



THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Laboratoire Inflammation, tissus épithéliaux et cytokines - LITEC (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :
Mathilde Pohin

Rôle de l'oncostatine M et des interleukines 6 et 31 dans l'inflammation cutanée chez la souris

Directeur(s) de Thèse :
Franck Morel

Soutenue le 17 janvier 2017 devant le jury

Jury :

Président	Frédéric Caux	Professeur des Universités, HP, Université de Paris 13
Rapporteur	Julien Seneschal	Professeur des Universités, HP, Université de Bordeaux 2
Rapporteur	Michel Simon	Directeur de recherche CNRS, Université de Toulouse
Membre	Franck Morel	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	Jean-Claude Lecron	Professeur des Universités, HP, Université de Poitiers
Membre	Jean-François Jégou	Maître de conférences, Université de Poitiers

Pour citer cette thèse :

Mathilde Pohin. *Rôle de l'oncostatine M et des interleukines 6 et 31 dans l'inflammation cutanée chez la souris* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2017. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)
Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Secteur de Recherche : Aspects Moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :

Mathilde POHIN

Rôle de l'oncostatine M et des interleukines 6 et 31 dans l'inflammation cutanée chez la souris

Directeurs de Thèse : Pr. Franck MOREL et Dr. Jean-François JEGOU

Soutenue le 17 janvier 2017

devant la Commission d'Examen

JURY

<u>Rapporteurs :</u>	Pr. SENESCHAL Julien	PU-PH INSERM, Bordeaux
	Dr. SIMON Michel	DR1 CNRS, INSERM, Toulouse
<u>Examinateurs:</u>	Pr. CAUX Frédéric	PU-PH INSERM, Paris 13
	Dr. JEGOU Jean-François	MCU, Poitiers
	Pr. MOREL Franck	PU, Poitiers
	Pr. LECRON Jean-Claude	PU-PH, Poitiers

Remerciements:

J'adresse mes premiers remerciements au Pr. Julien Séneschal et au Dr. Michel Simon pour avoir accepté d'être rapporteurs de thèse et de me faire l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

Je remercie également le Pr. Frédéric Caux pour l'évaluation de ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

Je remercie chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Franck Morel et Jean-François Jégou. Merci pour la qualité de votre encadrement, la transmission de vos connaissances et pour les nombreuses opportunités professionnelles : l'enseignement, les congrès et les collaborations aux différents projets du laboratoire. Franck, merci pour votre disponibilité, pour nos échanges scientifiques et pour avoir fait progresser ma rigueur scientifique, qualité essentielle au métier de chercheur. Jean-François, merci de m'avoir formée durant mon stage de master, pour ta disponibilité, ton soutien et la confiance que tu m'as accordée tout au long de cette thèse. Enfin merci pour ton aide précieuse dans l'écriture de ce manuscrit.

Je remercie le Pr. Jean-Claude Lecron pour m'avoir accueillie au LITEC. Merci pour vos conseils, votre gentillesse et votre bienveillance qui font la richesse et la particularité de ce laboratoire.

Je remercie vivement le Pr. Carolina Veaute pour son aide, ses conseils et pour sa participation à mon projet de thèse au cours de son séjour en France.

Je remercie le Dr. François-Xavier Bernard pour son implication dans le projet de mise au point des épidermes reconstruits murins et pour avoir mis à disposition son équipement et son savoir-faire dans la réalisation de ce projet. Je remercie aussi tout particulièrement Christine Barrault et Julien Garnier pour leur accueil chaleureux à BIOalternatives, pour leurs savoir-faire et leurs disponibilités.

Je remercie vivement tous les membres du LITEC pour m'avoir permise de venir chaque jour au laboratoire avec la même joie, envie et énergie grâce à leurs convivialités et leurs disponibilités. Gardez cet état d'esprit si précieux dans une équipe de travail. Je remercie tout particulièrement Laure, Martine, Isabelle, Adriana et Sandrine pour leurs conseils et

leurs aides, Martine Garcia pour m'avoir libérée de certaines charges d'enseignements au cours de l'écriture de ce manuscrit.

Je remercie également mes collègues de bureau et les doctorants du LITEC Eric, Magalie, Aina, Philippe, Vincent, Marie, Arthur et José pour les moments joyeux passés ensemble. Aina, merci de m'avoir formée au cours de mon stage de L3, merci pour toutes nos discussions scientifiques et amicales, j'ai une pensée pour toi à chaque fois que j'anticipe et prépare correctement une expérience. Philippe merci d'avoir apporté ton regard médical à nos discussions scientifiques toujours fructueuses, pour m'avoir fait participer à ton projet de thèse et pour avoir été un excellent colocataire de bureau. Merci à Elodie pour ta gentillesse et ta disponibilité, merci d'avoir apporté ta vision clinique à nos échanges scientifiques. Merci à Marie pour nos discussions et pour ton aide durant la rédaction de ce manuscrit, je te souhaite de réaliser une excellente thèse.

Je remercie aussi Jean-Marc Berjeaud pour m'avoir orientée vers la faculté de biologie et la carrière de scientifique. Sans toi j'aurais probablement choisi la faculté de médecine par défaut.

Je remercie les doctorants et membres d'autres unités Hélène, Elodie P, Elodie M, Emilie, Audrey, Madga, Adélie et tout particulièrement Julie, Sandie, Audrey et Obélia pour tous les moments de joie, de rire et aussi pour les moments d'écoutes passés au cours de ces trois ans, et pour tous ceux à venir j'espère ! Je vous souhaite à toutes de réussir dans votre vie professionnelle et personnelle.

Je remercie mes parents pour leur soutien, pour leur présence à mes côtés à chaque étape de ma vie et pour les valeurs qu'ils m'ont enseignée en particulier le fait que le travail est toujours récompensé. Je remercie ma famille et mes proches pour leurs soutiens et leurs générosités. Enfin merci à Mathieu pour avoir partagé ces trois années à mes côtés, pour ta patience et ton écoute.

Tables des matières

Chapitre 1 – La peau normale	1
1. L'hypoderme.....	2
2.Le derme.....	2
3. La jonction dermo-épidermique.....	5
4. L'épiderme.....	7
4.1. <i>Composition cellulaire</i>	7
4.2. <i>Les jonctions intercellulaires</i>	9
4.2.1. Les jonctions d'adhérence.....	10
4.2.2. Les desmosomes.....	12
4.2.3. Les jonctions serrées	13
4.2.4. Les jonctions communicantes	14
4.3 <i>Processus de différenciation des kératinocytes</i>	15
4.2.5. La couche basale.....	16
4.2.6. La couche épineuse	18
4.2.7. La couche granuleuse	20
4.2.8. La couche cornée.....	22
5. Spécificité de la peau de souris	24
Chapitre 2 - Système immunitaire cutané.....	26
1. Le kératinocyte, initiateur de l'inflammation.....	27
1.1. <i>Expression de récepteurs de l'immunité innée</i>	27
1.2. <i>Production de médiateurs de l'inflammation</i>	30
1.2.1. Les peptides antimicrobiens.....	30
1.2.2. Les cytokines/chimiokines.....	32
1.3. <i>Cellule présentatrice d'antigènes non professionnelle</i>	35
2. Immunité innée dermique.....	36
2.1. <i>Les macrophages résidents</i>	37
2.2. <i>Les mastocytes</i>	38
2.3. <i>Les cellules Lymphoïdes innées</i>	39
2.4. <i>Les fibroblastes</i>	40
3. Les cellules dendritiques	42
3.1. <i>Les cellules dendritiques myéloïdes</i>	42
3.2. <i>Les cellules dendritiques plasmacytoides</i>	44

4. Les Lymphocytes T.....	44
4.1.1. Les lymphocytes T cytotoxiques.....	45
4.1.2. Lymphocytes T <i>helper</i>	46
4.2. <i>Les lymphocytes T $\gamma\delta$ et NKT non conventionnels</i>	48
4.2.1. Les lymphocytes T <i>Natural Killer</i>	48
4.2.2. Les lymphocytes T <i>gamma delta</i>	49
Chapitre 3. Le psoriasis et la dermatite atopique, principales pathologies inflammatoires cutanées	
.....	51
1. Epidémiologie	51
2. Caractérisation comparative du psoriasis et de la DA.....	53
2.1. <i>Aspects cliniques du psoriasis et de la DA</i>	53
2.2. <i>Aspects histologiques, cellulaires et moléculaires du psoriasis et de la DA</i>	54
2.2.1. Caractérisation des épidermes psoriasiques et atopiques.....	56
a. Différenciation épidermique	56
b. Fonction immunitaire innée de l'épiderme.....	57
2.2.2. Caractérisation des infiltrats immunitaires psoriasiques et atopiques.....	58
a. Les cellules dendritiques	58
b. Les macrophages	59
c. Les lymphocytes T	59
d. Les polynucléaires	60
3. Physiopathologie du psoriasis	62
3.1. <i>Etiologie du psoriasis</i>	62
3.1.1. Défaut intrinsèque des kératinocytes	62
3.1.2. Présentation antigénique et rupture de la tolérance au soi	64
3.2. <i>Modèle physiopathologique du psoriasis</i>	65
3.2.1. Phase d'initiation.....	65
3.2.2. Phase de polarisation cytokinique.....	67
3.2.3. Phase d'expression du psoriasis et activités des cytokines sur les kératinocytes....	68
a. L'IL-1 α et β	69
b. L'interféron- γ	70
c. Le Tumor Necrosis Factor α	70
d. L'interleukine 17.....	71
e. L'interleukine-22.....	72
3.2.4. Effet synergique des cytokines.....	73

3.3. <i>Modèles murins de Psoriasis induit par application d'AldaraTM</i>	74
4. Physiopathologie de la dermatite atopique	77
4.1. <i>Etiologie de la dermatite atopique</i>	78
4.1.1. Altération de la barrière cutanée	78
4.1.2. Hypothèse hygiéniste	79
4.2. <i>Mécanismes physiopathologiques de la DA</i>	79
4.2.1. Phase d'initiation	79
4.2.2. Phase d'expression aiguë	82
4.2.3. Phase d'expression chronique	83
4.3. <i>Modèle murin de dermatite atopique induit par application de Calcipotriol</i>	84
Chapitre 4 - Cytokines de la famille de l'IL-6 et rôle dans l'inflammation cutanée	87
1. Généralités sur les cytokines de la famille de l'IL-6	87
2. L'interleukine 6	90
2.1. <i>Généralités</i>	90
2.2. <i>IL-6 et réponse inflammatoire</i>	92
2.3. <i>Activité de l'IL-6 sur les kératinocytes</i>	93
2.4. <i>Rôle de l'IL-6 dans le psoriasis</i>	93
3. L'oncostatine M	94
3.1. <i>Generalités</i>	94
3.2. <i>OSM et homéostasie</i>	97
3.3. <i>OSM et inflammation</i>	98
3.4. <i>OSM et kératinocytes</i>	100
4. L'interleukine-31	101
4.1. <i>Généralités</i>	101
4.2. <i>IL-31 et prurit</i>	103
4.3. <i>IL-31 et barrière cutanée</i>	104
4.4. <i>IL-31 et inflammation</i>	104
Objectif de la thèse	104
Axe I. Rôle de l'OSM, de l'IL-6 et de l'IL-31 dans l'inflammation cutanée chez la souris.	106
1. Présentation de l'article “Oncostatin M overexpression induces skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation”	106
2. Etude du profil transcriptomique de cultures primaires de kératinocytes murins stimulés par l'OSM	108
3. Comparaison de l'activité <i>in vitro</i> de l'OSM et de l'IL-31 sur des cultures primaires de kératinocytes murins et <i>in vivo</i> chez la souris.....	115

4. Rôle de l'OSM dans un modèle de dermatite atopique induite par application de calcipotriol.	117
Axe 2. Mise au point d'un modèle d'épiderme reconstruit murin et applications	125
1. Présentation de l'article “Development of a new model of reconstituted mouse epidermis and characterization of its response to proinflammatory cytokines”	125
2. Développement des épidermes reconstruits chez la souris et comparaison avec les cultures primaires de kératinocytes en monocouche dans un contexte inflammatoire	149
1. Comparaison de l'activité de l'OSM sur les NMEK et sur les RME	163
Discussion générale et Conclusion	169
1. Activité de l'OSM sur la différenciation des kératinocytes	170
2. Activité de l'OSM sur la production de médiateurs de l'inflammation par les kératinocytes.	172
3. Activité de l'OSM sur d'autres type cellulaires	175
4. Activité de l'OSM dans les pathologies inflammatoires cutanées	178
Références bibliographiques.....	181

Liste des abréviations

α-SMA: *α-smooth muscle actin*
Ad: adénovirus recombinant
ADAM: *a disintegrin and metalloprotease*
AIM2: *Absent in Melanoma 2*
AHR: *Aryl Hydrocarbon Receptor*
ARN: acide ribonucléique
ASC: *Apoptosis-associated Speck-like containing a CARD*
ATP: Adénosine triphosphate
BD: β-défensines
C-EBP: *CCAAT enhancer-binding protein 6*
CLA: *Cutaneous Leukocyte Antigen*
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
Cx: connexine
DA: dermatite atopique
DAMP : motifs moléculaires de dangers
DC : cellules dendritiques
dDC: cellules dendritiques dermique,
iDC : cellules dendritiques inflammatoires
pDC : cellules dendritiques plasmacytoides
DETC: *Dendritic Epidermal T Cell*
DSG: desmoglénines
DSC: desmocollines
EGF: *Epidermal Growth Factor*
E-cadhérine: *Epidermal cadhérine*
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HLA : *Human Leukocyte Antigen*
ICAM-1 : *InterCellular Adhesion Molecule*
IFN: interféron
Ig : immunoglobuline
IL: interleukine
IL-1R1AcP : IL1-R Accessory Protein
ILC : cellules lymphoïdes innées
IMQ : Imiquimod
JAK : Janus Kinases
JDE: jonction dermo-épidermique
K: kératine ou **CK:** cytokératine
KO: Knock Out
KGF: *Keratinocyte Growth Factor*
LC : *Langerhans Cell*, cellules de Langerhans
LCE: *Late Cornified Enveloppe*
LIF: *Leukemia Inhibitory Factor*
LPS : lipopolysaccharides
LT γδ : lymphocytes T non conventionnels à TCR gamme delta

LTh: lymphocyte T helper
LTc: lymphocyte T cytotoxique
LTi : *Lymphoid Tissue Inducers*
LT_{RM}: lymphocytes T résidents mémoires
MAPK: *Mitogen Associated Protein Kinase*
M1/M2 : macrophage de type 1 / macrophage de type 2
NCR: *Natural Cytotoxicity Receptor*
NHEK: *Normal Human Epidermal Keratinocyte*
NMEK: *Normal Murine Epidermal Keratinocyte*
NLR: NOD-Like Receptors
NLRP: NLR à domaine Pyrin
NK: *Natural Killer / NKT* : lymphocytes T NK
OSM: oncostatine M
P-cadhérine : *Placental cadhérine*
PAM : peptides antimicrobiens
PAMP: motifs moléculaires associés aux pathogènes
PASI: *Psoriasis Area Severity Index*
PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PNE: polynucléaires éosinophiles
PNN : polynucléaires neutrophiles
PRR: *Pattern Recognition Receptor*
RHE: *Reconstituted Human Epidermis*
RME: *Reconstituted Murine Epidermis*
ROR: *Retinoic Acid Orphan Receptor*
ROS : espèce réactive de l'oxygène
sIL-6Rα : IL-6 récepteur soluble
sgp130 : gp130 soluble
SAA: *Serum Amyloid Protein*
SHC: SH2-and collagen-homology-domain-containing protein
SOCS: *Suppressor of cytokine signaling*
SPRR: *Small Proline Rich Regions*
shRNA : petit ARN en épingle à cheveux
STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*
TCR: *T Cell Receptor*
TEWL: *Trans Epidermal Water Loss*
TGF-β: *transforming growth factor*
TNF-α: *Tumor Necrosis Factor*
TLR: *Toll-Like Receptors*
Treg: lymphocytes T régulateurs
TSLP: *Thymic Stomal Lymphopoietin*
UV: ultra-violets
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

Listes de publications:

- M. Pohin, C. Veaute, J. Garnier, C. Barrault, L. Cronier, F.X. Bernard, J.C. Lecron, F. Morel, J.F. Jégou. **Establishment of a reconstituted mouse epidermis model to characterize response to pro-inflammatory cytokines.** En révision, J. Tissue. Eng. Regen. Med.
- E. Couderc, F. Morel, P. Levillain, A. Buffière-Morgado, M. Camus, C. Paquier, L. Favot, C. Bodet, J.F. Jegou, M. Pohin, V. Huguier, J. Mccheik, C. Lacombe, F.X. Bernard, H. Yssel, G. Guillet, J.C. Lecron. **Interleukin-17A-induced production of acute serum amyloid A by keratinocytes contributes to psoriasis pathogenesis.** En révision, Brit. J. Dermatol.
- P. Vasseur, M. Pohin, P. Liagre, C. Paquier, JF. Jégou, L. Favot, N. Venisse, F. Morel, JC. Lecron, C. Sylvain. **Liver fibrosis is associated with the severity of cutaneous inflammation in a murine model of chronic psoriasiform dermatitis and in psoriatic patients.** En révision, Brit. J. Dermatol.
- P. Vasseur, L. Serres, J.F. Jégou, M. Pohin, A. Delwail, I. Petit-Paris, P. Levillain, L. Favot, M. Samson, H. Yssel, F. Morel, C. Sylvain, J.C. Lecron. **High-fat diet-induced IL-17A exacerbates psoriasiform dermatitis in a mouse model of steatohepatitis.** Am. J. Pathol. 2016. 186:2292-2301.
- M. Pohin, W. Guesdon, A.A.Tagne Mekouo, H. Rabeony, I. Paris, H. Atanassov, L. Favot, J. Mccheik, F.X. Bernard, C.D. Richards, J. Amiaud, F. Blanchard, J.C. Lecron, F. Morel, J.F. Jegou. **Oncostatin M overexpression induces potent skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation.** Eur. J. Immunol. 2016. 46: 1737–1751
- H. Rabeony, M. Pohin, P. Vasseur, I. Petit-paris, J.F. Jégou, L. Favot, E. Frouin, M. Boutet, and F. Blanchard, D. Togbe, B. Ryffel, F.X. Bernard, J.C. Lecron, F. Morel. **IMQ-induced skin inflammation in mice is dependent on IL-1R1 and MyD88 signaling but independent of the NLRP3 inflammasome.** Eur. J. Immunol. 2015. 45: 2847-285.

Avant-propos

Au cours des deux dernières décennies, la compréhension du rôle des cytokines dans la physiopathologie de maladies inflammatoires cutanées fréquentes comme le psoriasis et la dermatite atopique (DA) a permis le développement de nouveaux outils thérapeutiques. De fait, les biothérapies ciblant les cytokines produites dans la peau inflammatoire et ayant des activités majeures sur les kératinocytes ont montré une efficacité remarquable dans le traitement de ces pathologies. Néanmoins, certains patients restent en échec thérapeutique ou peuvent échapper à la réponse aux traitements à long terme. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques constitue donc un enjeu majeur de la recherche fondamentale, ceci afin d'étoffer l'arsenal médicinal disponible dans le traitement des pathologies inflammatoires cutanées.

Le Laboratoire Inflammation, Tissu Epithéliaux et Cytokines (LITEC, EA-4331) étudie le rôle des cytokines dans l'inflammation cutanée et leur contribution à la communication entre les cellules immunitaires et les kératinocytes. Parmi les cytokines dont l'expression est augmentée au cours de processus inflammatoire, le LITEC a décrit que l'oncostatine M (OSM) pourrait être impliquée dans l'inflammation cutanée par ces activités proinflammatoires sur les kératinocytes humains *in vitro* (Boniface et al, 2007). A mon arrivée au laboratoire, un projet visant à comparer les activités de l'OSM à celles d'autres cytokines de la famille de l'interleukine (IL)-6 avait été initié. Au cours de mon stage de master 2 puis de ma thèse, j'ai contribué à décrire le rôle de l'OSM dans l'inflammation cutanée en comparaison à celui de l'IL-6 et de l'IL-31 (Pohin et al. 2016). Pour cela, nous avons utilisé plusieurs approches méthodologiques : *in vitro*, par l'utilisation de cultures primaires de kératinocytes murins, et *in vivo* par l'utilisation de modèles murins d'inflammation cutanée. En parallèle de ces travaux sur l'OSM et en collaboration avec l'entreprise BioAlternatives, j'ai également développé un modèle d'épiderme reconstruit à partir de cultures primaires de kératinocytes murins (Pohin et al. en révision JTERM). Ce modèle couramment utilisé dans les tests de produits cosmétiques ainsi que dans la recherche fondamentale chez l'homme, n'avait pas connu un développement satisfaisant chez la souris à ce jour. Ce modèle de culture tridimensionnelle de kératinocytes, plus représentatif d'un épiderme natif de souris, répond aux cytokines inflammatoires de

manière similaire aux modèles *in vivo*. Parmi les cytokines connues pour leur implication dans les pathologies inflammatoires cutanées, nous montrons que l'OSM possède une activité plus importante que le *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α ou l'IL-17 sur la différenciation des épidermes reconstruits murins. Ces résultats renforcent l'idée que le blocage de l'OSM est une cible thérapeutique pertinente dans les pathologies inflammatoires cutanées.

Etude bibliographique

Chapitre 1 – La peau normale

La peau couvre le corps humain sur une surface de 2m², représente 15% du poids d'un organisme et mobilise jusqu'à 8% du métabolisme (Kolarsick et al. 2011). Sa structure complexe lui permet d'assurer de nombreuses fonctions vitales. Ainsi, chez les organismes terrestres, la principale fonction de la peau est de former une enveloppe imperméable contre les pertes d'eau. Son rôle est aussi de réguler la température corporelle, de participer à la synthèse de certaines vitamines et de former une protection particulièrement efficace contre les agressions environnementales. Les annexes cutanées épidermiques comprennent les glandes sébacées, les glandes sudoripares, les follicules pileux et les phanères qui participent aux fonctions protectrices de la peau (Figure 1). Des terminaisons nerveuses sensitives essentielles à la perception du milieu extérieur sont également présentes, ainsi qu'un système vasculaire dense permettant les échanges avec les organes internes.

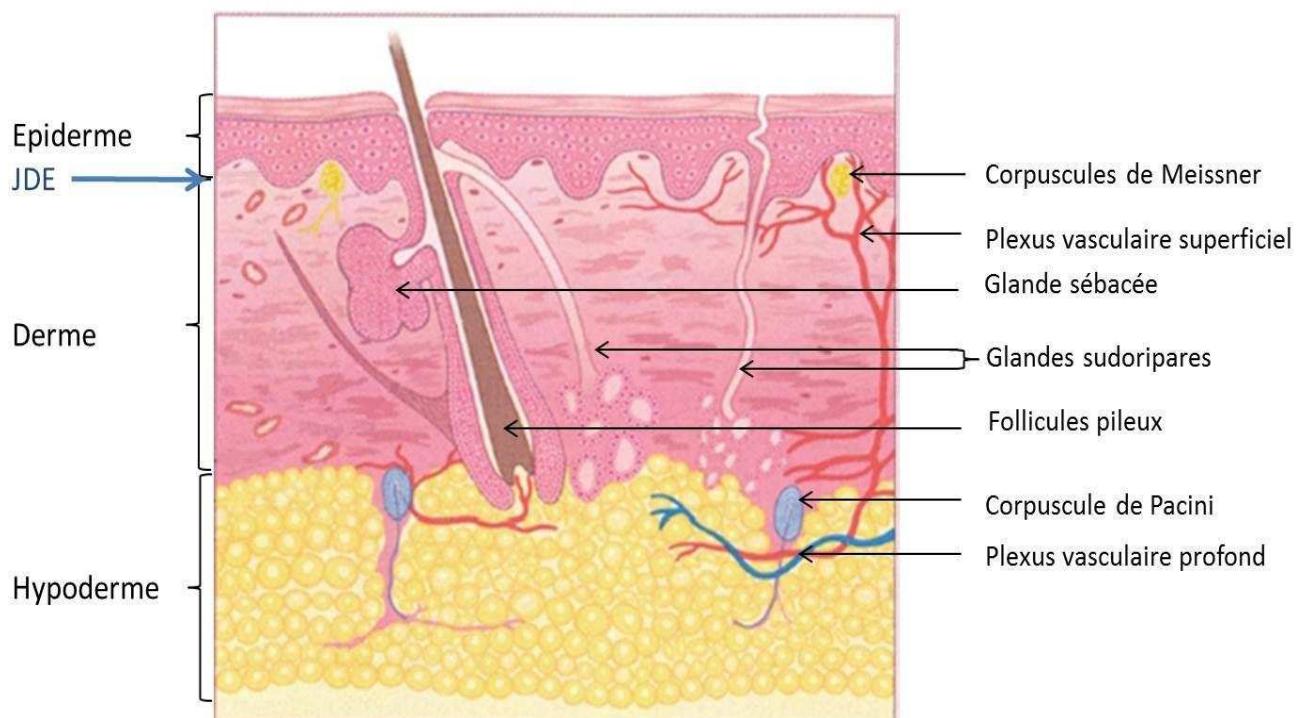


Figure 1 : Structure de la peau et des annexes cutanées. La peau est divisée en trois couches définies par des critères histologiques. Le derme et l'hypoderme sont des lieux d'ancrage pour différentes annexes épidermiques en particulier pour les follicules pileux et les glandes sébacées et sudoripares. JDE : jonction dermo-épidermique. *Repris et modifié d'après Kolarsick et al. 2011.*

1. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif adipeux blanc réparti en lobules graisseux formés d'adipocytes. Ces cellules spécialisées régulent le métabolisme par le stockage ou la libération de lipides et la physiologie de différents organes par la production d'hormones. Le tissu adipeux permet aussi de réguler la température corporelle et amortit les chocs mécaniques. Chez un individu non obèse, il peut représenter 10% de la masse corporelle (McKee 2012). Les lobules graisseux sont séparés par des septums fibreux riches en vaisseaux sanguins et en fibres nerveuses qui permettent les échanges avec le reste de l'organisme. Les cellules endothéliales et les macrophages présents dans les septums participent à la régulation endocrinienne et métabolique par la production d'adipokines. La transition entre l'hypoderme et le derme est grossièrement délimitée par le plexus vasculaire profond composé de vaisseaux artériels, veineux et lymphatiques (Figure 1).

2. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif fibreux de soutien qui assure les propriétés biophysiques de la peau en particulier son élasticité, sa résistance et sa résilience (Prost-Squarcioni 2006; McKee 2012). Pour cela, le derme est formé d'un vaste réseau de fibres de collagènes et d'élastines reposant sur une substance fondamentale amorphe (Figure 2). Les composants de cette matrice dermique sont synthétisés par les fibroblastes, des cellules spécialisées dans la formation et le remodelage de la matrice extracellulaire présentes dans tous les tissus conjonctifs sous-épithéliaux. Le derme est richement vascularisé par deux plaques vasculaires et un réseau de petites artères et veines (Figure 1). Cette vascularisation permet l'apport de nutriments, l'export des vitamines synthétisées dans la peau et le trafic de cellules immunitaires. En histologie, deux zones du derme humain se distinguent par l'organisation de la matrice extracellulaire (Figure 2).

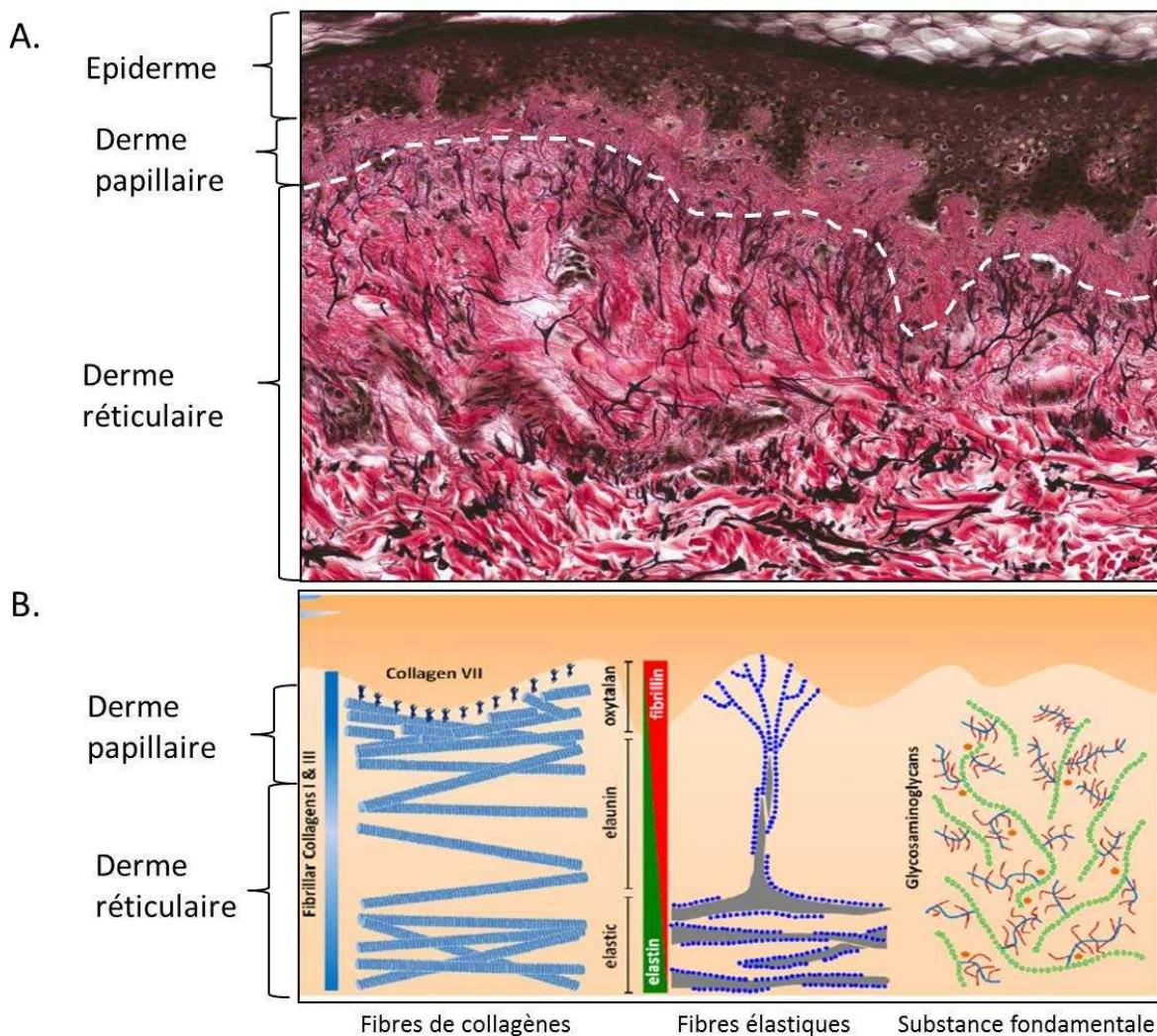


Figure 2. Structure du derme. (A) Coupe histologique de derme humain en coloration de Verhoeff contre coloré au Van Gieson faisant apparaître les fibres élastiques (marron) et les fibres de collagènes (rose). (B) Schéma représentant la composition de la matrice extracellulaire. Les fibres de collagènes sont attachées à la jonction dermo-épidermique par le collagène de type VII. Les fibres d'élaunine sont une forme intermédiaire de fibres élastiques comportant un ratio équivalent d'élastines et de fibrillines. Repris et modifié d'après (Naylor et al. 2011).

En surface, le derme papillaire s'intercale en papilles dermiques entre les crêtes épidermiques. Cette disposition non linéaire augmente la surface d'ancrage et d'échange entre le derme et l'épiderme. Le derme papillaire est un support nourricier dynamique de l'épiderme. Pour cela, il est irrigué par des micro-vaisseaux provenant du plexus vasculaire superficiel qui s'arborisent en fines artéries et veinules dans les papilles dermiques. Cette arborisation permet l'apport de nutriments nécessaires à la croissance et au renouvellement épidermique. Sur les mains et le visage, le derme papillaire contient également des récepteurs sensitifs, les corpuscules de Meissner responsables de la sensation tactile fine

(Figure 1). Il est formé de fibres de collagène de type I et de type III lâches et peu organisées et de fibres d'oxytalanes composées de fibrillines. Les fibres d'oxytalanes sont des fibres élastiques immatures progressivement remodelées pour former des fibres d'élaunine puis des fibres élastiques matures composées d'élastines et de fibrillines (McKee 2012). Les fibroblastes sont surtout présents dans le derme papillaire, leur forme étendue est caractéristique de cellules prolifératives et métaboliquement actives (Janson et al. 2012). Les fibroblastes du derme papillaire participent à l'homéostasie épidermique en produisant des facteurs de croissance tels que l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) ou les *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) 1 et 2 (Sorrell and Caplan 2004).

Le derme réticulaire est, quant à lui, plus dense. Son épaisseur est variable en fonction de la zone recouverte (épais au niveau des mains et des pieds, fin au niveau des paupières). D'épaisses fibres de collagène de type I et de fibres élastiques matures orientées parallèlement à la jonction dermo-épidermique (JDE) le constituent (Figure 2). Les fibres de collagènes assurent une résistance aux chocs mécaniques tandis que les fibres élastiques permettent à la peau de reprendre sa forme initiale après une pression et répondent aux étirements qu'elle subit (Figure 2). Les rares fibroblastes présents dans le derme réticulaire ont des propriétés contractiles importantes mais se multiplient peu. De plus, leurs formes étoilées diffèrent de celles des fibroblastes papillaires, suggérant un état de différenciation plus avancé (Sriram et al. 2015). Toutefois, les fibroblastes du derme réticulaire sont distingués des myofibroblastes caractérisés par l'expression de la protéine de stress α -smooth muscle actin (α -SMA) et retrouvés dans des tissus fibrotiques ou lors de la cicatrisation (Gabbiani 2003).

Le derme réticulaire est aussi le lieu d'ancrage de nombreuses annexes épidermiques. Les glandes sudoripares sont particulièrement nombreuses au niveau de la paume des mains et des pieds et secrètent la sueur, un liquide riche en sel et en certains composés peptidiques qui régule la température corporelle (Kolarsick et al. 2011). Les glandes sébacées sont le plus souvent annexées aux follicules pileux, l'ensemble formant un follicule pilo-sébacé. Le sébum, synthétisé dans la glande sébacée, est libéré dans le canal du follicule pileux et remonte à la surface de la peau avec le poil. Le sébum forme une couche lipidique protectrice qui limite la déshydratation et la prolifération de bactéries à la surface de l'épiderme (McKee 2012). En outre, les annexes épidermiques constituent des réservoirs

de cellules souches, en particulier les follicules pileux, qui participent activement au processus de ré-épithérialisation après lésion (Kolarsick et al. 2011). Dans le derme réticulaire profond, sont aussi retrouvés des corpuscules de Pacini permettant la détection des vibrations et des changements de pression (Kolarsick et al. 2011).

Enfin la substance fondamentale qui forme la matrice amorphe du derme est composée d'acide hyaluronique, de protéoglycans et de glycoprotéines (Figure 2). Les longues chaînes de glycosaminoglycans de ces molécules piégent les molécules d'eau et les facteurs de croissance et constituent ainsi un réservoir pour la croissance épidermique (Krieg and Aumailley 2011).

3. La jonction dermo-épidermique

La JDE est un complexe macromoléculaire séparant le derme de l'épiderme parfois considéré comme une couche à part entière. La JDE renforce l'intégrité de la peau en constituant une zone d'ancrage pour l'épiderme. Elle permet l'établissement de la polarité et la croissance des kératinocytes (Has and Nystrom 2015). La JDE est une membrane poreuse qui autorise les échanges moléculaires et cellulaires sélectifs entre le derme et l'épiderme (Kolarsick et al. 2011). De l'épiderme vers le derme, trois zones se distinguent :

La membrane plasmique basale des kératinocytes basaux est fixée au mésenchyme sous-jacent par des hémidesmosomes et des complexes d'adhérence focale (Figure 3.). Ces jonctions cellules-matrices coordonnent la polarité des cellules épithéliales par leur fixation au cytosquelette intracellulaire et régulent la prolifération de l'épiderme par leur interaction avec le récepteur membranaire de l'EGF (Simpson et al. 2011). Les hémidesmosomes sont formés d'intégrines $\alpha 6\beta 4$ et de *Bullous Pemphigoid Antigen 1/2* spécifiques de la JDE tandis que les complexes d'adhérence focale sont composés d'intégrines $\alpha 3\beta 1$ retrouvées dans de nombreuses lames basales (Simpson et al. 2011). De fait, les hémidesmosomes sont des structures rigides spécifiques de la peau qui participent au mécanisme de résistance face aux tensions mécaniques. A l'inverse, les complexes d'adhérence focale sont dynamiques et permettent la migration des cellules de l'épiderme au cours de la cicatrisation (Tsuruta et al. 2011; Has and Nystrom 2015).

La lame basale qui sépare l'épiderme du derme est formée d'une zone claire aux électrons, la *lamina lucida* et d'une zone sombre la *lamina densa*. La *lamina lucida* est constituée de filaments d'ancrage de laminines 332 et 311 reliés aux intégrines par leur domaine extracellulaire formant ainsi des jonctions cellules-matrices. La laminine 332, dont l'expression est restreinte à la peau, est essentielle au maintien de la continuité entre l'épiderme et le derme (Has and Nystrom 2015). La *lamina densa* est composée de fibres de collagènes de type IV et de protéines d'agrégation produites par les fibroblastes dermiques notamment les nidogènes 1 et 2 (Breitkreutz et al. 2013). Cette *lamina densa* est finalement fixée aux fibres du derme par de petite fibres de collagènes de type VII.

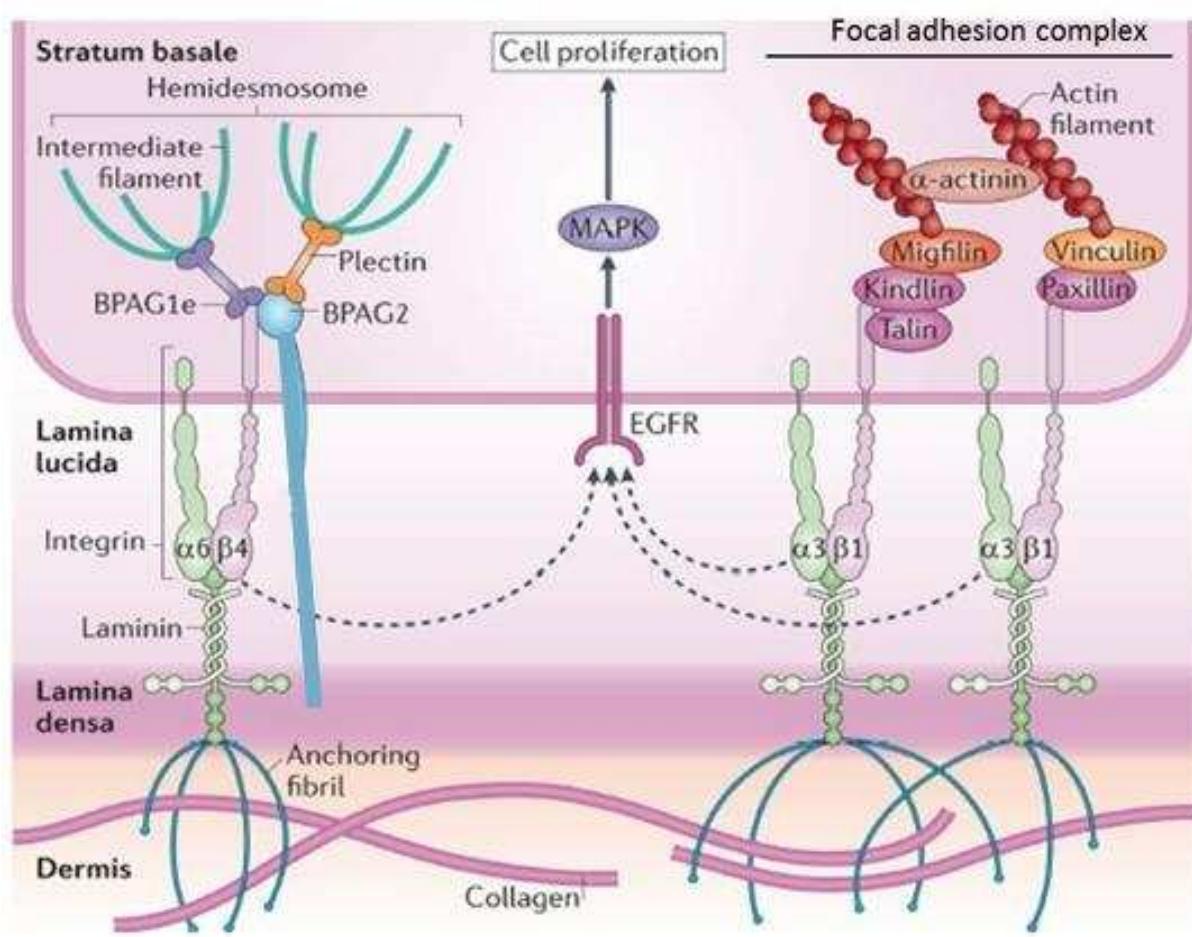


Figure 3 : Structure de la jonction dermo-épidermique. Les hémidesmosomes sont composés de complexes transmembranaires ; les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et de *Bullous Pemphigoid Antigen 2* aussi appelée collagène XVII, reliées aux filaments intermédiaires par des protéines adaptatrices. Les complexes d'adhérence focale sont structurés de manière identique mais sont composés d'un autre dimère d'intégrines $\alpha 3\beta 1$ et sont reliés aux filaments d'actine. Repris et modifié d'après (Simpson et al. 2011). BPAG: *Bullous Pemphigoid Antigen*, MAPK: *Mitogen Associated Protein Kinase*, EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*.

