimentales sont là [6] avec la mise en évidence par spectroscopie laser ultrarapide (10^{-15} s) de la trajectoire d'un électron hydraté en milieu confiné. Or le cytoplasme intracellulaire ne constitue-t-il pas un milieu confiné dans lequel l'eau se trouve sous forme interfaciale ?

27^{ème} Cours francophone de Biologie de la Peau ; 13^{ème} Colloque thématique
LYON CoBiP 2021

- [1] Barge, Flores, Baum, Vandervelde, Russel (2019). Redox and pH gradients drive aminoacids synthesis in iron hydroxyde mineral systems, PNAS, 116 (11), 4828-4833.
- [2] Quinton (1904). L'eau de mer milieu organique, Ed. Doin.
- [3] Vandanjon (2019). L'eau des algues marines pour la santé et la beauté du corps.
<https://www.youtube.com/watch?v=jilLoEaDWzg>
- [4] Pollack (2019). Le quatrième état de l'eau. Ed. Extraordinaires. ISBN 978-2-490769-04-09
- [5] Mentré (1995). L'eau dans la cellule, une interface hétérogène et dynamique des macromolécules. Ed. Elsevier Masson, ISBN 2-225-84608-1
- [6] Coudert (2007). L'eau et l'électron hydraté. Thèse de Doctorat Univ. Paris-Sud

Vendredi 19 mars 2021

Fonctionnalisation des biomatériaux

Jean-Daniel MALCOR

LBTI, UMR5305 CNRS, IBCP Lyon

Ancien Fellow à l'Université de Cambridge, Royaume Uni

courriel : jean-daniel.malcor@ibcp.fr

Les biomatériaux sont omniprésents en médecine, servant désormais d'élément de base pour des dispositifs médicaux (tests *in vitro* pour diagnostics, supports pour thérapies cellulaires), pour des systèmes d'administration de médicaments (microcapsules injectables, système transdermaux) et pour des implants (pacemakers, prothèses). De nombreux facteurs sont à prendre en compte lors de la conception de biomatériaux, comme les propriétés mécaniques, la dégradabilité, la biocompatibilité, la microstructure, ou encore l'interaction du biomatériau avec les tissus et cellules *in vivo*. Certaines de ces propriétés essentielles sont obtenues par modification de la surface de ces biomatériaux. Par exemple, en particulier pour les implants et les prothèses en titane, les surfaces peuvent être traitées pour augmenter la solidité et empêcher toute dégradation. La fonctionnalisation par des molécules biologiquement actives peut également augmenter l'efficacité de l'administration de médicaments, en greffant par exemple des composés ciblant spécifiquement un tissu ou un type de cellule sur des nanoparticules, nanocapsules, micelles ou dendrimères. De manière plus pertinente pour l'ingénierie tissulaire de la peau, l'introduction de composés actifs sur les biomatériaux destinés à êtreensemencés par des cellules est une stratégie extrêmement prometteuse pour promouvoir la régénération de tissus lésés.

En ingénierie tissulaire, l'intégration et l'efficacité des biomatériaux dépend des interactions entre les cellules composant le tissu ciblé et la surface de l'implant. Le guidage de la réponse cellulaire joue un rôle vital dans la performance de ces biomatériaux. Cependant, les biomatériaux bruts échouent jusqu'à présent à reproduire le microenvironnement physiologique des cellules. L'architecture tridimensionnelle, les propriétés mécaniques et les signaux biologiques de ce microenvironnement sont naturellement déterminées par la matrice extracellulaire (MEC), dont l'interaction avec les cellules est d'une importance fondamentale pour la plupart des procédés biologiques [1]. Bien que de nombreux biomatériaux ont pour élément de base des composants de la MEC, ceux-ci doivent subir des traitements chimiques afin d'obtenir des propriétés mécaniques adéquates. Par exemple, le collagène, le principal constituant de la MEC très largement utilisé en ingénierie tissulaire (et en particulier pour la bioingénierie de la peau) [2, 3], doit être réticulé afin de générer un biomatériau stable [4]. Cette réticulation modifie les sites de liaisons du collagène pour les récepteurs cellulaires, aboutissant à des interactions cellules/biomatériau insuffisantes et à un tissu incomplètement reconstruit. Ceci est également le cas pour les biomatériaux comportant d'autres composants tels que les protéoglycanes (décorine, biglycan, fibromodulin...), les glycosaminoglycanes (acide hyaluronique, sulfate de chondroïtine...), d'autres protéines de la