La mise en place d'une JDE efficiente est le produit d'une collaboration étroite entre les kératinocytes qui forment l'épiderme et les fibroblastes dermiques (Marionnet et al. 2006; Breitkreutz et al. 2013). Certains composants protéiques de la JDE comme le nidogène ne sont produits que par les fibroblastes alors que seuls les kératinocytes produisent la laminine 332. De plus, il a été montré que l'expression de la laminine 332 par les kératinocytes est dépendante de leur interaction avec les fibroblastes (Breitkreutz et al. 2013). Ceci démontre l'importance des interactions entre ces deux types cellulaires dans le développement et la structure cutanée.

4. L'épiderme

L'épiderme est la couche visible de la peau. Il s'agit d'un épithélium pavimenteux, stratifié et kératinisé (Prost-Squarcioni 2006). Cette spécificité morphologique lui confère des propriétés de protection et de résistance nécessaires à la vie terrestre. L'épiderme n'étant pas irrigué, l'apport de nutriments est uniquement dépendant de la vascularisation dermique. En revanche, il est pourvu de terminaisons nerveuses sensitives qui participent à la mécanoréception.

4.1. Composition cellulaire

Les kératinocytes représentent 90% des cellules de l'épiderme. Ils assurent la cohésion et la résistance mécanique de l'épiderme par la formation de jonctions intercellulaires (*cf* section 4.1) et forment, au terme d'un processus de différenciation complexe, une couche externe protectrice. La différenciation des kératinocytes et les jonctions intercellulaires sont aussi responsables de la structure stratifiée et pavimenteuse de l'épiderme (Simpson et al. 2011). En coupe histologique, quatre couches se distinguent (Figure 4):

- la couche basale (*Stratum basale*) est une assise cellulaire unique, polarisée, de kératinocytes cylindriques et immatures. La strate basale permet le renouvellement de l'épiderme ;
- la couche épineuse (*Stratum spinosum*) est caractérisée par la présence de nombreuses jonctions d'adhérences intercellulaires spécifiques de l'épiderme, les

desmosomes. Cette couche se compose de 5 à 15 assises cellulaires de kératinocytes polygonaux chez l'homme ;

- la couche granuleuse (*Stratum granulosum*) se compose de deux ou trois couches de kératinocytes aplatis. Elle doit son nom à la présence de grains de kératohyaline intracytoplasmiques basophiles ;

- la couche cornée (*Stratum corneum*) est la couche visible de la peau. Elle est composée de cellules mortes, empilées et anucléées appelées cornéocytes. Les cornéocytes et la matrice qui les entourent sont familièrement comparés à un système « brique-ciment ». Après deux semaines, les cornéocytes sont éliminés de la peau par desquamation, c'est-à-dire par lyse du ciment intercellulaire.

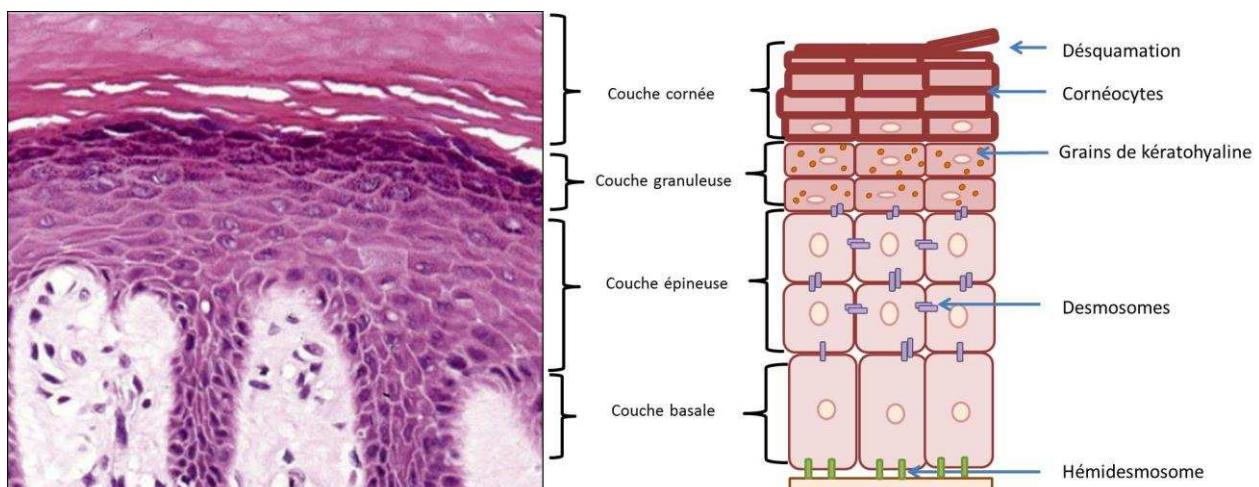


Figure 4 : Structure de l'épiderme humain. (A) Coupe histologique d'épiderme humain (x400). Repris et modifié d'après (McKee 2012). (B) Schéma représentant la structure de chaque couche épidermique.

L'épiderme comprend également des mélanocytes responsables de la pigmentation cutanée et pileuse et impliqués dans la photoprotection au travers de leur capacité à synthétiser la mélanine. Au stade mature, leur corps cellulaire est encastré dans la couche basale et des prolongements cytoplasmiques, appelés dendrites, s'étendent entre les kératinocytes des couches suprabasales. Ces prolongements dendritiques permettent le transfert de la mélanine, synthétisée par les mélanocytes, aux kératinocytes. Dans le cytoplasme des kératinocytes, la mélanine s'organise en coiffe au-dessus du noyau, protégeant ainsi l'ADN des rayons ultra-violets (UV) (Cichorek et al. 2013).

Les cellules de Langerhans (LC) ont été identifiées par Paul Langerhans dès 1878. Il fut le premier à décrire une population de cellules dendritiques (DC), non pigmentée dans l'épiderme. Un siècle plus tard, ces cellules ont été classées parmi les cellules d'origine hématopoïétique et sont retrouvées spécifiquement dans l'épiderme où elles représentent 3 à 5 % des cellules. Les fonctions immunitaires de ces cellules seront développées dans le chapitre II.

Les cellules de Merkel représentent entre 0,5 et 5% des cellules de l'épiderme. Initialement identifiées par Friedrich S. Merkel en 1875, l'origine et la fonction de ces cellules sont encore aujourd'hui controversées. La plupart sont associées à des terminaisons nerveuses et forment des synapses impliquées dans la sensation tactile fine mais certaines pourraient avoir un rôle immunitaire en interagissant avec les LC. Les cellules de Merkel produisent en particulier des hormones neuroendocrines comme la substance P impliquée dans la prolifération des fibroblastes et la libération d'histamine, ainsi que le *vasoactive intestinal peptide*, la sérotonine et le *calcitonin gene-related peptide* ayant un rôle important dans l'homéostasie épidermique (Moll et al. 2005; Boulais and Misery 2007).

4.2. *Les jonctions intercellulaires*

Contrairement au tissu conjonctif dermique et hypodermique, l'épiderme est composé d'un réseau de cellules étroitement liées. L'adhésion intercellulaire est essentielle à la formation, à la continuité et à la fonction barrière des tissus épithéliaux stratifiés. Les jonctions intercellulaires permettent cette adhésion, organisent le cytosquelette et contrôlent ainsi la morphogenèse cellulaire. Des études récentes suggèrent aussi leurs implications dans le contrôle de nombreuses voies de signalisation nécessaire à l'homéostasie épidermique (Niessen 2007; Sumigray et al. 2014). L'épiderme est caractérisé par la présence de nombreuses et diverses jonctions intercellulaires dont la composition et les fonctions sont étroitement liées aux couches épidermiques dans lesquelles elles sont exprimées (Figure 5).

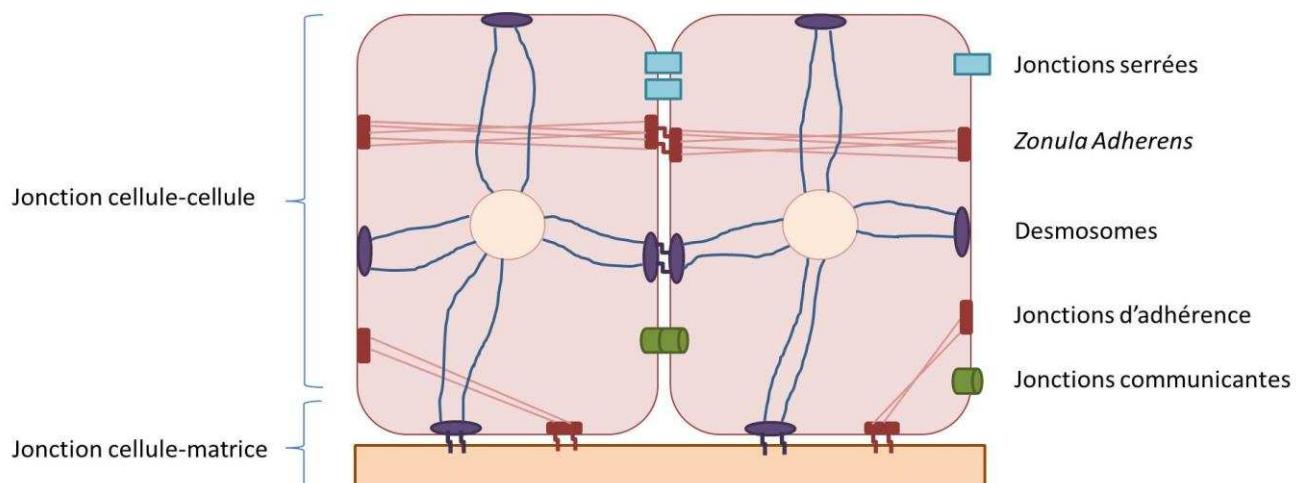


Figure 5 : Diversité des jonctions intercellulaires présentes dans l'épiderme. Les jonctions présentes dans l'épiderme sont de quatre types ; les jonctions d'adhérence, les desmosomes, les jonctions serrées et les jonctions communicantes. Les jonctions d'adhérence peuvent aussi former une structure en ceinture autour du pôle apical des kératinocytes appelée *Zonula Adherens*.

4.2.1. Les jonctions d'adhérence

Les jonctions d'adhérence ou jonctions d'ancrage sont des points d'attache entre deux cellules adjacentes retrouvés dans de nombreux tissus épithéliaux. Dans l'épiderme, les jonctions d'adhérence sont ponctuellement présentes sur les pôles basaux, apicaux et latéraux des kératinocytes. Elles présentent une organisation complexe et multiprotéique. Les parties extracellulaire et transmembranaire sont ainsi composées d'*Epidermal (E)-cadhérines* et de *Placental (P)-cadhérines*, des protéines transmembranaires se liant par homodimères de deux cellules voisines. La fonction d'adhésion des cadhérines est dépendante du calcium présent dans le milieu extracellulaire (Figure 6A). L'expression d'*E-cadhérine* est homogène pour toutes les couches épidermiques alors que l'expression de *P-cadhérine* est restreinte à la couche basale (Simpson et al. 2011). Dans le cytoplasme, l'extrémité terminale des cadhérines est associée à des protéines *Armadillo*, la β -caténine et la p120-caténine, et à l' α -caténine une protéine adaptatrice. Enfin, l' α -caténine se lie aux filaments d'actine par son extrémité C-terminale et aux β -caténines par son extrémité N-terminale (Figure 6A). Les filaments d'actine sont ainsi ancrés à la membrane plasmique par les jonctions d'adhérence d'où ils organisent la morphologie cellulaire (Brandner et al. 2010).

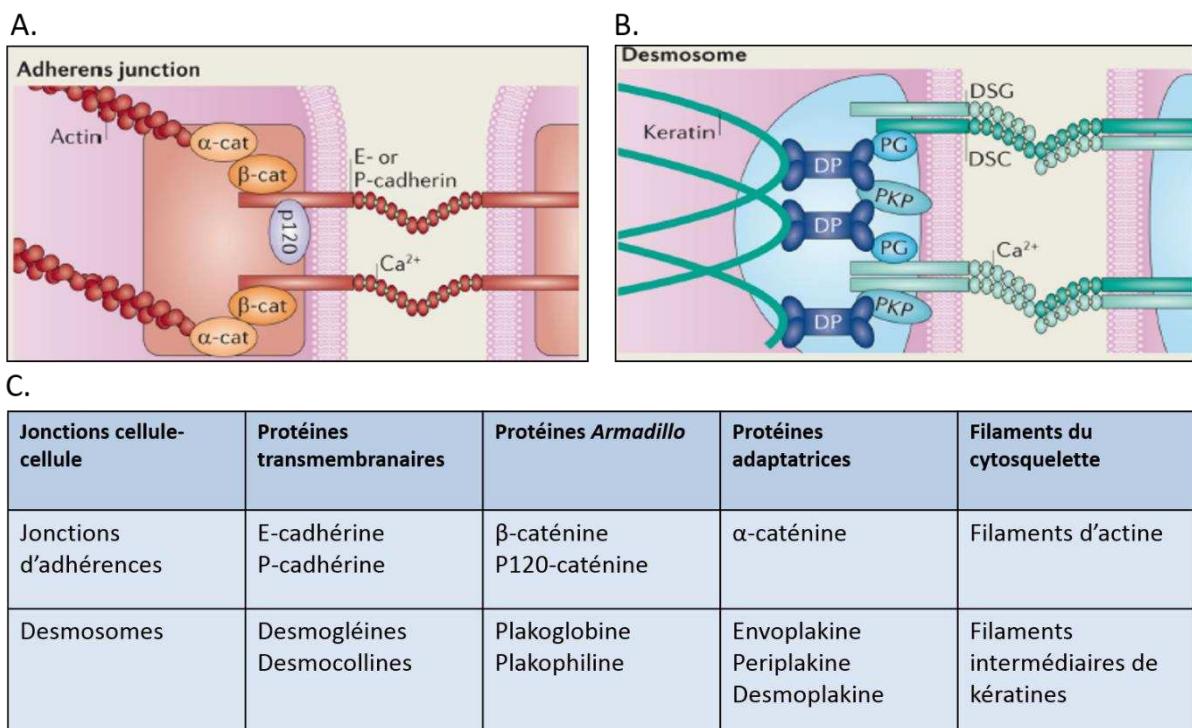


Figure 6 : Composition protéique des jonctions adhérentes. (A) schéma de la structure d'une jonction d'adhérence. (B) schéma de la structure d'un desmosome (repris d'après Simpson et al, 2011). (C) Tableau listant la composition des protéines impliquées dans la formation des jonctions. La structure générale des jonctions d'adhérence cellule-cellule est basée sur la présence de protéines transmembranaires associées à des protéines Armadillo, elles-mêmes reliées à des composants du cytosquelette par des protéines adaptatrices. cat : caténine, DP : desmoplakine, PG : plakoglobin, PKP : plakophiline, DSG : desmoglénine, DSC : desmocolline.

Dans la couche granuleuse, sous l'effet de tensions mécaniques, les jonctions d'adhérence sont réorganisées pour former une ceinture autour du pôle apical des kératinocytes. Ces complexes particuliers appelés *Zonula Adherens* sont associés aux filaments d'actine/myosine par lesquels ils renforcent la résistance de l'épiderme. Le réarrangement des jonctions d'adhérence en *Zonula Adherens* est dépendant du recrutement de la vinculine par la β -caténine (Ray et al. 2013).

Le rôle des jonctions d'adhérence dans la morphogenèse épidermique a été apporté par les modèles de souris transgéniques. Ainsi, les souris déficientes pour le gène codant l'E-cadhérine ont permis de montrer que les jonctions d'adhérence contrôlent l'organisation des filaments intermédiaires de kératines (K aussi nommées cytokératine CK) ainsi que la formation des desmosomes (Tinkle et al. 2008) et des jonctions serrées (Tunggal et al. 2005; Brandner et al. 2010).

4.2.2. Les desmosomes

Les desmosomes supplémentent les jonctions d'adhérence « classiques » de l'épiderme et sont exprimés dans les tissus soumis aux tensions mécaniques. Ils sont définis par Getsios, Huen et Green comme des points de soudure intercellulaire mécanorésistants (Getsios et al. 2004). La structure des desmosomes est très semblable à celle des jonctions d'adhérence classiques (Figure 6B). Ils sont formés de cadhérines transmembranaires couplées au cytosquelette par des protéines *Armadillo* dont au moins une isoforme de plakophiline et de plakoglobin liées à une desmoplakine adaptatrice (Figure 6C). Les desmosomes sont ainsi reliés aux filaments intermédiaires. Ces complexes forment un réseau *trans-cellulaire* dense qui renforcent la cohésion cellulaire et relaie les tensions mécaniques à travers l'épiderme. Dans un modèle murin déficient pour le gène codant la desmoplakine, l'absence d'expression des desmoplakines entraîne la mort rapide des sourceaux. Cette dernière est en effet nécessaire à la liaison des filaments intermédiaires du cytosquelette aux cadhérines desmosomales. En son absence, le choc mécanique provoqué par la mise-bas entraîne une dislocation de l'épiderme et une mort des sourceaux par déshydratation démontrant l'importance des desmosomes dans la maintien des fonctions épidermiques (Bouameur et al. 2014).

La diversité des cadhérines desmosomales est plus importante que celles des jonctions d'adhérence classiques. Les cadhérines desmosomales sont sous-divisées en deux groupes, les desmoglénines (DSG) 1, 2, 3 et 4 et les desmocollines (DSC) 1, 2 et 3. Elles présentent une structure moléculaire semblable à l'E-cadhérine avec la présence de domaine de fixation extracellulaire dépendant du calcium (Sumigray et al. 2014). Les DSG et les DSC sont toutefois capables de se lier indépendamment de la présence de Ca^{2+} . Cette propriété est spécifique des cadhérines desmosomales et contribue à la résistance des tissus. A ce titre, les desmosomes sont qualifiés de complexe « super-adhésif » (Getsios et al. 2004; Garrod and Chidgey 2008). Contrairement aux jonctions d'adhérence, la composition protéique des desmosomes diffère selon les couches épidermiques étudiées. DSG2, DSC2, DSG3, DSC3 et la plakophiline 2 sont exprimées dans la couche basale et sont progressivement remplacées par DSG1, DSG, DSC1 et la plakophiline 3 dans les couches suprabasales (Garrod and Chidgey 2008; Simpson et al. 2011). Ce remodelage des cadhérines

desmosomales est impliqué dans la régulation de la balance entre prolifération et différenciation des kératinocytes. Ainsi, une surexpression anormale de DSG3 sous le contrôle du promoteur de la K1 dans les couches suprabasales de l'épiderme entraîne une hyperprolifération des kératinocytes ainsi qu'une inhibition de la différenciation (Garrod and Chidgey 2008; Sumigray et al. 2014). Inversement, lorsque DSG1 est exprimée prématièrement dans la couche basale, le signal de prolifération induit par l'EGF est inhibé et l'épiderme est atrophié (Sumigray et al. 2014).

Enfin, les desmosomes sont considérés comme des mécanosenseurs. Par leur fixation aux filaments intermédiaires, ils relaient les tensions mécaniques à travers le cytoplasme jusqu'à la membrane nucléaire des kératinocytes et peuvent ainsi influencer l'homéostasie cutanée (Garrod and Chidgey 2008). Les défauts d'expression des desmosomes entraînent également des altérations de l'organisation des microtubules, des filaments d'actines, des *Zonula occludens* et des jonctions serrées dans la couche granuleuse. Ces propriétés sont dépendantes des protéines *Armadillo* associées aux cadhérines desmosomales (Garrod and Chidgey 2008; Bouameur et al. 2014).

4.2.3. Les jonctions serrées

L'adaptation des organismes à la vie terrestre a nécessité le développement d'un épiderme protégeant le milieu intérieur aqueux contre la déshydratation. Les jonctions serrées de la couche granuleuse assurent la prévention de la déshydratation en régulant les mouvements extracellulaires d'eau et d'ions des couches inférieures de l'épiderme vers le milieu extérieur (Kirschner et al. 2010). Pour se faire, elles relient étroitement les feuillets externes des membranes plasmiques de deux cellules voisines et forment ainsi des jonctions étanches entre les pôles basal et apical d'une cellule. Les jonctions serrées contrôlent également le passage d'agents pathogènes et des cellules immunitaires à travers les strates épidermiques (Brandner et al. 2015). Les jonctions serrées sont formées de protéines à plusieurs domaines transmembranaires ; les claudines et les occludines ainsi que des « *junctional adhesion molecule* » (Figure 7A). Dans la cellule, les claudines et les occludines sont reliées aux filaments d'actine par des protéines *Zonula Occludens* adaptatrices (Simpson et al. 2011). La perméabilité paracellulaire des jonctions serrées dépend de leurs compositions protéiques. De fait, la claudine-1 est la seule protéine exprimée par toutes les

couches épidermiques. En revanche, l'occludine et la claudine-4 sont uniquement exprimées dans la couche granuleuse où elles participent à la formation de jonctions étanches qui s'observent en microscopie électronique sous la forme de « *kissing-point* » (Figure 7B). La fonction de barrière contre les mouvements d'eau vers le milieu extérieur des jonctions serrées a été décrite par l'étude de souris déficientes pour le gène codant la claudine-1. A leur naissance, les souriceaux présentent une peau squameuse et sèche et meurent prématulement de déshydratation (Furuse et al. 2002).

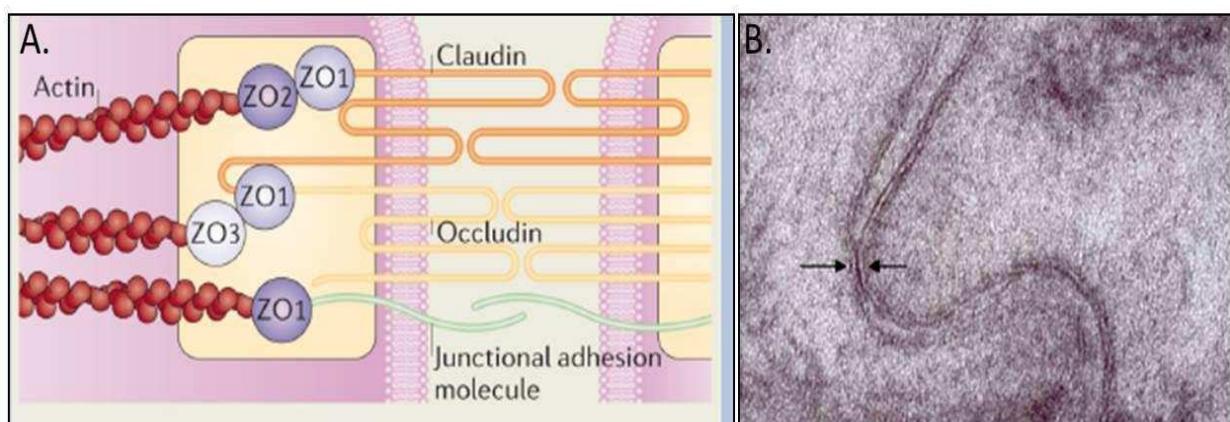


Figure 7 : Structure des jonctions serrées. (A) Schéma de la structure d'une jonction serrée. Repris d'après (Simpson et al. 2011). (B) Image en microscopie électronique d'un « *kissing point* » caractéristique de jonctions serrées étanches de la couche granuleuse. Repris d'après (Kirschner et al. 2010). ZO: *Zonula Occludens*

Les jonctions serrées sont également impliquées dans le maintien de la polarité cellulaire en régulant le passage intramembranaire de lipides ou de protéines. Cette fonction appelée « *fence function* » est particulièrement importante lors de la transition entre la couche granuleuse et cornée et serait impliquée dans le maintien d'un milieu extracellulaire favorable à la différenciation des kératinocytes (cf section 4.2). Enfin, les protéines *Zonula Occludens 1* et *2* exprimées dès la couche basale auraient également un rôle dans le contrôle de la balance entre prolifération et différenciation ainsi que dans la séquestration de certains facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation (Kirschner et al. 2010).

4.2.4. Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes forment des tunnels intercellulaires coordonnant les voies de signalisation de cellules adjacentes. Cette coordination est régulée par le passage

intracytoplasmique de petites molécules, de métabolites et de messagers secondaires dont le poids moléculaire n'excède pas 1 kDa (Scott et al. 2012). Afin de former ces tunnels, les jonctions communicantes sont composées de protéines à quatre domaines transmembranaires nommées connexines (Cx). L'assemblage de six connexines homo ou hétérodimériques forme un hémi-canal et la liaison de deux hémi-canaux forme la jonction communicante entre deux kératinocytes. Dans l'épiderme, ces jonctions coordonnent en particulier la différenciation épidermique (Scott et al. 2012). Cx43 et Cx31.1 sont exprimées par les kératinocytes des couches basales et épineuses (Churko and Laird 2013). L'inhibition de l'expression de Cx43 par l'utilisation de petit acide ribonucléique (ARN) en épingle à cheveux (shRNA) chez la souris adulte induit une diminution de l'expression des marqueurs de différenciation et suggèrent que la Cx43 joue un rôle dans le processus de différenciation (Churko and Laird 2013). Dans la couche granuleuse, sous l'influence d'une augmentation de la concentration en calcium, l'expression de Cx43 est inhibée au profit de l'expression de Cx30, Cx31.1 et Cx45 (Kretz et al. 2004). L'homéostasie épidermique semble en partie dépendre de la plasticité de composition des jonctions communicantes. Pour exemple, l'expression de la Cx26 est quasi-absente des épidermes normaux mais augmentée au cours de la cicatrisation (Churko and Laird 2013). Cette connexine serait aussi exprimée en réponse à un stress et son expression est fortement augmentée dans les épidermes hyperprolifératifs en particulier dans le psoriasis (Kretz et al. 2004; Scott et al. 2012). Néanmoins, les conséquences biologiques de la plasticité des connexines sont peu décrites.

4.3 Processus de différenciation des kératinocytes

Malgré la nécessité d'établir des jonctions cellulaires stables et fonctionnelles, l'épiderme est un tissu en renouvellement constant. Les cornéocytes sont éliminés de la surface de la peau par desquamation et doivent être remplacés par de nouveaux cornéocytes afin de maintenir une barrière continue. Chez l'homme, le renouvellement de l'épiderme est effectué en 40 à 56 jours (Koster 2009). Ce renouvellement permanent est assuré par la prolifération des cellules de la couche basale qui pousse les kératinocytes néoformés vers les couches supérieures où ils subissent une différenciation complexe. Tout au long de l'épiderme, cette différenciation s'accompagne d'une expression graduelle de protéines impliquées dans la fonction barrière de la peau. Ces protéines sont spécifiques de

l'état de différenciation des kératinocytes et sont considérées comme des marqueurs de la différenciation (Figure 8).

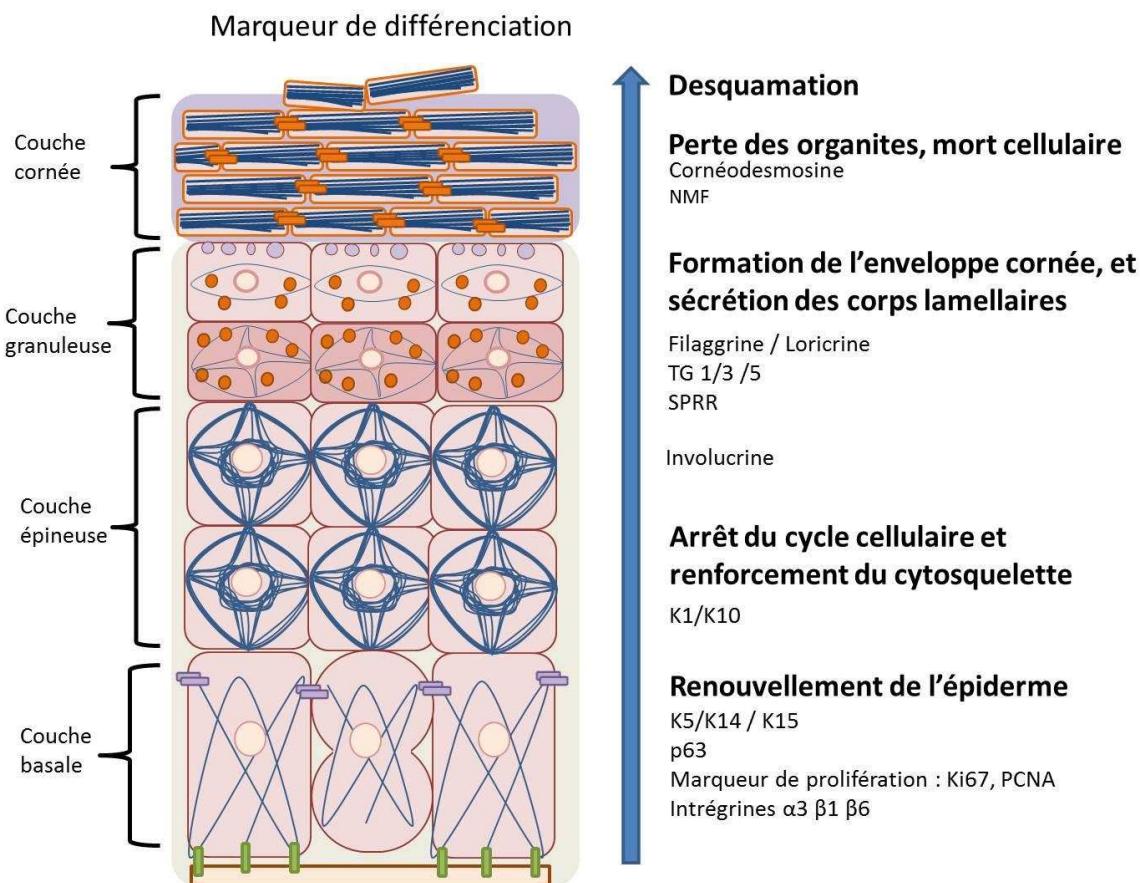


Figure 8 : Etapes et marqueurs associés à la différenciation des kératinocytes. Les grandes étapes de la différenciation des kératinocytes sont indiquées en gras, les protéines exprimées au cours de cette différenciation et considérées à ce titre comme des marqueurs de la différenciation sont également indiqués. SPRR: Small Proline Rich Region, TG: transglutaminase, K: kératine, PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen, NMF: Natural Moisturizing Factor.

4.2.5. La couche basale

Dans la couche basale, le renouvellement physiologique de l'épiderme est assuré par une population de cellules souches épidermiques (Solanas and Benitah 2013). Dans leurs niches de la couche basale au niveau des espaces inter-folliculaires, les cellules souches épidermiques sont quiescentes (Koster 2009). Périodiquement, elles sortent de leurs niches et entrent en phase mitotique pour générer des divisions asymétriques ou symétriques (Blanpain and Fuchs 2009; Solanas and Benitah 2013). Les cellules en mitose, issues de l'activation des cellules souches, sont appelées « *Transit-Amplifying* » ou cellules

amplificatrices. Elles représentent environ 8% des cellules de la couche basale et s'identifient par des marqueurs classiques de prolifération comme le *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) ou Ki67 (Heenen et al. 1998). La cellule amplificatrice peut subir plusieurs cycles mitotiques avant de migrer vers la couche épineuse où elle perdra son potentiel prolifératif. Le potentiel prolifératif des cellules de la couche basale est donc associé à l'expression des intégrines $\alpha 6$, $\beta 1$ et $\beta 4$ qui les attachent à la JDE (Morasso and Tomic-Canic 2005). La balance entre prolifération et différenciation des kératinocytes est un mécanisme régulé. L'un des acteurs majeurs de cette régulation est le facteur de transcription p63. Il maintient les cellules souches épidermiques en prolifération et induit également la transition vers l'arrêt du cycle cellulaire et l'initiation de la différenciation (Blanpain and Fuchs 2009). En condition physiologique, p63 n'est exprimé qu'au niveau de la couche basale des kératinocytes.

Les cellules post-mitotiques indifférenciées de la couche basale sont caractérisées par l'expression de K5, K14 et K15 (Figure 8). Les kératines sont des protéines hélicoïdales qui s'assemblent en hétérodimère formé d'une kératine de type I acide et d'une kératine de type II basique. Les hétérodimères s'assemblent ensuite en tétramères puis en protofilaments. Enfin, les filaments intermédiaires du cytosquelette sont unis par la liaison des domaines terminaux de plusieurs protofilaments de kératines. Le cytosquelette de kératines ainsi formé, relie la membrane plasmique à la membrane nucléaire (Bousquet and Coulombe 2002). L'expression des kératines est spécifique d'un type cellulaire ou de son état de différenciation (Bousquet and Coulombe 2002). L'expression spatio-temporelle appropriée des kératines conditionne la réponse de l'épiderme au stress mécanique, supporte une adhésion cellulaire forte et contrôle la croissance épidermique ainsi que l'organisation des organites intracytoplasmiques (Kumar et al. 2015). L'étude réalisé par Bar et coll. portant sur des épidermes de souris déficientes pour les kératines de type II a confirmé que le niveau d'expression des kératines est directement lié à la résistance de l'épiderme aux forces mécaniques (Bar et al. 2014). Chez l'homme et chez la souris, des défauts d'expression ou de fonctions de K14 ou K5 entraînent une dislocation des kératinocytes de la couche basale et une cytolysé (Tableau 1) (Moll et al. 2008; Bar et al. 2014).

	Kératines	Type	Localisation épidermique	Phénotype des souris déficientes
Couche basale	K5	Type I	Expression majoritairement basale remplacée progressivement dans la couche épineuse	mutation K14 (Coulombe et al. 1991) mutation K5 (Peters et al. 2001) Cytolyse des kératinocytes basaux mimant une épidermolyse bulleuse simplex humaine après traumatismes physiques
	K14	Type II		
	K15	Type I	Expression uniquement basale.	Non décrit
Couche épineuse	K1	Type II	Expression couche suprabasale	K1-KO : décès néonatal associé à une expression de molécules proinflammatoires (Roth et al. 2012) K10-KO : phénotype mineur, hyperprolifération, cytolysé suprabasale Compensation par K5/14 (Fuchs et al. 1992; Reichelt et al. 2001) Double KO : décès néonatal, défaut de formation des desmosomes et perte prématuée des noyaux (Wallace et al. 2012)
	K10	Type I		
	K2e	Type II	Expression couche suprabasale tardive	Epidermolyse de l'épiderme superficielle
	K9	Type I	Différenciation tardive des épidermes palmoplantaires	Epidermolyse palmoplantaire
Kératine inducible	K6 (a, b)	Type II	Exprimée en réponse à un stress ou une activation dans la couche basale et suprabasale	Délai de cicatrisation (Wojcik et al. 2000; Mazzalupo et al. 2003)
	K16	Type I	Exprimée en réponse à un stress ou une activation dans la couche suprabasale	Hyperkératose palmoplantaire Défaut de structure de la langue (Lessard and Coulombe 2012)
	K17	Type I		Délai de cicatrisation (Mazzalupo et al. 2003)

Tableau 1 : Kératines exprimées dans la peau, localisation et phénotype des souris déficientes pour ces kératines. K : kératine, KO : Knock-Out

4.2.6. La couche épineuse

En migrant vers la couche épineuse, les kératinocytes débutent leur processus de différenciation. La première étape clé de la différenciation des kératinocytes consiste en un remplacement des dimères de K5/14 par des dimères plus denses composés de K1 et K10

(Figure 8) (Moll et al. 2008; Bragulla and Homberger 2009). Les niveaux d'expression de K1 et K10 sont largement supérieurs aux niveaux d'expression des autres kératines de l'épiderme (Kumar et al. 2015). Un défaut d'expression des K1/10 est retrouvé dans certaines pathologies épidermolytiques et entraîne une dislocation de l'épiderme suprabasal, une expression suprabasale de la K14 associée à une hyperprolifération des kératinocytes (Tableau 1). K1 aurait également un rôle majeur dans le contrôle de la réponse inflammatoire des kératinocytes (cf Chapitre 2). Ainsi, les souriceaux déficients pour cette kératine présentent un épiderme d'aspect normal mais meurent rapidement après la naissance de défaut de la barrière épidermique associée à une forte expression de médiateurs de l'inflammation en particulier l'IL-18 (Roth et al. 2012). Cette fonction semble être spécifique de K1 et n'est pas retrouvée chez les souris déficientes pour le gène codant K10 (Reichelt and Magin 2002). Ces dernières sont viables mais présentent un épiderme hyperprolifératif associé à une cytolysé des kératinocytes de la couche épineuse (Fuchs et al. 1992; Reichelt et al. 2001). Chez les souris pour lesquelles le gène codant K10 est muté ou absent, un mécanisme de compensation par le maintien de l'expression suprabasale de K5 et de K14 est aussi observé (Fuchs et al. 1992; Reichelt et al. 2001) tandis qu'il n'est pas présent chez les souris déficientes pour le gène (« *Knock Out* » KO) codant K1 (Roth et al. 2012). De plus, K10 pourrait directement prévenir la prolifération des kératinocytes de la couche épineuse en séquestrant des kinases de la voie de signalisation Akt impliquée dans l'activation du cycle cellulaire (Paramio et al. 2001).

Parmi les autres kératines de l'épiderme, K2e est faiblement exprimée dans les couches épineuses supérieures et est associée à un niveau de différenciation avancé des kératinocytes (Bragulla and Homberger 2009). Dans les zones soumises aux tensions mécaniques répétées comme la paume des mains et des pieds, l'expression de K9 supplémente les filaments classiques de K1/10 (Moll et al. 2008). En condition physiologique, K6, 16 et 17 ne sont exprimées qu'au niveau des follicules pileux ou dans les épidermes se renouvelant rapidement comme l'épiderme palmo-plantaire (Moll et al. 2008). Leurs présences dans les couches basale et épineuse des espaces inter-folliculaires sont associées à un état activé des kératinocytes et aux épithéliums hyperprolifératifs (Moll et al. 2008). La K16 est exprimée par les kératinocytes post-mitotiques tandis que K6 et K17 sont exprimées par l'ensemble des couches épidermiques. Enfin, K6, 16 et 17 sont connues pour leurs

expressions dans de nombreuses pathologies cutanées. Dans les épidermes pathologiques, ces kératines favoriseraient la plasticité des kératinocytes et donc leurs potentiels prolifératifs, migratoires voir invasifs (Bousquet and Coulombe 2002). K16 et K17 pourraient être impliquées dans la réponse immunitaire innée en régulant l'expression des médiateurs de l'inflammation (cf chapitre 2) produits par les kératinocytes (Depianto et al. 2010; Lessard et al. 2013).

Enfin, dans la couche épineuse supérieure, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium induit également l'expression de protéines précoces de l'enveloppe cornée telle l'involucrine ainsi que les protéines *Armadillo* périplakine et envoplakine (Kalinin et al. 2002; Candi et al. 2005).

4.2.7. La couche granuleuse

La couche granuleuse est composée de kératinocytes en différenciation tardive. A cette étape, les kératinocytes produisent des protéines impliquées dans la formation de l'enveloppe cornée ainsi que des corps lamellaires chargés de lipides et d'enzymes qui formeront le ciment lipidique extracellulaire (Candi et al. 2005). Les grains de kératoyaline synthétisés dans cette couche sont des agrégats de protéines insolubles constitués de pro-filaggrine phosphorylée ou de loricrine (Candi et al. 2005).

La mise en place de l'enveloppe cornée est dépendante de la concentration en calcium intracellulaire. Sous l'influence du Ca^{2+} , l'envoplakine et la périplakine sont déposées près de la membrane plasmique où elles servent d'attache aux filaments de K1/10. L'involucrine est ensuite ajoutée à ce complexe intracytoplasmique. Les études sur souris déficientes pour le gène codant l'involucrine (Djian et al. 2000), l'envoplakine (Maatta et al. 2001) ou la périplakine (Aho et al. 2004) ont montré qu'individuellement, aucune n'était indispensable à la structure de l'épiderme ou à la fonction barrière de la peau suggérant une forte redondance dans les fonctions de ces protéines. A l'inverse, la déficience conjointe de ces trois protéines induit un délai de formation de la barrière épidermique durant l'embryogenèse, des défauts d'assemblage de l'enveloppe cornée, une réduction de la densité du ciment intercornéocytaire, un défaut de desquamation de la couche cornée et une inflammation chez la souris (Sevilla et al. 2007). Ces études ont permis de confirmer le

rôle de ces protéines dans la formation de l'enveloppe cornée. En effet, la présence de complexe protéique composé d'involutrine, d'envoplakine et de périplakine à proximité de la membrane plasmique sert d'échafaudage pour la fixation de protéines de l'enveloppe cornée comme la loricrine, les « *Small Proline Rich Regions* » (SPRR), les « *Late Cornified Enveloppe* » (LCE) ou les protéines S100 (Kalinin et al. 2002; Eckert et al. 2004). A elle seule la loricrine représente 80% de la masse protéique de l'enveloppe cornée, et avec la filaggrine elles constituent des marqueurs tardifs de la différenciation du kératinocyte (Figure 8). La loricrine n'est pas indispensable à la formation de la barrière épidermique. Les études sur souris déficientes pour le gène codant cette protéine ont en effet montré que chez ces souris l'absence de loricrine est compensée par une augmentation de l'expression de protéines SPRR et de protéines S100 post-natale (Koch et al. 2000).

Parallèlement à la formation de l'enveloppe cornée, le calcium intracellulaire permet aussi le trafic vésiculaire des corps lamellaires jusqu'à la membrane plasmique supérieure des kératinocytes de la couche granuleuse (Matsui and Amagai 2015). Au niveau de la jonction entre la couche granuleuse et la couche cornée, les corps lamellaires fusionnent avec la membrane plasmique des kératinocytes et déversent leur contenu lipidique et enzymatique dans l'espace extracellulaire. L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} entraîne également l'activation des transglutaminases (Candi et al. 2005). Ces enzymes catalysent la formation de ponts isopeptidiques entre les protéines de l'enveloppe cornée et rigidifient ainsi la membrane des kératinocytes (Eckert et al. 2005). Parmi les transglutaminases identifiées dans l'épiderme, la transglutaminase 1 semble avoir un rôle majeur dans la formation de la barrière cutanée. En effet, les souriceaux déficients pour cette enzyme meurent de déshydratation peu de temps après la naissance. L'examen de la peau de ces souris a montré que l'absence de cette enzyme entraîne une augmentation des mouvements d'eau de la couche basale vers la couche cornée (« *Trans Epidermal Water Loss* » TEWL) associée à des défauts de formation du ciment lipidique et de l'enveloppe cornée (Kuramoto et al. 2002). La transglutaminase 1 est en effet impliquée dans la formation de liaisons covalentes entre l'involutrine et la membrane plasmique ainsi que dans la fixation des ω -hydroxycéramides, composant majeur du ciment lipidique, à l'involutrine (Kalinin et al. 2002). Ainsi reliés, les ω -hydroxycéramides forment une monocouche extracellulaire qui complémente les phospholipides de la membrane plasmique

des kératinocytes et constitue une matrice pour la formation du ciment lipidique (Matsui and Amagai 2015).

4.2.8. La couche cornée

La transition des kératinocytes de la couche granuleuse à la couche cornée s'accompagne d'une perte des organites et d'une mort cellulaire programmée appelée cornification (Simpson et al. 2011). Cependant, les cornéocytes restent biochimiquement actifs et contrairement au mécanisme d'apoptose classique, la cornification n'est pas dépendante de l'action de caspases telles que les caspases 3, 7 et 8. Seule la caspase 14 est active dans la couche cornée. Elle n'est pas directement impliquée dans les mécanismes de mort cellulaire mais participe aux fonctions de la peau par son action protéolytique en particulier sur la filaggrine (Denecker et al. 2008).

La transition entre la couche granuleuse et la couche cornée s'accompagne d'une chute de la proportion d'eau de 70% à 30% (Madison 2003). Le maintien de ce gradient aqueux, nécessaire aux fonctionnements des enzymes de la couche cornée, est assuré par les jonctions serrées et les lipides hydrophobes (Madison 2003). Dans la couche cornée inférieure, les lipides polaires provenant des corps lamellaires sont modifiés par des réactions enzymatiques et organisés en feuillet hydrophobes entre les cornéocytes (Matsui and Amagai 2015). Le ciment lipidique ainsi formé est constitué de céramides (50%), d'acides gras libres (15%) et de cholestérol (25%) (Feingold 2007). Une altération de la composition lipidique ou des défauts enzymatiques de maturation des lipides entraînent l'augmentation du TEWL associée à une sécheresse cutanée ainsi qu'une altération de la desquamation (Madison 2003; Proksch et al. 2008; Lopez-Pajares et al. 2013).

La couche cornée est aussi le lieu de maturation enzymatique d'un grand nombre de protéines. Parmi ces dernières, la filaggrine est particulièrement importante dans les fonctions barrières de la peau. La filaggrine est une protéine de la famille des S100 *fused* protéines comprenant la filaggrine 2, l'hornerine, la trichohyaline. La filaggrine est synthétisée sous la forme d'un précurseur dans la couche granuleuse et subit un long processus de maturation post-traductionnelle comprenant une étape de déphosphorylation et plusieurs clivages protéolytiques dans la couche cornée. Plus précisément, la pro-

filaggrine est déphosphorylée afin d'être clivée par protéolyse en séquences répétées de filaggrine. Les monomères de filaggrine ainsi libérés se fixent aux filaments de kératines et les agrègent en une matrice kératinique dense (Le Lamer et al. 2015). Les kératines associées à la filaggrine représente 90% de la masse protéique totale de l'épiderme (Candi et al. 2005) et permettent la compaction des cornéocytes formant alors les « briques » de la couche cornée (Figure 9).

Dans les couches cornées supérieures, la structure biochimique de la filaggrine est modifiée par citrullination, libérant ainsi les monomères de filaggrine des filaments de kératines. Enfin, la filaggrine est ensuite dégradée par des enzymes comprenant la caspase 14, la bléomycine hydrolase et la calpaïne 1 en acides aminés formant des facteurs naturels d'hydratation (Le Lamer et al. 2015). Les facteurs naturels d'hydratation favorisent l'hydratation naturelle de la peau et participent au maintien du TEWL. En outre, ils confèrent un pH légèrement acide à l'épiderme favorable au développement d'une flore microbienne commensale qui limite le développement de bactéries pathogènes telles que le *Staphylococcus aureus*. Enfin, l'acide urocanique, un produit majeur de la dégradation de la filaggrine, participe à la photoprotection contre les UV au même titre que la mélanine (Brown and McLean 2012; Le Lamer et al. 2015). De par ses nombreuses fonctions, la filaggrine est essentielle à la fonction barrière cutanée, ainsi chez l'homme comme chez la souris, des mutations de cette protéine sont associées à des altérations de la barrière cutanée induisant des pathologies telles que l'ichtyose vulgaire ou la DA (cf Chapitre 3).

Enfin, dans la couche cornée, la liaison des desmosomes de deux cornéocytes voisins est renforcée par la cornéodesmosine, une protéine « colle » permettant de solidifier les ponts d'adhésion intercellulaires. Les desmosomes associés à la cornéodesmosine sont appelés cornéodesmosomes (Matsui and Amagai 2015). Lors de la desquamation, la cornéodesmosine est la cible des kallikréines, des enzymes exprimées dans les couches cornées supérieures permettant la libération et l'élimination des cornéocytes.

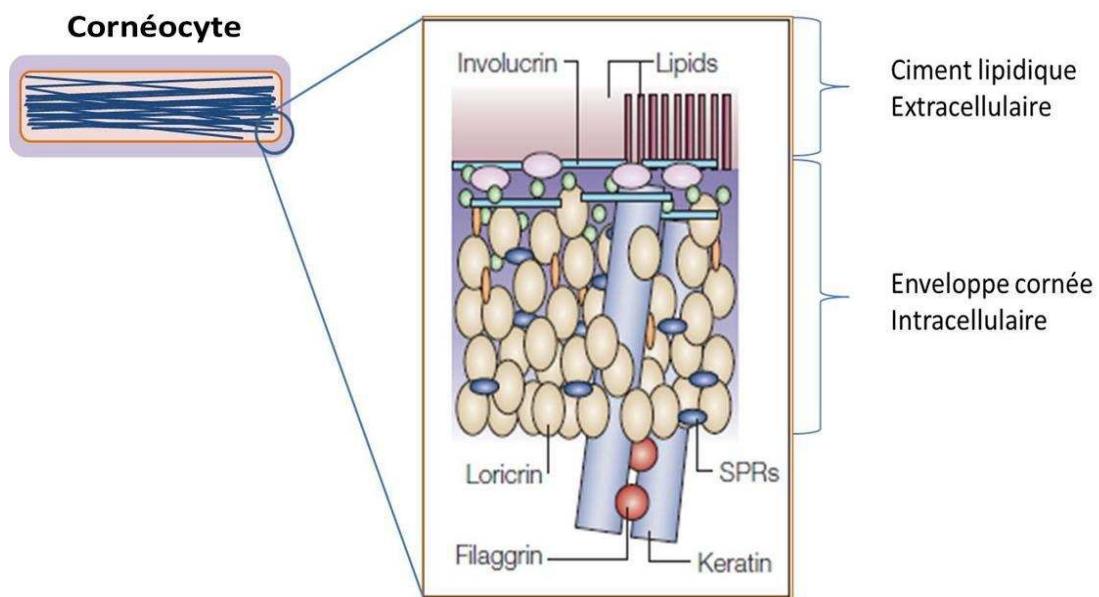


Figure 9 : Composition et structure de la membrane des cornéocytes matures. L'enveloppe cornée est composée de loricrine, SPRR et involucrine attachés par des liaisons isopeptidiques aux filaments intermédiaires de kératines dans le cytosol et au ciment lipidique dans le milieu extracellulaire. *Repris et modifié d'après (Candi et al. 2005).* SPRs: *Small Proline-Rich proteins* (équivalentes aux SPRR)

5. Spécificité de la peau de souris

La souris est le modèle animal le plus fréquent pour étudier la physiologie et la physiopathologie de la peau. En effet, elle possède une structure identique à la peau humaine à l'exception d'une couche de cellules musculaires squelettiques striées présente sous l'hypoderme appelée *panniculus carnosus* (Figure 10). Chez la souris, cette couche musculaire permet une contraction de la peau favorable à la cicatrisation (Gerber et al. 2014). L'épaisseur de l'épiderme humain est d'environ 100 µm contre 25 µm chez la souris qui, de fait se renouvelle plus rapidement que l'épiderme humain (Koster 2009). La structure fine de l'épiderme de souris rend ainsi difficile l'identification des quatre couches de différenciation épidermique dans les modèles murins (Koster 2009). La peau de souris est également plus riche en follicules pileux que la peau humaine, les espaces inter-folliculaires y sont donc réduits et ne présentent pas de crêtes épidermiques invaginées dans le derme. Chez l'homme, ces crêtes épidermiques augmentent la surface d'attache de l'épiderme au derme et augmentent ainsi la résistance de la peau au frottement. Chez la souris, la présence des follicules pileux suffit à créer une zone de contact solide entre le derme et

l'épiderme contre les phénomènes de friction (Treuting and Dintzis 2011). Les follicules pileux sont également des annexes épidermiques particulières qui présentent une structure et une régulation différente des espaces intercellulaires. Pour exemple, les niches dans lesquels résident les cellules souches épidermiques semblent être localisées au niveau des follicules pileux chez la souris tandis que leurs emplacement est sujet à controverse chez l'Homme (Solanas and Benitah 2013). Après une lésion, les cellules souches des annexes épidermiques sont activées et participent à rétablir une barrière épidermique rapidement en colonisant les espaces interfolliculaires.

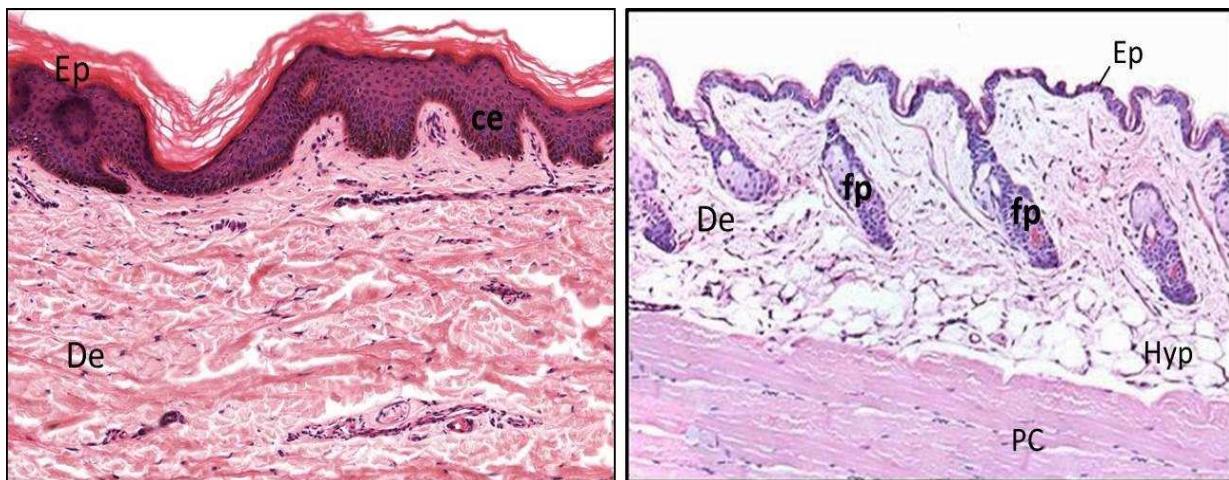


Figure 10 : Comparaison histologique de peau humaine (à gauche) et murine (à droite). Coupes histologiques après coloration à l'Hématoxyline de Meyer/Eosine observées au microscope optique (x100). Ep : épiderme ; De : derme ; Hyp : hypoderme ; PC : *Panniculus carnosus* ; ce : crête épidermiques ; fp : follicules pileux.

Au niveau cellulaire et moléculaire, la peau de souris présente des similitudes avec la peau humaine. Une étude transcriptomique récente portant sur l'expression de gènes spécifiquement exprimés dans la peau a montré que 30% des gènes sont communs entre la souris et l'homme. La plupart des gènes communs codent pour des protéines impliquées dans la structure et la fonction barrière de la peau tandis que les différences concernent majoritairement des gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Gerber et al. 2014).

Malgré toutes ces fonctions protectrices, la peau est en permanence soumise aux agressions chimiques et biologiques du milieu extérieur. Lorsque la barrière physique formée par la couche cornée n'est pas suffisante, l'entrée de pathogènes ou de substance chimiques provoquent le déclenchement d'une réponse immunitaire très organisée

Chapitre 2 - Système immunitaire cutané

La peau ne forme pas seulement une barrière physique contre les agressions en provenance du milieu extérieur mais constitue également une première ligne de défense du système immunitaire. Malgré la découverte précoce de lymphocytes dans l'épiderme (1922), le concept de fonction immunitaire cutanée ne fut introduit qu'en 1983 par Streilein (Streilein 1983). De fait, dans les années 80, trois découvertes fondamentales ont motivé la description de ce concept ; (1) les LC sont des cellules d'origine hématopoïétique présentatrices d'antigènes, (2) certains lymphocytes T(LT) ont une attirance particulière pour la peau et (3) les kératinocytes participent au recrutement des cellules immunitaires par la production de chimiokines et cytokines (Egawa and Kabashima 2011). Streilein utilisa donc le terme de « *Skin-Associated Lymphoid Tissue* » pour décrire ces fonctions (Streilein 1983). Toutefois, la peau n'étant pas un lieu d'activation de LT naïfs et ne possédant pas de veinules à endothélium épais, elle ne répond pas strictement à la définition d'un tissu lymphoïde secondaire (Egawa and Kabashima 2011). L'équipe de Bos préférera l'emploi du terme « système immunitaire cutané » pour décrire les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la défense cutanée (Bos and Kapsenberg 1986).

Les cellules composant le système immunitaire cutané forment un vaste réseau de cellules sentinelles qui assure l'immunosurveillance (Kupper and Fuhlbrigge 2004). Cette dernière repose sur la capacité des cellules résidentes de la peau à reconnaître un pathogène ou un signal de danger et à mettre en place une réponse inflammatoire efficiente contre ce danger. Les travaux réalisés dans les années 2000 ont permis de mettre en évidence la diversité des cellules effectrices de l'immunité présentes dans la peau incluant des LT résidents mémoires (LT_{RM}) et des LT $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$), les LC, des cellules dendritiques dermiques (dDC), des mastocytes, des macrophages, des cellules lymphoïdes innées (*Innate lymphoid cell*, ILC). Des *Dendritic Epidermal T Cell* (DETC) sont aussi spécifiquement décrites chez la souris (Figure 11). Par ailleurs, les kératinocytes et les fibroblastes possèdent de nombreuses caractéristiques de cellules de l'immunité innée et de fait, participent aux mécanismes de défense immunitaire

cutanée. De plus, les kératinocytes sont aujourd’hui considérés comme les principaux initiateurs de l’inflammation cutanée (Bernard et al. 2012; Pasparakis et al. 2014). La défense et le maintien de l’homéostasie cutanée reposent en particulier sur la capacité des kératinocytes à interagir avec les cellules immunitaires par le biais de cytokines (Pasparakis et al. 2014).

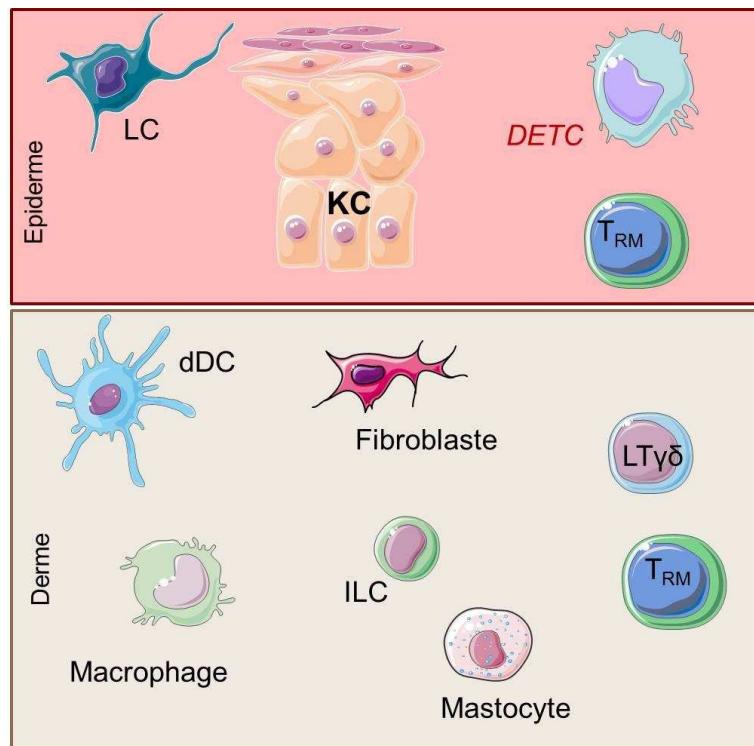


Figure 11 : Acteurs cellulaires du système immunitaire cutané. LC : cellule de Langerhans, KC : kératinocyte, DETC : Dendritic Epidermal T cell uniquement présent dans la peau de souris, T_{RM} : lymphocyte résident mémoire, dDC : cellule dendritique dermique, LT $\gamma\delta$: lymphocyte T non conventionnel à TCR $\gamma\delta$, ILC : cellule lymphoïde innée.

1. Le kératinocyte, initiateur de l’inflammation

Afin d’assurer l’intégrité de l’organisme, le kératinocyte, fortement soumis aux stimuli externes, exerce une fonction sentinelle en identifiant des dangers potentiels et en initiant une réponse inflammatoire dirigée contre ce danger.

1.1. Expression de récepteurs de l’immunité innée

La reconnaissance des signaux pathogènes par les kératinocytes s’effectue au moyen de récepteurs de l’immunité innée (« *Pattern Recognition Receptor* » PRR). Les PRR sont capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (« *Pathogen-*

Associated Molecules Patterns » PAMPs) ainsi que des motifs moléculaires de dangers (« *Damage-Associated Molecules Patterns* » DAMPs) libérés par les cellules lésées (Takeuchi and Akira 2010).

La famille de récepteurs de l'immunité innée la mieux décrite est la famille des *Toll-Like Receptors* (TLR), des protéines transmembranaires comprenant 13 récepteurs à ce jour. Les TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont localisés à la membrane des kératinocytes et sont impliqués dans la reconnaissance de peptides d'origine bactérienne, fongique ou parasitaire (Figure 12) (Lebre et al. 2007). Le TLR2 s'associe aux TLR1 ou 6 pour former un complexe de reconnaissance des lipoprotéines tandis que les TLR4 et 5 forment des homodimères qui reconnaissent respectivement les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-négatives et les protéines du flagelle. Par ailleurs, les TLR2 et 4 peuvent aussi être activés par des ligands endogènes issus de la nécrose cellulaire ou d'un traumatisme physique (Musette et al. 2006). Les TLR3, 7 et 9 sont eux, exprimés à la membrane d'endosomes intracytoplasmiques et sont spécialisés dans la réponse antivirale. Ils reconnaissent pour cela des ARN simple brin, des ARN double brin ou des motifs Cytosine-phosphate-Guanine non méthylés (Musette et al. 2006). Constitutivement, le kératinocyte exprime les TLR3 et 9 à un niveau basal mais l'expression du TLR7 peut être induite en réponse aux interférons (IFN) (Lebre et al. 2007).

La famille des *NOD-Like Receptors* (NLR) a été décrite plus récemment et comporte 22 récepteurs. Les NLRC (NOD1 et NOD2) sont des récepteurs intracellulaires à domaine multiple contenant au moins un domaine CARD de recrutement des caspases (Moreira and Zamboni 2012). Les NLRC sont impliqués dans la reconnaissance des fragments de peptidoglycans bactériens. NOD1 reconnaît en particulier des peptides associés aux bactéries Gram-négatives alors que NOD2 est activé par un dipeptide muramylé issu d'un peptidoglycane constitutif de toutes les bactéries (Moreira and Zamboni 2012). NOD1 (Harder and Nunez 2009) et NOD2 (Roth et al. 2014) sont exprimés dans le cytoplasme des kératinocytes et participent à la reconnaissance des bactéries pathogènes telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Enfin, l'inflamasome est un autre complexe important dans la détection des signaux de dangers par le kératinocyte. Il s'agit d'une structure macromoléculaire formée par l'assemblage d'un NLR, d'une protéine adaptatrice « *Apoptosis-associated Speck-like*

containing a CARD » (ASC) et de la pro-caspase-1 inactive (Figure 12). La reconnaissance de signaux pathogènes par les NLR entraîne l’assemblage des protéines de l’inflammasome, le clivage de la pro-caspase-1 en caspase-1 active et *in fine* la maturation de l’IL-1 β et de l’IL-18 (Nestle et al. 2009). La nature du NLR recruté pour former l’inflammasome dépend du signal de danger identifié. A ce jour, l’inflammasome le mieux décrit est induit par l’activation du NLR à domaine *Pyrin* (NLRP) 3 qui est capable de détecter des signaux de stress variés tels que les UV-B (Feldmeyer et al. 2007), des haptènes chimiques (Watanabe et al. 2008), ou encore des protéines de la phase aigüe comme les « *Serum Amyloid Protein* » (SAA) (Yu et al. 2015). L’« *Absent in Melanoma 2* » (AIM2) est un autre récepteur PRR capable d’induire l’assemblage de l’inflammasome après reconnaissance d’acides nucléiques endogènes issus de la nécrose épidermique. Par ce mécanisme, l’AIM2 serait un déterminant majeur de la transition entre l’immunotolérance et l’initiation d’une réponse inflammatoire chronique (Watanabe et al. 2008).

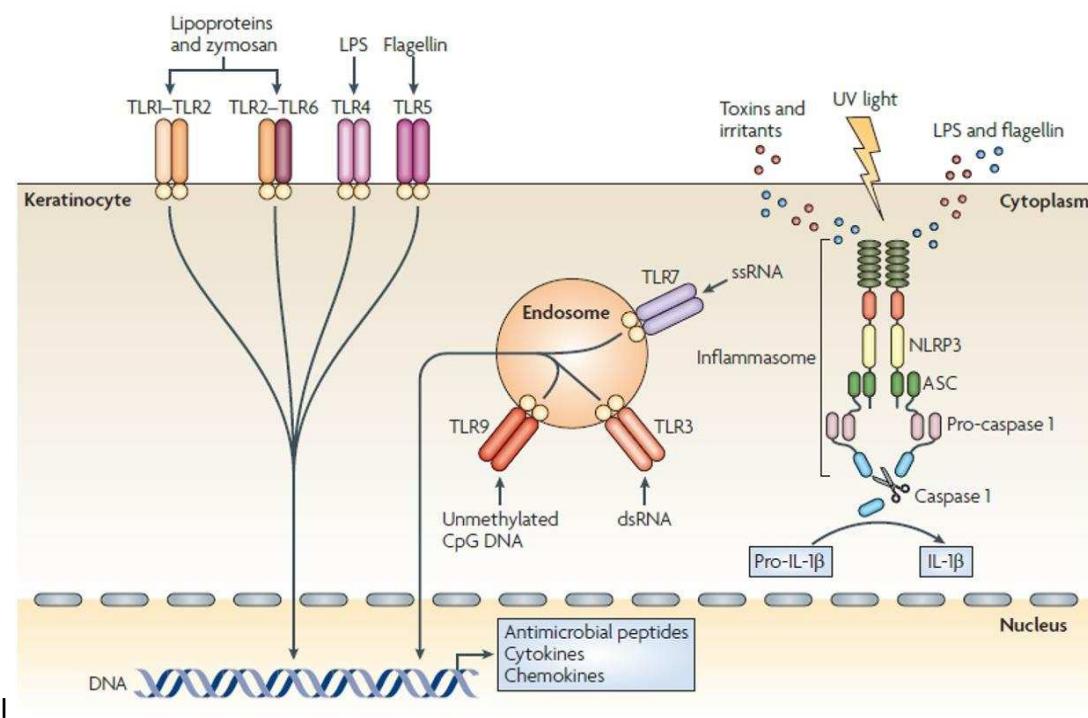


Figure 12. Récepteurs de l’immunité innée exprimés par les kératinocytes. Repris d’après (Nestle et al. 2009)

Une fois reconnus par les PRR, les signaux de dangers induisent des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de gènes de l’immunité. La principale voie de signalisation activée par les PRR conduit à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B et

l'activation d'AP1 (Nestle et al. 2009). Ces derniers régulent l'expression de gènes impliqués dans l'initiation de l'inflammation, en particulier l'expression de cytokines, de chimiokines, de molécules d'adhésion, d'enzymes impliquées dans la synthèse des médiateurs lipidiques et d'espèces réactives de l'oxygène (Kupper and Fuhlbrigge 2004). D'autre part, la reconnaissance de composants d'origine virale par les TLR intracellulaires induit aussi l'activation des « *Interferon Regulating Factors* » et la production d'IFN de type I.

1.2. Production de médiateurs de l'inflammation

Historiquement, le kératinocyte a été qualifié de « transducteur de signal » capable de transformer un stimulus exogène en molécules effectrices endogènes et d'induire une réponse inflammatoire indépendante de la présentation d'antigène (Barker et al. 1991). Les kératinocytes constituent la source principale de médiateurs de l'inflammation de l'épiderme (Williams and Kupper 1996). Ils produisent en particulier des peptides antimicrobiens (PAM), des cytokines et des chimiokines qui peuvent avoir une action directe sur les pathogènes mais sont surtout impliqués dans l'initiation de la réponse inflammatoire et le recrutement de cellules circulantes.

1.2.1. Les peptides antimicrobiens

Les PAM sont des polypeptides de petites tailles, majoritairement cationiques qui inhibent la croissance bactérienne par action lytique directe. Les PAM participent aussi à la réponse inflammatoire par leurs activités pro-immunogènes et chimioattractantes sur les monocytes, les LT et sur les polynucléaires neutrophiles (PNN) (Bräff et al. 2005). En condition normale, certains sont constitutivement produits par les kératinocytes mais leur nombre et leur diversité sont surtout accrus après activation du kératinocyte.

La cathélicidine LL-37 est produite de manière constitutive par les glandes sudoripares. Elle participe à la formation d'une barrière chimique et contrôle les infections topiques à la surface de la peau en détruisant les membranes virales et bactériennes (Bräff et al. 2005). En réponse à un stress, les kératinocytes produisent LL-37 sous la forme d'un précurseur dont la maturation nécessite l'activation des kallikréines de la couche cornée (Morizane and Gallo 2012). Une fois libérée dans le milieu extracellulaire, LL-37 peut induire la sécrétion de chimiokines par les kératinocytes et participe directement au recrutement des mastocytes (Bräff et al. 2005).

Les défensines sont des PAM cationiques sous-divisés en α -défensines et β -défensines (BD). Les α -défensines sont très exprimées dans l'épithélium intestinal tandis que les PAM BD sont majoritaires dans la peau. BD-1 est produite constitutivement par les kératinocytes alors que BD-2 et 3 sont exprimées en condition inflammatoire (Braff et al. 2005). De plus, leurs activités antimicrobiennes sont complémentaires, BD-2 est particulièrement active contre les bactéries Gram-négative mais inefficaces contre *Staphylococcus aureus* (Schroder and Harder 2006). BD-3 couvrent un large spectre bactérien, incluant *Staphylococcus aureus*, mais aussi fongique. Dans le psoriasis, le spectre d'activité antimicrobienne de BD-3 participe à protéger la peau de potentielles surinfections des lésions. L'expression des BD par le kératinocyte est induite en réponse à de nombreuses cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 α et β , l'IL-17A, l'IL-22, le TNF- α , l'OSM et l'IFN- γ pour BD2 (Guilloteau et al. 2010; Morizane and Gallo 2012). Cette dernière participe aussi au recrutement des LT circulants et des DC en se fixant au récepteur CCR6 (Braff et al. 2005).

Les PAM de la famille S100 sont des "senseurs" de calcium impliqués dans la différenciation des kératinocytes (Eckert et al. 2004). En condition normale, la fonction principale des protéines S100 consiste à réguler les flux de calcium intracellulaire (Donato et al. 2013). Toutefois, une activité antimicrobienne par séquestration des ions manganèse et zinc a été décrite pour les protéines S100A7, S100A8, S100A9, S100A12 et S100A15 (Morizane and Gallo 2012). Dans la peau normale, S100A7 (ou psoriasine) est faiblement exprimée par les kératinocytes et par les glandes sébacées où son action antimicrobienne est majoritairement dirigée contre *Escherichia coli* (Schroder and Harder 2006). S100A7 est fortement surexprimée dans les pathologies inflammatoires cutanées (Donato et al. 2013) et induite par l'IL-17A et l'IL-1 α (Guilloteau et al. 2010). Par ailleurs, il est décrit que S100A7 peut induire le recrutement de LT, monocytes et granulocytes par sa fixation au récepteur « *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* » et la production de ROS par les PNN (Donato et al. 2013). L'expression de S100A8 et S100A9 est fortement induite par les cytokines proinflammatoires ainsi que par les bactéries pathogènes ou en réponse à une lésion de la barrière cutanée induite par "tape-stripping" (Eckert et al. 2004). S100A8 et S100A9 sont souvent exprimés de concert et peuvent s'assembler en hétérodimère de calprotectine qui inhibe la croissance bactérienne et fongique en séquestrant le manganèse et le zinc. S100A8 et S100A9 possèdent également des activités proinflammatoires

dépendantes de leurs fixations au récepteur *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* ainsi qu'au TLR4. Par leurs liaisons à certains PRR, ils induisent, entre autre, la production de cytokines et de chimiokines par les kératinocytes (Donato et al. 2013).

1.2.2. Les cytokines/chimiokines

Les cytokines sont des protéines de communication essentielles aux interactions et à la coordination entre cellules. Dans l'épiderme, les kératinocytes représentent la source majoritaire de cytokines et de chimiokines (Luger and Schwarz 1990). Historiquement, l'IL1 α , l'IL-6, le « *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* » (GM-CSF) et le TNF- α ont été les premières cytokines décrites pour être produites par les kératinocytes en réponse aux agressions (Luger and Schwarz 1990). Une fois secrétées, l'IL-1 α et le TNF- α ont une fonction autocrine en se fixant à leurs récepteurs spécifiques et amplifient ainsi la réponse inflammatoire. Dans les années 2000, la liste des cytokines produites par le kératinocyte a été étendue à de nouvelles cytokines ainsi qu'à certaines chimiokines (Tableau 2). Toutefois, le kératinocyte semble surtout produire de l'IL-1 α et du TNF- α qui sont stockés sous une forme inactive dans les endosomes intracellulaires et rapidement libérés après activation. La liste des cytokines produites par le kératinocyte en réponse à l'activation de PRR, répertoriées à ce jour, est présentée dans le tableau 2.

Les chimiokines forment une classe à part entière de cytokines dont la fonction consiste à réguler le trafic des cellules immunitaires. La fonction chimioattractante de ces petites molécules est dépendante de leur fixation à des récepteurs à sept domaines transmembranaires exprimés de manière différentielle par les cellules du système immunitaire. Le recrutement de cellules immunitaires est donc à la fois dépendant d'une source productrice de chimiokine et de l'expression des récepteurs à la surface des cellules circulantes. Les chimiokines et leurs récepteurs sont répartis en quatre familles en fonction de leurs homologies structurales, basées sur la position de cystéines dans leur séquence peptidique (CC, CXC, CX3C ou XC). Chaque chimiokine peut se lier à un ou plusieurs récepteurs ; inversement, un récepteur peut être activé par plusieurs chimiokines (Figure 13). L'expression des chimiokines peut être constitutive (chimiokine d'homéostasie) ou induite en réponse à divers stimuli proinflammatoires (Esche et al. 2005)

Stimuli		Cytokines/ Chimiokines	Référence
PRR	Pam3Cys (TLR1/2)	CCL20, CCL2, CXCL8	(Niebuhr et al. 2010a)
	Lipopeptide et <i>S. aureus</i> (TLR2/6)	TSLP	(Vu et al. 2010)
	CpG TLR9	IFN- α / β , TNF- α , CXCL8, CCL2 CXCL9, CXCL10	(Lebre et al. 2007)
	LPS (TLR4)	TNF- α , CCL20, CCL2, CXCL8	(Lebre et al. 2007)
	Poly I:C (TLR3)	GM-CSF, IFN- β , IL-6, TSLP, TNF- α , CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL5, CCL2, CCL22	(Kinoshita et al. 2009)
		IL-36 α / γ	(Boutet et al. 2016)
		CCL27, IFN- α / β , CCL20	(Lebre et al. 2007)
	<i>S. aureus</i> (NOD2)	IL-17C	(Roth et al. 2014)
	Flagelline (TLR5)	TSLP, IL-6, GM-CSF, CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL5, CCL27	(Le et al. 2011)
		CCL20	(Lebre et al. 2007)
Dommages physiques	Dissociation cellulaire	IL-23A, IL-15, IFN- κ CXCL8, CCL20, CCL2	(Kennedy-Crispin et al. 2012)
	Tape stripping (<i>in vivo</i> souris)	IL-23	(Yoon et al. 2016)
	Tape stripping (<i>in vivo</i> humain)	IFN- γ , TNF- α , CXCL8, IL-10	(Nickoloff and Naidu 1994)
	UV-B	IL-10 IL-12	(Enk et al. 1995; Enk et al. 1996)
Irritant Allergène de contact	Dérivés du phénol	IL-1 α , TNF- α , CXCL8	(Newby et al. 2000)
	Dodécylsulfate de sodium Nickel Sulfate Potassium dichromate	IL-1 α , TNF- α CCL20, CCL27, CXCL8	(Spiekstra et al. 2005)

Tableau 2. Cytokines et chimiokines produites par les kératinocytes en réponse à l'activation des PRR par les PAMPs ou DAMPs. Pam3cys : Lipopeptide Trihydrochloride ; CpG : Cytosine-phosphate-Guanosine ; LPS : lipopolysaccharide ; Poly I:C : acide polyinosinique-polycytidylique ; UV-B : ultra-violets B, TSLP : *Thymic Stromal Lymphopoïetin*.

Dans la peau, les kératinocytes activés sont des sources majeures de chimiokines (Figure 13), la production de ces dernières semblent être particulièrement importantes en réponse à l'activation du « *myeloid differentiation factor* » 88 par les TLR, l'IL-1 α ou encore le TNF- α (Esche et al. 2005). CXCL8 est rapidement produite en réponse aux stimuli exogènes et induit le recrutement des PNN circulants (Olaru and Jensen 2010). Les chimiokines CXCL1, CXCL2,

CXCL3, CXCL5, CCL2 et CCL5 sont exprimées en réponse à l'activation de PRR (tableau 2) et aux cytokines proinflammatoires (Giustizieri et al. 2001; Guilloteau et al. 2010). Ces chimiokines participent majoritairement aux recrutements des PNN et des monocytes circulants. CCL11 et CCL26 sont exprimés par les kératinocytes en réponse aux cytokines Th2 comme l'IL-4 et l'IL-13 et sont majoritairement impliquées dans le recrutement des polynucléaires éosinophiles (PNE). Les chimiokines CXCL9/10 recrutent majoritairement les LT *helper* (LTh)1 par leur fixation à CXCR3, de plus CCL3/4 sont aussi décrites pour participer au recrutement des LTh1. Ces chimiokines sont produites en réponse à des stimuli d'origine virale ainsi qu'à des cytokines proinflammatoires comme l'IFN- γ , l'IL-18 (Kanda et al. 2007) ou encore le TNF- α et l'IL-4 (Albanesi et al. 2000). De même, CCL17/22 sont majoritairement associées au recrutement de LTh2 et sont exprimées par les kératinocytes en réponse à l'IL-13 (Purwar et al. 2006), au TNF- α et à l'IFN- γ (Horikawa et al. 2002). De plus, CCL2/5 pourraient également participer au recrutement des LTh2. Enfin la chimiokine CCL20 recrute des DC circulantes et de LT circulants en particulier les LTh17 exprimant le CCR6 (Esche et al. 2005; Ghannam et al. 2011). Elle serait aussi fortement associée au recrutement de LT non conventionnels gamme delta (LT $\gamma\delta$) participant à la polarisation Th17 chez la souris (Mabuchi et al. 2011). Son expression par les kératinocytes est augmentée en réponse à divers stimuli comprenant l'IL1- α et le TNF- α (Esche et al. 2005) mais aussi par l'activation de TLR, des lésions physiques et en réponse aux UV (Kennedy-Crispin et al. 2012).

Dans un contexte inflammatoire, il est difficile de distinguer les cytokines produites par les kératinocytes en réponse directe à la reconnaissance d'un agent pathogène des cytokines secondairement produites en réponse aux médiateurs de l'inflammation. De fait, les cytokines produites par les cellules immunitaires en particulier par les LT contribuent grandement à l'activation des kératinocytes et augmentent de façon synergique la quantité et la diversité des médiateurs de l'inflammation produits par les kératinocytes (Guilloteau et al. 2010). Pour exemple, la production de cytokines Th17 dans le psoriasis ou celle de cytokines Th2 dans la DA (cf chapitre 3) favorisent la production de chimiokines impliquées dans le maintien d'un environnement cytokinique Th17 (CCL20) ou Th2 (CCL17, CCL22) par les kératinocytes (Albanesi and Pastore 2010). La communication par le biais des cytokines entre les kératinocytes, les DC et les LT est un facteur déterminant de la réponse

inflammatoire (Pasparakis et al. 2014). En outre, elle peut permettre, la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative.

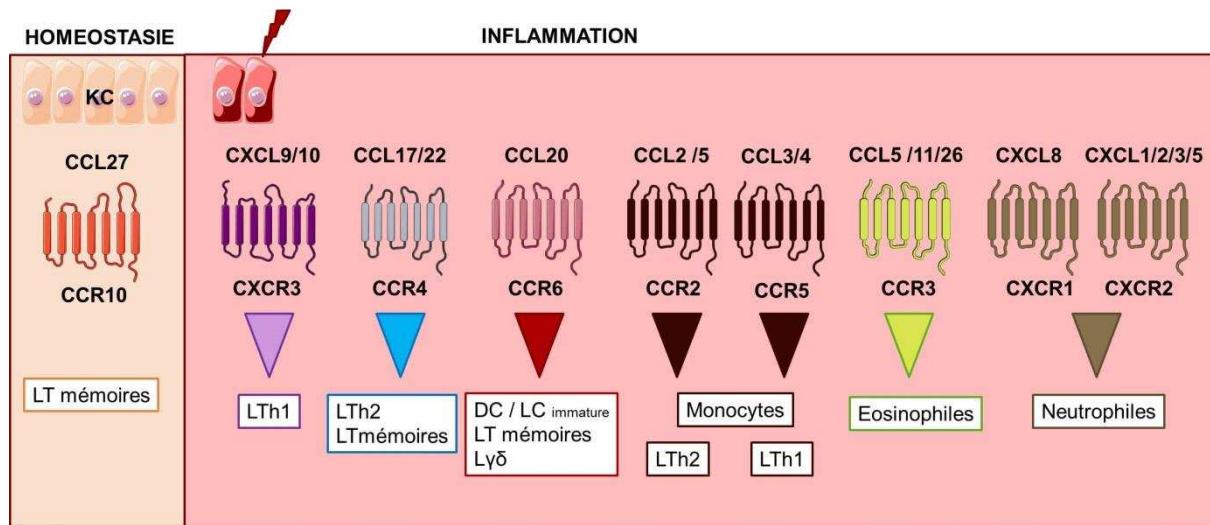


Figure 13. Principales chimiokines produites par les kératinocytes et leurs récepteurs. DC : cellule dendritique, LC : cellule de Langerhans, LT : lymphocyte T, LTh : lymphocyte T helper, LT γ : lymphocyte T à TCR γ δ .

1.3. Cellule présentatrice d'antigènes non professionnelle

La présentation d'antigènes nécessite l'endocytose et l'apprêttement de peptides antigéniques issus de la dégradation du pathogène reconnu. Ces derniers sont ensuite présentés aux LT par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) encore nommé « *Human Leukocyte Antigen* » (HLA) chez l'homme. La présentation de l'antigène au « *T Cell Receptor* » (TCR) du lymphocyte T requiert aussi l'expression de molécules de costimulation B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86), ainsi que l'expression de molécules d'adhésion. Le tout forme une synapse immunologique qui aboutit à l'activation des LT CD4 $^{+}$ ou LTh lorsque l'antigène est présenté au sein du CMH de classe II et l'activation de LT CD8 $^{+}$ ou T cytotoxiques (LTc) lorsque l'antigène est présenté par le CMH de classe I.