MEC (fibronectine, laminine, perlecan...) ou encore des polymères comme le chitosane ou le poly(éthylène glycol). Ainsi, il existe un important besoin de développer des supports biologiquement actifs capables de soutenir un comportement cellulaire adéquate. Cette activité biologique peut être obtenue sélectivement et de manière contrôlée par fonctionnalisation de biomatériaux inertes par des principes actifs, tout en préservant leur rigidité, élasticité et stabilité [5].

Dans un premier temps, cette fonctionnalisation permettra d'assurer l'adhésion et la survie cellulaire. Suivant l'application souhaitée, la fonctionnalisation est également nécessaire pour promouvoir la prolifération et la migration de cellules, puis éventuellement leur différenciation en lignées cellulaires (si des cellules souches sont utilisées) et leur assemblage en tissu ou en organe fonctionnel. Les molécules greffés sur les biomatériaux afin d'améliorer leur activité biologique sont souvent des ligands pour les récepteurs exprimés à la surface de cellules présentes dans le tissu ciblé. Par exemple, pour promouvoir l'adhésion cellulaire, les biomatériaux peuvent être fonctionnalisés avec des peptides RGD ciblant certaines intégrines ($\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha IIb\beta 3$) [6]. Pour réguler la fonction cellulaire, des facteurs de croissance (tels que TGF- β , FGF, BMP-2 ou VEGF) ou des cytokines sont également utilisés [7]. Par ailleurs, des anticorps peuvent être greffés pour capter et recruter spécifiquement un type de cellule pour la régénération de tissu endommagé [8]. Une autre stratégie prometteuse consiste à greffer des molécules qui reproduisent certains sites de liaisons cellulaires de la MEC, comme les peptides triples hélices qui miment la structure naturelle du collagène et comportent des sites de liaisons pour les récepteurs au collagène dans leur séquence [9].

L'immobilisation de principes actifs à la surface des biomatériaux s'effectue par liaison covalente ou par adsorption. La liaison covalente permet un revêtement très stable, mais la chimie nécessaire peut s'avérer compliquée et peut apporter des changements qui affectent la fonction du biomatériau ou de molécules destinées à être greffées. La liaison covalente s'effectue très majoritairement entre chaînes latérales d'acides aminés de la protéine constituant le biomatériau ou une molécule biologiquement active. Ceux-ci peuvent être des lysines, des glutamates, des aspartates ou plus rarement des cystéines. Des alternatives existent pour ne pas altérer la séquence protéique, consistant à introduire des groupements chimiques à la réactivité très spécifique (par exemple par click-chemistry ou par exposition aux UV d'un groupement photoréactif). A l'inverse, l'adsorption est un processus beaucoup plus simple s'effectuant en milieu physiologique, mais qui est réversible. Une stratégie permettant de contourner ces écueils consiste à combiner une adsorption passive avec un traitement aboutissant à une liaison covalente [9].

Références

- [1] S. Bierbaum, V. Hintze, D. Scharnweber, Functionalization of biomaterial surfaces using artificial extracellular matrices, *Biomatter* 2(3) (2012) 132-141.
- [2] K. Takahashi, Y. Nakata, K. Someya, M. Hattori, Improvement of the physical properties of pepsin-solubilized elastin-collagen film by crosslinking, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 63(12) (1999) 2144-2149.
- [3] L.H.H. Olde Damink, P.J. Dijkstra, M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide, *Biomaterials* 17(8) (1996) 765-773.
- [4] C.N. Grover, J.H. Gwynne, N. Pugh, S. Hamaia, R.W. Farndale, S.M. Best, R.E. Cameron, Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films, *Acta Biomater.* 8(8) (2012) 3080-3090.