Depuis les années 90, la capacité du kératinocyte à présenter des antigènes fait l'objet de controverse. En condition normale, le kératinocyte exprime faiblement le CMH de classe I et n'exprime pas le CMH de classe II caractéristique des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Toutefois, il a été montré qu'*in vitro*, après stimulation par l'IFN- γ , CMH de classe II est exprimé par les kératinocytes. Ces derniers sont alors capables d'activer des LT naïfs (Nickoloff and Turka 1994). A ce titre, les kératinocytes ont été qualifiés de cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles ou accessoires. Toutefois, les molécules de

costimulation CD80/86 ne sont pas détectables à la surface des kératinocytes (Nickoloff and Turka 1994). En l'absence de molécules de costimulation, le kératinocyte serait donc capable de présenter des antigènes mais le faible signal présenté au TCR conduirait à une anergie des LT plutôt qu'à l'activation de cellules effectrices (Black et al. 2007). Ainsi, les kératinocytes seraient davantage impliqués dans la tolérance immunitaire que dans l'activation d'une réponse immunitaire adaptative. En 2007, Black et coll. ont confirmé l'augmentation d'expression du CMH I et II par les kératinocytes en réponse à l'IFN- γ . Ils ont aussi suggéré que l'« *InterCellular Adhesion Molecule* » (ICAM-1), une protéine d'adhésion impliquée dans la formation de la synapse immunologique et dont l'expression est augmentée par l'IFN- γ , serait suffisante pour induire la formation de cellules effectrices. Black et coll. ont pour cela utilisé des LT mémoires spécifiques d'antigènes déterminés et ont montré que l'expression d'ICAM-1 par les kératinocytes pré-stimulés par l'IFN- γ , permet la formation d'une synapse immunologique suffisante pour induire la présentation d'antigène et l'activation de LTh1 et Th2 et mais aussi celle de LTc *in vitro* (Black et al. 2007). Plus récemment, la capacité de présentation d'antigène a été mise en évidence *in vivo* dans un modèle d'inflammation cutanée induite par greffe de LTc dirigés contre l'ovalbumine. Dans ce modèle, la déplétion en LC ne modifie pas la gravité du phénotype suggérant qu'une autre cellule résidente de l'épiderme, le kératinocyte, est capable de présenter l'ovalbumine aux LTc et d'induire le phénotype (Kim et al. 2009). Le kératinocyte étant incapable de migrer vers les ganglions lymphatiques où il serait susceptible de rencontrer des LT naïfs. La fonction de présentation antigénique du kératinocyte est probablement dépendante de la présence de LT mémoires dans l'épiderme (cf. Section D).

2. Immunité innée dermique

Initialement peu décrites d'un point de vue fonctionnel, les cellules de l'immunité innée présentes dans le derme, parfois qualifiées de système immunitaire dermique (Di Meglio et al. 2011) connaissent depuis quelques années un regain d'intérêt pour leur implication dans les pathologies inflammatoires chroniques. Elles sont particulièrement actives dans la production de cytokines et participent à la mise en place d'une réponse inflammatoire.

2.1. Les macrophages résidents

Dans la peau saine, les macrophages résidents sont localisés autour des vaisseaux lymphatiques et sanguins du derme profond et représentent la population de leucocytes la plus dense dans la peau normale (Tay et al. 2014). Une partie de ces macrophages aurait colonisé la peau durant le développement embryonnaire et serait issue d'un précurseur commun aux LC provenant du sac vitellin. Cette hypothèse est en partie basée sur des ressemblances phénotypiques entre les macrophages et les LC telles que l'expression du marqueur F4/80 et leur dépendance vis-à-vis du récepteur CSF-1R dont les cibles sont le M-CSF et l'IL-34, indispensables à leur différenciation (Malissen et al. 2014). Au cours de processus inflammatoire, les macrophages issus du sac vitellin sont progressivement remplacés par les macrophages dérivés de monocytes recrutés depuis la circulation dont la prolifération est dépendante du GM-CSF (Italiani and Boraschi 2014).

L'ontogénie n'est pas le seul élément en faveur de la diversité des macrophages. Selon le contexte inflammatoire, les macrophages sont phénotypiquement subdivisés en macrophages de type I (M1) et de type 2 (M2). Les macrophages M1 sont impliqués dans la réponse aiguë aux agents infectieux et la réponse anti-tumorale. Ils秘rètent des cytokines proinflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-23 et l'IL-12 ainsi que des ROS et sont caractérisés par l'expression de la « Nitric Oxyde Synthase » inductible. Les macrophages M1 sont activés en réponse au LPS ainsi qu'au TNF- α et à l'IFN- γ (Davies et al. 2013). A l'inverse, les macrophages M2 sont impliqués dans la résolution de l'inflammation et dans les processus de cicatrisation par la production de cytokines anti-inflammatoires, en particulier l'IL-10 et le TGF- β . Ils sont caractérisés par l'expression de l'arginase et sont pro-angiogéniques (Pasparakis et al. 2014). Les macrophages M2 sont activés par différents stimuli ce qui a conduit à leur sous-classification en trois phénotypes, les M2a activés par l'IL-4 et l'IL-13, les M2b activés par les ligands des TLR ou la fixation d'immunoglobuline (Ig) G au récepteur Fc γ R et enfin les M2c dont l'activation est induite en réponse aux glucocorticoïdes ainsi qu'aux cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β (Italiani and Boraschi 2014). En outre, la polarisation des macrophages M1 ou M2 n'est pas un processus irréversible. Ainsi, de nombreux auteurs suggèrent que les M1 présents dans les tissus au cours d'une réponse inflammatoire anti-infectieuse pourraient ensuite être reprogrammés en M2 lors de la phase de réparation (Italiani and Boraschi 2014). Le phénotype des

macrophages et les fonctions assurées par ces cellules au cours de la réponse immunitaire seraient donc largement dépendants du milieu cytokinique.

Les macrophages résidents cutanés expriment une grande diversité de PRR (TLR, NLR, mannose récepteur...) et sont de fait, capables de détecter des agents pathogènes, des métabolites issus de cellules nécrotiques et des signaux de danger du microenvironnement (Davies et al. 2013). En condition homéostatique, les M2 sont majoritaires dans la peau normale tandis que les M1 sont présents en condition inflammatoire. Par leurs capacités à détecter des DAMPS ou PAMPS, les macrophages résidents cutanés auraient donc un rôle central dans le maintien de l'homéostasie cutanée. Pour se faire, ils possèdent une forte activité de phagocytose et participent à la production de médiateurs de l'inflammation incluant des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire, des médiateurs inflammatoires lipidiques et des ROS (Gordon et al. 2014). Ils participent ainsi à la réponse inflammatoire en recrutant rapidement des cellules circulantes comme les PNN et les monocytes mais sont en revanche caractérisés par une faible capacité de recirculation et une faible expression du CMH II suggérant une capacité de présentation antigénique minime (Malissen et al. 2014).

2.2. *Les mastocytes*

Les mastocytes sont des cellules mononucléées granuleuses présentes dans de nombreux tissus conjonctifs et en particulier dans la peau. Historiquement, leur rôle a été décrit dans la réponse aux infections parasitaires et dans les pathologies allergiques médiées par les cytokines de type 2. De fait, le rôle des IgE dans la dégranulation des mastocytes et la libération de molécules vasoconstrictrices impliquées dans les chocs anaphylactiques a été largement décrit (Galli and Tsai 2012). Dans la peau, ils sont localisés à proximité des fibres nerveuses dermiques et auraient ainsi un rôle majeur dans la réponse inflammatoire au stress. Parmi les nombreux facteurs activant les mastocytes sont retrouvés des neuropeptides comme la substance P, la neuropoïétine, le « *nerve growth factor* » ainsi que la « *corticotrophin-releasing hormone* » (Theoharides et al. 2012). Les autres facteurs induisant la dégranulation ou la synthèse *de novo* de médiateurs de l'inflammation par les mastocytes incluent les ligands des TLR (2, 4, 7 et 9), les IgG, les IgE, les cytokines proinflammatoires (IL-1, TNF- α), les prostaglandines et les molécules C3a, C5a du complément (Theoharides et al. 2012). Au sein des tissus épithéliaux, la capacité de ces

cellules à libérer rapidement et spécifiquement des médiateurs de l'inflammation stockés dans les granules intracytoplasmiques seraient une voie essentielle de la réponse inflammatoire. Parmi les facteurs libérés sont décrits des molécules vasoactives ou pro-angiogéniques comme l'histamine ou le « *Vascular Endothelial Growth Factor* » (VEGF), des protéases comme les métalloprotéinases ainsi que de nombreuses chimiokines et cytokines impliquées dans l'activation des fibroblastes, le recrutement de leucocytes circulants. L'ensemble de ces molécules favorise les dommages tissulaires, l'inflammation et la douleur. Plus récemment, un rôle des mastocytes dans la transition entre la réponse immunitaire innée et adaptative a aussi été suggéré ainsi qu'un rôle dans la physiopathologie de maladies auto-immunes (Bulfone-Paus and Bahri 2015). En effet, les mastocytes sont capables d'interagir avec les LT au sein de synapses immunologiques fonctionnelles et pourraient à ce titre, être impliqués dans la présentation antigénique et l'activation de LTh, de LTC ainsi que dans la tolérance immunologique en interagissant avec les LT régulateurs (Treg) (Bulfone-Paus and Bahri 2015).

2.3. *Les cellules Lymphoïdes innées*

En 2013, Spits et coll. ont proposé une appellation unique d'ILC pour décrire les populations cellulaires de morphologie lymphoïde, négatives pour l'expression de marqueurs communs des lignées lymphocytaires, myéloïdes et dendritiques (CD45+PAN^{neg}) et n'exprimant pas l'enzyme de réarrangement antigénique (*Recombinant-Activating gene RAG*) du TCR (Spits et al. 2013). Malgré leurs caractères « innés », les ILC présentent une diversité fonctionnelle aussi importante que celles des LTh (Cherrier 2014). Contrairement à ces derniers, l'activation des ILC n'est cependant pas spécifique d'un antigène et peut être induite par des stimuli exogènes et des cytokines indépendamment de la présentation antigénique (Kim 2015). Cette spécificité leur permet de répondre rapidement à l'entrée de pathogènes par la production de cytokines proinflammatoires (Sonnenberg and Artis 2015). En revanche, il a été récemment montré que les ILC sont capables d'activer la prolifération de LTh par la présentation antigénique *via* le CMH II (von Burg et al. 2015).

Les ILC sont divisées en trois groupes selon leur profil d'expression cytokinique. Ainsi, le groupe 1 comprend les cellules *Natural Killer* (NK) et les ILC1 produisant de l'IFN- γ et du TNF- α et sont impliquées dans la réponse antivirale et anti-tumorale (Robinette and Colonna 2016). Les NK seraient majoritairement circulants tandis qu'une faible proportion d'ILC1 est

présente dans la peau en condition physiologique (Teunissen et al. 2014). L'activation des ILC1 est dépendante de l'IL-12, de l'IL-18 et de l'IL-15 produites par les cellules de l'immunité innée présentes dans le microenvironnement inflammatoire. L'expression du facteur de transcription T-bet est indispensable à la différenciation des ILC1 tandis que le facteur EOMES serait associé aux fonctions cytotoxiques des NK comme la production de granzyme B et de perforine (Robinette and Colonna 2016). Les ILC du groupe 2 sont caractérisées par un profil de cytokines Th2 (IL-5 et IL-13) et Th9 (IL-9) ainsi que par l'expression des facteurs de transcription GATA-3 et « *Retinoic Acid Orphan Receptor* » (ROR)- α (Robinette and Colonna 2016). Leur activation est dépendante des cytokines IL-33, IL-25 et de « *Thymic Stromal Lymphopoietin* » (TSLP) produites par les cellules épithéliales (Salimi and Ogg 2014). Dans la peau saine, les ILC2 représenteraient 5% des cellules d'origine hématopoïétique et participeraient à la cicatrisation et à l'élimination des parasites intracellulaires (Kim 2015). Enfin, les ILC du groupe 3 incluent les « *Lymphoid Tissue Inducers* » (LTi), les « *Natural Cytotoxicity Receptor* » (NCR) $^-$ ILC3 et les NCR $^+$ ILC3. Les NCR $^+$ ILC3 sont présentes dans le derme où elles contribuent à la défense antimicrobienne et fongique et à l'immunotolérance aux bactéries de la flore commensale (Salimi and Ogg 2014). Elles ont surtout été décrites pour leurs implications dans les pathologies auto-immunitaires et produisent des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-17 et de l'IL-22. Le développement des ILC3 est dépendant du facteur de transcription ROR- γ tandis que le facteur de transcription « *Aryl Hydrocarbon Receptor* » (AHR) semble être essentiel aux fonctions de ces cellules. Ce dernier est activé par des stimuli exogènes comprenant les polluants, certains métabolites bactériens ou alimentaires et permet l'expression d'IL-22 par les ILC3 (Robinette and Colonna 2016).

Par leur production de cytokines, les ILC contribuent donc à l'amplification de la réponse inflammatoire. Récemment, il a néanmoins été montré que dans certains syndromes combinés d'immunodéficience sévère, l'absence d'ILC en présence de LT n'induit pas de pathologies particulières chez ces patients. Ceci suggère que les fonctions des ILC et des LT sont redondantes et qu'en présence de LT le rôle des ILC dans l'immunité n'est pas indispensable (Vely et al. 2016).

2.4. Les fibroblastes

Les fibroblastes sont aujourd'hui reconnus comme des acteurs à part entière de la réponse immunitaire innée. *In vitro*, les fibroblastes de derme humain répondent aux TLR 1 à

10 par la production de molécules proinflammatoires comme l'IL-6 et CXCL8 ou par la production de MMP (Yao et al. 2015). L'expression de TLR par les fibroblastes pourrait être essentielle à la détection de ligands endogènes issus de cellules lésées ou induits par des traumatismes physiques et chimiques. Les fibroblastes pourraient ainsi assurer l'immunsurveillance dermique et la détection d'antigènes du soi. En outre et de manière inattendue, la comparaison des niveaux d'expressions des TLR par les fibroblastes et les kératinocytes humains montre que l'expression des TLR est plus importante pour les fibroblastes que celle décrite pour les kératinocytes (Yao et al. 2015). De plus, la stimulation du TLR1/2 par un lipopeptide bactérien synthétique (PAM3CSK4) induit une expression d'IL-6 et de CXCL8 plus importante pour les fibroblastes que pour les kératinocytes (Yao et al. 2015). Ceci suggère que les kératinocytes sont moins sensibles que les fibroblastes aux stimuli endogènes ou exogènes. De plus, de nombreuses cytokines (IL-13, IL-6, IL-33, IL-1 β , TGF- β 1) produites par les cellules immunitaires au cours de la réponse inflammatoire sont actives sur les fibroblastes (Kendall and Feghali-Bostwick 2014). En réponse à ces stimuli, les fibroblastes produisent des protéines de la matrice extracellulaire et des métalloprotéinases et remodelent ainsi le tissu conjonctif dermique. Après une lésion, ce remodelage est essentiel à la cicatrisation, néanmoins lorsque l'inflammation persiste, il peut aboutir à la formation d'une fibrose caractérisée par la production incontrôlée de fibres de collagène et soutenue par la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes (Kendall and Feghali-Bostwick 2014). En réponse à l'environnement proinflammatoire, les fibroblastes秘ètent aussi des cytokines, des chimiokines, des médiateurs inflammatoires lipidiques, des facteurs de croissance et des facteurs pro-angiogéniques. La production de cytokines et de facteurs de croissance par les fibroblastes pourrait notamment influencer la réponse inflammatoire des kératinocytes et promouvoir leurs activations. Pour exemple, l'IL-1 α fortement produite par les kératinocytes, induirait l'expression de FGF par les fibroblastes dermiques qui en retour activerait la prolifération des kératinocytes (Maas-Szabowski et al. 1999). Par ailleurs, il a été décrit que les fibroblastes favorisent la maturation des DC en induisant l'expression de molécules de costimulation (Saalbach et al. 2007) et la polarisation Th17 en soutenant la production d'IL-23 par les DC (Schirmer et al. 2010). Par ces mécanismes, les fibroblastes auraient un rôle majeur dans la transition entre l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique (Buckley et al. 2001).

3. Les cellules dendritiques

3.1. *Les cellules dendritiques myéloïdes*

Les DC sont spécialisées dans la capture, le transport et la présentation d'antigènes aux LT. En condition basale, les DC sont présentes dans la peau sous une forme immature caractérisée par une faible expression du CMH II et des molécules de costimulation CD80/86 (Clausen and Stoitzner 2015). A ce stade, elles ont un rôle de sentinelle et participent à la reconnaissance d'agents pathogènes par l'expression de PRR, de récepteurs des fragments Fc des Ig, de récepteurs aux lectines et de récepteurs du complément. En réponse aux stimuli exogènes ou aux cytokines produites par les cellules de l'immunité innée, les DC initient un processus de maturation et de réorganisation des récepteurs de surface. Ce processus inclut l'endocytose des PRR et l'adressage membranaire du CCR7 permettant leurs migrations jusqu'aux ganglions lymphatiques. Au cours de leur transport vers les organes lymphoïdes secondaires, les DC apprêtent ensuite l'antigène et acquièrent leur capacité de présentation antigénique aux lymphocytes T par l'expression du CMH II et des molécules de costimulation CD80/86 (Kaplan et al. 2008; Romani et al. 2010). Par ce mécanisme, les DC induisent une réponse immunitaire adaptative en présentant des antigènes exogènes aux LT mais ont aussi un rôle dans l'immunotolérance en présentant des antigènes du soi aux LT autoréactifs et en induisant leur anergie (Kaplan et al. 2008; Zaba et al. 2009b). Depuis peu, il est également décrit que les DC peuvent exercer leurs fonctions de cellules présentatrices d'antigènes au sein même de la peau. Cette fonction dépend de la présence de LT_{RM} (cf section D) et permet une seconde réponse immunitaire rapide et spécifique contre l'agent infectieux détecté.

Les DC expriment de nombreux récepteurs aux cytokines et leurs fonctions sont ainsi largement influencées par les cytokines présentes dans le microenvironnement inflammatoire. Pour exemple, l'IL-1 α et le TNF- α fortement produites par les kératinocytes en réponse aux stimuli exogènes seraient impliqués dans l'inhibition de l'E-cadhérite et la réorganisation du cytosquelette favorisant ainsi la mobilité et l'activation des LC (Wang et al. 1999).

Les DC ne constituent pas une population homogène. En condition basale, les LC sont exclusivement présentes dans l'épiderme et possèdent une forme dendritique leur

permettant de s'intercaler entre les kératinocytes. Chez l'homme, les LC sont caractérisées par l'expression du « *Cutaneous Leukocyte Antigen* » (CLA) associé au tropisme cutané, du CD1a impliqué dans la reconnaissance de certains lipides endogènes ou issus de mycobactéries et de la langérine, un récepteur lectine de type C (Klechevsky 2013). Dans la peau saine, les LC ont un rôle majeur dans l'immunotolérance aux bactéries de la flore commensale ainsi qu'aux endo-antigènes issus de la nécrose des kératinocytes (Clausen and Stoitzner 2015). Néanmoins, les LC peuvent participer à l'activation de LT effecteurs au cours de processus inflammatoire (Tableau 3). Les dDC sont majoritairement présentes dans le derme papillaire et sont fonctionnellement et phénotypiquement hétérogènes (Tableau 3). De manière générale elles sont impliquées dans l'activation de LT et dans la polarisation dépendante des cytokines présentes dans l'environnement inflammatoire.

	Souris		Homme	
DC (CD11c ⁺)	Marqueurs cellulaires	Rôles décrits	Marqueurs cellulaires	Rôles décrits
LC	CD11b ^{low} CD103 ⁻ Langerine ⁺	<ul style="list-style-type: none"> - Polarisation Th17 dans un modèle d' infection <i>C.Albicans</i> - Tolérance allogénique - Induction Treg dans un modèle d'hypersensibilité de contact 	CD1a ⁺ CD1c ⁺ Langerine ⁺ CLA ⁺	<ul style="list-style-type: none"> - Induction Treg en condition homéostatique - Polarisation de lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes Th1, Th2, Th17 et Th22 en condition inflammatoire - Présentation non classique via CD1a - Présentation croisée aux LTC dépendante de l'IL-15
DC	CD11b ⁺ CD103 ⁻	<ul style="list-style-type: none"> - Tolérance allogénique en condition homéostasique - possible activation Treg 	CD1a ⁺ CD1c ⁺	- Polarisation Th2/Th1
	XCR1 ⁺ Langerine ⁺ CD103 ⁺⁻ CD11b ⁻	<ul style="list-style-type: none"> - Présentation croisée aux LTC - Polarisation Th1 dans un modèle d'infection à <i>C.Albicans</i> 	CD1a ⁺ CD1c ⁺ CD141 ^{high} CD14 ⁻	- Présentation croisée aux LTC
	?	??	CD1c ⁺ CD141 ⁺ CD14 ⁻	<ul style="list-style-type: none"> - Induction Treg - Activation immunité humorale via l'activation des LT_{FH}

Tableau 3. Comparaison phénotypique et fonctionnelle des cellules dendritiques présentes dans la peau humaine et murine. Tableau réalisé à partir des revues de la littérature (Klechevsky 2013; Clausen and Stoitzner 2015; Said and Weindl 2015). LC : cellule de Langerhans, dDC : cellule dendritique dermique, Treg : lymphocyte T régulateur, Th : lymphocyte T helper, LTC : lymphocyte T cytotoxique, LT_{FH} : Lymphocyte T follicular helper.

3.2. *Les cellules dendritiques plasmacytoïdes*

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont spécialisées dans la production d'IFN de type I et sont impliquées dans la réponse immunitaire antivirale grâce à l'expression des TLR7 et 9 (Swiecki and Colonna 2015). Les pDC sont des cellules circulantes transitant entre le derme et la périphérie par les vaisseaux sanguins et lymphatiques. En condition inflammatoire, les pDC sont recrutées dans le derme où elles constituent la principale source d'IFN- α . De fait, elles seraient impliquées dans de nombreuses pathologies autoimmunes cutanées et dans les processus de cicatrisation (Zaba et al. 2009b). Les pDC expriment aussi le CMH II et peuvent présenter des antigènes aux LT mais sont moins efficaces que les dDC dans cette fonction (Swiecki and Colonna 2015).

4. Les Lymphocytes T

En condition non-pathologique et chez l'homme, la peau contient plus d'un million de LT par cm^2 (Clark 2010). L'adressage spécifique des LT vers la peau est effectuée dans les ganglions drainants au moment de la présentation antigénique et se caractérise par l'expression du CLA, l'expression des récepteurs CCR4, CCR6 et CCR10 (Park and Kupper 2015). Le CLA est une selectine qui facilite l'extravasation des LT dans le derme par sa fixation aux E-selectines exprimées par les cellules endothéliales des capillaires sanguins dermiques. Une fois dans le derme, les LT sont guidés jusqu'à la zone inflammatoire par les chimiokines tels que CCL27, CCL20, CCL17 et CCL22 qui se fixent respectivement aux récepteurs CCR10, CCR6 et CCR4 (Park and Kupper 2015). Les études réalisées au cours des années 2000 sur la caractérisation phénotypique des LT présents dans la peau saine ont mis en évidence la fonction mémoire de ces cellules (98%). Les LT_{RM} ont été générés au cours de phases infectieuses et contrairement aux LT effecteurs mémoires, sont maintenus dans la peau après résolution de l'inflammation (Suwanpradid et al. 2016). Le caractère « résident » de ces LT est associé à leurs incapacités à recirculer et se distingue par l'expression de CD69 (Park and Kupper 2015; Watanabe et al. 2015). Les LT_{RM} possèdent un répertoire TCR diversifié et sont retrouvés au niveau de zones cutanées ayant été en contact avec l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. De plus, il a été montré que les LT_{RM} sont capables de

coloniser des sites cutanés éloignés du lieu de la primo-infection ou d'autres tissus susceptibles de rencontrer l'antigène contre lequel ils sont dirigés (Clark 2015).

La description phénotypique des LT_{RM} récemment réalisée chez l'homme, a montré que la peau humaine est très majoritairement colonisée par des LT $\alpha\beta$ conventionnels se répartissant en CD4⁺ et CD8⁺ dans le derme et dans l'épiderme (Watanabe et al. 2015). Ils apparaissent aujourd'hui comme des acteurs majeurs de l'immunosurveillance cutanée (Heath and Carbone 2013; Suwanpradid et al. 2016) et permettent la mise en place d'une réponse rapide et efficace à une seconde stimulation par le même antigène et indépendamment du recrutement de LT circulants (Park and Kupper 2015). Ainsi, chez la souris, une infection virale par *Herpes virus* ou par *Vaccinia Virus* induit la génération de LT_{RM} CD8⁺ CD103⁺ persistant dans l'épiderme plusieurs mois après la résolution de l'inflammation et formant une protection suffisante et plus efficace que celle induite par les LT mémoires circulants contre une seconde infection par ces virus (Clark 2015). Les LT_{RM} seraient ainsi responsables de la protection induite par la vaccination et seraient aussi impliqués dans la chronicité et les rechutes observées dans certaines pathologies inflammatoires (Clark 2015). La fonction de ces LT dans la peau saine est encore peu décrite, seuls des études principalement réalisées chez la souris ont permis de mettre en évidence un rôle de ces cellules dans la défense cutanée contre les infections virales et bactériennes, dans la photoprotection ainsi que dans l'immunotolérance au microbiote cutané (Suwanpradid et al. 2016).

4.1. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels

4.1.1. Les lymphocytes T cytotoxiques

La fonction des LTc au sein de la peau saine est peu décrite. Par leurs activités cytotoxiques, ces cellules seraient impliquées dans la lyse de cellules infectées et pourraient ainsi avoir un rôle majeur dans la réponse antivirale. De plus, leurs fonctions pro-apoptotiques pourraient être impliquées dans le rejet de greffe, dans les réactions cutanées médicamenteuses et dans le contrôle du développement tumoral (Nomura et al. 2014). Les LTc pourraient aussi produire des cytokines comme l'IFN- γ , l'IL-17 et l'IL-22. Ainsi, l'inhibition de ces cellules dans différents modèles d'inflammation cutanée murins mimant respectivement la dermatite allergique (Hennino et al. 2007), la dermatite de contact

(Vocanson et al. 2006) ou le psoriasis (Di Meglio et al. 2016) altèreraient le développement du phénotype inflammatoire suggérant un rôle majeur des LT CD8⁺ dans l'initiation de ces pathologies.

4.1.2. Lymphocytes T helper

Les LTh orchestrent la réponse inflammatoire par leurs activités sur les cellules de l'immunité innée et favorisent l'activation des LTc ou celle des lymphocytes B. Ils secrètent des cytokines dont la nature dépend du milieu cytokinique majoritairement établi par les DC lors de la présentation antigénique (Figure 14). La polarisation cytokinique des LTh implique la phosphorylation des protéines « *Signal Transducers and Activators of Transcription* » (STAT) qui induisent l'expression de facteurs de transcription spécifiques de chaque sous populations de LTh (Figure 14). Historiquement divisés en deux populations mutuellement antagonistes, LTh1 et LTh2, les profils cytokiniques des LTh dans divers contextes pathologiques se sont largement diversifiés et incluent aujourd'hui des populations LTh17, Treg mais aussi des populations plus rares comme les LTh22, LT_{FH} et LTh9 (Nomura et al. 2014).

La polarisation cytokinique des LTh est dépendante des cytokines produites par les cellules de l'immunité innée, de l'intensité du signal d'activation du TCR et de fait, associée à des contextes infectieux bien caractérisés. Ainsi les LTh1 sont majoritairement impliqués dans les défenses antivirale, anti-infectieuse contre des bactéries intracellulaires et anti-tumorale. Les LTh2 soutiennent l'immunité humorale en activant la production d'anticorps par les lymphocytes B, participent à la défense antiparasitaire et sont fortement associés aux pathologies allergiques. Par ailleurs, dans la peau, la polarisation Th2 peut être induite par une destruction mécanique de la barrière cutanée par « *Tape –Stripping* » (Oyoshi et al. 2010). Les LTh17 sont impliqués dans la défense antimicrobienne et antifongique et sont ainsi fortement associés aux mécanismes de défense des tissus épithéliaux. En plus des cytokines décrites dans la figure 14, la polarisation des LTh17 peut être induite à partir des Treg en présence de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-21. Ces cytokines proinflammatoires sont impliquées dans la phosphorylation de STAT-3 qui lève l'inhibition de FOXP3 et induit la polarisation LTh17 (Nomura et al. 2014). L'IL-23 est ensuite requise pour la stabilisation et l'expansion des LTh17 (Figure 14). Les LTh9 sont fortement associés au tropisme cutané, secrètent majoritairement de l'IL-9 ainsi que du TNF- α et la granzyme B. Ils

pourraient avoir un rôle important dans la défense contre les pathogènes extracellulaires et peuvent favoriser la production de cytokines par les sous-populations LTh1, 2 et 17 (Schlapbach et al. 2014). Chez l'homme, une population LTh22 a été récemment identifiée et se distingue des LTh17 par son incapacité à secréter de l'IL-17. Les Th22 ont été identifiés dans les lésions de DA, produisent de l'IL-22 et des facteurs de croissance impliqués dans le remodelage cellulaire et pourraient avoir une fonction importante dans l'immunité des épithéliums ainsi que dans la cicatrisation cutanée (Eyerich et al. 2009). Enfin les Treg représentent 5 à 10% des LT_{RM} présents dans la peau saine et ont une fonction essentielle dans l'immunotolérance au microbiote cutané (Clark 2010). Ces Treg sont décrits pour être très actifs dans les cancers cutanés où leurs activités immunosuppressives pourraient favoriser la prolifération tumorale tandis que leurs fonctions sont plutôt déficientes dans les pathologies inflammatoires cutanées.

La polarisation des LTh est un mécanisme réversible. Pour exemple, dans un contexte inflammatoire, la présence d'IFN- γ dans le milieu cytokinique modifie le phénotype Th2 en Th1. Cette plasticité complexifie davantage la fonctionnalité et le rôle des LTh dans la réponse inflammatoire. De surcroit, la description récente de populations d'ILC ou de LT non conventionnels capables de produire des cytokines dépendantes du contexte inflammatoire comme cela est décrit pour les LTh suggère que la réponse inflammatoire est majoritairement dépendante des cytokines produites et non des cellules présentes.

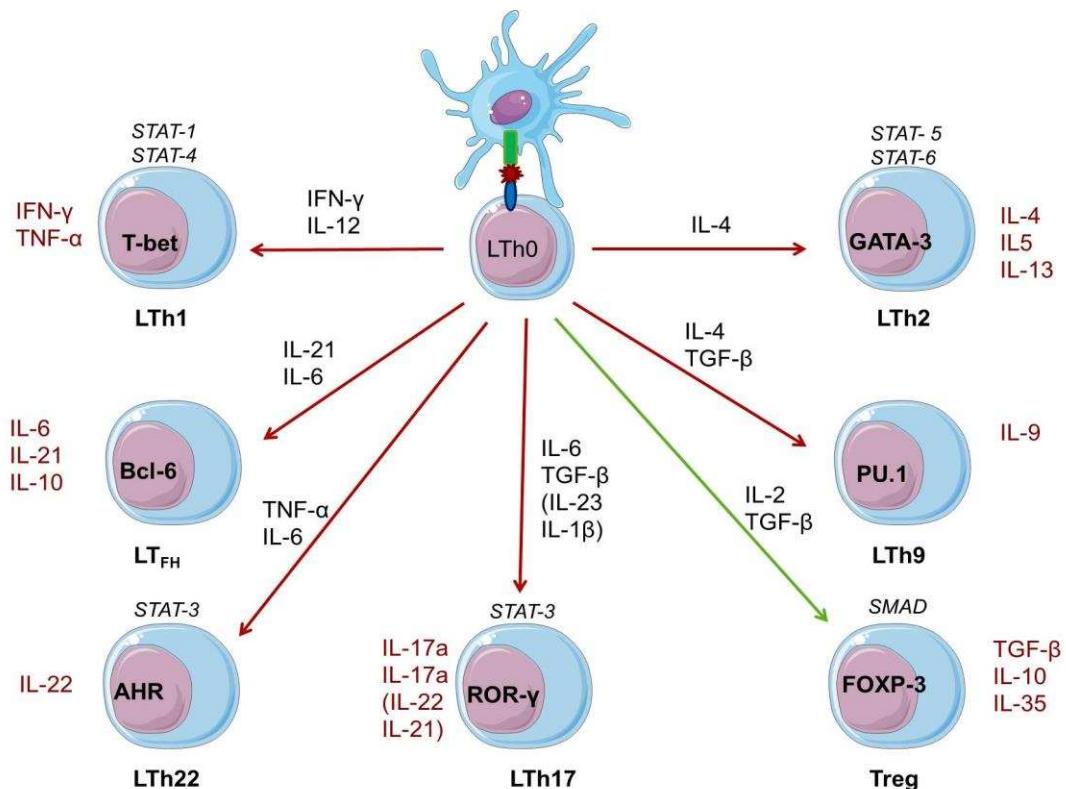


Figure 14. Différenciation et polarisation cytokinique des sous-populations de LT helper. La présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs (Th0) induit la production de phénotypes différents qui dépendent des cytokines présentes dans la synapse immunologique. Les cytokines indiquées entre parenthèse sont associées aux LTh17 décrits en condition pathologique. STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*, ROR: *Retinoic acid Orphan Receptor*, FOXP3: *forkhead box P3*, AHR: *Aryl Hydrocarbon Receptor*, Treg: *Lymphocyte T régulateur*. Tfh : *lymphocyte T Follicular Helper*.

4.2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ et NKT non conventionnels

Les LT non conventionnels possèdent une diversité de répertoire du TCR restreinte et des caractéristiques de cellules de l'immunité innée. Ils représentent une faible proportion des cellules du système immunitaire cutané chez l'homme mais participent aux mécanismes de défense cutanée par leurs capacités à produire des cytokines en réponse à des stimuli n'impliquant pas l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

4.2.1. Les lymphocytes T Natural Killer

Les lymphocytes NKT expriment un TCR α invariant et possèdent un répertoire TCR β peu diversifié reconnaissant des glycolipides issus de bactéries ou des lipides endogènes rares ou anormaux présentés par le CD1d. De fait, dans la peau saine, ils pourraient avoir un rôle immunosupresseur en prévenant les mécanismes de l'auto-immunité et par leurs actions anti-tumorales. Les NKT秘ètent pour cela de nombreuses cytokines comprenant l'IL-4, l'IL-

10, l'IFN- γ et le TNF- α et sont riches en granules contenant des molécules cytolytiques comme la perforine et la granzyme B (McKee et al. 2014). A l'inverse, par ces fonctions et par leurs capacités à produire des cytokines proinflammatoires, les NKT sont décrits pour leurs implications dans la physiopathologie des maladies inflammatoires cutanées comme le psoriasis ou la dermatite de contact (Nestle et al. 2009).

4.2.2. Les lymphocytes T *gamma delta*

Les LT possédant un TCR $\gamma\delta$ ne représentent qu'un faible pourcentage des LT résidents de la peau humaine mais sont majoritaires dans la peau de souris (Sumaria et al. 2011). Ils présentent un phénotype mémoire CD69 $^+$ suggérant leur recrutement lors d'une primo-infection (Sumaria et al. 2011). De plus, malgré un répertoire TCR $\gamma\delta$ plus restreint que celui des LT $\alpha\beta$ conventionnels, les LT $\gamma\delta$ sont pré-activés pour devenir rapidement des cellules effectrices en réponse à la détection d'un stress au sein des tissus où ils résident (Bonneville et al. 2010). En condition inflammatoire, les LT $\gamma\delta$ sont une source importante d'IL-17 et ont par conséquent un rôle essentiel dans le psoriasis. Dans la peau de souris, il existe aussi une population de LT $\gamma\delta$ non retrouvée dans l'épiderme humain. Les DETC sont caractérisés par un TCR $V\gamma 3V\delta 1$ unique qui reconnaît un antigène de stress exprimé par les kératinocytes après une lésion (Jameson and Havran 2007). En l'absence des DETC, la proportion de kératinocytes apoptotiques augmente considérablement dans l'épiderme des souris TCR δ déficientes (Witherden and Havran 2013). Les DETC sont donc nécessaires à l'homéostasie épidermique. En réponse aux UV, il est décrit que les kératinocytes libèrent de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) reconnus par des récepteurs purigéniques exprimés à la surface des DETC (Suwanpradid et al. 2016). Une fois activés, les DETC secrètent de l'IL17 et favorisent ainsi la réponse antimicrobienne des kératinocytes, régulent leur migration, leur métabolisme cellulaire, le réarrangement du cytosquelette ainsi que la différenciation épidermique. Enfin, ils secrètent de grande quantité de facteurs de croissance impliqués dans la croissance cellulaire des kératinocytes comme les KGF 1 et 2 et l' « *Insulin Growth Factor* ». Par ces fonctions, les DETC ont également un rôle important dans la cicatrisation cutanée et dans le rétablissement de la barrière cutanée (Suwanpradid et al. 2016).

L'ensemble des acteurs cellulaires du système immunitaire cutané exercent donc des fonctions redondantes et complémentaires permettant à la fois la détection de dangers issus de l'environnement externe, le déclenchement d'une réponse inflammatoire efficiente

contre le danger détecté ainsi qu'une tolérance contre les antigènes du soi. Cette balance entre les mécanismes de défense et de tolérance immunitaire est essentielle à l'homéostasie cutanée. Un déséquilibre de cette dernière est à l'origine de nombreuses pathologies inflammatoires cutanées.

Chapitre 3. Le psoriasis et la dermatite atopique, principales pathologies inflammatoires cutanées

Malgré son rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cutanée, le système immunitaire peut être également mis en cause dans de nombreuses pathologies inflammatoires. Une réponse immunitaire excessive ou inappropriée, car dirigée contre des éléments du soi, peut en effet modifier la physiologie cutanée, activer les kératinocytes et conduire à une dermatose. Parmi les nombreuses pathologies inflammatoires cutanées observées chez l'homme, le psoriasis et la DA sont de loin les plus fréquentes. Bien que le pronostic vital de ces patients ne soit pas mis en jeu, l'aspect inesthétique des lésions cutanées peut avoir des répercussions psychologiques et sociales qui sont reconnues comme impactant la qualité de vie des patients (Feldman et al. 2005). La compréhension des mécanismes impliqués dans ces pathologies est un enjeu fondamental de la recherche en dermatologie. De fait, l'identification et la description fonctionnelle des acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la physiopathologie de ces dermatoses ont permis le développement de nouveaux outils thérapeutiques ayant fortement amélioré la qualité de vie des patients.

1. Epidémiologie

Depuis 2014, le psoriasis est reconnu par l'organisation mondiale de la santé comme une maladie chronique, non-contagieuse, douloureuse, inesthétique et invalidante. Dans la population caucasienne, le psoriasis affecte 2 à 4% de la population avec une prévalence très importante comparée à celles des populations asiatique et africaine. Par ailleurs, le psoriasis est une pathologie affectant plus fréquemment les adultes avec deux pics d'apparition ; l'un précoce autour de 20 ans, l'autre plus tardif autour de 50 ans (Perera et al. 2012).

Comparé au psoriasis, la DA (ou eczéma allergique) est une pathologie majoritairement infantile. Les études épidémiologiques montrent que dans les pays occidentaux, la

prévalence de la DA a augmenté durant les trente dernières années pour atteindre un plateau autour de 20 à 30% de cas chez les jeunes enfants. En parallèle, le nombre de cas initialement plus faible dans les pays émergents est aussi en augmentation et semble suivre l'industrialisation et la courbe de modernité de ces pays (Weidinger and Novak 2016). Malgré cette prévalence mondiale importante, une rémission de la DA avant l'âge de cinq ans est observée dans 70% des cas. L'incidence de la DA chez l'adulte serait de 10% et affecterait majoritairement des patients pour qui le phénotype cutané infantile était sévère (Weidinger and Novak 2016). La DA a longtemps été considérée comme une conséquence cutanée de l'atopie (ou allergie), une prédisposition héréditaire à privilégier les réactions d'hypersensibilité immédiate à IgE vis-à-vis d'antigènes alimentaires ou environnementaux communs. Toutefois, la description des mécanismes immunopathologiques ont montré que les IgE n'ont pas un rôle fondamental dans l'initiation de la DA mais en serait plutôt une conséquence. En outre, une forme intrinsèque ou non allergique caractérisée par des taux d'IgE normaux concerne 20% des patients et pourrait correspondre aux phases précoce de cette pathologie. Il est néanmoins reconnu que la peau lésée peut être le lieu de sensibilisation pour de nombreux allergènes et peut ainsi provoquer le développement d'allergie alimentaire ou respiratoire. De fait, un nourrisson sur trois, en particulier ceux atteints de DA sévère et précoce, développera plus tard un asthme allergique ou une rhinite allergique (Weidinger and Novak 2016). Ce phénomène est appelé marche atopique.

Dans la DA comme dans le psoriasis, de nombreuses comorbidités sont décrites et suggèrent le caractère systémique de l'inflammation. Parmi ces comorbidités, l'arthrite psoriasique est la plus fréquemment retrouvée dans le psoriasis (Di Meglio et al. 2014b). Elle affecte les tendons et les articulations et serait médiée par des mécanismes immunologiques similaires au psoriasis. D'après des données épidémiologiques, 20 à 30% des patients atteints de psoriasis développeront une arthrite psoriasique au cours de leur vie et 80% des patients atteints d'arthrite psoriasique ont un psoriasis cutané (Perera et al. 2012). Ces données montrent également que le psoriasis est associé à la maladie de Crohn et au syndrome métabolique. Enfin, il constitue un facteur de risque de la survenue de diabète de type II ou de maladies cardiovasculaires (Boehncke et al. 2011). Ces comorbidités, parfois qualifiées de marche psoriasique, pourraient être responsables de la diminution de l'espérance de vie (4 à 5 ans en moyenne) chez les patients atteints de psoriasis sévère. Plus

récemment, il a aussi été décrit que la DA augmente le risque de développer des maladies cardiovasculaires (Werfel et al. 2016). La fréquence des risques cardiovasculaires chez ces patients serait une conséquence de l'augmentation de taux circulants de cytokines proinflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α dont le rôle dans la formation de plaques d'athérosclérose a été décrit (Boehncke et al. 2011).

2. Caractérisation comparative du psoriasis et de la DA

2.1. Aspects cliniques du psoriasis et de la DA

Le psoriasis se caractérise par la présence de plaques érythémateuses épaisses recouvertes de squames brillantes se détachant facilement de la surface cutanée (Di Meglio et al. 2014b). Les plaques psoriasiques présentent des contours bien délimités les différenciant des lésions diffuses caractéristiques de la DA (Figure 15A, B) (Guttman-Yassky, 2011). Les plaques de psoriasis sont principalement localisées sur la tête, les coudes, les genoux, sont réparties de manière symétriques et ne dépassent pas la taille d'une paume de main dans les formes modérées de la pathologie (Figure 15D). Cette forme dite « vulgaire » se retrouve chez 80% des patients. Elle se distingue d'autres formes cliniques moins courantes comprenant le psoriasis inversé localisé dans le cuir chevelu et les zones humides de la peau, le psoriasis en goutte majoritairement retrouvé chez l'enfant et faisant généralement suite à une angine bactérienne, le psoriasis unguéal ainsi que des phénotypes rares mais potentiellement mortels de psoriasis pustuleux généralisés et érythrodermiques (Di Meglio et al. 2014).

La peau des patients atteints de DA est globalement caractérisée par une xérose cutanée et un prurit intense (Guttman-Yassky et al. 2011a). En phase aiguë, les lésions de DA s'identifient par la présence de plaques érythémateuses et vésiculeuses pouvant libérer un exsudat sérique et une excoriation après grattage (Figure 15B). Lorsque ces lésions deviennent chroniques, l'épiderme prend un aspect rosé, la peau s'épaissit et des sillons peuvent se former (lichenification). Pour cette pathologie, la localisation des plaques varie selon l'âge des patients. Ainsi, les lésions sont majoritairement localisées sur les joues et la tête chez le nourrisson tandis qu'elles affectent plutôt les plis de la peau chez le jeune enfant et l'adulte (Figure 15C). De surcroit, il est fréquent d'observer des surinfections bactériennes

à *Staphylococcus aureus* des peaux atopiques tandis que les infections cutanées sont rares pour les patients atteints de psoriasis.

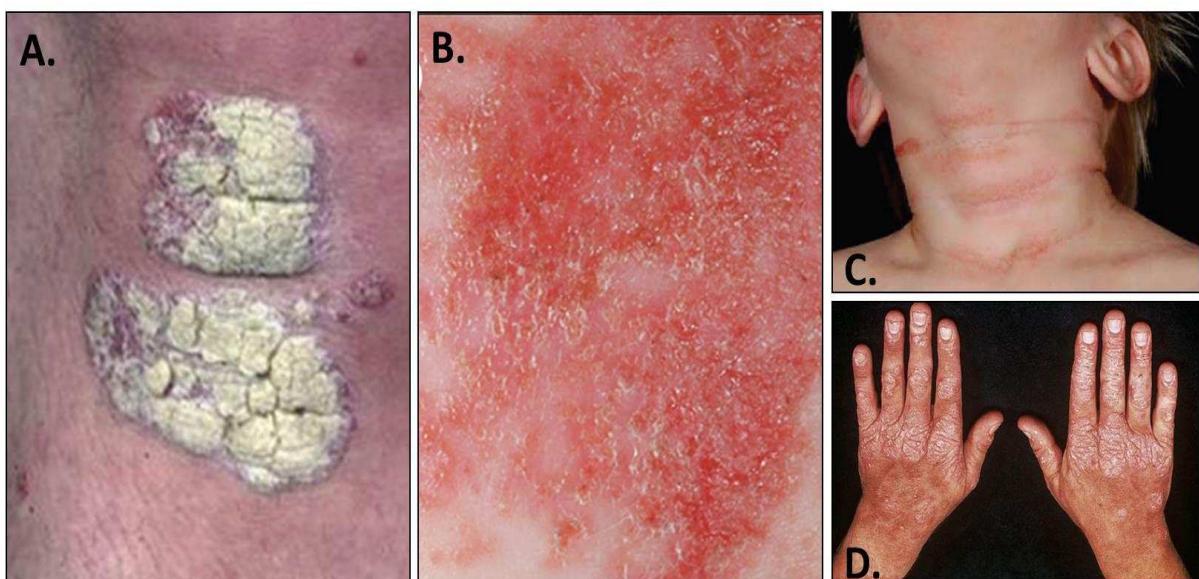


Figure 15. Aspects cliniques du psoriasis et de la dermatite atopique. (A) Aspect clinique d'une plaque de psoriasis. *Repris et modifié d'après* (McKee 2012). (B) Aspect clinique d'une lésion aiguë de DA. *Repris d'après* (Weidinger and Novak 2016). (C) Localisation des plaques au niveau de plis caractéristiques de la DA. *Repris d'après* (Weidinger and Novak 2016). (D) Aspect symétrique des lésions caractéristique du psoriasis. *Repris d'après* (McKee 2012).

La sévérité du psoriasis et de la DA peut être évaluée cliniquement à l'aide de score de sévérité. Pour le psoriasis, le score de sévérité le plus fréquent est le « *Psoriasis Area Severity Index* » (PASI) qui prend en compte l'érythème, l'épaisseur de la plaque, l'aspect squameux et la surface atteinte. Les psoriasis modérés à sévères recouvrent plus de 10% de la surface du corps et correspondent à un score PASI supérieure à 10 et pouvant aller jusqu'à 72. Le score de sévérité de la DA (« *Scoring atopic dermatitis* ») est une adaptation du PASI qui prend en compte la xérose cutanée, la surface de l'eczéma, l'érythème, le suintement, l'excoriation ainsi que la lichenification des plaques. Il s'étend jusqu'à 40 pour les formes légères et modérées et peut atteindre un score de 100 dans les formes les plus graves.

2.2. Aspects histologiques, cellulaires et moléculaires du psoriasis et de la DA

Les lésions de psoriasis et de DA sont caractérisées par un épiderme hyperplasique associé à une altération de la différenciation kératinocytaire. L'hyperplasie épidermique est

une conséquence de l'état hyperprolifératif des kératinocytes provoquant la formation de plusieurs strates de cellules en prolifération et un épaississement de la couche épineuse nommé acanthose (Figure 16). Dans le derme, une vasodilatation et un infiltrat immunitaire de DC (CD11c⁺) et de LT (CD3⁺) sont observés et sont responsables de l'aspect érythémateux de la peau (Figure 16). Ces critères histologiques communs à de nombreuses dermatoses inflammatoires ne sont pas suffisants pour faire la distinction entre le psoriasis et la DA. En revanche, il existe des caractéristiques histologiques, moléculaires et de polarisation cytokinique propre à ces dermatoses.

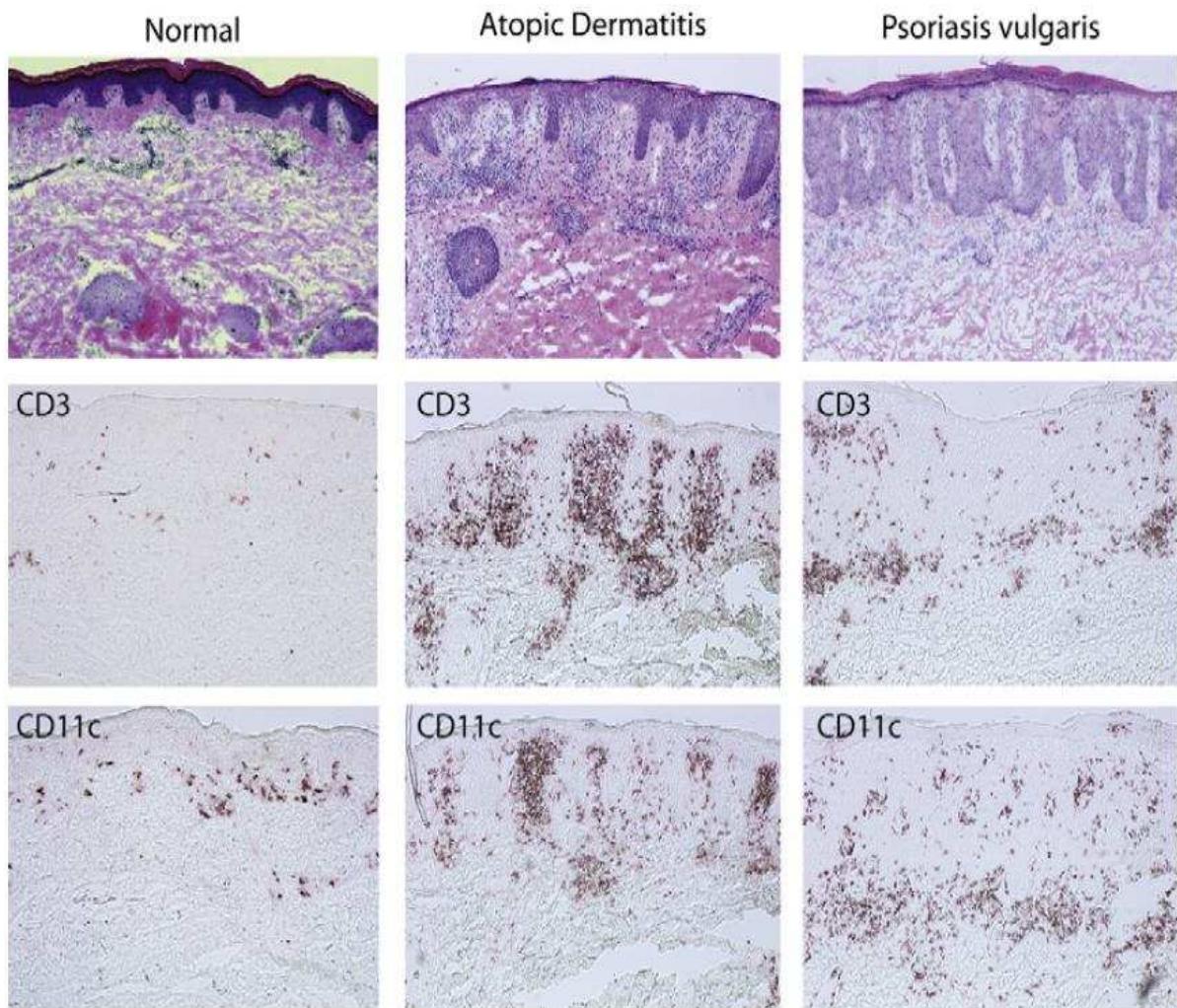


Figure 16: Histologie et immunohistochimie comparatives de la peau normale et de la peau lésée de patients atteints de dermatite atopique ou de psoriasis. Des coupes de peaux saines, atopiques ou psoriasiques sont colorées à l'Hématoxiline de Mayer/Eosine (panel en haut), ou marquées par un anticorps anti-CD3 révélant la présence de lymphocytes T (panel central), ou par un anticorps anti-CD11c révélant la présence de cellules dendritiques (panel en bas). *Repris et modifié d'après* (Guttmann-Yassky et al. 2011a).

2.2.1. Caractérisation des épidermes psoriasiques et atopiques

a. Différenciation épidermique

Le psoriasis est caractérisé par un renouvellement excessif de l'épiderme, effectué en moins de sept jours contre trois semaines dans une peau normale. Ce phénomène nommé « *régénérative maturation* » n'est normalement observé qu'après lésion de la peau, au cours de la cicatrisation (Bowcock and Krueger 2005). De fait, les kératinocytes migrant vers la couche cornée n'ont pas achevé leur processus de différenciation tandis que la prolifération incontrôlée de la couche basale entraîne un allongement des crêtes épidermiques dans le derme papillaire (papillomatose). En histologie, la différenciation incomplète de l'épiderme est identifiée par une couche granuleuse fine voire absente (hypogranulose) et par un épaississement de la couche cornée (hyperkératose) associé à la présence anormale de noyaux dans les cornéocytes (parakératose) (Perera et al. 2012). En immunohistochimie, l'altération de la différenciation épidermique est mise en évidence par la persistance de marqueurs de kératinocytes indifférenciés comme K14 ou les β intégrines dans la couche suprabasale, une expression précoce de la pro-filaggrine et de l'involucrine associée à une diminution de l'intensité du marquage de ces protéines dans la couche granuleuse. Des protéines épidermiques non classiques sont également exprimées en particulier les kératines 6, 16 et 17 ainsi que des protéines encodées par des gènes du complexe de différenciation épidermique comme les protéines S100 (S100A7, S100A8, S100A9, S100A12) et la LCE3 (Bowcock and Krueger 2005; Rabeony et al. 2014; Niehues et al. 2016).

Concernant la DA, l'épiderme des lésions aiguës présente un aspect vacuolisé (spongiose) pouvant induire la formation d'œdèmes intercellulaires par infiltration de liquide. Ces caractéristiques histologiques résultent de la destruction des jonctions adhérentes et des jonctions serrées exprimées par les kératinocytes. Lors de cette phase aigüe, l'hyperplasie épidermique est modérée et une partie des kératinocytes sont apoptotiques. En revanche, une activation soutenue de la réponse immunitaire innée favorise la chronicité des lésions cutanées qui se lichenifient. L'épiderme prend alors un aspect hyperplasique, acanthosique et peut aussi présenter une papillomatose. En plus d'une prolifération des kératinocytes, l'altération de la barrière cutanée est une caractéristique de la DA pouvant être mis en évidence par une hypogranulose et une orthokératose (Guttmann-Yassky et al. 2011a). L'orthokératose est une conséquence de

l'inhibition d'expression des protéines impliquées dans la formation de l'enveloppe cornée et d'une altération de la composition des lipides intercornéocytaires (Le Lamer et al. 2015).

Finalement, l'analyse transcriptomique comparative de peaux psoriasiques et atopiques met en évidence une diminution de l'expression de protéines de la différenciation et l'expression de K6, K16 et des protéines S100. Ceci suggère que certains mécanismes physiopathologiques sont communs entre le psoriasis et la DA. Néanmoins, l'inhibition des marqueurs de la différenciation semble être quantitativement plus importante dans la DA que dans le psoriasis (Guttman-Yassky et al. 2009).

b. Fonction immunitaire innée de l'épiderme

Outre les modifications de la structure épidermique, le psoriasis et la DA sont aussi caractérisés par une forte activation des fonctions immunes des kératinocytes. L'une des premières caractéristiques moléculaires identifiées dans ces dermatoses a été l'expression d'ICAM-1 par les kératinocytes (Singer et al. 1989). Exprimée en réponse à de nombreuses cytokines (IL-4, IFN- γ , TNF- α ...), cette protéine d'adhésion forme un complexe avec le « *lymphocyte function-associated antigen* » 1 présent à la surface des LT permettant ainsi leur ancrage aux kératinocytes (Albanesi and Pastore 2010). De plus, dans ces pathologies, les kératinocytes constituent un important réservoir de médiateurs de l'inflammation. Toutefois, les profils d'expression de chimiokines, de cytokines et de PAM exprimés par les kératinocytes sont différents dans le psoriasis et la DA (Guttman-Yassky et al. 2009; Quaranta et al. 2014; Inkeles et al. 2015). Dans le psoriasis, les kératinocytes produisent majoritairement des chimiokines et cytokines impliquées dans le recrutement et la polarisation Th17 et Th1. A l'inverse, en phase aiguë de la DA, les cytokines et chimiokines produites sont associées à une polarisation Th2. Les kératinocytes isolés à partir de lésions atopiques sont aussi caractérisés par une production de CCL27 plus importante que celle des kératinocytes psoriasiques, associée à une forte présence de LT mémoires dans le derme de ces lésions (Albanesi and Pastore 2010; Quaranta et al. 2014). Enfin, dans ces deux pathologies de nombreuses cytokines activent les DC et induisent le recrutement de monocytes circulants (Tableau 4). L'expression des PAM protégeant la peau des surinfections est très abondante dans le psoriasis. A l'inverse, la diversité et la quantité de PAM produits dans les lésions atopiques est faible et seraient liées à l'action inhibitrice des cytokines Th2 sur leurs production (Albanesi and Pastore 2010). L'ensemble des médiateurs

inflammatoires produits par les kératinocytes contribue à la communication avec les infiltrats immunitaires et est essentiel au maintien des lésions.

2.2.2. Caractérisation des infiltrats immunitaires psoriasiques et atopiques

Le psoriasis et la DA sont globalement caractérisés par une vasodilatation et un infiltrat immunitaire très riche. Parmi les cellules communément retrouvées dans ces pathologies inflammatoires, les LT et les DC occupent une part importante de l'infiltrat dermique (Figure 16). Une analyse plus approfondie des marqueurs exprimés par ces cellules montrent que leurs phénotypes et leurs profils cytokiniques sont bien distincts. Dans le psoriasis, les infiltrats lymphocytaires sont caractérisés par une polarisation Th1/Th17 tandis que les peaux atopiques présentent une polarisation Th2 durant la phase aigüe puis un profil Th1/Th2 durant la phase chronique de la pathologie (Guttman-Yassky et al. 2011b).

a. Les cellules dendritiques

Dans les lésions cutanées psoriasiques, la proportion de DC peut être jusqu'à trente fois supérieure au nombre de DC retrouvées dans une peau saine. La caractérisation phénotypique de ces cellules a permis d'identifier trois populations distinctes comprenant les pDC, les dDC classiques ainsi qu'une population de DC inflammatoire (iDC) (Zaba et al. 2009a). Ces dernières pourraient provenir de précurseurs monocytaires ou dendritiques circulants et seraient recrutées dans le derme au cours des phases inflammatoires aiguës (Zaba et al. 2009a). Les DC présentes dans le derme exercent diverses fonctions physiopathologiques au sein des lésions psoriasiques. Ainsi les pDC seraient impliquées dans les phases précoce de la pathologie, les dDC seraient majoritairement responsables de la présentation antigénique et de la polarisation Th1/Th17 (Chu et al. 2011) tandis que les iDC seraient immatures et non impliquées dans la présentation antigénique. En revanche, elles contribuent à la production de cytokines proinflammatoires et produisent en particulier de l'IL-23, de l'IL-20 et du TNF- α (Zaba et al. 2009a).

En comparaison avec le psoriasis, la DA se distingue par une altération du recrutement des pDC depuis la circulation, associée à la sensibilité aux infections virales observées chez ces patients (Novak and Bieber 2005). Cette pathologie est également caractérisée par la présence de LC dans le derme suggérant leurs états activés ainsi qu'une forte proportion d'iDC (Chu et al. 2011). Dans la DA, les LC seraient responsables de la polarisation Th2 alors

que les iDC pourraient contribuer au changement de polarisation vers l'axe Th1 observé durant la phase chronique de cette pathologie (Chu et al. 2011).

b. Les macrophages

Les lésions de psoriasis sont caractérisées par un infiltrat de macrophages massifs dans le derme papillaire à proximité de la JDE. De manière équivalente, des macrophages sont retrouvés dans le derme des lésions atopiques et plus particulièrement lors de phases chroniques. Cependant, leurs fonctions restent mal décrites. Les macrophages des lésions psoriasiques pourraient phagocytter les cellules immunitaires apoptotiques, tandis que cette fonction serait altérée dans la DA (Kasraie and Werfel 2013). Leur implication dans la physiopathologie serait liée à leur capacité à sécréter des cytokines particulières en complément de celles libérées par les LT (cf. section 2.2.3). Leur phénotype serait majoritairement de type M1 dans les lésions psoriasiques (Fuentes-Duculan et al. 2010) tandis que les peaux atopiques seraient caractérisées par un mélange de macrophages M1 et M2 (Kasraie and Werfel 2013). Dans des modèles murins de dermatite psoriasiforme, l'absence de macrophages résultent en une amélioration significative du phénotype (Stratis et al. 2006; Wang et al. 2006) suggérant que les macrophages pourraient être essentiels à la physiopathologie du psoriasis et probablement de la DA.

c. Les lymphocytes T

La présence de LT mémoires activés dans le derme et dans l'épiderme est une caractéristique des lésions chroniques du psoriasis et de la DA. L'analyse des profils cytokiniques des LT présents au sein des infiltrats dermiques et épidermiques démontrent que les lésions atopiques chroniques sont majoritairement caractérisées par une production de cytokine Th2 mais aussi Th22 et Th1, tandis que les peaux psoriasiques sont majoritairement associées à une polarisation Th17, Th22 et Th1 (Hijnen et al. 2013). De plus, les LTc majoritairement présents dans l'épiderme, sont en contact étroit avec les kératinocytes pouvant suggérer une activité cytotoxique par interaction FAS/FASL, ainsi qu'une possible présentation antigénique par les kératinocytes.

En plus des LT conventionnels, les LT γ δ sont retrouvés dans le derme des lésions psoriasiques où ils pourraient participer à la production de cytokines Th17 (Laggner et al. 2011). Enfin, il a été récemment décrit que les ILC sont également présentes dans le derme des lésions atopiques et psoriasiques et pourraient être rapidement recrutées depuis la

circulation durant les phases précoces de la pathologie. Les ILC3 sont associées au psoriasis et les ILC2 à la DA. La production de cytokines telles que l'IL-17 et l'IL-22 pour les ILC3 ou l'IL-5 et l'IL-13 pour les ILC2 pourrait aussi contribuer à la physiopathologie de ces dermatoses (Roediger et al. 2014; Villanova et al. 2014).

d. Les polynucléaires

L'épiderme psoriasique présente de nombreux PNN formant des micro-abcès de Munro-Sabouraud dans la couche cornée et des pustules spongiforme multiloculaire de Kogoj-Lapière dans la couche épineuse. A l'inverse, la DA est caractérisée par une absence de PNN qui pourrait favoriser les surinfections bactériennes décrites dans cette pathologie. Néanmoins, le derme des lésions atopiques est riche en mastocytes et en PNE dont la dégranulation est associée au prurit.

En résumé, les lésions de psoriasis et de DA présentent une altération de la fonction épidermique commune. Toutefois, les réponses immunitaires mises en jeu dans ces pathologies sont largement différentes, indiquant une étiologie distincte de ces dermatoses (Tableau 4).

	Psoriasis	Dermatite atopique
Caractéristiques cliniques	Erythème	Erythème
	Squames brillantes	Vésicules
	Epaississement de la peau	Epaississement de la peau (DA chronique)
	Contours lésions délimités	Contours des lésions mal délimités
		Prurit intense
Caractéristiques Histologiques	Parakératose	Orthokératose
	Hypogranulose	Hypogranulose
	Spongiose rare	Spongiose
	Papillomatose	Papillomatose (DA chronique)
	Vasodilatation et angiogenèse	Vasodilatation et fibrose dermique
Nature des infiltrats immunitaires	LTh1, Th17 CCR6 ⁺	LTh2 CCR4 ⁺ , CCR10 ⁺
	PNN épidermique, Mastocytes	PNE dermique, Mastocytes
	Macrophages	Macrophages
Caractéristiques moléculaires des kératinocytes	Forte expression K6, K16, K17	Forte expression de K6, K16
	Inhibition de K10, K1, LOR, Expression aberrante d'IVL, FLG dans la couche épineuse	Inhibition de K10, K1, LOR, IVL, FLG
	Inhibition des E-cadhérines, expression aberrante d'occludine dans la couche épineuse	Inhibition des E-cadhérines, DSG, Claudines 1
	Production de PAM importante: - S100A7, S100A8, S100A9 - BD 2,3 - cathélicidine LL-37	Faible production de PAM: S100A7, S100A8, S100A9
	Facteurs pro-angiogéniques (VEGF)	
	Recrutement de Monocytes via CCL5 / CCL2	Recrutement de Monocytes via CCL5 / CCL2
	Recrutement de PNN via CXCL8, CXCL1, CXCL3	Recrutement de PNE via CCL11, CCL26
	CXCL9, CXCL10, CCL20	CCL18, CCL22, CCL27
	Activation de la réponse immunitaire innée IL-1 α , IFN- β , IL-36, TNF- α	Activation de la réponse immunitaire innée GM-CSF, IL-18, IL-33, IL-25, TNF- α
	Polarisation cytokinique	Polarisation cytokinique Th17 : IL-6, IL-23, IL-1 β
		Polarisation cytokinique Th2 : TSLP, IL-4/5/13

Tableau 4 : Comparaison du psoriasis et de la dermatite atopique. Tableau résumant les caractéristiques histologiques, immunitaires et moléculaires du psoriasis et de la DA. K : kératine, PAM : peptides antimicrobiens, LTh : lymphocytes T helper, PNN : polynucléaires neutrophile, PNE : polynucléaire éosinophile, IVL: involucrine, FLG : filaggrine, LOR : loricrine

3. Physiopathologie du psoriasis

Le psoriasis était initialement considéré comme une maladie restreinte aux kératinocytes dont certaines anomalies intrinsèques pouvaient être à l'origine de leurs états hyperprolifératifs (Harden et al. 2015b). Dans les années 90, la découverte de l'efficacité des traitements immunsupresseurs dans le blanchiment des lésions a conduit les scientifiques à s'intéresser au rôle des LT et à considérer le caractère auto-immun du psoriasis. Depuis, le débat sur un défaut primaire des kératinocytes ou des LT a fait l'objet de nombreuses revues scientifiques (Nickoloff et al. 2000; McKenzie and Sabin 2003; Nickoloff 2006; Ye et al. 2014). Il est aujourd'hui considéré que l'initiation du psoriasis résulte d'une activation aberrante de la réponse immunitaire innée, en particulier des kératinocytes, en réponse à des éléments environnementaux.

3.1. *Etiologie du psoriasis*

3.1.1. Défaut intrinsèque des kératinocytes

Les lésions de psoriasis se développent majoritairement sur des zones exposées aux traumatismes physiques comme les coudes ou les genoux et peuvent être initiées par des facteurs externes incluant les interventions chirurgicales (phénomène de Koebner), des infections (en particulier à Streptocoques chez l'enfant) et des traitements médicamenteux (Di Meglio et al. 2014b). Dans une peau saine, la réponse inflammatoire déclenchée par ces signaux de danger est rapidement résolue tandis qu'elle est maintenue dans les lésions psoriasiques. De fait, il est suggéré que les kératinocytes des peaux psoriasiques soient plus sensibles que les kératinocytes normaux à ces stimuli (McKenzie and Sabin 2003; Nicolas 2014). En support de cette hypothèse, il a été décrit que les kératinocytes de peaux asymptomatiques de sujets psoriasiques présentent des défauts des voies de signalisation mobilisées par l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-1 (McKenzie and Sabin 2003). Cette signalisation anormale entraîne une réponse de ré-épithérialisation exagérée ainsi qu'une résistance des kératinocytes à l'apoptose (McKenzie and Sabin 2003). La preuve de concept qu'une activation aberrante de voies de signalisation peut initier une inflammation cutanée a aussi été apportée par les modèles murins de souris transgéniques. Ainsi, l'activation constitutive du NF- κ B pour les souris $I\kappa B\alpha^{\Delta/\Delta}$ (Rebholz et al. 2007), de STAT-3 pour les souris K5 STAT3C

(Sano et al. 2005), de la voie des « *Mitogen Associated Protein Kinase* » (MAPK) pour les souris InvEE (Hobbs et al. 2004) et InvORAS^{V12G} (Gunderson et al. 2013) conduisent spontanément au développement de lésions cutanées mimant un phénotype psoriasique. Inversement, des défauts d'induction de AP-1 pour les souris K5-Cre *JunB/c-Jun* (Zenz et al. 2005) ou de NF-κB pour les souris K14-Cre/Ikk2^{FL/FL} (Pasparakis et al. 2002) et *Traf2*^{-/-} (Etemadi et al. 2015) entraînent aussi la formation de lésions cutanées inflammatoires. De manière intéressante, le phénotype inflammatoire cutané des souris K5-Cre *JunB/c-Jun* est associé à une atteinte articulaire pouvant mimer une arthrite psoriasique suggérant qu'une altération de la voie de signalisation de NF-κB est également associée aux comorbidités du psoriasis. En accord avec ce modèle, de nombreux polymorphismes ont été décrits pour des gènes codant des protéines de la voie de signalisation du NF-κB (Roberson and Bowcock 2010). Pour exemple, deux gènes *CARD14* et *IL-36RN*, dont les séquences sont mutées chez certains patients, ont été fonctionnellement associés à une activation constitutive de NF-κB (Onoufriadi et al. 2011; Jordan et al. 2012). L'activation de NF-κB conduisant à la production de médiateurs de l'inflammation, ces mutations pourraient être à l'origine d'une production aberrante de cytokines proinflammatoires par les kératinocytes mais aussi par de nombreuses cellules de l'immunité innée présente dans le derme. La description de nombreux polymorphismes de gènes impliqués dans l'immunité innée et exprimés par les kératinocytes tels que *CARD14*, *TNIP1*, *TNFAIP3* ou *IL36RN* a ainsi donné une nouvelle dimension à l'hypothèse de défaut intrinsèque des kératinocytes (Harden et al. 2015).

Une étude très récente a apporté la preuve de concept qu'en réponse à un stimulus exogène, les cellules non hématopoïétiques telles que les kératinocytes peuvent être à l'origine de l'initiation de la pathologie. *TNIP1* est un inhibiteur de la voie de signalisation du NF-κB dont les polymorphismes sont décrits dans le psoriasis. Ippagunta et coll. ont soumis des souris exprimant une mutation de *TNIP1* spécifiquement par les kératinocytes à un agoniste synthétique du TLR7 (Imiquimod, IMQ) décrit pour induire ou aggraver le psoriasis chez l'homme (cf section 5) et ont montré que ces souris développaient une dermatite psoriasiforme présentant de nombreux aspects communs avec le psoriasis (Ippagunta et al. 2016). Ainsi sous l'influence de stimuli externes détectés par les kératinocytes, certains polymorphismes génétiques pourraient induire l'activation aberrante de la réponse immunitaire et ainsi favoriser l'initiation du psoriasis. Parmi les facteurs environnementaux

associés au psoriasis, le stress, le tabac, l'obésité et l'alcool peuvent aussi générer un environnement proinflammatoire et pourraient ainsi favoriser l'activation d'une réponse immunitaire innée aberrante. Le maintien et la chronicité de cette pathologie semblent toutefois impliquer l'activation de LT par des antigènes.

3.1.2. Présentation antigénique et rupture de la tolérance au soi

L'analyse phénotypique des LT présents dans le sang et la peau des patient atteints de psoriasis a permis de montrer que les LT de patients psoriasiques sont oligoclonaux et majoritairement caractérisés par des réarrangements communs de la chaîne V β suggérant la reconnaissance d'antigènes particuliers, et ainsi le caractère auto-immun du psoriasis (Chang et al. 1997; Bour et al. 1999; Vollmer et al. 2001). Toutefois, la découverte d'auto-antigènes a longtemps fait défaut et a remis en cause le concept d'auto-immunité. Une des hypothèses suggérées est que les angines à streptocoques peuvent induire un psoriasis cutané. Ce concept propose que la protéine M du streptocoque puisse être à l'origine d'une expansion clonale de LT spécifiques qui, en migrant dans la peau, pourraient ensuite reconnaître des autoantigènes issus de K6, K16 et K17 par mimétisme moléculaire (Valdimarsson et al. 2009). De surcroit, il a été prédit que les peptides reconnus par mimétisme moléculaire puissent être présentés par l'HLA-Cw6 dont le gène fut l'un des premiers facteurs de susceptibilité décrit pour être associé au psoriasis. Bien que pertinent, ce concept est toutefois restreint aux facteurs déclenchant infectieux observés majoritairement dans le psoriasis en goutte.

Au regard des travaux réalisés sur la physiopathologie des maladies auto-immunes, il est manifeste que la rupture de la tolérance au soi et l'activation de LT autoréactifs peut être initiée par de nombreux mécanismes ou défaut génétique incluant la présentation d'antigène cryptique, la présentation d'antigène non classique ainsi qu'un déficit des fonctions tolérogéniques des LT régulateurs. En 2014 et 2015, deux auto-antigènes ont pour la première fois été décrits dans le psoriasis et ont finalement confirmé le caractère auto-immun de cette pathologie (Lande et al. 2014; Arakawa et al. 2015). Lande et coll. ont montré que 46 % des LT CD3 $^{+}$ circulants de patients atteints de psoriasis prolifèrent en réponse au peptide antimicrobien LL-37 fortement exprimé par les kératinocytes et les PNN (Lande et al. 2014). Une seconde équipe a isolé un clone de LT CD8 $^{+}$ dirigé contre un peptide dérivé de la protéine ADAMTSL5 spécifiquement exprimée par les mélanocytes et présenté

par le HLA-Cw6 (Arakawa et al. 2015). Dans cette étude, il a été montré que 61,9% des LT CD8⁺ testés répondent à l'ADAMTSL5 par la production d'IFN-γ et d'IL-17. Enfin, une étude très récente a montré qu'une proportion de LT mémoires circulants issus de patients psoriasiques répondaient fortement à la présentation antigénique non classique *via* le CD1a par la production d'IL-17 et d'IL-22 (Kim et al. 2016b). Dans la peau, le CD1a étant majoritairement exprimé par les LC, il est suggéré que la présentation de lipides exogènes ou endogènes *via* CD1a contribue au phénotype psoriasique en induisant la sécrétion d'IL-22 et d'IL-17 par les LT αβ CD1a-autoréactifs.

Ces études confirment le caractère auto-immun du psoriasis et démontrent que de nombreux antigènes classiques ou non classiques peuvent induire l'activation de LT autoréactifs. De plus, elles suggèrent que les cytokines produites par les LT autoréactifs plus que la spécificité des antigènes contre lesquels ils sont dirigés sont fondamentales dans le psoriasis. En 2013, une équipe a d'ailleurs artificiellement reproduit un phénotype psoriasique dans un modèle de souris immunodéficientes par transfert adoptif de LTh17 exprimant un TCR spécifique de DSG3. Pour ce faire, ces auteurs ont préalablement polarisé ces LT DSG3-autoréactifs en LTh17 et ont ainsi montré que la polarisation Th17 est responsable du phénotype tandis qu'une polarisation Th1 ne permet pas de mimer un phénotype psoriasique dans ce modèle (Nishimoto et al. 2013).

3.2. Modèle physiopathologique du psoriasis

3.2.1. Phase d'initiation

Sous l'action d'un stimulus exogène, les kératinocytes lésés libèrent de l'ADN ou de l'ARN ainsi que des cytokines dans le milieu extracellulaire. Dans un contexte non pathologique, les fragments d'ADN ou d'ARN relargués par les kératinocytes à la suite de dommages ou d'un stress sont rapidement dégradés par des nucléases. Dans le psoriasis, il est décrit que la cathélicidine LL37 produite en grande quantité par les kératinocytes activés, protègent les acides nucléiques endogènes de la dégradation en formant un complexe ARN ou ADN-LL37. Ces complexes sont ensuite reconnus par les TLR7 et 9 exprimés par les pDC et le TLR8 des DC myéloïdes induisant leurs maturations (Lande et al. 2007; Ganguly et al. 2009). Les cytokines produites par les kératinocytes activés ainsi que les cellules immunitaires dermiques peuvent également favoriser l'activation des DC (Figure 17).

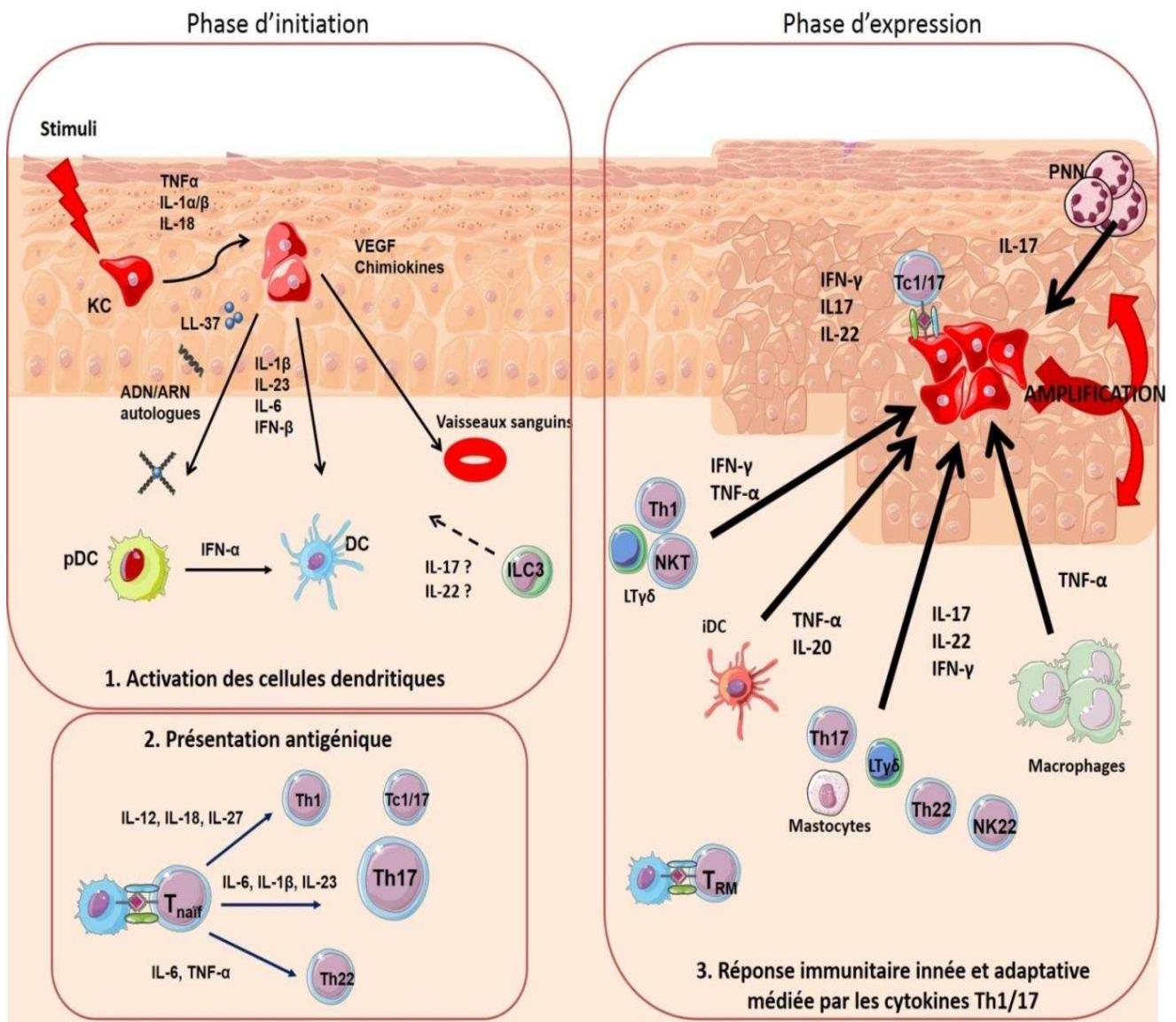


Figure 17 : Physiopathologie du psoriasis. KC: kératinocytes, pDC: cellules dendritiques plasmacytoides, DC: cellules dendritiques, ILC: cellules lymphoïdes innées, T_{naïf}: lymphocytes T naïf, Th : lymphocytes T effecteurs, Tc : lymphocytes T cytotoxiques, NKT : lymphocytes *natural killer*, iDC : cellules dendritiques inflammatoires, PNN : polynucléaires neutrophiles

Parmi les cytokines impliquées dans les phases précoces du psoriasis sont retrouvés des IFN de type I. Le rôle des IFN de type I a été suggéré par le fait que le traitement d'infection virale par l'IFN- α et l'IFN- β peut exacerber ou induire une rechute du psoriasis (Grine et al. 2015b). Ces IFN de type I seraient impliqués dans l'initiation du psoriasis en activant le processus de maturation des mDC. L'IFN- α est majoritairement sécrété par les pDC tandis que l'IFN- β peut être produit par les kératinocytes en réponse à l'activation de PRR (RIG5 et MDA5) par des acides nucléiques cytosoliques (Zhang et al. 2016). Dans un modèle de souris xenogreffée avec de la peau de patients psoriasiques, le blocage de l'IFN- α prévient le

recrutement des LT démontrant son rôle essentiel durant la phase d'initiation du psoriasis (Nestle et al. 2005). A l'inverse, l'utilisation d'anticorps ciblant ces cytokines n'a pas montré d'effet sur le traitement du psoriasis lors d'un essai clinique de phase I (Grine et al. 2015b). Les interférons de type I sont donc essentiels à l'initiation mais pas au maintien du psoriasis.

D'autres cytokines produites par les kératinocytes en réponse à l'activation des PRR ou par les macrophages résidents cutanés pourraient participer à l'initiation d'une inflammation cutanée. Parmi celles-ci, l'IL-1 α et le TNF- α sont décrits pour activer les DC et pourraient être rapidement secrétés lors des phases d'initiation du psoriasis en réponse aux stimuli externes (cf chapitre 2). Néanmoins, le TNF- α est aussi décrit pour altérer les fonctions de migration des DC, en particulier des LC (Stoitzner et al. 1999). Cette cytokine étant fortement surexprimée dans le psoriasis, elle pourrait être responsable de l'altération des propriétés de migration de LC caractérisant le psoriasis. En parallèle, les cytokines rapidement produites par les cellules immunitaires innées favoriseraient l'activation des kératinocytes et ainsi induiraient la libération de chimiokines impliquées dans le recrutement de PNN, de cellules lymphoïdes innée (LT $\gamma\delta$; ILC) et de monocytes circulants et de facteurs pro-angiogéniques favorisant la néo-angiogenèse (Figure 17).