27^{ème} Cours francophone de Biologie de la Peau ; 13^{ème} Colloque thématique
LYON CoBiP 2021

- [5] E. Makareeva, E.L. Mertz, N.V. Kuznetsova, M.B. Sutter, A.M. DeRidder, W.A. Cabral, A.M. Barnes, D.J. McBride, J.C. Marini, S. Leikin, Structural Heterogeneity of Type I Collagen Triple Helix and Its Role in Osteogenesis Imperfecta, *283(8)* (2008) 4787-4798.
- [6] J.J. Grzesiak, M.D. Pierschbacher, M.F. Amodeo, T.I. Malaney, J.R. Glass, Enhancement of cell interactions with collagen/glycosaminoglycan matrices by RGD derivatization, *Biomaterials 18(24)* (1997) 1625-1632.
- [7] E. Quinlan, A. López-Noriega, E. Thompson, H.M. Kelly, S.A. Cryan, F.J. O'Brien, Development of collagen-hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering, *J. Controlled Release 198* (2015) 71-79.
- [8] C. Shi, Q. Li, Y. Zhao, W. Chen, B. Chen, Z. Xiao, H. Lin, L. Nie, D. Wang, J. Dai, Stem-cell-capturing collagen scaffold promotes cardiac tissue regeneration, *Biomaterials 32(10)* (2011) 2508-15.
- [9] J.-D. Malcor, D. Bax, S.W. Hamaia, N. Davidenko, S.M. Best, R.E. Cameron, R.W. Farndale, D. Bihan, The synthesis and coupling of photoreactive collagen-based peptides to restore integrin reactivity to an inert substrate, chemically-crosslinked collagen, *Biomaterials 85* (2016) 65-77.

Tétraspaines et mélanome

Ingrid MASSE, Gaël RUNEL et Noémie LOPEZ-RAMIREZ

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon – INSERM U1052 - CNRS 5286 – CLB – Université Lyon 1, Lyon.

courriel : ingrid.masse@univ-lyon1.fr

Les tétraspaines sont une famille de 33 protéines à quatre domaines transmembranaires qui interagissent entre elles et avec d'autres protéines membranaires telles que des intégrines, des protéines à domaines immunoglobulines, des récepteurs à facteurs de croissance et à cytokines... Elles participent ainsi à l'organisation de réseaux de signalisation à la membrane plasmique des cellules appelés « Tetraspanin webs ». Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires par lesquels les tétraspaines régulent différents processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration, l'invasion et la survie des cellules, ou encore l'infection par les virus. Elles ont récemment été impliquées également dans la formation et la fonction de vésicules extracellulaires. Nous nous intéresserons dans un premier temps au rôle de différentes tétraspaines, en particulier les tétraspaines CD9, CD63, CD151, Tspan3c, dans les mélanocytes de la peau, et en particulier à leur fonction physiologique dans la morphogenèse des mélanosomes, la mise en place de la pigmentation et la migration cellulaire. Puis dans un deuxième temps, nous détaillerons le rôle des diverses tétraspaines impliquées dans la migration et l'invasion des cellules de mélanomes. Enfin, nous verrons comment la Tétraspaine 8 pourrait constituer un bon marqueur de l'invasion tumorale chez les patients atteints de mélanome malin.