3.2.2. Phase de polarisation cytokinique

Une fois matures, les dDC sont responsables de la présentation antigénique aux LT naïfs. Cette présentation peut avoir lieu dans la peau et activer les LT_{RM} ou dans les ganglions lymphatiques drainants et induire la polarisation de LT naïfs. Pour cela, les DC secrètent de l'IL-12 ou de l'IL-23 dont le rôle est essentiel dans la polarisation des LTh1 et des LTh17, respectivement (Figure 17). L'IL-12 et l'IL-23 sont des cytokines hétérodimériques composées de deux sous-unités IL-12p35 et IL-23p19 et d'une sous-unité p40 commune ayant été décrites pour leurs rôles dans les pathologies inflammatoires chroniques (Teng et al. 2015). L'IL-12p40-p35 active se fixe à un récepteur composé des sous-unités IL-12R β 1 et IL-12R β 2 et induit majoritairement la phosphorylation de STAT4 mais aussi de STAT1, STAT3 et STAT5. L'IL-23 active majoritairement STAT3 via son récepteur composé d'une chaîne spécifique IL-23R et de la chaîne IL-12R β 1. Dans le psoriasis, l'expression des chaînes IL-23p19 et IL12/23p40 est fortement augmentée en comparaison à la peau asymptomatique tandis que l'expression d'IL12-p35 est plutôt diminuée (Lee et al. 2004). Par

immunohistochimie de peaux psoriasiques, la forme active de l'IL-12 a cependant été décrite et serait exprimée par les dDC et les macrophages dans le derme papillaire mais aussi par les LC dans l'épiderme (Yawalkar et al. 2009). L'IL-23 est produite par les dDC, les iDC (Boltjes and van Wijk 2014) mais aussi par les macrophages résidents et les kératinocytes (Piskin et al. 2006; Fuentes-Duculan et al. 2010). L'implication de ces cytokines dans le psoriasis a été suggérée par le fait que l'injection intradermique de ces cytokines dans les oreilles de souris induit une acanthose et une inflammation caractérisée par la présence de LT producteurs d'IFN- γ pour l'IL-12 et de LTh17 produisant à la fois de l'IL-17 et de l'IL-22 pour l'IL-23 (Zheng et al. 2007). L'acanthose induite par l'IL-12 est toutefois plus modérée que celle produite en réponse à l'IL-23. En effet, cette dernière permet d'induire une acanthose associée à une hyperplasie épidermique, des micro-abcès composés de PNN dans la couche cornée et une inflammation caractérisée par un infiltrat de macrophages (F4/80 $^{+}$) et de LT CD4 $^{+}$ dermiques mimant de nombreux aspects du psoriasis (Chan et al. 2006). L'implication de l'IL-23 dans cette pathologie a ensuite été confirmée dans de nombreux modèles murins (van der Fits et al. 2009; Tonel et al. 2010; Nakajima et al. 2011). L'injection d'anticorps bloquants anti-IL-23 ou l'utilisation de souris IL-23KO montrent une forte diminution de l'expression d'IL-17 accompagnant une amélioration significative du phénotype cutané dans ces modèles. Au regard du rôle majeur de l'IL-23 dans l'initiation du psoriasis, l'Ustekinumab, un anticorps bloquant dirigé contre la sous-unité p40 commune à l'IL-12 et l'IL-23 a reçu l'autorisation de mise sur le marché en 2009 pour la France et a montré une grande efficacité dans le traitement des formes modérées à sévères de psoriasis mais aussi dans le traitement du rhumatisme associé. De plus des anticorps dirigés contre la sous-unité p19 sont actuellement en phase III d'essai clinique (Tildrakizumab et Guselkumab). Par son action inductive de la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22, l'IL-23 s'avère être une cytokine « clé » du psoriasis.

3.2.3. Phase d'expression du psoriasis et activités des cytokines sur les kératinocytes.

Une fois activés par les DC, les LT sont recrutés au sein de la peau par les chimiokines CXCL9/10 pour les LTh1 et par CCL20 pour les LTh17 majoritairement produits par les kératinocytes (Figure 17). Une fois dans la peau, la production de cytokines par ces lymphocytes T coordonnent la réponse inflammatoire en instruisant la libération de

cytokines, chimiokines, facteurs pro-angiogéniques et médiateurs lipidiques par les cellules présentes dans la peau. En retour, ces cellules permettent le maintien de l'activation des LT et forment ainsi une boucle d'amplification auto-inflammatoire. Parmi les cellules présentes dans la peau pouvant contribuer au maintien des lésions, les kératinocytes inflammatoires pourraient présenter des antigènes aux LT et maintenir l'activation des cellules immunitaires par la libération d'endo-antigènes et la production de médiateurs de l'inflammation. Le caractère inflammatoire des kératinocytes est orchestré par les cytokines présentes dans le microenvironnement. Ainsi une boucle d'amplification auto-inflammatoire médiée par les cytokines se crée et favorise l'apparition des lésions cutanées.

a. L'IL-1 α et β

Historiquement, l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1RA ont été les premières cytokines de cette famille décrites pour leur rôle dans le psoriasis. Leur synthèse par les kératinocytes peut être induite par de nombreux signaux activateurs (*cf* chapitre 2) ainsi que par des cytokines comme l'IL-17 et le TNF- α . L'IL-1 β est aussi produite par les macrophages en réponse aux acides gras chez des souris obèses et pourrait constituer une voie d'activation majeure de l'initiation de l'inflammation cutanée observée chez ces souris (Zhang et al. 2015). Ces cytokines se fixent au récepteur IL-1R1 exprimé par les kératinocytes et recrutent une sous-unité ubiquitaire IL1-R Accessory Protein (IL-1R1AcP). La dimérisation du récepteur induit l'activation des MAPK ainsi que la translocation nucléaire NF- κ B pour l'IL-1 α / β alors que l'IL-1RA est une cytokine antagoniste n'induisant pas de signal intracellulaire. Le LITEC a décrit que l'action de l'IL-1 α et de l'IL-1 β sur les kératinocytes est redondante. Elle induit notamment la production de PAM (BD-2, S100A7) ainsi que de chimiokines comme CCL5 et CXCL8 (Guilloteau et al. 2010). Le rôle de l'IL-1 dans le psoriasis a aussi été mis en évidence dans des modèles murins où une déficience en IL-1RA induit une inflammation cutanée psoriasiforme (Shepherd et al. 2004), ainsi que dans le modèle d'inflammation induit par application d'IMQ où les souris IL1-R1KO sont fortement protégées (Rabeony et al. 2015). L'Anakinra est un antagoniste de l'IL-1R utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ayant montré une efficacité dans les formes pustuleuses du psoriasis. Ce dernier pourrait être utilisé comme une alternative possible dans le traitement du psoriasis résistant aux thérapies classiques (Pazyar et al. 2012). Néanmoins, aucune étude clinique ne décrit l'efficacité de ce traitement pour le psoriasis vulgaire.

b. L'interféron- γ

L'expression d'IFN- γ est augmentée dans la peau comme dans le sang des patients atteints de psoriasis. Cette cytokine est produite par les LT CD4 $^+$, CD8 $^+$ ainsi que par les NKT. L'effet antiprolifératif et pro-apoptotique de l'IFN- γ sur les kératinocytes normaux semblent absent sur les kératinocytes de sujets psoriasiques (Baker et al. 1988). Ces effets seraient associés à une diminution de l'activation de STAT-1 et de l'*« Interferon Regulating Factor-1 »*, deux protéines de la voie de signalisation induite par l'IFN- γ (Jackson et al. 1999). Malgré ces défauts, les kératinocytes restent sensibles à l'IFN- γ et l'injection de cette cytokine dans la peau saine ou dans une peau asymptomatique de patients psoriasiques induit l'expression d'HLA-DR, de chimiokines impliquées dans le recrutement des LTh1 (CXCL9, CXCL10) ainsi que l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM) (Johnson-Huang et al. 2012). En outre, l'IFN- γ peut favoriser la polarisation et le recrutement des Th17 en augmentant l'expression d'IL-1, d'IL-23 et de CCL20 par les dDC (Kryczek et al. 2008).

c. Le Tumor Necrosis Factor α

L'expression protéique du TNF- α est fortement augmentée dans les lésions ainsi que dans le sérum de patients atteints de psoriasis (Schottelius et al. 2004). Le TNF- α est une cytokine homotrimérique, multifonctionnelle, de la superfamille des TNF, impliquée dans la réponse immunitaire innée ainsi que dans l'induction de l'apoptose (Banno et al. 2004). Il est exprimé sous la forme d'une protéine transmembranaire biologiquement active et peut être solubilisé par clivage enzymatique (Schottelius et al. 2004). Dans la peau, les activités du TNF- α sont majoritairement médiées par le récepteur TNFR1 (p55). La fixation du TNF- α à ce récepteur induit une cascade de signalisation complexe activant NF- κ B ainsi qu'AP-1 et « CCAAT *enhancer-binding protein 6* » (C-EBP). Le TNF- α peut être produit par l'ensemble des cellules immunitaires cutanées et plus particulièrement par les LTh1 et les macrophages (Rozieres et al. 2006). L'analyse transcriptomique des gènes modulés par le TNF- α sur les kératinocytes humains *in vitro* a permis de décrire les fonctions de cette cytokine dans la production de médiateurs de l'inflammation mais aussi dans la mobilité cellulaire, le remodelage de la MEC, dans le contrôle du cycle cellulaire et la régulation de gènes pro-apoptotiques (Banno et al. 2004). Le TNF- α est aussi impliqué dans l'inhibition de la différenciation (Rabeony et al. 2014) mais n'est pas directement actif sur la prolifération des kératinocytes. En revanche, il induit l'expression de cytokines et de facteurs de croissance qui eux, peuvent induire la prolifération des kératinocytes par action autocrine (IL-6, IL-24,

KGF) (Banno et al. 2004; Kumari et al. 2013). Enfin, son rôle essentiel dans le psoriasis a été confirmé par l'efficacité des biothérapies utilisant des anticorps bloquants anti-TNF- α (Infliximab, Adalimumab) ou des récepteurs antagonistes solubles (Etanercept) dans le traitement du psoriasis (Perera et al. 2012).

d. L'interleukine 17

L'IL-17 est la cytokine clé, responsable du phénotype psoriasique. Dans les lésions actives, cette cytokine est produite par de nombreux types cellulaires et contrairement à ce qui a été longtemps suggéré, pas majoritairement par les LT CD4 conventionnels. En effet, L'IL-17 est aussi secrétée par les LT $\gamma\delta$, les ILC3, les PNN et les mastocytes (Lynde et al. 2014). Néanmoins, la production d'IL-17 par les LTh17 est essentielle à la physiopathologie du psoriasis. Cheung et coll. ont en particulier décrit qu'après blanchiment des lésions, une population de LT mémoires CD8 $^{+}$ est maintenue dans la peau, une fois activée *in vitro*, ces cellules ont été décrites pour produire de l'IL-17 (Cheuk et al. 2014). Ces cellules formeraient ainsi une « mémoire pathologique » dans les lésions blanchies et seraient à l'origine des rechutes (Clark 2015). De plus, la production d'IL-17 est favorisée par de nombreuses cytokines présentes dans le psoriasis comme le TGF- β , l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-21.

Parmi les cinq isoformes de l'IL-17 décrites (A à F), l'IL-17A, l'IL-17F ainsi que l'IL-17C sont surexprimées dans les lésions psoriasiques (Johansen et al. 2009). Les kératinocytes sont les cellules cibles de ces cytokines pour lesquelles ils expriment constitutivement les sous-unités réceptrices IL-17RA, IL-17RC et IL-17RE. La fixation des IL-17A et F à leurs récepteurs active le NF- κ B, la voie des MAPK et C-EBP (Shen and Gaffen 2008) et induit la production de PAM (BD2, BD3, LL-37, S100A7, S100A8 et S100A9) ainsi que de chimiokines (CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 et CXCL8) par les kératinocytes humains en culture (Guilloteau et al. 2010). Le LITEC a notamment participé à la description phénotypique des LTh17 dans les lésions psoriasiques et a décrit leur rôle prépondérant dans la production de PAM, par comparaison aux LTh1 et LTh2, sur les kératinocytes humains en culture (Wilson et al. 2007). La production de ces médiateurs de l'inflammation est ensuite responsable de l'amplification et du maintien des lésions. Parmi toutes les chimiokines exprimées par les kératinocytes en réponse à l'IL-17A, la chimiokine CCL20 est impliquée dans le recrutement de cellules lymphoïdes productrices d'IL-17 et semble essentielle au maintien des lésions psoriasiques (Mabuchi et al. 2013). Les activités de l'IL-17A et de l'IL-17F sur les kératinocytes sont très

redondantes (Guilloteau et al. 2010), ces cytokines sont majoritairement produites par les leucocytes tandis que l'IL-17C est une isoforme produite par le kératinocyte en réponse à d'autres cytokines proinflammatoires comme le TNF- α . Son action autocrine sur les kératinocytes est redondante avec l'IL-17A et F et contribue à l'amplification de la réponse inflammatoire (Ramirez-Carrozzi et al. 2011). Très récemment, deux anticorps ciblant l'IL-17, Secukinumab et Ixekizumab ont été approuvés dans le traitement du psoriasis. Durant les phases d'essais cliniques, ces traitements ont permis de réduire le score PASI de 75% pour plus de 80% des patients confirmant ainsi le rôle essentiel de l'IL-17 dans cette pathologie.

e. L'interleukine-22

L'IL-22 est co-secrétée par les cellules productrices d'IL-17F et d'IL17A chez la souris, mais peut aussi être produite par une population LTh22 récemment identifiée chez l'homme. Les LTh22/LTc22 sont présents dans le sang de patients atteints de psoriasis et de DA et secrètent de l'IL-22, du TNF- α et de l'IL-13 (Eyerich et al. 2009; Trifari et al. 2009). L'IL-22 est une cytokine de la famille de l'IL-10 fortement impliquée dans l'immunité des muqueuses et la défense contre les microorganismes. Les activités de cette cytokine sont induites par sa fixation à son récepteur formée des sous-unités IL-10R β (commune au récepteur de l'IL-10) et de la sous-unité IL-22R (commune à l'IL-20 et l'IL-24) et activent majoritairement la phosphorylation de STAT-3 (Boniface et al. 2005a; Boniface et al. 2007b). De fait, la sous-unité IL-22R du récepteur de l'IL-22 est exprimée par de nombreuses cellules épithéliales tandis qu'elle n'est pas exprimée par les cellules immunitaires (Rutz et al. 2014). L'IL-22 est produite par les LTh22 (Nograles et al. 2009), mais aussi par les LTh17, les LTc17 (Hijnen et al. 2013), les LT γ δ (Laggner et al. 2011), les ILC3 (Villanova et al. 2014) et les mastocytes (Mashiko et al. 2015). Cette cytokine est impliquée dans l'expression de molécules proinflammatoires comme S100A7, S100A8 et S100A9 ainsi que dans l'expression de métalloprotéinases responsables du remodelage tissulaire. L'activité de l'IL-22 sur le remodelage tissulaire pourrait être associée à une induction de la migration de kératinocytes primaires humains *in vitro* (Boniface et al. 2005a). De surcroit, l'IL-22 inhibe l'expression de gènes impliqués dans la différenciation épidermique comme l'involucrine et la loricrine et induit une hyperplasie épidermique dans un modèle d'épiderme reconstruit humain (« *Reconstituted Human Epidermis* » RHE) (Boniface et al. 2005a). Les gènes modulés par l'IL-22 sont aussi modifiés dans le psoriasis suggérant le rôle majeur de cette cytokine dans la

physiopathologie du psoriasis (Boniface et al. 2007b). Dans la peau psoriasique, l'IL-22 serait produite en aval de l'IL-23 et serait majoritairement responsable de l'hyperplasie épidermique et de l'inhibition de la différenciation *via* la phosphorylation de STAT-3. Ainsi, les souris IL-22KO présentent une réduction de l'inflammation cutanée dans deux modèles murins de psoriasis (Zheng et al. 2007; Van Belle et al. 2012).

Plus récemment, il a aussi été décrit que la sous famille de l'IL-20 présente des activités redondantes à celles de l'IL-22 et est capable d'induire la phosphorylation de STAT-3. L'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 seraient actives sur les kératinocytes et pourraient participer à l'inhibition de la différenciation. Le LITEC a en particulier décrit que l'IL-20 et l'IL-24 présentent des activités redondantes à l'IL-22 sur la sécrétion de PAM et sur l'inhibition d'expression de K10 pour l'IL-24 (Boniface et al. 2005b). Ces résultats ont ensuite été confirmés dans un modèle *in vitro* de RHE dans lequel l'IL-22 et l'IL-24 induisent une hyperplasie et une altération de la différenciation épidermique (Sa et al. 2007). Ces cytokines sont produites par de nombreuses cellules immunitaires en particulier par les iDC pour l'IL-20, par les macrophages mais aussi par les kératinocytes en réponse au TNF- α pour l'IL-24 (Boniface et al. 2005b; Kumari et al. 2013).

3.2.4. Effet synergique des cytokines

Les cytokines exprimées par les cellules composant l'infiltrat dermique possèdent donc des activités proinflammatoires sur les kératinocytes. L'activité de ces cytokines sur les kératinocytes est responsable du processus de réépithérialisation excessif et de l'expression de molécules proinflammatoires. De façon intéressante, l'action de ces cytokines met en jeu diverses voies de signalisation dont l'activité est fortement induite dans le psoriasis (Figure 18). En comparant les profils transcriptomiques des kératinocytes stimulés individuellement par l'IL-17A, l'IL-1 α , l'IL-22, le TNF- α et l'OSM à celui de peaux psoriasiques, l'équipe de Gudjonsson a indiqué que les gènes modulés par ces cytokines sont peu concordants avec les gènes dont l'expression est modulée dans la peau psoriasique (Gudjonsson et al. 2010). En revanche, le LITEC et d'autres équipes ont décrit que l'action synergique de ces cinq cytokines sur les kératinocytes générait un profil transcriptomique proche de celui des lésions psoriasiques (Teunissen et al. 1998; Guilloteau et al. 2010; Chiricozzi et al. 2011). L'IL-1 α , l'IL-17A et le TNF- α seraient majoritairement impliqués dans la production de molécules proinflammatoires par leur capacité à activer NF- κ B tandis que l'IL-22 et l'OSM seraient

davantage impliquées dans l'altération de la différenciation épidermique par l'activation de STAT3 (Guilloteau et al. 2010; Rabeony et al. 2014). L'effet combiné des cytokines secrétées par les infiltrats immunitaires est donc essentielle à la physiopathologie du psoriasis et rompre cette synergie constitue un enjeu majeur dans son traitement.

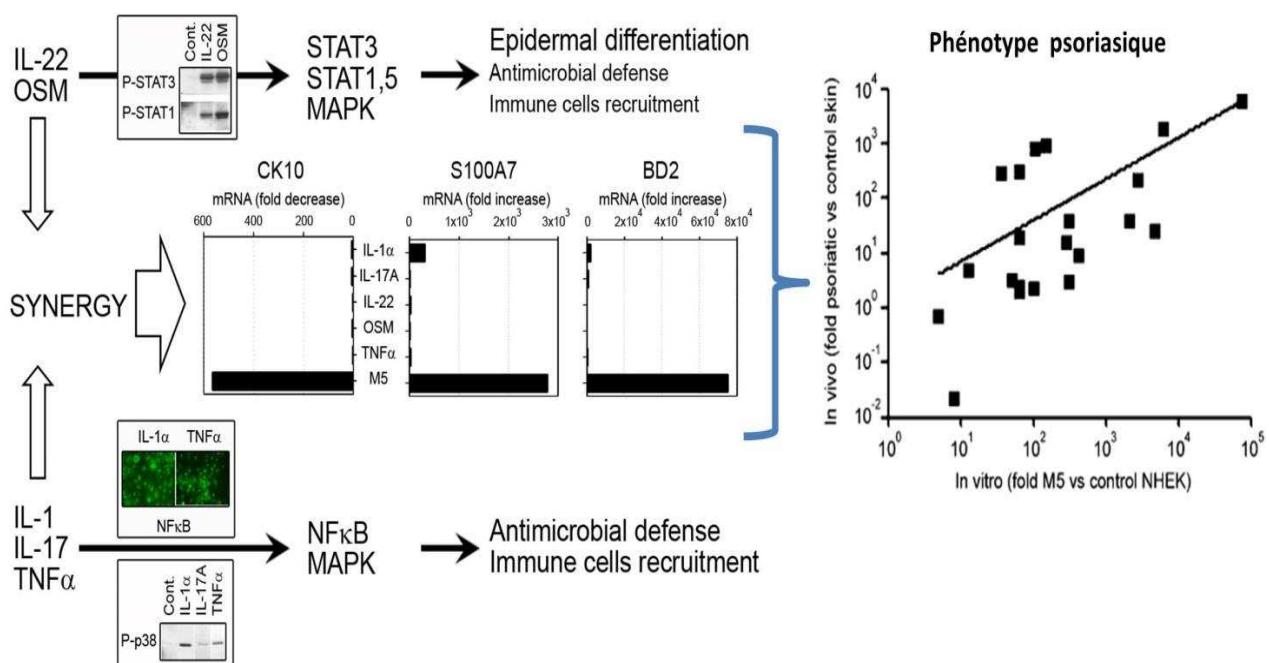


Figure 18 : Action synergique du mélange M5 comprenant l'IL-1 α , l'IL17A, le TNF- α , l'IL-22 et l'OSM sur les voies de signalisation et l'expression de gènes associés au psoriasis. L'OSM et l'IL-22 induisent la phosphorylation de STAT-3/1 responsables de l'altération de la différenciation épidermique pour STAT-3 par les cultures primaires de kératinocytes humains tandis que l'IL-1, l'IL-17 et le TNF- α activent majoritairement NF- κ B et les MAPK induisant la production de PAM et le recrutement de cellules immunitaires. La stimulation combinée de kératinocytes par le mélange M5 corrèle au profil transcriptomique de lésions psoriasiques. NHEK : *Normal Human Epidermal Keratinocytes*. (Lecron et al. 2013).

3.3. Modèles murins de Psoriasis induit par application d'AldaraTM

Au cours des vingt dernières années, une grande partie des mécanismes immunopathologiques impliqués dans le psoriasis ont été décrit en utilisant des modèles murins. Les souris ne développant pas spontanément de psoriasis, diverses stratégies ont été mises au point pour créer un phénotype mimant le psoriasis chez la souris. En 2006, Nestle et Nickoloff ont défini des critères pour « un modèle murin de psoriasis idéal ». Ce modèle doit comporter les trois caractéristiques cliniques suivantes : (1) une hyperprolifération de l'épiderme, (2) la présence d'un infiltrat inflammatoire et (3) une augmentation de la vascularisation dermique. Le modèle de psoriasis doit aussi présenter les

caractéristiques histologiques classiques d'une lésion psoriasique comme l'acanthose, la papillomatose et l'hyperkératose. Enfin, ce modèle devrait aussi être dépendant des LT et répondre aux traitements classiques utilisés chez les patients (anti-TNF- α , méthotrexate...) (Nestle and Nickoloff 2005). Dans une revue récente, Wagner et coll. ont comparé les différentes caractéristiques des modèles murins de psoriasis décrits dans la littérature au regard des critères établis par Nestle et Nickoloff (Wagner et al. 2010). Parmi ces modèles, de nombreuses souris transgéniques surexprimant une cytokine impliquée dans la physiopathologie du psoriasis (IL-23 Tg mice) ou déficiente pour des protéines de voie de signalisation (*cf* section 1) sont citées. Néanmoins, le caractère monogénique de ces modèles ne mime que certains aspects du psoriasis et ne récapitule pas l'ensemble des caractéristiques moléculaires et histologiques décrites dans le psoriasis. En revanche, le modèle de souris immunodéficiente xenogreffée avec de la peau issue de patient atteints de psoriasis, qui fut l'un des premiers modèles décrits, a contribué à la description du rôle des LT dans l'initiation de la pathologie (Wrone-Smith and Nickoloff 1996). Par la suite, ce modèle a été amélioré par l'utilisation de souris AGR présentant un déficit en lymphocytes NKT en plus du déficit en LT conventionnel. Ce modèle permet l'étude directe des infiltrats immunitaires humains et contribuent à la description du rôle des LT_{RM} ainsi que celui des LT CD8⁺ dans l'initiation de la pathologie (Boyman et al. 2004; Di Meglio et al. 2016). En outre, l'efficacité des biothérapies confirme la relevance clinique de ce modèle (Boyman et al. 2004). Il n'est cependant utilisé que par quelques rares équipes à travers le monde du fait de sa difficulté de mise en œuvre ainsi que du nombre limité de souris et de donneurs humains disponibles (Wagner et al. 2010).

La découverte fortuite d'un cas d'exacerbation du psoriasis chez un patient traité par AldaraTM a conduit à la description du rôle des pDC et de l'IFN- α dans les phases initiatrices du psoriasis (Gilliet et al. 2004). L'AldaraTM est utilisé dans le traitement des condylomes acuminés, des kératoses actiniques et certains carcinomes basocellulaires superficiels. La molécule active, R837 ou IMQ, est un agoniste de synthèse des TLR7/8 humains utilisé pour son effet activateur des DC et indirectement de la réponse antivirale. De nombreux cas d'exacerbation ou d'induction du psoriasis ont ensuite été rapportés et ont conduit à la mise au point d'un modèle de psoriasis induit par application topique de la crème AldaraTM chez la souris (van der Fits et al. 2009). Ce modèle présente de nombreux avantages comme la

rapidité et la facilité de mise en œuvre, son faible cout ainsi que sa fonctionnalité sur de nombreux fonds génétiques murins (Flutter and Nestle 2013). Dans leur étude princeps, Van der Fits et coll. ont décrit que l'application topique d'Aldara™ durant cinq à six jours consécutifs sur l'oreille et/ou le dos préalablement rasés et épilés d'une souris âgée de 8 à 11 semaines, induit un phénotype inflammatoire mimant un psoriasis sur la zone d'application (van der Fits et al. 2009). Ce modèle permet de reproduire de nombreux aspects cliniques et histologiques du psoriasis incluant, l'érythème, la présence de squames, une hyperplasie épidermique associée à une hyperprolifération des kératinocytes de la couche basale et une parakératose associée à une altération de l'expression de l'involucrine. La présence de PNN dans la couche cornée est aussi observée dans ce modèle où ils forment des amas semblables aux micro-abcès de Munro-Sabouraud. Enfin, le derme est caractérisé par un riche infiltrat composé de DC et de LT. Van der fits et coll. ont également adapté le score PASI utilisé par les dermatologues pour définir le score de sévérité de l'inflammation induite dans leur modèle. Ce score de sévérité prend en compte les trois aspects cliniques des lésions (érythème, squame et épaisseur). Ainsi, l'application d'Aldara™ induit un érythème sur la zone appliquée dès 3 jours tandis que l'épaisseur et les squames n'apparaissent qu'après cinq jours de traitement consécutif. L'inflammation induite par l'Aldara™ résulte de l'action de l'IMQ sur le TLR7 exprimé par les DC et les macrophages (Flutter and Nestle 2013). De plus, Walter et coll. ont rapporté que l'acide isostéarique utilisé comme excipient de l'Aldara™, est aussi impliqué dans l'initiation de l'inflammation en induisant une apoptose précoce des kératinocytes ainsi que l'activation de l'inflammasome (Walter et al. 2013). L'Aldara™ est donc capable d'activer de nombreuses voies de la réponse immunitaire innée décrites pour être impliquées dans la physiopathogenèse du psoriasis.

La dermatite psoriasiforme induite par application topique d'Aldara™, généralement nommé IMQ dans la littérature, est dépendante des cytokines de la famille de l'IL-1 (Tortola et al. 2012; Rabeony et al. 2015) et partiellement dépendante du TNF- α et de l'IFN- α/β (Grine et al. 2015a). Une fois cette première phase inflammatoire établie, le phénotype psoriasique induit par l'IMQ promeut l'activation de l'axe IL-23/Th17. Ainsi les souris IL-23KO et IL-17RAKO présentent une forte diminution du phénotype tandis que les souris IL-17FKO, IL-22KO et IL-17AKO sont partiellement protégées (van der Fits et al. 2009; Van Belle et al.

2012). Ce modèle est donc crucialement dépendant de l'axe IL-23/Th17 et mime en cela de nombreux aspects du psoriasis. En outre, une étude transcriptomique a mis en évidence une homologie de 69% entre les gènes régulés dans ce modèle et ceux retrouvés dans les lésions psoriasiques (Swindell et al. 2011). Néanmoins, il est décrit que contrairement au psoriasis, les LT $\alpha\beta$ ne sont pas indispensables à l'inflammation cutanée chez la souris. En effet, dans la peau de souris, les LT $\gamma\delta$ et les ILC3 représentent une source suffisante d'IL-17 et d'IL-22 compensant ainsi l'absence de LT $\alpha\beta$ dans ce modèle (Pantelyushin et al. 2012). Plus récemment, il a aussi été décrit qu'une mémoire immunologique est mise en place lors de l'application d'IMQ. Contrairement à ce qui est décrit chez l'homme et en accord avec l'activité majeure des LT $\gamma\delta$ chez la souris, cette population mémoire présente un TCR $\gamma\delta$ persistant au site traité jusqu'à cinquante jours après la résolution de l'inflammation (Hartwig et al. 2015). Lors d'une seconde application, ces LT $\gamma\delta$ mémoires seraient à même d'induire un phénotype plus important que lors de la phase initiale (Hartwig et al. 2015). Le modèle d'inflammation psoriasiforme par application d'IMQ est à ce jour le plus utilisé pour les recherches portant sur la description du rôle des populations immunitaires ou des cytokines impliquées dans la physiopathologie du psoriasis.

4. Physiopathologie de la dermatite atopique

L'eczéma observé dans la DA est médié par l'activation de LT dirigés contre des antigènes pouvant pénétrer la barrière cutanée. Cette caractéristique est commune aux réactions d'hypersensibilité retardée qui sont à l'origine des dermatites de contact. Toutefois dans le cas de la DA, l'agent de sensibilisation n'est pas un haptène chimique de faible poids moléculaire mais une protéine de grande taille. Le passage de ces molécules dans la peau nécessite que la barrière cutanée soit lésée. La sensibilisation induite par ces allergènes est alors responsable d'eczéma allergique. Toutefois, la cause primaire de la dysfonction de la barrière cutanée reste équivoque et deux hypothèses sont suggérées. Initialement, l'altération de la barrière cutanée fut considérée comme une conséquence de l'inflammation et de la polarisation Th2. Cette hypothèse de « *Inside Out* » s'oppose à l'hypothèse de l'« *Outside in* » stipulant que l'altération de la barrière cutanée est le facteur initiant la pathologie (Silverberg and Silverberg 2015). D'autre part, la forte prévalence familiale observée pour la DA a conduit à la recherche d'une étiologie génétique. Les études

épidémiologiques et la découverte de l'importance du microbiote cutané suggère aujourd'hui que des facteurs environnementaux sont fortement impliqués dans l'initiation de la DA (Eyerich and Novak 2013). Finalement, l'étiologie de la DA s'avère complexe et met en jeu des facteurs génétiques et environnementaux contribuant à altérer la barrière épidermique et à favoriser une polarisation cytokinique de type 2.

4.1. *Etiologie de la dermatite atopique*

4.1.1. **Altération de la barrière cutanée**

L'hypothèse de l'« *Outside in* » comme facteur déclenchant la pathologie est, d'une part soutenue par le constat que la sévérité de la DA est fortement corrélée à l'atteinte de la barrière cutanée et d'autre part que la peau non lésionnelle de patient atopique présente aussi des altérations de la barrière cutanée (Elias and Schmuth 2009). Ces altérations sont caractérisées par une augmentation du TEWL, une altération de la compaction et de la cohésion de la couche cornée, une réduction de la sécrétion des corps lamellaires ainsi qu'une modification de la composition du ciment lipidique (Le Lamer et al. 2015). L'initiation de la pathologie pourrait être directement imputée à certains polymorphismes de gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation de la couche cornée en particulier les gènes présents sur le complexe de différenciation épidermique (Oyoshi et al. 2009). Parmi ces derniers, des mutations du gène codant la filaggrine *FLG* sont retrouvées chez 10 à 50% des patients selon leur localisation géographique (Kim et al. 2016a). Ces défauts génétiques pourraient réduire l'exocytose des corps lamellaires, favoriser la déshydratation cutanée, modifier le pH de la couche cornée (Elias and Schmuth 2009) et induire la sécrétion d'IL-1 α / β et de TSLP par les kératinocytes (Agrawal and Woodfolk 2014). Par ailleurs des mutations faux-sens de la filaggrine sont décrites pour les patients souffrant d'ichtyose vulgaire, une pathologie génétique fortement associée à la DA. Néanmoins, dans les modèles murins mutés pour le gène codant la filaggrine, la perte de fonction de cette protéine n'est ni suffisante ni nécessaire à l'apparition de la DA (Le Lamer et al. 2015). En outre, la DA est une pathologie polygénique au même titre que le psoriasis. Parmi les nombreux polymorphismes décrits ; les gènes codant la loricrine, l'involucrine (Guttman-Yassky et al. 2011a), la claudine-1, la filaggrine 2, le SPRR3 et des enzymes impliquées dans la formation du ciment lipidique peuvent contribuer à l'altération de la barrière cutanée (Kim et al. 2016a). D'autres polymorphismes peuvent avoir des conséquences indirectes sur la

barrière cutanée. Cette seconde hypothèse de l'«'Inside Out » propose que des mutations pour les gènes codant les cytokines Th2 (IL-4, IL-13), leur récepteur (IL-4R α) ou d'autres récepteurs de l'immunité innée (TLR2, NOD1, NOD2) puissent être à l'origine d'un déséquilibre de la balance cytokinique en faveur d'une altération de la barrière cutanée (Kim et al. 2016a). Outre les polymorphismes génétiques, certains facteurs environnementaux favorisent aussi l'altération de la couche cornée. C'est le cas du pH alcalin de certains savons, des acariens de la poussière ainsi que des toxines produites par *S. aureus*, pouvant augmenter l'activité des protéases à sérine endogènes et ainsi favoriser la dégradation de la cornéodesmosine et des lipides extracellulaires (Elias and Schmuth 2009). Par ailleurs, la sécheresse cutanée favorise aussi le prurit qui peut altérer la barrière cutanée en modifiant le gradient de calcium nécessaire à la différenciation épidermique (Le Lamer et al. 2015).

4.1.2. Hypothèse hygiéniste

Bien que les prédispositions génétiques soient un facteur déterminant dans l'apparition de la DA, il n'explique pas l'augmentation des cas de DA relatée par les études épidémiologiques depuis les années 50. Ce constat a été expliqué par «l'hypothèse hygiéniste » qui stipule que les enfants vivants à proximité des villes sont moins exposés aux bactéries pathogènes durant la petite enfance que les enfants vivants en zone rurale. L'exposition précoce aux pathogènes environnementaux stimule la formation de cytokines Th1 et permettrait de rééquilibrer la balance cytokinique majoritairement en faveur des cytokines Th2 avant la naissance (Novak et al. 2003). Cette hypothèse est confirmée par de nombreuses données épidémiologiques qui montrent qu'une réduction de l'exposition aux bactéries durant l'enfance augmentent la sévérité et la prévalence de la DA (Guttman-Yassky et al. 2011b). L'utilisation abusive d'antibiotiques durant la petite enfance pourrait aussi influencer la balance cytokinique en faveur d'une polarisation Th2 en inhibant directement la production de molécules proinflammatoires Th1 ou en perturbant le microbiote intestinal (Kuo et al. 2013). Ce déséquilibre du microbiote peut favoriser la colonisation par *S. aureus* et ainsi l'initiation de l'inflammation cutanée.

4.2. Mécanismes physiopathologiques de la DA

4.2.1. Phase d'initiation

Le stimulus exogène ayant pénétré la barrière épidermique, active les kératinocytes et initie une réponse immunitaire innée par la production de cytokines. Parmi ces dernières

le TSLP serait nécessaire à l'initiation de la DA. Le récepteur du TSLP formé de deux sous-unités TSLP-R et IL-7-R α est en effet fortement exprimé par les DC et dans une moindre mesure par les LT, les PNE, les ILC2 et les mastocytes (Cianferoni and Spergel 2014). *In vitro*, l'activation des DC humaines par le TSLP induit l'expression des molécules impliquées dans la présentation antigénique (CMH II, CD80, CD86), la production des chimiokines CCL17 et CCL22 et l'expression de l'OX ligand, impliqués dans l'activation et le recrutement de LTh2 (Ziegler and Artis 2010). La production de TSLP par les kératinocytes pourrait donc induire la polarisation Th2 indirectement par l'activation de LC (Figure 19). De fait, des souris transgéniques surexprimant TSLP sous le contrôle du promoteur de K5 présentent une inflammation cutanée caractérisée par une spongiose épidermique, des infiltrats dermiques éosinophiles, une production d'IL-4 et d'IL-13 par les LT CD4 $^{+}$ ainsi qu'un taux élevé d'IgE mimant la DA humaine (Yoo et al. 2005). Le TSLP est aussi capable d'induire une polarisation de type 2 en dehors de la présence de LT par l'activation des cellules de l'immunité dermique telles que les ILC2 et les mastocytes. D'autres cytokines également produites par les kératinocytes activés telles que l'IL-33 et l'IL-17E (IL-25) vont activer les ILC2 (Salimi et al. 2013) qui semblent avoir un rôle majeur dans l'initiation de la DA et pourraient contribuer à induire la dégranulation des mastocytes par leur production d'IL-9 en favorisant ainsi le recrutement des LTh2 et des PNE (Roediger et al. 2014). Lors de cette phase d'initiation, les PNE sont aussi recrutés et maintenus dans la peau par l'IL-5. De fait, dans un modèle murin de DA, il a été montré que les souris IL-5KO ne présentent pas d'éosinophilie dermique ou sanguine. L'absence de ces cellules est aussi associée à une diminution de l'hyperplasie épidermique et dermique suggérant que les PNE contribuent à l'inflammation cutanée (Spergel et al. 1999). Ces cellules pourraient contribuer aux dommages tissulaires en libérant des protéines cationiques comme la « *major basic protein* » ou la protéine cationique éosinophile par dégranulation. Ces protéines stimulent les mastocytes et favorisent la fibrose dermique en induisant la sécrétion d'IL-13 et de TGF- β 1 (Liu et al. 2011). De plus, la stimulation de PNE *in vitro* par des cytokines Th2 (IL-4, IL-5) induit l'expression d'IL-12 suggérant que les PNE pourrait participer au modification de la polarisation cytokinique associée à la chronicité des lésions (Grewe et al. 1998).

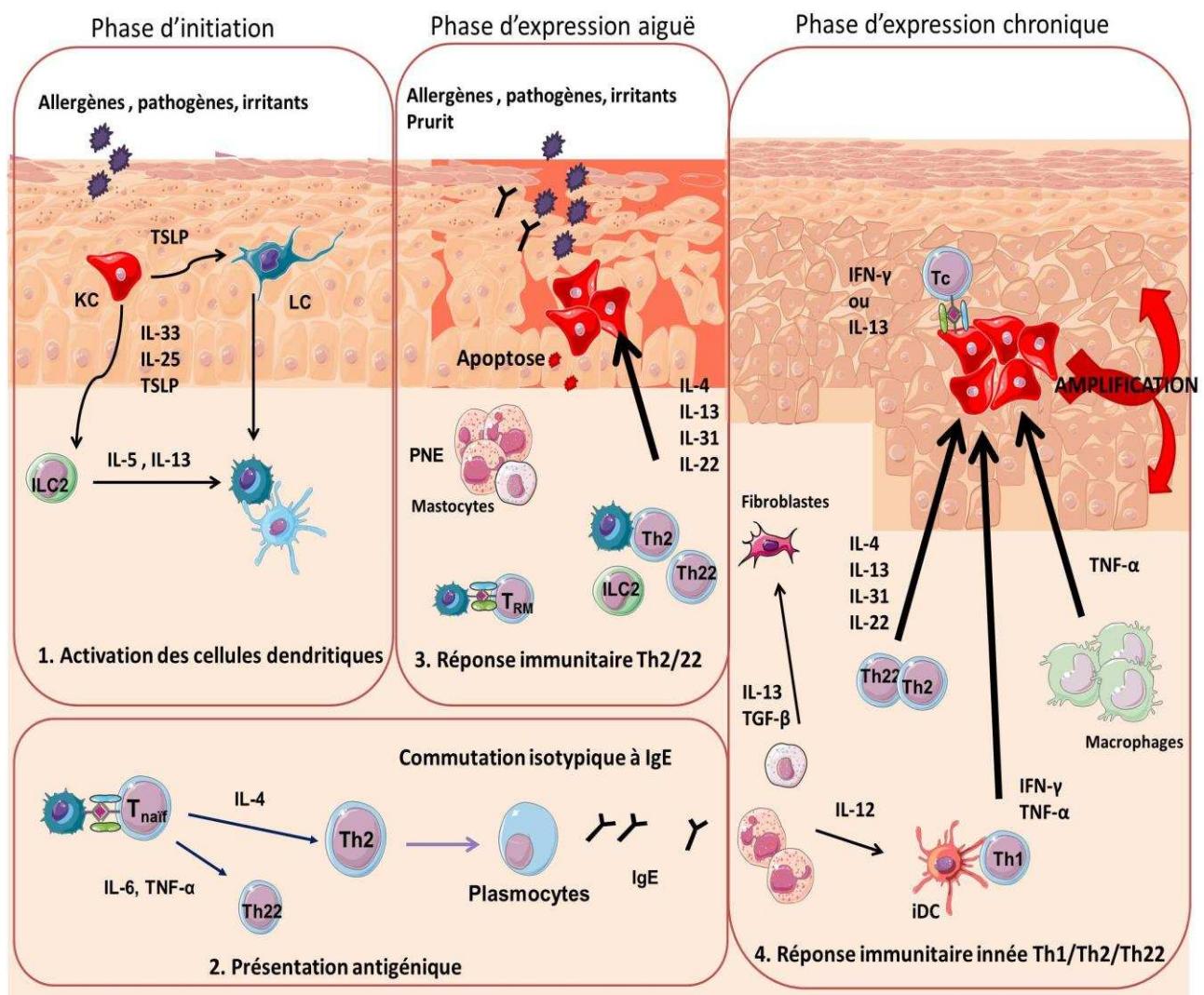


Figure 19 : Physiopathologie de la dermatite atopique KC : kératinocytes, LC : cellules de Langerhans, ILC : cellules lymphoïdes innées, T_{naïf} : lymphocytes T naïfs, Th : lymphocytes T effecteurs, Tc : lymphocytes T cytotoxiques, iDC : cellules dendritiques inflammatoires, PNE : polynucléaires éosinophiles

Une fois activées, les DC migrent vers les ganglions où elles vont présenter l'antigène ayant traversé la barrière cutanée aux LTnaïfs (Figure 19). Cette phase de sensibilisation est essentielle à la physiopathologie de la DA. Elle génère des LTh2 CLA⁺ qui vont alors participer à la commutation isotypique des lymphocytes B en cellules productrices d'IgE (Kim et al. 2016a). Les IgE ainsi produites reconnaissent de nombreux allergènes ou auto-antigènes et jouent un rôle essentiel dans le maintien et la chronicité des lésions. Les LTh2 vont eux, migrer dans la peau afin de former une population mémoire qui sera rapidement réactivée à la suite d'un nouveau contact avec l'antigène.