Applications cliniques des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux

Céline AUXENFANS, Lucille CAPIN, Adeline DESANLIS

Banque de tissus et cellules, Hospices Civils de Lyon, Université Claude-Bernard Lyon 1

courriel : celine.auxenfans@chu-lyon.fr

Le tissu adipeux (TA) est une source reconnue de cellules souches mésenchymateuses, et son accessibilité, par lipoaspiration, le place au rang de matériel biologique de choix en médecine régénérative. Il présente l'avantage de pouvoir être utilisé directement en chirurgie esthétique et réparatrice, mais également comme source de cellules stromales mésenchymateuses à différents stades de préparation. Les recherches sur ces cellules souches appelées adipose derived stem/stromal cells ou ASC, ont débuté au début des années 2000 à l'échelle internationale¹, comme en France². Elles ont depuis fait leur preuve dans des nombreux essais précliniques et quelques essais cliniques.

Caractéristiques des ASC : Les ASC partagent les mêmes caractéristiques de cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse. Dans un souci d'harmonisation, l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) a publié les critères de définitions minimums pour ces CSM, les cellules doivent (i) être adhérentes au plastique en culture in vitro ; (ii) présenter une combinaison d'antigènes de surface (CD73+, CD90+, CD105+, CD34-, CD45-, CD11b-, CD14-, CD19-, CD79a et HLA-DR-); (iii) être capables de se différencier in vitro vers les lignées ostéo-, chondro- et adipogéniques. Contrairement aux CSM de la MO, in vivo, les ASC expriment le marqueur CD34, cette expression de CD34 est rapidement perdue en culture. Il n'existe toujours pas de marqueur unique d'identité pour les CSM, le phénotype consensuel des ASC au sein de la SVF (ASC dites « natives », à l'extraction) peut être restreint à l'expression du marqueur CD34 et à l'absence des protéines CD45 et CD31 (soit CD34+/ CD45- / CD31-). Le marqueur CD271, permet d'isoler des cellules hautement clonogéniques au sein de la SVF³. Les ASC sont capables de se différencier en de nombreux types cellulaires in vitro et in vivo tels qu'en adipocytes, cellules des muscles lisses, cardiomyocytes, en cellules des tissus musculo-squelettiques comme les ostéocytes, myocytes ou encore les chondrocytes. Enfin, plusieurs études ont montré une différenciation vers la lignée neurogénique. Les ASC sont localisés dans l'adventice des petits vaisseaux sanguins du tissu adipeux blanc⁴.

Stratégies thérapeutiques : Plusieurs stratégies thérapeutiques sont envisageables à partir des ASC: (i) le TA issu du lipoaspirat peut être injecté au site de traitement tel quel ou (ii) après digestion du lipoaspirat et centrifugation sous forme de SVF ; (iii) après culture d'ASC extraites de la SVF (iv) après différenciation des ASC pour obtenir les cellules différenciées du tissu cible (v) ou encore en utilisant des dérivées acellulaire (surnageant de culture, exosomes, surnageant de lipoaspirat...). Lorsqu'une étape de préparation et de transformation du lipoaspirat a lieu hors du bloc opératoire, le produit thérapeutique doit répondre à la réglementation du Médicament de thérapie innovante.

La voie d'administration des CSM dépend de l'effet escompté et de la pathologie à traiter. Les voies intraveineuse (IV) et intra-artérielle (IA), sont utilisées pour des pathologies à la fois systémiques et locales, l'injection in situ dans le cas de pathologies uniquement locales. Lors des injections IV ou IA les CSM sont rapidement prises au piège dans le réseau vasculaire pulmonaire. Cependant, leur action thérapeutique ne dépend pas la survie à long terme des ASC injectées suggérant un mode d'action passant par leur secrétôme. De plus, Les injections locales d'ASC semblent avoir un effet bénéfique sur l'inflammation systémique.

Propriétés immunomodulatrices : Les ASC sont capables de supprimer la réaction lymphocytaire mixte associée aux réactions allogéniques. et suppriment la prolifération des lymphocytes T. De plus, la sécrétion par les lymphocytes T de certaines cytokines inflammatoires comme le $TNF\alpha$, l'IFN γ et l'IL-12 est aussi inhibée. C'est la prostaglandine E2 sécrétée par les ASC qui est responsable de cette inhibition lymphocytaire alors que l'IL10, le TGF- β et l'HGF n'ont aucun impact sur cette activité immunosuppressive. Par ailleurs, cette immunosuppression serait aussi liée à l'IL6 capable d'inhiber la différenciation des cellules dendritiques, cellules déclenchant la réponse immunitaire adaptative, une réaction complexe ayant pour acteurs principaux, les lymphocytes B et les lymphocytes T. La PGE2 induit également une conversion des macrophages en phénotype anti-inflammatoire producteurs d'IL-10.

In-vivo, les ASC sécrètent des facteurs capables d'activer les lymphocytes T régulateurs anti-inflammatoires et inhiber les lymphocytes T CD4 Th1 pro-inflammatoires afin de supprimer la réponse immunitaire. La prostaglandine E2 est encore une fois impliquée dans ce processus et accompagnée de l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO), l'IL-10 et le TGF- β . Ainsi les interactions cellulaires et les facteurs sécrétés conduisent à une « rééducation » des cellules immunitaires et induisent l'apparition de cellules régulatrices tolérogènes. La sécrétion constitutive d'IDO est faible, par contre elle est fortement induite par des cytokines proinflammatoires comme l'IFN- γ , suggérant la réactivité des CSM à un environnement inflammatoire⁶.

Propriétés régénératrices : Les ASC favorisent la régénération tissulaire par le biais de leur secrétôme. En effet, lorsqu'elles sont administrées au niveau d'un tissu lésé ou malade, les ASC sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance qui stimulent la régénération tissulaire. Cet effet cicatrisant s'explique par la sécrétion paracrine de facteurs qui vont moduler l'action des principaux acteurs de la cicatrisation. L'action

des ASC sur les kératinocytes est liée à la sécrétion de facteurs comme le KGF, EGF et TGF- α . Le KGF libéré stimule la mitose des kératinocytes alors que l'EGF et le TGF- β favorisent leur migration et leur différenciation permettant ainsi la régénération de l'épiderme. L'EGF, accompagné du PDGF et bFGF favorise aussi la prolifération des fibroblastes. Les ASC libèrent aussi des facteurs angiogéniques tels que le HGF, le TGF- β et le VEGF qui participent à l'angiogenèse et à la néovascularisation des tissus. L'HGF, en plus de favoriser l'angiogenèse, stimule aussi la prolifération des cellules épithéliales, la motilité et la morphogénèse contribuant ainsi à la régénération des tissus.

Le PDGF est lui aussi considéré comme un agent mitotique mais contrairement au VEGF qui agit sélectivement sur les cellules endothéliales, le PDGF agit principalement sur les fibroblastes. Par synergie avec le VEGF, l'HGF, l'IGF, l'IL1, le TNF α et le TGF- β , il stimule en effet leur production de collagène et, accompagné de l'EGF et du bFGF, il favorise leur prolifération. On a montré que les MSC sont capables de réduire la formation de cicatrices chez la souris, notamment chez la souris via l'IL-10 qui induit une diminution de IL-6 et -8 et par conséquent une réduction de la production de collagène et via l'HGF qui est impliqué dans la régulation négative de la fibrose⁷. De plus, l'ajout de ASC en faible proportion (25%) dans un modèle de peaux reconstruites améliore la qualité de l'épiderme et du derme empêchant la sénescence⁸.