4.2.2. Phase d'expression aiguë

Un second contact avec l'allergène responsable de la sensibilisation va permettre aux DC de présenter l'antigène aux LT mémoires directement dans la peau (Figure 19). Cette présentation serait facilitée par la liaison des complexes IgE-antigène au récepteur Fc ϵ RI de haute affinité exprimé par les DC, favorisant ainsi leur internalisation (Chu et al. 2011). Dans les phases aiguës de la DA, la réponse inflammatoire est majoritairement médiée par les cytokines Th2 et Th22 responsables de l'altération de la barrière cutanée. Cette altération permet le passage de nombreux antigènes de l'environnement qui vont maintenir et amplifier l'inflammation cutanée.

L'IL-4 et l'IL-13 sont surexprimées dans la peau atopique et plus particulièrement lors des phases aiguës pour l'IL-4. Le rôle de ces cytokines dans l'altération de la barrière cutanée est lié à la phosphorylation de STAT-6 et possiblement des MAPK, après fixation de l'IL-4 et de l'IL-13 aux sous-unités IL-4R α et l'IL-13R α exprimées par les kératinocytes (Omori-Miyake et al. 2014). L'IL-4 et l'IL-13 inhibent en particulier l'expression de l'involucrine, de la loricrine, de la filaggrine 1 ainsi que l'expression de K1 et K10 (Kim et al. 2008; Omori-Miyake et al. 2014). Ces interleukines favorisent aussi la dégradation des cadhérines desmosomales en augmentant l'activité des kallikréines 7 (Morizane et al. 2012) et en inhibant directement la synthèse des cadhérines DCS1 et DCG1 spécifiques de la couche cornée (Omori-Miyake et al. 2014). Enfin, l'IL-4 et l'IL-13 sont aussi décrites pour leurs action inhibitrice de la synthèse des céramides (Danso et al. 2014). L'ensemble de ces actions favorisent l'entrée des pathogènes ou d'allergènes et la sensibilisation atopique. En parallèle de leur activité sur l'altération de la barrière cutanée, il a été décrit que l'IL-4 et l'IL-13 sont aussi impliquées dans la spongiose épidermique en activant l'apoptose des kératinocytes dans un modèle de peau reconstruite humaine (Kamsteeg et al. 2011). Enfin, ces cytokines inhibent l'expression de PAM induite par l'IFN- γ et le TNF- α et contribuent ainsi à augmenter la susceptibilité des peaux atopiques aux surinfections (Albanesi et al. 2007). Le rôle de ces cytokines dans la DA a été confirmé *in vivo* chez la souris où la surexpression de l'IL-4 ou de l'IL-13 pour les souris transgéniques K14-IL4 (Chan et al. 2001) et K5-IL-13 (Zheng et al. 2009) induit une inflammation cutanée caractérisée par un érythème, un prurit intense, une excoriation et une pyodermité à *S. aureus*. En histologie, cette inflammation cutanée est associée à une spongiose et une hyperplasie épidermique ainsi qu'un infiltrat de monocytes,

mastocytes et PNE dans le derme. Enfin, ces souris transgéniques sont aussi caractérisées par une augmentation des taux circulants d'IgE et d'IgG1. De manière plus spécifique, les souris K5-IL-13 présentent aussi une fibrose dermique associée à l'activité de l'IL-13 sur la synthèse de collagène par les fibroblastes (Zheng et al. 2009). Ainsi, l'inflammation cutanée induite par la surexpression d'IL-4 ou d'IL-13 reproduit de nombreux aspects de la DA, démontrant le rôle essentiel de ces cytokines dans cette pathologie. Ces données ont été transférées à la clinique humaine et ont permis le développement du Dupilumab, un anticorps bloquant ciblant l'IL-4R α . Lors d'essais cliniques, le Dupilumab a été testé en association avec l'application de dermocorticoïdes, un traitement classique de la DA et a montré une grande efficacité dans la normalisation des altérations de la barrière épidermique et dans l'inhibition de la réponse inflammatoire.

En parallèle, la production d'IL-22 pourrait contribuer à favoriser l'altération de la barrière épidermique par l'activation de STAT-3 (Figure 19). En effet, la présence de LT produisant de l'IL-22 a été mise en évidence dans la DA (Nograles et al. 2009) et le pourcentage de LT CD8 $^{+}$ produisant de l'IL-22 est corrélé à la sévérité de la DA. En outre, l'expression de cette cytokine est plus importante dans la peau atopique que dans la peau psoriasique (Nograles et al. 2009). Dans la DA cette cytokine serait produite par les LT en réponse aux toxines de *S. aureus* (Niebuhr et al. 2010b). Un anticorps bloquant cette cytokine est actuellement à l'essai chez l'homme.

4.2.3. Phase d'expression chronique

Les lésions chroniques résultent d'une activation excessive du système immunitaire entraînant le maintien de l'état activé des kératinocytes et l'apparition d'une hyperplasie épidermique (Figure 19). Les lésions chroniques de DA sont caractérisées par un profil cytokinique mixte Th1/Th2 et par un infiltrat dermique majoritairement composé de macrophages. Les iDC recrutées lors des phases aiguës pourraient contribuer à favoriser la polarisation Th1 et la chronicité des lésions par la production d'IL-12. Les iDC seraient majoritairement responsables de cette polarisation Th1 et sont activées par la fixation des IgE au Fc ϵ RI qu'elles expriment (Chu et al. 2011).

Dans cette pathologie, il est décrit que contrairement au psoriasis, l'IFN- γ produit par les LTh1 est impliqué dans l'induction de l'apoptose. En effet, l'IFN- γ augmente l'expression de FAS à la surface des kératinocytes rendant ainsi les kératinocytes sensibles à l'apoptose

induite par les FASL exprimée par les LT cytotoxiques. Le clivage enzymatique des E-cadhérines par les caspases est un évènement précoce de cette apoptose responsable de l'aspect spongieux de l'épiderme (Albanesi and Pastore 2010). Enfin le TNF- α produit par les LTh1 et les macrophages est décrit pour agir en synergie avec l'IL-4 et l'IL-13 sur les épidermes reconstruits humains (Danso et al. 2014). Le TNF- α associé à l'IL-4 et l'IL-13 peut notamment augmenter l'expression de TSLP par les kératinocytes et contribuent ainsi à la formation d'une boucle d'amplification auto-inflammatoire (Bogiatzi et al. 2007).

Comme pour le psoriasis, il a été décrit que l'action combinée de l'IL-22, de l'IL-4, de l'IL-13 et du TNF- α sur les épidermes reconstruits humains peut mimer un phénotype atopique (Bernard et al. 2012). Ainsi la comparaison des profils transcriptomiques induit par le mélange cytokinique « DA » comparée aux mélanges cytokiniques « M5 psoriasis » montrent que ces cytokines sont responsables de l'expression différentielle des PAM, chimiokines et cytokines observées dans ces pathologies (Bernard et al. 2012). A elles seules, ces cytokines permettent de recréer un modèle *in vitro* de psoriasis ou de DA (Bernard et al. 2012).

4.3. Modèle murin de dermatite atopique induit par application de Calcipotriol

De nombreux cas d'eczéma cutané sont décrits chez les animaux domestiques comme les chiens, les chats et les rongeurs. L'eczéma allergique n'est donc pas une pathologie restreinte à l'homme. Parmi eux, la souris est l'animal le plus étudié pour décrire les mécanismes physiopathologiques de la DA. Les modèles murins de DA peuvent être classés en trois catégories, (1) les modèles de DA spontanée, (2) les modèles de souris transgéniques et (3) les modèles induits par application cutanée d'un agent sensibilisant (Jin et al. 2009). Parmi les modèles murins de DA spontanée, les souris Nc/Nga furent les premières identifiées. Ces souris présentent une activation constitutive de JAK3 favorisant l'activation des lymphocytes B et la production d'IgE sérique (Jin et al. 2009). Ce modèle présente de nombreux points communs avec la DA humaine comme l'apparition d'un prurit après la mise en contact des souris avec un agent sensibilisant, une hyperplasie, une spongiose, un infiltrat éosinophile et l'expression de cytokines Th2. Parmi les modèles induits par l'application d'une substance allergène ou d'un irritant, le plus utilisé consiste à appliquer de l'ovalbumine, une protéine du blanc d'œuf, sur une peau préalablement

altérée par « tape stripping » de souris sauvage BALB/c décrites pour leur polarisation Th2 préférentielle (Spergel et al. 1998). Cette phase de sensibilisation reproduit celle décrite chez l'homme. Lorsque la peau est à nouveau exposée à l'ovalbumine, une inflammation cutanée mimant la DA est induite. Cette inflammation est caractérisée par un prurit, un épaississement épidermique et dermique, un infiltrat de LTh2 CCR4⁺ produisant de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'IL-5, un infiltrat dermique éosinophile et mastocytaire accompagné d'une augmentation des taux circulants d'IgE sériques (Oyoshi et al. 2009). En revanche, ce modèle n'est pas associé à la production d'IFN-γ dans la peau des souris. Certains haptènes décrits pour induire une hypersensibilité retardée, sont aussi utilisés pour induire une dermatite de contact majoritairement médiée par les cytokines Th1. Néanmoins, il a été montré que des phases de sensibilisation répétée à ces haptènes entraînent un switch vers une polarisation Th2 et l'initiation d'un phénotype allergique (Oyoshi et al. 2009).

Plus récemment un modèle de DA par application d'un analogue hypocalcémiant de la vitamine D3, le MC903 ou calcipotriol (Dovonex ou Daivonex), a également été décrit (Li et al. 2006). Le calcipotriol est utilisé pour ses activités anti-inflammatoires dans le traitement du psoriasis (Kragballe and Iversen 1993). Son mécanisme d'action serait lié à sa fixation aux différents récepteurs de la vitamine D induisant une modification de la polarisation cytokinique au profit des cytokines Th2 (Scolletta et al. 2013). De fait, Li et coll. ont décrit que l'application répétée de calcipotriol durant seize jours sur l'oreille ou le dos d'une souris, induit un phénotype mimant la DA (Li et al. 2006). Ce dernier est caractérisé par un épaississement de la zone traitée associé à un érythème, un aspect squameux et crousteux de l'oreille. Un prurit et une augmentation des taux sériques des IgE et IgG ont aussi été constatés chez ces souris. D'un point de vue histologique, l'aspect clinique de la peau est associé à une hyperplasie épidermique et un infiltrat de LT CD4⁺ et T CD8⁺, de DC et de PNE. (Li et al. 2009). L'action du calcipotriol est essentiellement dirigée sur les kératinocytes qui expriment le récepteur de la Vitamin D et les « *Retinoic acid Receptors* » α et β (Li et al. 2006). En outre, les souris déficientes pour le gène codant le TSLP présentent une forte réduction de l'érythème et de l'épaisseur de l'oreille, associée à une diminution de l'infiltrat dermique. Ce dernier est majoritairement responsable du phénotype cutané et permet le recrutement de cellules produisant des cytokines comme l'IL-4, l'IL-13, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-31 dans la peau des souris traitées (Li et al. 2009). En revanche, l'hyperplasie épidermique est

modérément réduite en l'absence de TSLP suggérant qu'une autre voie d'activation est impliquée. De plus, seule l'expression de l'IFN- γ observée dans les oreilles de souris sauvages n'est pas diminuée en l'absence de TSLP suggérant que la polarisation Th1 est toujours active dans ce modèle est qu'elle est en partie responsable de l'hyperplasie épidermique. Ce modèle mime de nombreux aspects de la DA et présente l'avantage d'être rapide et peu onéreux à mettre en place.

Finalement les études menées sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la DA et le psoriasis ont permis de décrire le rôle majeur des cytokines dans l'initiation et le maintien de ces pathologies. Le LITEC a en particulier décrit que l'action synergique de certains cytokines fortement impliquées dans l'activation des kératinocytes permet de reproduire ces pathologies dans des modèles de RHE (Guilloteau et al. 2010; Bernard et al. 2012; Rabeony et al. 2014) ainsi qu'*in vivo* chez la souris (Rabeony et al. 2014). Parmi ces cytokines, il est décrit que l'OSM, l'IL-6 et l'IL-31 sont actives *in vitro* sur les kératinocytes humains et pourraient être ainsi impliquées dans l'inflammation cutanée.

Chapitre 4 - Cytokines de la famille de l'IL-6 et rôle dans l'inflammation cutanée

1. Généralités sur les cytokines de la famille de l'IL-6

Les cytokines sont regroupées en famille sur la base d'homologie de séquence et structurale de leurs récepteurs. Ainsi, la famille de l'IL-6 comprend les cytokines dont le récepteur est composé d'une sous-unité gp130 commune, ubiquitaire et nécessaire à la transduction du signal (Heinrich et al. 1998). Dans cette famille sont inclus, l'IL-6, le *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), la cardiotrophine-1, l'IL-11, la *Cardiotrophin-Like Cytokine*, l'OSM, le *Ciliary Neutrophic Factor* (Heinrich et al. 2003) et l'IL-31 de découverte plus récente (Dillon et al. 2004). Selon la définition énoncée par Heinrich et coll., l'IL-27 et l'IL-35 peuvent également être considérées comme des cytokines de la famille de l'IL-6. Les récepteurs de l'IL-27 et de l'IL-35 sont en effet composés de la sous-unité gp130 (Hunter 2005; Egwuagu and Larkin 2013). Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 sont hétérodimériques ou hétérotrimériques (Figure 20). Les sous-unités qui composent ces récepteurs sont classées en deux catégories, d'une part les chaînes α non signalisantes (IL-6R α , IL-11R α et CNTF-R α) et d'autre part les chaînes β transmembranaires et impliquées dans la transduction du signal (gp130, OSM-R β , LIF-R β et IL-31RA).

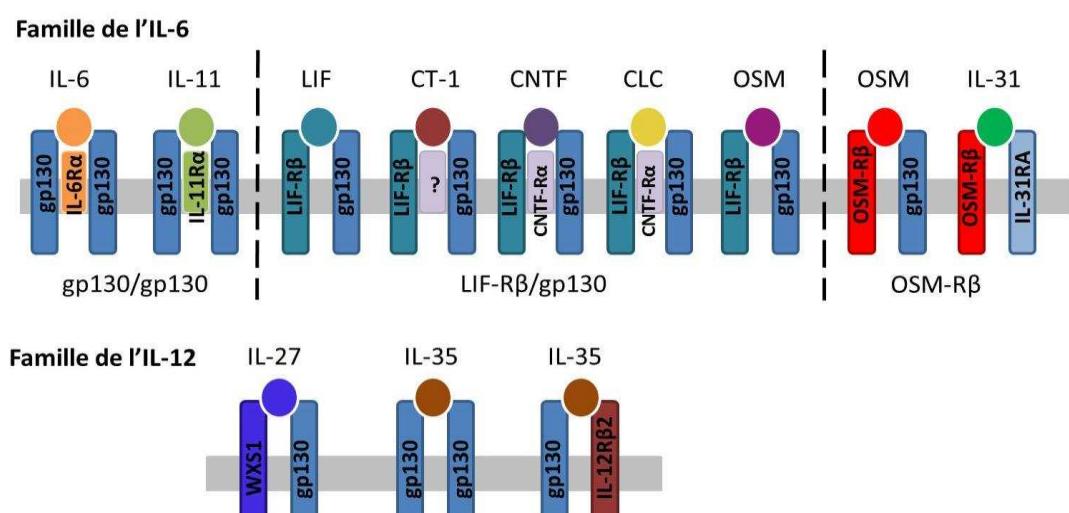


Figure 20. Cytokines et récepteurs de la famille de l'IL-6. (d'après (Heinrich et al. 2003; Rose-John et al. 2015). LIF: *leukemia inhibitory factor*, CT-1 : *cardiotrophin 1*, CNTF *Ciliary Neutrophic Factor*, CLC: *Cardiotrophin-Like Cytokine*, OSM : *oncostatine M*

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont caractérisées par une structure secondaire composée de quatre hélices alpha permettant de former trois sites de liaisons aux récepteurs (Figure 21). Les cytokines formées de quatre hélices alpha « droites » comme l'IL-6 et l'IL-11 recrutent d'abord une chaîne alpha IL-6R α et IL-11R α respectivement, *via* le site II puis deux sous-unités de signalisation gp130 *via* les sites I et III. A l'inverse, les cytokines ayant une conformation « entortillée » comme le LIF, le CNTF et l'OSM se fixent à une sous-unité gp130 *via* le site II puis recrutent une seconde chaîne β signalisante LIF-R β ou OSM-R β *via* le site III (Heinrich et al. 2003). Il semblerait que ce soit la différence de structure tertiaire « droite » ou « entortillée » qui confère la possibilité aux cytokines « entortillées » de transduire un signal *via* un récepteur hétérodimérique LIF-R β ou OSM-R β /gp130 et non pas par l'homodimère gp130/gp130. Par ailleurs, des formes solubles de certaines sous-unités sont décrites, en particulier l'IL-6R α soluble (sIL-6R α) et le gp130 soluble (sgp130). La sous-unité sgp130 est un antagoniste des cytokines de la famille de l'IL-6. A l'inverse, sIL-6R α est un récepteur agoniste permettant à l'IL-6 d'interagir avec l'ensemble des types cellulaires exprimant la sous-unité gp-130 par la *trans*-signalisation (Heinrich et al. 2003). Cette particularité confère des activités extrêmement pléiotropes à l'IL-6.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 active préférentiellement la voie de signalisation Janus Kinases (JAK)/STAT, en particulier JAK1, JAK2, et tyrosine kinase (TYK)2 constitutivement liées à la sous-unité gp130 (Silver and Hunter 2010). La fixation d'une cytokine à son récepteur induit l'activation des JAK qui vont alors phosphoryler les protéines STAT-1 et STAT-3 (Figure 2B) (Silver and Hunter 2010). En parallèle, la chaîne gp130 du récepteur est aussi impliquée dans le recrutement de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 et est ainsi capable d'activer la voie ERK1/2 des MAPK et la voie Pi3k/Akt (Silver and Hunter 2010). La régulation de ces voies de signalisation dépend de différents processus physiologique comme l'internalisation des récepteurs ou l'expression des protéines *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS) en particulier SOCS3, exprimée en réponse à l'activation de STAT-3 et permettant d'inhiber la phosphorylation de STAT-3 en se fixant à la sous-unité gp130 ou celle de JAK1 pour l'OSM-R β . Les effets proinflammatoires des cytokines de la famille de l'IL-6 contrairement à l'IL-10 activant STAT-3 mais décrite pour son activité anti-inflammatoire, serait dépendantes de la protéine SOCS3 (Silver and Hunter 2010).

L'OSM active une gamme plus large de voies de signalisation en comparaison aux autres cytokines de la famille de l'IL-6. En plus de la phosphorylation de STAT-1 et 3, l'OSM induit la phosphorylation de STAT-5 et de STAT-6 dans des cultures de fibroblastes primaires issues de tissu pulmonaire. L'OSM est aussi impliquée dans l'activation de p38 et de JNK en déclenchant la voie des MAPK par une protéine adaptatrice spécifique, *SH2-and collagen-homology-domain-containing protein* (SHC) (Hermanns 2015). Les voies de signalisation induites par l'OSM seraient associées aux motifs peptidiques présents sur la sous-unité OSMR- β et pourrait être commune à l'IL-31 mais la nature des voies d'activation induite par cette cytokine est peu décrite. La pluralité des voies de signalisation induites par les cytokines de la famille de l'IL-6 leur permet de réguler de nombreuses fonctions homéostatiques et d'induire l'expression de gènes impliqués dans la différenciation, la survie, l'apoptose ainsi que la prolifération cellulaire.

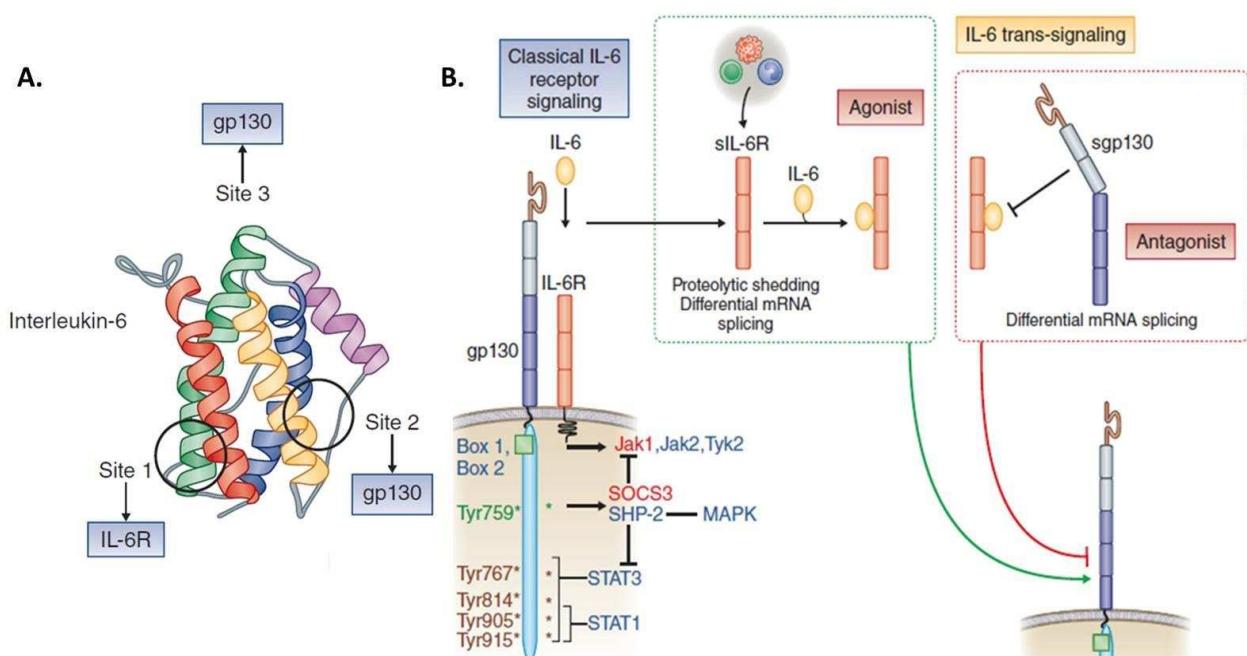


Figure 21 : Structure de l'IL-6 et signalisation. (A) représentation schématique de la structure tertiaire de l'IL-6 et identification des sites impliqués dans la liaison aux sous-unités du récepteur. (B) Représentation schématique de la signalisation induite par la liaison de l'IL-6 à son récepteur membranaire et des formes solubles des sous-unités sIL-6R α et sgp130 décrites. La protéine SOCS3 indiquée en rouge est un inhibiteur de la phosphorylation de STAT-3. Tyr(nombre) : emplacement d'une tyrosine sur la chaîne gp130 impliquée dans la transduction du signal. JAK: janus kinase, Tyk : tyrosine kinase, SOCS3 : *Suppressor of cytokine signaling 3*, MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*, STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*.

L'expression de gp130, de l'IL-31RA et de l'OSM-R β par les kératinocytes humains suggère que l'IL-6, l'IL-31 et l'OSM sont actives sur ces cellules (Dillon et al. 2004; Boniface et al. 2007a). Ceci a été confirmé par des données non publiées de notre laboratoire mettant en évidence la phosphorylation de STAT-1, STAT-3 et ERK en réponse à ces trois cytokines sur des cultures primaires de kératinocytes humains (Figure 22). Pour cette raison, la suite de ce chapitre sera consacrée à la description des activités de l'IL-6, de l'OSM et de l'IL-31 dans l'inflammation cutanée.

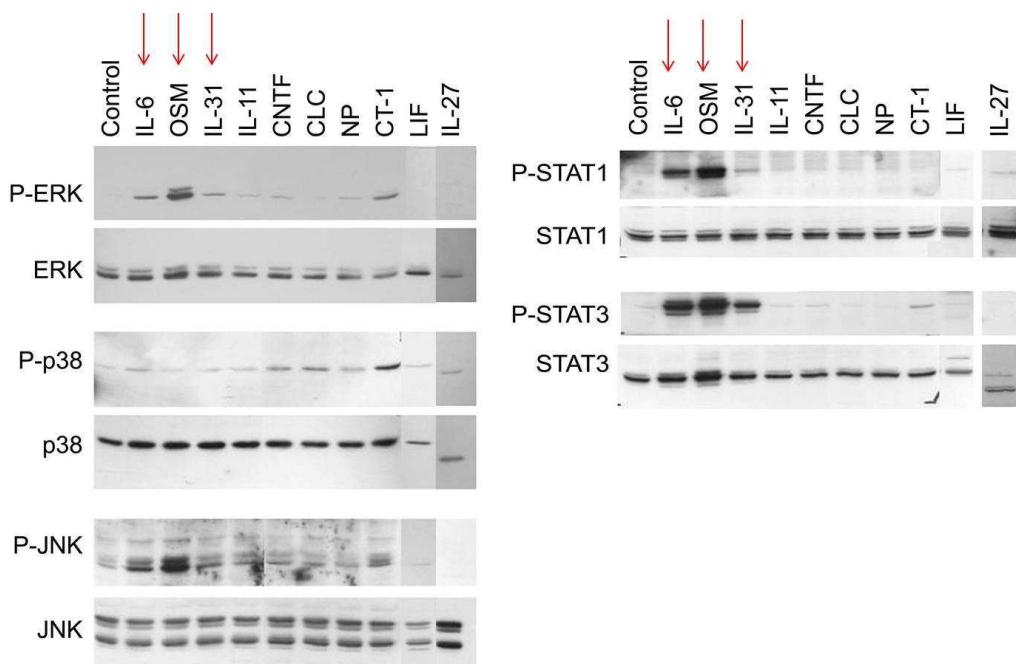


Figure 22 : Signalisation induite par les cytokines de la famille de l'IL-6 sur les kératinocytes humains. Des cultures primaires de kératinocytes humains ont été stimulées par les cytokines de la famille de l'IL-6 à la concentration de 50 ng/ml pendant 15 minutes et récupérés afin d'analyser, par Western-Blot, les voies de signalisation activées (données non publiées du LITEC). (P- : phospho)

2. L'interleukine 6

2.1. Généralités

Dans les années 80, l'IL-6 a été simultanément découverte par de nombreuses équipes au vue de ses propriétés de protection contre une infection virale sur des fibroblastes et ainsi nommée IFN- β 2, sa capacité à stimuler la sécrétion d'Ig par les lymphocytes B (*B-cell stimulatory factor 2*) ou encore son rôle dans la croissance cellulaire de nombreuses lignées (*hepatocyte-stimulatory factor, hybridoma growth factor*) (Simpson et al. 1997). L'IL-6 est une glycoprotéine de 28 kDa aux effets pléiotropiques, impliquée aussi

bien dans la phase aigüe de la réponse inflammatoire que dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire. En outre, elle participe aussi à la régulation de nombreuses fonctions endocrines comme le métabolisme lipidique, la résistance à l'insuline, le système neuroendocrinien, l'activité mitochondriale et le comportement neuropsychologique (Hunter and Jones 2015). Le gène codant l'IL-6 est retrouvée sur le chromosome 7 chez l'homme et sur le chromosome 5 chez la souris. L'IL-6 est composé de quatre exons et de quatre introns tout comme l'IL-6 de plus, ces deux séquences ont montré 65% d'homologie (Kishimoto 1989). Le récepteur de l'IL-6 est composée d'une sous unité gp130 et d'une sous unité IL-6R α respectivement présente sur le chromosome 5 et sur le chromosome 3 chez la souris. La comparaison des séquences des gènes *GP130/Gp130* et *IL-6R/IL-6r* a montré 72% d'homologie pour la première et seulement 52% pour la seconde (Saito et al. 1992). L'IL-6 est produite, en réponse à divers signaux de danger, par de nombreuses cellules hématopoïétiques (macrophages, DC, mastocytes, lymphocytes B), mais aussi par des cellules stromales, endothéliales et épithéliales. Sa sécrétion serait consécutive à l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et du C/EBP α dont les sites de liaison ont été décrits dans la région promotrice de la séquence codant l'IL-6 (Rincon 2012). Les fonctions pléiotropiques de l'IL-6 sont en partie dues à la forme soluble du récepteur sIL-6R α lui permettant d'interagir potentiellement avec toutes les cellules de l'organisme par la *trans*-signalisation. La forme membranaire de l'IL-6R α serait exprimée par un nombre de cellules restreintes comprenant les leucocytes et les hépatocytes (Rincon 2012) et serait majoritairement impliquée dans les fonctions homéostatiques de l'IL-6 ; tandis que la forme soluble du récepteur serait en partie responsable des fonctions pathologiques de cette dernière (Rabe et al. 2008). Pour exemple, certains LT activés n'exprimant pas la chaîne membranaire IL-6R α sont tout de même sensibles aux activités de cette cytokine *via* la fixation du complexe IL-6/sIL-6R α à la sous-unité gp130 (Jones et al. 2010). La forme soluble du récepteur est produite par clivage enzymatique ou par épissage alternatif de la forme membranaire chez l'homme (Hunter and Jones 2015) tandis que seul le clivage enzymatique de la forme membranaire est décrit chez la souris (Scheller et al. 2011). Lors d'une réaction inflammatoire, les PNN impliqués dans la phagocytose de microorganismes et de débris meurent rapidement par apoptose. Cette apoptose induit la libération d'« *a disintegrin and metalloprotease* » (ADAM) 17 impliquée dans le clivage du récepteur IL-6R α . De plus,

certaines toxines bactériennes, l'IL-1 α et le TNF- α ont été décrits pour induire l'activation d'ADAM17 et ainsi le clivage enzymatique de l'IL-6R α (Scheller et al. 2011)

2.2. IL-6 et réponse inflammatoire

L'IL-6 est un marqueur de l'inflammation retrouvé dans le sérum au cours de nombreuses pathologies infectieuses et inflammatoires suggérant son rôle dans de multiples aspects de la réponse immunitaire (Rincon 2012). L'IL-6 entraîne en particulier la synthèse hépatique des protéines de phase aigüe (Mihara et al. 2012) ainsi que des effets indirects sur l'angiogenèse en induisant la sécrétion de VEGF par les cellules présentes au site inflammatoire. De plus, elle serait également impliquée dans le trafic leucocytaire en favorisant le recrutement des PNN lors de la réponse inflammatoire aiguë puis en induisant la transition vers la phase de réparation *via* le recrutement de monocytes circulants (Hurst et al. 2001; Kaplanski et al. 2003). Pour se faire l'IL-6 active les cellules endothéliales et induit l'expression de molécules d'adhésion comme l'ICAM-1 et de chimiokines comme CXCL5, CXCL6, CCL8 (Silver and Hunter 2010). Enfin, l'IL-6 participerait également à la différenciation des monocytes en macrophages et à l'apoptose des PNN favorisant ainsi leur dégradation et la phase de réparation tissulaire (McLoughlin et al. 2003).

Traditionnellement, l'IL-6 est décrite pour son rôle essentiel dans la transition entre l'immunité innée et adaptative. En effet, c'est un facteur d'activation de LT qui prévient l'apoptose de ces cellules en induisant la synthèse de facteurs anti-apoptotiques comme *B-cell lymphoma -2* (Jones et al. 2010). Cette interleukine joue aussi un rôle essentiel dans la différenciation des LT et B. Elle favorise la polarisation Th2 en induisant l'expression d'IL-4 et d'IL-13 et en inhibant celle de l'IFN- γ (Scheller et al. 2011). Dans un modèle d'asthme allergique, l'expression d'IL-13 est en particulier réduite chez les souris IL-6KO suggérant un rôle majeur de l'IL-6 sur la sécrétion d'IL-13 dans ce modèle (Neveu et al. 2009). Pour finir, l'IL-6 inhibe l'expression de FOXP3 par les Treg et influence ainsi la plasticité des LTh au profit d'une polarisation Th17 (Kimura and Kishimoto 2010). Le rôle de cette dernière dans la polarisation Th17 serait essentiel dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques telles que la sclérose en plaque, la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn. De fait, le blocage ou une déficience du gène codant l'IL-6 réduit le développement de l'arthrite induite par le collagène, améliore l'asthme et empêche le développement de l'encéphalomyélite auto-immune induite chez la souris (Silver and Hunter 2010). Ces

données ont été exploitées en clinique humaine et ont permis le développement d'un anticorps bloquant le récepteur membranaire et le récepteur soluble, le tocilizumab, utilisé en cas d'échec des thérapies anti-TNF α dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Rincon 2012) et de la maladie de Crohn (Silver and Hunter 2010).

2.3. Activité de l'IL-6 sur les kératinocytes

Les kératinocytes expriment et répondent à l'IL-6 pour laquelle ils expriment la forme membranaire du récepteur. Dans l'épiderme humain, cette expression est restreinte à la couche basale proliférative de kératinocytes (Yoshizaki et al. 1990). Parmi les actions pléiotropes de l'IL-6, il a été montré qu'elle peut induire la prolifération de kératinocytes humains en culture (Grossman et al. 1989). Néanmoins, cette activité semble nécessiter une concentration d'IL-6 importante (50ng/ml) en comparaison aux activités prolifératives induites par d'autres facteurs comme l'EGF ou le TGF α (Hernandez-Quintero et al. 2006). De plus, le rôle de l'IL-6 sur les kératinocytes reste controversé. Il a tout d'abord été décrit que la production d'IL-6 par les kératinocytes sous le contrôle du promoteur du gène codant K14 ou que l'injection intradermique d'IL-6 recombinante n'induisait pas la prolifération des kératinocytes *in vivo* chez la souris. De plus, ces souris ne présentaient pas de phénotype cutané majeur et seule une hyperplasie était visible par histologie sans mise en évidence d'altération de la différenciation épidermique (Turksen et al. 1992). En revanche, chez le rat, l'injection d'une construction plasmidique codant l'IL-6 humaine et exprimée par les kératinocytes induit un phénotype cutané caractérisé par un infiltrat dermique et une hyperplasie. Ceci suggère des activités de l'IL-6 murine et humaine divergentes sur les kératinocytes (Sawamura et al. 1998). Plus récemment, un rôle de l'IL-6 dans la réparation de la barrière cutanée a également été décrit. Après destruction de la couche cornée par *tape stripping*, les souris IL-6KO présentent un retard de réparation de la couche cornée, inversé par l'injection d'hyper IL-6, une molécule chimérique constituée de sIL6R et de l'IL-6 (Wang et al. 2004). Ces observations indiquent que l'IL-6 pourrait avoir un rôle proinflammatoire direct sur les kératinocytes, toutefois ces activités sont à ce jour, peu décrites.

2.4. Rôle de l'IL-6 dans le psoriasis

Dans la peau de patients atteints de psoriasis, l'IL-6 est largement exprimée par les kératinocytes, les cellules endothéliales ainsi que par les leucocytes infiltrant le site inflammatoire (Grossman et al. 1989). De plus, les taux sériques d'IL-6, qui constituent un marqueur de l'activité inflammatoire et de réponse aux traitements, sont élevés chez ces patients psoriasiques (Saggini et al. 2014). Bien que les activités de l'IL-6 sur les kératinocytes soient peu décrites, cette dernière est fortement impliquée dans la physiopathologie du psoriasis en particulier par son rôle dans la polarisation des LTh17 et sur le recrutement de monocytes et de PNN circulants. Dans la peau, l'IL-6 est produite par de nombreuses cellules et notamment par les kératinocytes en réponse à l'IL-17A, le TNF α et l'IL-17F (Fujishima et al. 2010) ainsi que par les DC myéloïdes en réponse à l'IL-36 (Foster et al. 2014). Le blocage ou l'absence d'expression d'IL-6 induit une diminution de la sévérité du phénotype cutané dans différents modèles murins de psoriasis chez la souris (Lindroos et al. 2011; Croxford et al. 2014). Dans le modèle de psoriasis induit par l'expression d'IL-17A sous le contrôle du promoteur de K14, l'amélioration du phénotype par le blocage de l'IL-6 s'accompagne d'une diminution du nombre de PNN dans l'épiderme et de macrophages dans le derme (Croxford et al. 2014). De plus, les souris IL-6KO sont résistantes au modèle de dermatite psoriasiforme induit par injection intradermique d'IL-23, notamment parce qu'elles produisent peu d'IL-17 (Lindroos et al. 2011). A l'inverse, l'expression d'IL-22, également induite par l'IL-23, n'est pas modifiée. Néanmoins, les kératinocytes des souris IL-6KO ne semblent pas sensibles aux effets de l'IL-22 et n'expriment pas la sous-unité IL-22R. Lindroos et coll ont donc suggéré que l'IL-6 induit l'expression de l'IL-22R par les kératinocytes et pourrait ainsi sensibiliser les kératinocytes aux activités proinflammatoires de l'IL-22 (Lindroos et al. 2011). Dans le psoriasis comme dans d'autres pathologies médiées par les cytokines Th17, l'expression d'IL-6 en réponse aux cytokines Th17 formerait une boucle d'amplification essentielle au développement et au maintien de la pathologie (Ogura et al. 2008). L'IL-6 pourrait donc être une cible thérapeutique potentielle dans le traitement du psoriasis (Saggini et al. 2014).

3. L'oncostatine M

3.1. Généralités

Initialement, l'OSM a été isolée à partir de surnageants de culture de cellules de la lignée myéloïde U937 traitées au phorbol 12-myristate 13-acetate et décrite pour son

activité antiproliférative sur la lignée cellulaire A375 de mélanome humain par l'équipe de George. J. Todaro (Zarling et al. 1986). Après isolement de la fraction active, l'équipe de Todaro a montré que l'OSM possédait une masse moléculaire comprise entre 18 et 28kDa et qu'elle était stable à pH compris entre 2 et 11. La séquence de l'OSM n'ayant montré aucune homologie avec d'autres cytokines connues à l'époque pour leur capacité antiproliférative comme le TNF- β , les IFN- α , β et γ ou encore l'IL-1, cette équipe a conclu que l'OSM était un nouveau facteur de croissance impliqué dans la régulation pro ou antiproliférative de certaines cellules et qu'après injection *in vivo*, elle pourrait avoir des activités biologiques multiples semblables à celles décrites pour d'autres cytokines à cette époque.

Le gène codant l'OSM est situé sur le chromosome 22q12 chez l'homme (Malik et al. 1989) et sur le chromosome 11 chez la souris (Yoshimura et al. 1996). La structure de l'*OSM* et de l'*Osm* est commune pour ces deux espèces et se constitue de trois exons séparés par deux introns. Une partie située en 3' de l'*OSM/Osm* riche en nucléotides AU serait responsable d'une prolongation de 4 heures de la demi-vie des transcrits (Hermanns 2015). Ces séquences codent respectivement pour une séquence protéique de 258 acides aminés chez l'homme et 263 acides aminés chez la souris. La partie C-terminale de l'OSM murine serait plus longue que celle de l'OSM humaine et la comparaison des séquences n'a montré qu'une homologie de 48% entre ces deux espèces (Yoshimura et al. 1996). Chez l'homme, la séquence peptidique C-terminale est clivée lors de la maturation post-traductionnelle de l'OSM pour induire une forme active mature de 195 acides aminés. Les deux formes de l'OSM humaine, pro-OSM et la forme clivée seraient capables de se fixer aux récepteurs de l'OSM sur une lignée de cellules fibroblastiques COS2 néanmoins, la forme clivée présenterait une activité biologique plus importante que le précurseur sur l'inhibition de la croissance cellulaire d'une lignée A375 de mélanome humain (Linsley et al. 1990). Chez la souris, les deux formes protéiques de l'OSM sont également décrites, toutefois la pertinence biologique de la forme précurseur en comparaison à la forme clivée active n'est pas décrite (Hermanns 2015).

En outre, la structure de l'*OSM/Osm* est très semblable à celle décrite pour le *LIF/Lif*, ceci est associé au fait que ces gènes ne sont distincts que d'une dizaine de kilobases sur les chromosomes humains et murins, suggérant une évolution par duplication d'un gène ancestral. Néanmoins, l'alignement de séquences de ces deux gènes n'a pu établir qu'une

similarité de 30% chez l'homme (Rose et al. 1993). En comparant les structures tridimensionnelles du LIF et de l'OSM, Chollangi et coll. ont aussi montré que seule une boucle entre les hélices B et C plus grande pour l'OSM que pour le LIF diffère dans leur structure. Cette dernière serait responsable de la moindre affinité de l'OSM pour le LIF-R β (Chollangi et al. 2012). La région promotrice des gènes codant l'OSM présente un domaine riche en G-C ainsi qu'un domaine de fixation de C/EBP et de STAT-5 chez l'homme et chez la souris (Hermanns 2015). L'expression de l'OSM peut ainsi être induite sur des cellules hématopoïétiques par l'activation de nombreuses cytokines (IL-2, IL-3, GM-CSF...) activant la phosphorylation de STAT-5. Les prostaglandines E2 sembleraient aussi permettre l'expression d'OSM par les macrophages (Repovic and Benveniste 2002) ainsi que le LPS pour les DC (Suda et al. 2002). La synthèse *de novo* d'OSM peut ainsi être induite pour les macrophages (Repovic and Benveniste 2002), les DC (Suda et al. 2002), les mastocytes (Salamon et al. 2008) et les PNE (Tamura et al. 2002) tandis qu'un stock préformé serait présent dans le cytosol des PNN (Grenier et al. 1999). L'OSM est aussi produite par les LT et pourrait être associée à une polarisation Th1 (Rogge et al. 2000; Broxmeyer et al. 2002).