Indications thérapeutiques : Au vu de leurs propriétés, l'intérêt des ASC en médecine régénérative ne cesse de croître. À ce jour, 181 études cliniques utilisant des CSM du tissu adipeux sont répertoriées sur « clinicaltrials.gov » en utilisant « adipose mesenchymal stem cell » comme mots-clés. L'Europe réalise 24% de ces essais (dont 7 en France), les États-Unis rassemblent 18% de ces études et l'Asie de l'est 38%. Ainsi, les ASC et/ou la SVF les contenant à l'état natif ont été utilisées dans de nombreuses indications en médecine régénérative comme le comblement tissulaire, la cicatrisation des plaies chroniques, le traitement de la brûlure thermique, chimique ou radioinduite, la réparation du cartilage, la reconstruction osseuse, les accidents vasculaires cérébraux ou encore l'incontinence urinaire. Ces cellules ont également montré des effets bénéfiques dans le traitement de la GVH, des maladies neuro-dégénératives, du diabète, les cicatrices des cordes vocales, de la sclérose en plaque, de la sclérodermie et dans l'alopecie.

Au niveau cutané, le mode d'action des ASC passe par i) la modulation immunitaire, ii) inhibition de la différenciation médiée par TGF β de diverses cellules types en myofibroblastes sécrétant l'ECM par épithélium à transition mésenchymateuse, iii) inhibition du stress oxydatif, et iv) remodelage de la matrice. Plusieurs essais cliniques avec l'injection des CSM sur des plaies ont démontré que les greffes de CSM soutiennent et favorisent la réparation cutanée à la fois dans les plaies chroniques et aiguës, et les prises de greffe.

Sécurité : Peu d'effets secondaires sont répertoriés suite à l'injection des ASC cependant il reste des réticences à l'utilisation des ASC en chirurgie reconstructive après une tumeur. De plus, il est important de

sélectionner la zone de prélèvement du tissu adipeux et vérifier les pathologies (diabète, obésité) et antécédents médicaux des patients, ces facteurs pouvant moduler voire inverser les propriétés des ASC9,10

Références :

1. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. 2001;7(2):211–228. doi:10.1089/107632701300062859
2. Villena JA, Cousin B, Pénicaut L, Casteilla L. Adipose tissues display differential phagocytic and microbicidal activities depending on their localization. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2001;25(9):1275–1280. doi:10.1038/sj.ijo.0801680
3. Álvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y, Otero-Hernández J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World Journal of Stem Cells*. 2015;7(2):470–476. doi:10.4252/wjsc.v7.i2.470
4. Hörl S, Ejaz A, Ernst S, Mattesich M, Kaiser A, Jenewein B, Zwierzina ME, Hammerle S, Miggitsch C, Mitterberger-Vogt MC, et al. CD146 (MCAM) in human cs-DLK1-/cs-CD34+ adipose stromal/progenitor cells. *Stem Cell Research*. 2017;22:1–12. doi:10.1016/j.scr.2017.05.004
5. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine*. 2009;15(1):42–49. doi:10.1038/nm.1905
6. Najar M, Raicevic G, Crompton E, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells: A Story of a Regulatory Network. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*. 2016;39(2):45–59.
7. Wu S-H, Shirado T, Mashiko T, Feng J, Asahi R, Kanayama K, Mori M, Chi D, Sunaga A, Sarukawa S, et al. Therapeutic Effects of Human Adipose-Derived Products on Impaired Wound Healing in Irradiated Tissue. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2018;142(2):383–391. doi:10.1097/PRS.0000000000004609
8. Odile Damour MD, Metral, Elodie. Adipose-derived Stem Cells Promote Skin Homeostasis and Prevent its Senescence in an In vitro Skin Model. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. 2014 [accessed 2020 Feb 5];4(4). <https://www.omicsonline.org/open-access/adipose-derived-stem-cells-promote-skin-homeostasis-prevent-senescence-2157-7633.1000194.php?aid=24999>. doi:10.4172/2157-7633.1000194
9. Silva KR, Baptista LS. Adipose-derived stromal/stem cells from different adipose depots in obesity development. *World Journal of Stem Cells*. 2019;11(3):147–166. doi:10.4252/wjsc.v11.i3.147
10. Kouidhi M, Villageois P, Mounier CM, Ménigot C, Rival Y, Piwnica D, Aubert J, Chignon-Sicard B, Dani C. Characterization of human knee and chin adipose-derived stromal cells. *Stem Cells International*. 2015;2015:592090. doi:10.1155/2015/592090

Marqueurs lipidiques dans la peau

Iuliana POPA

Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay

courriel : iuliana.popa@u-psud.fr

Le métabolisme lipidique dans la peau est réduit souvent à la formation des céramides, témoins de l'étanchéité de la barrière cutanée.

De plus, comme la peau est en soi un organe complexe, il y a au niveau macro un turnover lipidique qui accompagne spécifiquement les excréctions solides (cheveux et ongles), les vésicules intracellulaires (autophagosomes, mitophagosomes, caveolae) (Brown, 2000; Merrill, 2002; Hakomori, 1998; Tidhar, 2013) et extracellulaires (exosomes) et la production de sébum et le film hydrolipidique à la surface de la peau .

Ceci montre la complexité du maintien de l'équilibre lipidique dans la peau du point de vue structural et fonctionnel dans une peau normale et, de surcroît, le déséquilibre croissant dans ce rhéostat lipidique dans le cas d'une peau vieillissante ou dans un état pathologique tel que l'atopie ou l'ichtyose.

Pour mettre en évidence les changements des composants lipidiques ou enzymatiques du rhéostat lipidique dans divers états ou niveaux cellulaires, il y a des outils méthodologiques de la biologie cellulaire (lignées cellulaires, cultures 3D, peau reconstruite) en présence des principes actifs ayant une influence sur diverses classes lipidiques ou sur les système enzymatiques qui les desservent, l'histologie des cellules et des tissus et le marquage colorimétrique avec des anticorps spécifiques.

Dans ce sens, sont utilisés en laboratoire des marquages colorimétrique type Rouge Nil ou Oil Red (pour les lipides neutres ou un marquage global et non-spécifique) ou des marquages plus spécifiques avec des anticorps anti-lipides (ex : ki67, anti-sphingosine, anti-céramides, anti-glucosylcéramides, anti-lactosylcéramides, anti-gangliosides) quand ces anticorps existent et ont la possibilité d'interagir avec le site spécifique dans l'échantillon. De plus, on peut suivre le métabolisme enzymatique qui conduit à la synthèse ou au catabolisme lipidique et dans ce sens les activités des glucosylcéramide synthases, céramidases, ou la STL1 sont déterminées. En complément, des mises en évidence au niveau protéique et ADN/ARN/miRNA de ces enzymes sont effectuées. Les changements au niveau lipidique sont corrélés avec la détection au niveau

humoral (détection des interleukines ou détection des peptides antimicrobiens- cathélicidines). Le tape-stripping est une méthode usitée pour extraire facilement les lipides de la couche cornée (Bleck et al, 1999).

Dans un contexte d'identification des épitopes lipidiques de surface cellulaire, les cellules préincubées avec des anticorps spécifiques peuvent être passées en cytométrie de flux avec des anticorps monoclonaux (exemple dans l'identification des cellules de mélanome avec un anticorps spécifique pour le ganglioside GD3). Une méthode ancienne qui donne de très bons résultats consiste à pré-incuber les échantillons cellulaires ou la peau avec des précurseurs radioactifs comme la [14C]-sérine dans le cas de biosynthèse des sphingolipides dans la peau en présence de l'actif Lipidessence (Popa et al, 2010).

Feingold et coll. (JLR 2007) ont montré les bases du métabolisme de novo et de recyclage de certaines classes lipidiques dans la couche basale, suite au processus de différenciation épidermique et l'obtention d'une couche cornée à la surface de la peau.

Les glycosphingolipides (la totalité des lipides ayant une base sphingoïde dans leur composition) ont un rôle important dans le processus conduisant à la formation de la couche cornée. Ils sont susceptibles de former des synapses avec les intégrines et avoir un rôle important dans la communication intercellulaire (Vance et al, 2002), de moduler les protéines de la surface cellulaire (Ernst and Brügger, 2014), de moduler l'activité des récepteurs de type EGF (Hakomori et coll, 1998), d'avoir un rôle dans l'autophagie, dans les complexes de type raft (Hellwing et coll, 2018), caveolae ou SNARE (Head et coll, 2014).

Des exemples des effets biologiques des lipides mis en évidence par diverses approches sont montrés au fur et à mesure dans cette présentation .

Pour commencer, Kendal et coll (2015) ont montré que suite à la supplémentation avec de l'acide PUFA omega-3 sur des explants de peau, les médiateurs bioactifs lipidiques ayant une activité anti-inflammatoire sont co-responsables avec tout le système protéique du bon fonctionnement de l'homéostasie de la peau.

Dans le contexte du derme au cours de l'âge, Tashiro K et coll (2014) ont montré que certaines classes lipidiques ont une activité biologique importante au niveau intracellulaire et extracellulaire (signalisation type paracrine locale et à distance). De plus, ils ont montré l'étroite corrélation entre l'accumulation des autophagosomes remplis de lipofuscine et l'apparition de la dermoporse et la perte d'hydratation du derme.

Par exemple, l'augmentation de la sphingomyéline dans la peau est synonyme d'une hydratation à long terme (Haruta-Ono et coll, 2012).

La régulation des gènes de la biosynthèse lipidique impliquant le rhéostat lipidique pourra contribuer à la survie cellulaire, à l'autophagie (Tashiro et coll, 2014) dans les cellules âgées et à une bonne adhésion et différenciation épidermique.

De plus, il a été montré que la sphingosine-1-phosphate est biologiquement active dans le

traitement topique de l'atopie car elle restaure l'équilibre enzymatique en favorisant l'accumulation des céramides (Japtok et coll, 2014.). La Phytosphingosine a montré cliniquement une activité anti-inflammatoire dans le traitement de l'acné (Pavicic et coll, 2007). Dans un contexte similaire, la sphingosine 1-phosphate (S1P) stimulée par le resveratrol a induit la production des peptides antimicrobiens de type cathélicidines (Park et coll, 2013). Le même groupe a proposé un mécanisme par lequel cette activité antimicrobienne est mise en place grâce au rhéostat lipidique et en particulier à la S1P (Parka et coll, 2014).

Concernant l'importance de la signalisation lipidique dans le tissu adipocytaire sous-cutané, il a été montré dans un modèle de souris obèses que dans le tissu adipeux, les muscles comme dans tous les organes (pancréas, foie), l'activation de l'enzyme Sptlc2 induit une accumulation des lipides à base de céramides associée à une résistance à l'insuline (Chaurasia et coll, 2016) et que son inhibition avec la myriocine va induire dans tous les organes et la peau une diminution de cette production lipidique et de l'inflammation par une réduction dans le sérum de IL-6, MCP-1 et TNf-alpha.

Il a été montré que divers actifs sont à la base d'une synthèse lipidique optimale dans les tissus cutanés comme dans les fibroblastes et les kératinocytes en présence d'un extrait de Gromwell (*Lithospermum erythrorhizon*) (Kim et coll, 2012) ou de resveratrol (Park et coll, 2013), ou de génisteine (K Park et coll, 2014), ou de Megaderm® (mélange d'acides gras insaturés omega-6 et omega-3) (Popa et coll, 2011), ainsi qu'en présence d'un hydrolysate peptidique de pomme de terre (Popa et coll, 2009) ou de vitamine C (Kim et coll, 2011).

Néanmoins ces lipides de type céramide pourront induire un effet promoteur ou retardateur d'absorption lors de la délivrance d'actifs via un véhicule liposomal ou dans le cadre d'un système eutectique (Benson, 2005).

Ces exemples ont pour but de souligner encore une fois l'importance des lipides dans la biologie de chaque cellule de la peau, ainsi que dans le maintien fonctionnel de l'homéostasie cutanée et à échéance dans la résilience et le traitement global de peau.