Chez l'homme, il existe deux récepteurs capables de lier l'OSM, formés des sous-unités LIF-R β et gp130 pour le récepteur de type I et des sous-unités OSM-R β et gp130 pour le récepteur de type II. Contrairement aux autres cytokines de la famille de l'IL-6, l'OSM se lie d'abord à la chaîne gp130 via le site II en formant un complexe de basse affinité puis aux chaînes LIF-R β ou OSM-R β via le site III. Seule la liaison de la chaîne gp130 à l'OSM permet d'augmenter l'affinité de cette cytokine pour les autres sous-unités. Son récepteur de type II lui confère des activités biologiques spécifiques en comparaison aux activités décrites pour le LIF. Pour exemple, seule l'OSM stimule la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales. La sous-unité OSM-R β n'est pas exprimée par les lymphocytes mais est exprimée par les monocytes stimulés par le LPS (présentant un phénotype M1) (Fuentes-Duculan et al. 2010). L'expression de l'OSM-R β est aussi retrouvée dans la peau, la trachée ainsi que dans le thymus chez l'homme (Dillon et al. 2004).

L'équipe de Miyajima a montré que contrairement à l'OSM humaine, l'OSM et le LIF murin ne partagent pas le même récepteur (Ichihara et al. 1997). En effet, chez la souris, l'action de l'OSM est majoritairement exercée par sa liaison au récepteur de type II (Hara et al. 1997; Ichihara et al. 1997). Plus récemment, une étude portant sur le remodelage osseux

a montré que la forme murine de l'OSM pouvait également se lier avec une très faible affinité au récepteur composée du LIF-R β /gp130 murin exprimé par les ostéocytes et les ostéoblastes, et stimulerait ainsi la formation de tissu osseux (Walker et al. 2010; Walker et al. 2016). La liaison de l'OSM murine au récepteur du LIF murin serait ainsi capable d'induire la phosphorylation de STAT-3 mais pas celle de STAT-1 par les ostéoblastes issus de souris OSM-R β KO (Walker et al. 2016). Une forme inhibitrice soluble de l'OSM-R β a également été décrite et détectée dans le sérum humain. Cette dernière serait induite par l'OSM et ne serait active qu'en présence du récepteur sgp130 soluble (Hermanns 2015). Cependant, la pertinence biologique de ce récepteur n'a pas encore été identifiée (Diveu et al. 2006). Enfin, l'OSM se lie à la matrice extracellulaire dans une conformation biologiquement active qui la protège des protéases (Ryan et al. 2015). Cette fixation décrite pour d'autres cytokines (PDGF, IL-2) a un effet majeur sur la biodisponibilité de ces dernières dans le microenvironnement tumoral et leur régulation dans des contextes inflammatoires. L'OSM est la seule cytokine de la famille de l'IL-6 capable de se fixer spécifiquement aux fibres de collagènes de type I, III, IV et VI. Cette propriété aurait un rôle dans l'activité proliférative et profibrogénique de l'OSM dans des contextes de remodelage tissulaire ou de cicatrisation (Somasundaram et al. 2002; Ryan et al. 2015).

3.2. *OSM et homéostasie*

Au regard de la diversité des voies de signalisation induite par l'OSM, de nombreuses fonctions homéostatiques incluant l'hématopoïèse, le développement du système nerveux central et la régénération hépatique sont décrites pour être régulées par cette cytokine (Richards 2013). Les souris déficientes pour le gène codant l'OSM présentent une diminution du nombre de neurones nociceptifs associés à la douleur (Morikawa et al. 2004), une hypoplasie thymique et un défaut d'élimination des LT apoptotiques responsable du développement de glomérulonéphrites avec l'âge (Esashi et al. 2009). Inversement, des souris transgéniques surexprimant l'OSM affichent une hyperplasie thymique associée à une forte prolifération de LT intra et extra-thymique (Clegg et al. 1996). Par ailleurs, il a été décrit que des souris déficientes en STAT-4 ayant un défaut de polarisation Th1 présentent une diminution de l'expression d'OSM. Dans ce modèle, l'injection d'OSM recombinante permet de rétablir le déficit en cellules progénitrices hématopoïétiques observé chez les souris STAT-4KO (Broxmeyer et al. 2002). En accord avec cette étude, il a été décrit que les souris OSM-

R β KO ont aussi un phénotype caractérisé par une diminution du nombre de cellules progénitrices hématopoïétiques (Tanaka et al. 2003). L'OSM semble donc avoir un rôle dans les fonctions de sélection thymique et serait requise dans le microenvironnement hématopoïétique (Richards 2013).

3.3. OSM et inflammation

L'OSM possède des effets pro ou anti-inflammatoires dépendants du tissu où elle est exprimée et probablement de la durée du signal activateur. En phase inflammatoire aiguë, l'OSM est rapidement synthétisée par les macrophages et libérée par les PNN à partir d'un stock préformé (Grenier et al. 1999). Chez la souris, l'injection sous-cutanée d'OSM induit l'activation de cellules endothéliales et l'expression des molécules d'adhésion telles que la P-selectine et des chimiokines comme CCL2, importantes pour l'extravasation des PNN (Modur et al. 1997). Cette cytokine induit également l'expression de VEGF par les cellules endothéliales et favorise la néo-angiogenèse (Richards 2013). Les activités de l'OSM sur le remodelage cellulaire, l'induction de molécules d'adhésion et de chimiokines, les processus de migration, de différenciation et de prolifération cellulaires participeraient donc à la réponse inflammatoire.

L'expression de l'OSM est augmentée dans de nombreuses pathologies inflammatoires et auto-immunes. Afin d'étudier le rôle pathologique potentiel de cette cytokine, l'équipe de Carl Richards a mis au point une construction adénovirale codant pour le gène de l'OSM murine (AdOSM) et capable d'induire une surexpression de l'OSM une fois injectée *in vivo* chez la souris (Kerr et al. 1999). L'injection intramusculaire d'AdOSM active la sécrétion de protéines de phase aigüe par le foie et induit une augmentation des taux sériques d'IL-6 et de SAA, suggérant l'induction d'une réponse inflammatoire systémique (Kerr et al. 1999). L'administration intra-nasale d'AdOSM induit un dépôt de matrice extracellulaire dans les poumons de souris (Wong et al. 2014). De plus *in vitro*, l'OSM induit une transformation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes (Nagahama et al. 2013). L'OSM aurait donc un rôle profibrotique dans un contexte pulmonaire. En accord avec ces activités, une forte concentration d'OSM est détectée dans les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de fibrose idiopathique pulmonaire et dans les expectorations de patients atteints d'asthme obstructif sévère (Mozaffarian et al. 2008; Simpson et al. 2009). De plus, l'OSM agit en synergie avec l'IL-4 et l'IL-13 pour induire

l'expression de CCL11 par les cellules musculaires lisses des voies respiratoires (Faffe et al. 2005) ainsi que par une lignée de fibroblastes. Par conséquent, elle serait impliquée dans le recrutement de PNE et pourrait avoir un rôle majeur dans l'asthme allergique (Fritz et al. 2011). Dans ce modèle d'inflammation pulmonaire médiée par l'administration intranasale d'AdOSM, l'équipe de Carl Richards a aussi montré que cette cytokine active les lymphocytes B et conduit à la formation de tissus lymphoïdes associées aux bronches. (Botelho et al. 2013). La caractérisation des mécanismes mis en jeu dans ce modèle a montré que l'OSM participe au recrutement des PNE en activant la phosphorylation de STAT-6 au même titre que les cytokines Th2 (Fritz et al. 2011). Par ailleurs, la production de cytokines Th2 (IL-5, IL-13, IL-10) et de chimiokines (CCL24, CCL2) retrouvées dans ce modèle est dépendante de la capacité de l'OSM à induire l'expression d'IL-6 (Botelho et al. 2013). En revanche, le rôle de l'OSM dans la fibrose pulmonaire n'est pas associé à l'activation de STAT-6 et pourrait être spécifique de cette cytokine. Enfin, les travaux menés sur les activités de cette cytokine dans le tissu pulmonaire ont aussi montré que l'OSM altère la perméabilité de la barrière mucosale en inhibant l'expression des jonctions serrées (Pothoven et al. 2015).

Dans le foie, l'expression d'OSM participe à la régénération hépatique tandis qu'une expression soutenue pourrait participer à la fibrose hépatique (Richards 2013). Il a en particulier été décrit que l'expression d'OSM est augmentée chez les patients présentant une cirrhose hépatique. Par ailleurs, l'injection intramusculaire d'AdOSM chez la souris, induit une forte expression d'IL-33 par les cellules endothéliales hépatiques, une alarmine décrite pour être associée à la fibrose hépatique (Arshad et al. 2015). Les activités de l'OSM dans la fibrose hépatique seraient uniquement médiées par le récepteur de type I. L'expression du LIF-R β est en effet augmentée dans les cirrhoses tandis que l'expression de l'OSM-R β n'est pas détectée (Richards 2013).

A l'inverse, dans la polyarthrite rhumatoïde, l'OSM agit en synergie avec l'IL-17, le TNF- α ou l'IL-1 α pour induire l'expression de métalloprotéinases par les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes. L'activité de l'OSM sur les fibroblastes synoviaux serait cette fois ci médiée par le récepteur de type II (Le Goff et al. 2014). Ainsi, l'OSM favorise la dégradation de la matrice extracellulaire et l'inflammation dans cette pathologie (Moran et al. 2009; Le Goff et al. 2014). L'OSM y est produite par les macrophages présents dans le liquide synovial et son expression est corrélée avec le taux de destruction du cartilage et le

niveau d'expression d'autres marqueurs inflammatoires (Cawston et al. 1998). Chez la souris, l'injection d'AdOSM seule ou en synergie avec l'IL-1 induit une inflammation de l'articulation du genou caractérisée par un infiltrat de cellules mononucléées, la production de métalloprotéinases, l'inhibition des protéines impliquées dans le contrôle de ces dernières, ainsi qu'une dégradation du cartilage (Langdon et al. 2000; Rowan et al. 2003). En outre, l'injection d'anticorps anti-OSM améliore significativement l'inflammation synoviale dans ces modèles (Plater-Zyberk et al. 2001).

L'OSM serait aussi impliquée dans les pathologies cardiaques et possède une activité inhibitrice de la différenciation des cardiomyocytes favorisant le remodelage du myocarde. Elle exerce ainsi un rôle protecteur après un dommage cardiaque mimant un infarctus du myocarde chez la souris. En revanche, l'exposition prolongée à l'OSM est associée à une diminution de la contractilité des cardiomyocytes pouvant conduire à une insuffisance cardiaque (Richards 2013). De fait, les anticorps bloquants anti-OSM sont également efficaces dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chez la souris (Poling et al. 2014).

Enfin, l'OSM est aussi décrite pour être rapidement secrétée par les macrophages après lésions ou fractures osseuses. Dans ce contexte, l'OSM favoriserait l'ostéogenèse et serait ainsi impliquée dans la réparation osseuse. De manière intéressante, il a été décrit que l'OSM est aussi impliquée dans l'activation des ostéoclastes et le remodelage de la matrice osseuse. Les effets contradictoires de cette cytokine dans le remodelage osseux seraient imputables aux récepteurs de type I ou de type II respectivement impliqués dans l'ostéogenèse et dans la résorption osseuse (Guihad et al. 2015).

La description du rôle de l'OSM dans ces différentes conditions physiopathologiques met en évidence le pléiotropisme de cette cytokine, notamment la dualité de son rôle, tantôt dans les processus de réparation, tantôt dans les processus de dégradation tissulaire.

3.4. OSM et kératinocytes

Les kératinocytes humains expriment uniquement le récepteur de type II (OSM-R β /gp130) et répondent à l'OSM par la phosphorylation de STAT-3, STAT-1 et par l'activation des MAPK (ERK1/2, JNK, p38) (Boniface et al. 2007a) ; données non publiées du LITEC). Plusieurs études transcriptomiques ont été réalisées sur des cultures de kératinocytes primaires humains normaux (*Normal Human Epidermal Keratinocyte NHEK*) indifférenciés

ainsi que sur des RHE et ont montré que l'OSM est active sur ces deux modèles *in vitro* (Finelt et al. 2005; Gazel et al. 2006; Boniface et al. 2007a). D'une manière générale, la classification des gènes modulés par l'OSM démontre son implication dans différents processus physiologiques comprenant la stratification et la différenciation épidermique, le métabolisme, l'immunité innée et la réponse inflammatoire. Plus précisément, l'OSM inhibe l'expression de gènes impliqués dans la différenciation épidermique tels que K1 et K10, la filaggrine, l'involucrine et la loricrine ainsi que des enzymes impliquées dans la maturation de la couche cornée (Finelt et al. 2005; Gazel et al. 2006; Boniface et al. 2007a). En outre, l'OSM induit fortement l'expression des protéines S100 ainsi qu'une hyperplasie, une hypogranulose et une parakératose des RHE (Boniface et al. 2007a). Les fonctions de l'OSM dans ce modèle sont redondantes à celles décrites pour l'IL-22 et seraient majoritairement dépendante de l'activation de STAT-3 (Boniface et al. 2005a; Boniface et al. 2007a). Les analyses *microarray* et *macroarray* ont aussi décrit que l'OSM régule positivement l'expression d'enzymes protéolytiques, de protéines de jonctions intercellulaires comme DSG2 et DSG3 et de chimiokines comme CXCL5 et CXCL8 (Gazel et al. 2006; Boniface et al. 2007a). L'ensemble de ces travaux démontrent que l'OSM pourrait exercer un rôle majeur dans l'inhibition de la différenciation épidermique et la réponse proinflammatoire des kératinocytes et ainsi, être impliquée dans l'inflammation cutanée (Finelt et al. 2005; Gazel et al. 2006; Boniface et al. 2007a). Le LITEC a en particulier décrit que l'OSM est surexprimée dans les lésions de psoriasis, de DA et d'angiodermite nécrotique (Boniface et al. 2007a; Giot et al. 2013). Gazel et coll. propose une conclusion différente quant à l'implication de l'OSM dans le psoriasis. Cette équipe suggère en effet que l'OSM pourrait avoir un rôle anti-inflammatoire dans cette pathologie. Cette hypothèse s'appuie sur la description de gènes modulés par l'OSM sur les RHE. Parmi ces derniers, STAT-1 et la voie de signalisation de l'IL-1 sont inhibés tandis que l'expression des sous-unités IL4R et IL-13R du récepteur de l'IL-4 et de l'IL-13 est induite. Par ce mécanisme ces auteurs proposent que l'OSM puisse avoir un rôle bénéfique dans le psoriasis en inhibant la voie Th1 au profit de la polarisation Th2 (Gazel et al. 2006).

4. L'interleukine-31

4.1. Généralités

L'IL-31 a été découverte par recherche de ligand pour le récepteur composé de la sous-unité IL-31RA et gp130. L'IL-31RA, elle a été récemment identifiées par recherche de séquences homologues au gp130 et à l'IL-6R α chez l'homme (Ghilardi et al. 2002). Chez l'homme, le gène codant l'IL-31 est situé sur le chromosome 12 et code pour une séquence peptidique de 140 acides aminés tandis qu'il est situé sur le chromosome 5 chez la souris et code pour 141 acides aminés. De plus, la comparaison de ces séquences n'a montré que 31% d'homologie entre l'homme et la souris (Dillon et al. 2004). L'IL-31RA induit l'expression de nombreux isoformes du récepteur parmi lesquels la forme contenant 192 acides aminés dans la partie intracellulaire du récepteur serait la plus active (Hermanns 2015). L'IL-31 est exprimée dans de nombreux tissus épithéliaux et est fortement produite par les LT dans un contexte de polarisation Th2, en particulier par les LT mémoires CLA $^+$ (Dillon et al. 2004; Bilsborough et al. 2006). Le promoteur de l'IL-31 est composé d'une région de liaison de STAT-6 activé par l'IL-4 ainsi que d'une région de fixation pour le NF- κ B. Cette dernière pourrait être responsable du rôle synergique de l'IL-33 dans l'expression d'IL-31 par les LTh2 en réponse à l'IL-4 (Hermanns 2015). De surcroit, il a été décrit que l'expression d'IL-31 par les LT est rapidement et spécifiquement induite par les superantigènes de *S. aureus* suggérant un rôle de cette cytokine dans la DA (Sonkoly et al. 2006). A l'inverse, l'IL-31RA est faiblement exprimée dans les tissus à l'exception des ganglions spinaux de la racine dorsale (Sonkoly et al. 2006). Parmi les PBMC humains, seuls les PNE exprimeraient constitutivement l'IL-31RA (Cheung et al. 2010), tandis qu'une pré-stimulation par l'IFN- γ est nécessaire à l'expression de ce récepteur par les DC et les monocytes (Dillon et al. 2004; Horejs-Hoeck et al. 2012). Plus récemment, il a aussi été décrit que l'activation de STAT-6 par l'IL-4 et l'IL-13 induit également l'expression de ce récepteur par les macrophages murins (Edukulla et al. 2015). Enfin, les kératinocytes humains expriment aussi le récepteur de l'IL-31 et sont donc sensibles à cette cytokine. La stimulation de kératinocytes par l'IL-31 induit en particulier la phosphorylation de STAT-1, STAT-3, STAT-5. Des données non publiées de notre laboratoire ont confirmé l'activité de cette cytokine sur les kératinocytes humains en culture. Cependant, la phosphorylation de STAT-3 et STAT-1 induite par l'IL-31 semble être moins importante que celle générée par l'OSM (Figure 22). Les différences d'activité de l'OSM, de l'IL-6 et de l'IL-31 sur la phosphorylation de STAT-3 et STAT-1 ont aussi été décrites dans d'autres types cellulaires comme les pneumocytes et les cellules épithéliales bronchiques (Chattopadhyay et al. 2007). De plus, l'expression de l'IL-31RA est inhibée

jusqu'à disparaître durant le processus de différenciation des kératinocytes humains suggérant alors que dans un épiderme normal, l'expression de l'IL-31RA est restreinte aux cellules indifférenciées de la couche basale (Heise et al. 2009). Pour finir, l'IFN-γ peut aussi induire l'expression d'IL-31RA par des cultures de kératinocytes humains qu'ils soient dans un état prolifératif ou différencié (Heise et al. 2009).

4.2. IL-31 et prurit

Les souris transgéniques surexprimant l'IL-31 dans l'ensemble des tissus développent une inflammation cutanée caractérisée par un épaississement de l'épiderme, une alopecie et un prurit intense (Dillon et al. 2004). En histologie, la peau de ces souris présente une acanthose, une hyperkératose et un infiltrat immunitaire composé de mastocytes. Ceci suggère que l'IL-31 peut induire une inflammation cutanée et pourrait être impliquée dans les dermatoses inflammatoires (Dillon et al. 2004). Plus récemment, il a été décrit que la concentration d'IL-31 dans le sérum de patients atteints de DA est corrélée à la sévérité de la maladie (Raap et al. 2008). Par ailleurs, l'expression de l'IL-31 est augmentée dans les lésions de DA ainsi que dans les lésions de prurigo nodulaire de Hyde, une autre dermatose caractérisée par un prurit intense, tandis qu'elle est normale dans les lésions psoriasiques pour lesquelles le prurit n'est pas un critère sémiologique (Sonkoly et al. 2006). L'expression de la sous-unité IL-31RA est aussi plus intense dans les kératinocytes et dans les macrophages de peaux atopiques que de peaux saines (Bilsborough et al. 2006).

Le lien entre IL-31 et le prurit a ensuite été démontré par le fait que l'injection cutanée ou intrathécale d'IL-31 induit un comportement de grattage chez la souris, proportionnellement à la dose d'IL-31 injectée (Cevikbas et al. 2014). De plus, les corps cellulaires des fibres nerveuses démyélinisées responsables de la sensation de démangeaisons et de la douleur sont localisées dans les ganglions spinaux de la racine dorsale où l'expression de l'IL-31RA est fortement détectée (Sonkoly et al. 2006). La description des mécanismes impliqués dans la sensation de grattage induite par l'IL-31 démontre que cette dernière n'est pas dépendante du relargage d'histamine par les mastocytes mais requiert la présence de canaux impliqués dans la nociception et exprimés par les neurones afférents (Cevikbas et al. 2014). Dans le modèle murin NC/Nga, il est décrit que l'injection d'anticorps bloquants anti-IL-31 réduit significativement le comportement de grattage des souris sans améliorer le phénotype cutané (Grimstad et al. 2009) tandis que les

deux paramètres sont améliorés dans un autre modèle de DA chronique induit par sensibilisation au Trinitro-chloro-benzene (Kasutani et al. 2014).

4.3. IL-31 et barrière cutanée

La stimulation d'un modèle de RHE par l'IL-31 induit une altération de la barrière cutanée caractérisée par une hypogranulose, un épiderme plus fin associé à une diminution des marqueurs de différenciation (FLG, IVL, K10), ainsi qu'une désorganisation de l'expression des marqueurs K14 et intégrine β 4 de la couche basale (Cornelissen et al. 2012). Le récepteur de l'IL-31RA étant faiblement exprimé par les kératinocytes, cette même équipe a ensuite utilisé une lignée de kératinocytes humains exprimant artificiellement l'IL-31RA sous le contrôle d'un vecteur lentiviral pour décrire les activités de l'IL-31 sur les kératinocytes humains. Les peaux reconstruites générées à partir de cette lignée et stimulées par l'IL-31 présentent alors une altération de la fonction barrière cutanée induite par l'inhibition de protéines de la couche cornée et une modification de la composition du ciment lipidique extracellulaire. L'activité de l'IL-31 sur la fonction de barrière serait médiée indirectement par l'IL-20 et l'IL-24, l'IL-31 induisant leur expression dans ces modèles (Cornelissen et al. 2012; Hanel et al. 2016).

4.4. IL-31 et inflammation

La stimulation des PNE par l'IL-31 retarde l'apoptose de ces cellules et induit la production de chimiokines (CXCL1, CXCL8, CCL2, CCL18) et de cytokines (IL-1 β et IL-6). De même, les DC秘ètent de nombreuses chimiokines et cytokines en réponse à IL-31 en particulier du TNF- α , CCL22, CCL5 et CCL2 décrits pour leur rôle favorisant un contexte inflammatoire Th2 (Horejs-Hoeck et al. 2012). Enfin, dans leur modèle de peaux reconstruites surexprimant l'IL-31RA, Hanel et coll. ont aussi décrit que l'IL-31 stimule indirectement la production de PAM par les kératinocytes *via* l'IL-1 α (Hanel et al. 2016). L'IL-31 pourrait donc contribuer indirectement au recrutement de cellules immunitaires et à l'altération des fonctions de barrière cutanée *via* ses effets sur les cellules immunitaires et les kératinocytes.

Objectif de la thèse

Objectif de la thèse

Ce projet de thèse s'intègre dans l'axe de recherche portant sur le rôle des cytokines dans l'inflammation cutanée du Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC EA-4331). L'analyse des lésions cutanées de patients atteints de psoriasis ou de DA a mis en évidence une surexpression d'OSM dans ces lésions. Cette cytokine, jusqu'alors peu étudiée dans la physiopathologie cutanée, exerce une activité proinflammatoire sur les kératinocytes et modifie en profondeur le développement d'épidermes reconstruits humains (Boniface et al. 2007a). Parmi les cytokines décrites par le laboratoire pour agir sur les kératinocytes humains, l'OSM semble être majoritairement impliquée dans l'altération de la différenciation kératinocytaire et l'induction de l'hyperplasie épidermique, caractéristiques des lésions cutanées de psoriasis et de DA (Guilloteau et al. 2010; Rabeony et al. 2014). L'analyse *in vitro* des activités de l'OSM sur les kératinocytes humains et son implication potentielle dans les pathologies inflammatoires chroniques cutanées ont abouti au dépôt d'un portefeuille de brevets portant sur des stratégies de blocage de cette cytokine. A mon arrivée au laboratoire, un projet visant à étudier l'activité de l'OSM *in vivo* chez la souris a été initié. L'objectif de ces travaux de thèse a donc été d'apporter la preuve de concept *in vivo* que l'OSM est impliquée dans l'inflammation cutanée, en utilisant différents modèles murins. Au regard des activités redondantes des cytokines, nous avons souhaité comparer l'activité de l'OSM à celles de cytokines de la famille de l'IL-6 décrites pour être actives sur les kératinocytes. Les données de littérature et les travaux de notre laboratoire nous ont amené à nous focaliser sur le rôle de l'IL-6, de l'IL-31 et de l'OSM dans l'inflammation cutanée.

Notre premier objectif a été de comparer les activités de l'OSM à celles de l'IL-6 et de l'IL-31 dans l'inflammation cutanée chez la souris. Nous avons pour cela, utilisé deux approches méthodologiques. Dans un premier temps, nous avons réalisé des stimulations de cultures primaires de kératinocytes murins par différentes concentrations de cytokines recombinantes ou à l'aide d'adénovirus recombinant permettant la surexpression des cytokines. La réponse inflammatoire des kératinocytes à ces cytokines a ensuite été analysée au niveau transcriptionnel par l'étude de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire tels que les PAM et les chimiokines, ainsi que ceux codant des protéines de

différenciation épidermique. Dans un deuxième temps, cette approche *in vitro*, a été complétée par la mise au point d'un modèle d'inflammation cutanée *in vivo* consistant à injecter en intradermique des adénovirus recombinants dans l'oreille de souris C57BL/6J, permettant ainsi une surexpression de la cytokine d'intérêt. L'inflammation cutanée induite par ces cytokines a été étudiée par des approches clinique, histologique, transcriptionnelle et protéique. Notre deuxième objectif était d'apporter la preuve de concept que l'OSM est une cible thérapeutique pertinente dans les pathologies inflammatoires cutanées en particulier dans le psoriasis et la DA. Pour se faire, nous avons utilisé deux modèles d'inflammation cutanée par application topique de composés actifs, l'un mimant une dermatite psoriasiforme par application d'IMQ (AldaraTM), le second mimant une DA par application de calcipotriol. Afin d'étudier le rôle de l'OSM dans ces modèles, nous disposions de souris déficientes pour le gène codant l'OSM (OSMKO) ainsi que d'anticorps bloquants anti-OSM murin. Le phénotype inflammatoire des souris a été analysé d'un point de vue clinique, histologique, au niveau transcriptionnel et par immunohistofluorescence. Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'axe I.

Afin d'étudier les activités des cytokines, nous avons été amenés à développer la culture de kératinocytes primaires murins. Toutefois, ces cultures primaires de kératinocytes en monocouche ne permettant pas de reproduire les caractéristiques physiologiques d'un épiderme normal, nous avons également développé un modèle en trois dimensions d'épiderme reconstruit murin à partir de kératinocytes primaires issus de sourceaux nouveau-nés. Ce modèle permet de reproduire fidèlement un épiderme murin normal et de comparer la réponse inflammatoire de culture de kératinocytes en monocouche à celle d'épidermes reconstruits, en réponse aux cytokines proinflammatoires ainsi qu'à différents PAMPs. La caractérisation de ce modèle constitue le troisième objectif de cette thèse et fait l'objet de l'axe II. Ces travaux de thèse ont été réalisés en étroite collaboration avec l'entreprise BIOalternatives (Gençay) qui a apporté son expertise dans le développement des épidermes reconstruits ainsi qu'avec le Pr Carl Richards (Mc Master University, Canada) et le Dr Frédéric Blanchard de l'équipe INSERM-UMR 937 de l'Université de Nantes, qui ont développé et nous ont fourni les adénovirus recombinants permettant la surexpression des cytokines pour les études *in vitro* et *in vivo*.

Axe 1. Rôle de l'OSM, de l'IL-6 et de l'IL-31 dans l'inflammation cutanée chez la souris

Axe I. Rôle de l'OSM, de l'IL-6 et de l'IL-31 dans l'inflammation cutanée chez la souris.

1. Présentation de l'article “Oncostatin M overexpression induces skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation”

L'OSM est une cytokine de la famille de l'IL-6 dont les membres exercent leur activité par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques présentant une chaîne gp130 commune ; ceci suggérant de potentielles activités redondantes des cytokines de cette famille au sein de nombreux processus biologiques. Parmi ces cytokines, l'IL-6 et l'OSM ont été décrites pour induire la phosphorylation de STAT-3 par les kératinocytes humains et sont surexprimées dans le psoriasis et la DA. De fait, elles pourraient avoir un rôle proinflammatoire dans la physiopathologie de ces dernières. Aucune étude comparative n'ayant été menée sur cette famille de cytokines, nous avons souhaité comparer l'activité de l'OSM et de l'IL-6 *in vitro* sur les cultures primaires de kératinocytes murins (*Normal Murine Epidermal Keratinocyte*, NMEK) et *in vivo* chez la souris. Pour se faire, nous avons utilisé des cytokines recombinantes et des adénovirus recombinants surexprimant l'OSM (AdOSM) et l'IL-6 (AdIL-6), ainsi que la protéine GFP (AdGFP) servant de protéine contrôle non pertinente de l'inflammation cutanée. Ceci a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Frédéric Blanchard de l'INSERM UMR 957, à Nantes et du Pr. Carl D. Richards du *McMaster Immunology Research Centre*, qui ont mis au point les constructions adénovirales. Ce modèle *in vitro* nous a permis de montrer que l'OSM est plus active que l'IL-6 sur l'induction d'un phénotype inflammatoire et sur l'inhibition de la différenciation. De plus, la stimulation combinée de l'OSM et de l'IL-6 ne montre pas de synergie. L'OSM induit en particulier la chimiokine CXCL3 tandis qu'elle inhibe l'expression de CCL2 et CCL5 par les kératinocytes. L'OSM est aussi fortement impliquée dans la production de PAM comme S100A8 et S100A9, induit l'expression de K6 et K16 et inhibe l'expression des protéines de la différenciation épidermique K1, K10, la filaggrine et l'involucrine.

Dans un second temps, nous avons comparé le rôle de l'OSM et de l'IL-6 *in vivo* dans un modèle murin par injection intradermique d'AdOSM et d'AdIL-6 dans l'oreille de souris C57BL/6J. La surexpression d'OSM pendant sept jours induit les signes cliniques d'une inflammation cutanée caractérisée par un érythème, un aspect squameux et un épaississement de l'oreille. A l'inverse, aucun signe clinique d'inflammation persistante n'a pu être mis en évidence chez les souris injectées par AdIL-6, de même que pour les souris contrôles AdGFP. D'un point de vue histologique, l'inflammation cutanée induite par l'OSM est caractérisée par une hyperplasie épidermique associée à la prolifération des kératinocytes de la couche basale, une spongiose, une parakératose et une hypogranulose. En accord avec ces caractéristiques histologiques, une diminution de l'expression de K10 et de la loricrine a été mise en évidence par immunohistofluorescence et a ainsi confirmé l'altération de la différenciation épidermique. A l'inverse, aucune caractéristique inflammatoire histologique notable n'a été mise en évidence chez les souris AdIL-6. Les souris surexprimant l'OSM présentent aussi un infiltrat immunitaire dermique caractérisé par la présence de granulocytes et de macrophages, associé à une forte expression de chimiokines (CXCL3, CCL2, CCL5, CCL20), de PAM (S100A8 et S100A9), de facteurs pro-angiogéniques (VEGF-A et VEGF-D) ainsi que de cytokines Th1 et Th2 (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-13). Ce modèle nous a permis de montrer que l'OSM est plus active que l'IL-6 sur les kératinocytes murins et qu'elle permet de reproduire une inflammation cutanée *in vivo* chez la souris suggérant un rôle proinflammatoire majeur de cette cytokine en comparaison à celui de l'IL-6. Enfin, nous avons souhaité caractériser le rôle de l'OSM dans un modèle d'inflammation cutanée psoriasiforme induit par application d'IMQ (AldaraTM). Néanmoins, dans ce modèle, les souris déficientes pour le gène codant l'OSM ainsi que le blocage de cette cytokine par injection d'anticorps neutralisants n'ont pas permis de mettre en évidence une réduction significative de l'inflammation cutanée suggérant que d'autres cytokines présentes dans la peau inflammatoire et activant la voie de signalisation de STAT-3 exercent, selon un mécanisme de compensation, des activités redondantes à celle de l'OSM dans ce modèle.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *The European Journal of Immunology* ainsi que de deux communications orales (CCC 2013, Croizic, CARD 2013 Brest).

Des expériences complémentaires visant à approfondir la description des activités de l'OSM sur les NMEK par analyse transcriptomique, à comparer le rôle de l'OSM et de l'IL-31 dans l'inflammation cutanée et à étudier le rôle de l'OSM dans un modèle murin de DA induit par application topique de calcipotriol ont été réalisées et sont présentées ici en résultats complémentaires de l'article 1.

2. Etude du profil transcriptomique de cultures primaires de kératinocytes murins stimulés par l'OSM

Nous montrons que l'OSM est plus puissante que l'IL-6 dans l'induction d'une réponse inflammatoire et que cette cytokine exerce une activité proinflammatoire majeure sur les NMEK en comparaison à celle de l'IL-6. Afin de caractériser plus finement cette réponse, nous avons stimulé des NMEK issus de souriceaux nouveau-nés à l'aide d'OSM recombinante (10ng/ml) pendant 6h et 24h. Après extraction des ARN totaux et transcription inverse, le profil transcriptomique des NMEK stimulés par l'OSM a été comparé à celui des NMEK non stimulés (NS) à l'aide de puce à ADN *full genome* Mouse gene 2.1 ST array (Affymetrix). Cette expérience a été réalisée en collaboration avec l'entreprise BIOAlternatives qui dispose d'une plateforme Affymetrix pour l'analyse de puces à ADN. Parmi les 30 000 gènes analysés, l'OSM module l'expression de 600 gènes. Parmi ces derniers, seuls quelques gènes sont régulés spécifiquement à 6h tandis que la plupart sont à la fois induits ou inhibés à 6h et 24h (Figure 23). L'annotation fonctionnelle de ces gènes a été réalisée à l'aide du logiciel *Data base for Annotation, Vizualization and Integrated Discovery* (DAVID). Les gènes ont été classés selon les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués (Figure 24 et 25).

Parmi les gènes dont l'expression est augmentée par l'OSM dès 6h chez la souris, sont retrouvés certaines protéines associées à la voie d'activation de STAT-3 comme *Jak2*, *Stat3* et *Socs3*. Alors que *Jak2* et *Stat3* sont surexprimés de manière transitoire, la surexpression de *Socs3* ($\pm 15x$ NS) est maintenue à 24h. Ce dernier est décrit pour se fixer à la sous-unité gp130 et inhiber la phosphorylation des protéines JAK associées au récepteur des cytokines de la famille de l'IL-6 (Carow and Rottenberg 2014). Par ce mécanisme, SOCS3 inhibe l'activation de STAT3, STAT1 et STAT4 et pourrait exercer un rétrocontrôle sur les voies de signalisation induite par l'OSM. Chez l'homme, la stimulation de NHEK par l'OSM, l'IL-6 ou

l'IL-22 n'induit par l'expression de SOCS3 conduisant à une phosphorylation prolongée de STAT-1 et STAT-3 (Zeitvogel et al. 2012). Ces auteurs suggèrent ensuite que la phosphorylation prolongée de STAT-3 et STAT-1 pourrait être associée aux pathologies inflammatoires présentant un profil cytokinique Th1/Th17 comme le psoriasis tandis que l'expression de SOCS3 serait associée à un profil Th2. En accord avec cette hypothèse, l'expression de SOCS3 est fortement induite dans les lésions atopiques en comparaison à celle de lésions psoriasiques ou de peaux saines (Horiuchi et al. 2006). A l'inverse, une étude plus ancienne décrit que l'expression de SOCS3, SOCS1 et SOCS2 est plus importante dans les lésions de psoriasis et de dermatite de contact irritante au nickel que dans les lésions atopiques (Federici et al. 2002). Notre étude transcriptomique indique que contrairement aux NHEK, les NMEK répondent à l'OSM par une forte expression de SOCS3 suggérant une inhibition au moins partielle de la phosphorylation de STAT-3. L'analyse par western blot de la phosphorylation de STAT-3 indique que ce facteur de transcription est fortement phosphorylé en réponse à l'OSM (données non montrées). Cette phosphorylation est en partie inhibée après 1h de stimulation puis à nouveau augmentée à 6h. Ces données préliminaires semblent indiquer que, malgré l'expression de SOCS3, la phosphorylation de STAT-3 est maintenue par les NMEK en réponse à l'OSM. Ces données préliminaires doivent cependant être confirmées sur une cinétique plus longue ainsi que par l'analyse de la phosphorylation de STAT-1, une autre cible de SOCS3.

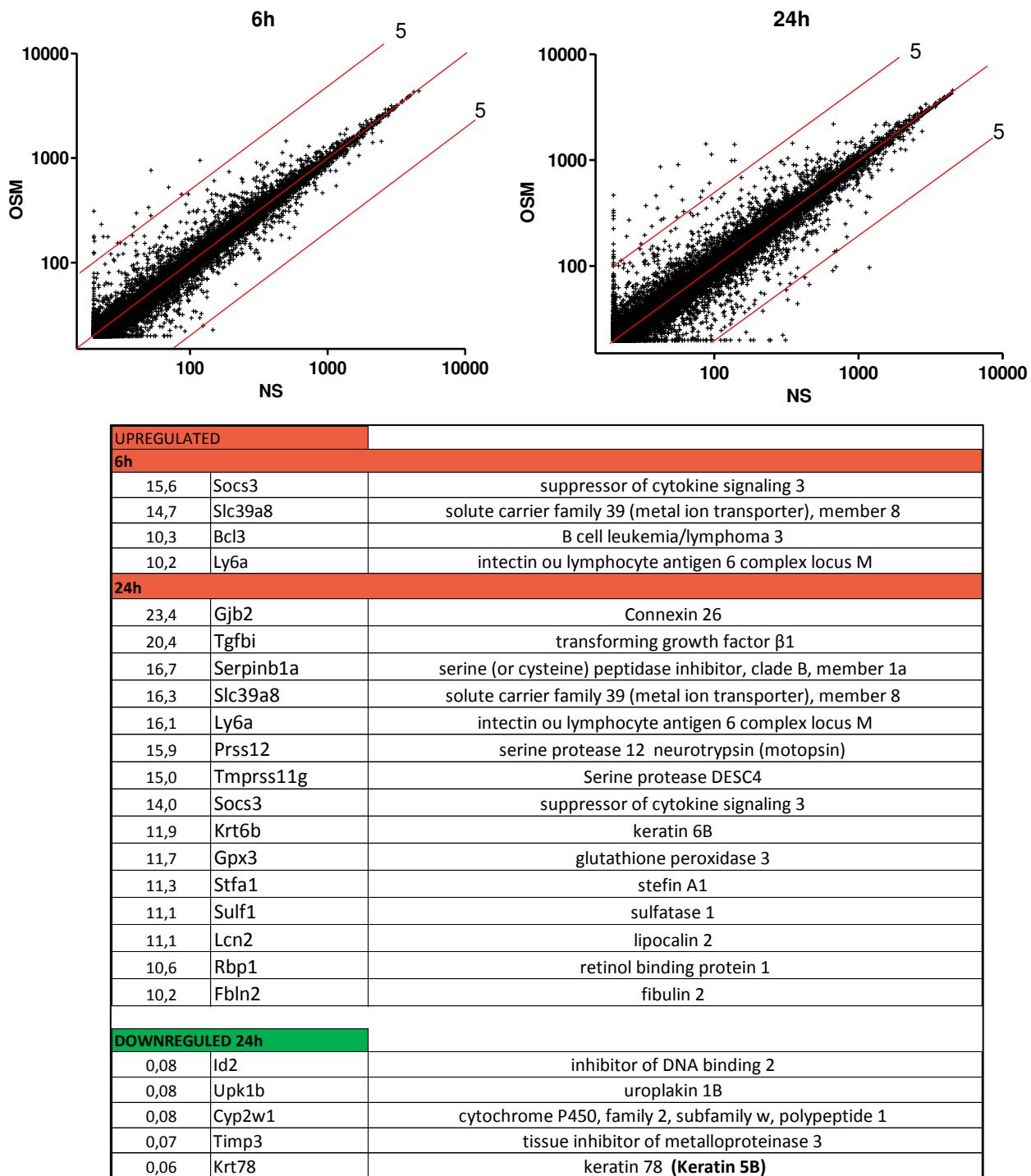


Figure 23 : Modification du profil transcriptomique des NMEK induit par l'OSM à 6h et à 24h. Les NMEK ont été stimulés par l'OSM recombinante (10ng/ml) pendant 6h et 24h, lysés puis les ARN ont été extraits. Les échantillons ont été analysés par puce à ADN « *full genome Mouse gene 2.1 ST array* » (Affymetrix). Les gènes compris entre la ligne rouge centrale et les lignes rouges (5) indique les gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée de 0 à 2 fois par rapport au contrôle (NS), les gènes au-dessus et au-dessous des lignes rouges « 5 » représentent les gènes dont l'expression est cinq fois supérieure ou inférieure au contrôle. Le tableau indique la liste des gènes fortement régulés par l'OSM (supérieur ou inférieur à 10 fois le contrôle).

Cx26 est fortement exprimée en réponse à l'OSM après 24h de stimulation (x23,4 NS). De manière intéressante, cette connexine est surexprimée dans le psoriasis et les souris transgéniques surexprimant Cx26 sous le contrôle du promoteur de l'involucrine développent une inflammation cutanée mimant un psoriasis (Martin and van Steensel 2015). Dans cette pathologie, la Cx26 pourrait favoriser l'hyperplasie épidermique (Martin and van Steensel 2015). Les stimuli permettant l'expression de cette connexine au sein des épidermes psoriasiques sont cependant peu décrits. Ici, nous montrons que l'OSM induit une forte expression de Cx26 par les kératinocytes murins. A l'inverse, le « *B cell leukemia/lymphoma 3* » (Bcl3) dont l'expression est fortement induite par l'OSM à 6h (x10,3 NS) et à 24h (x 7,75 NS) est fortement associée à la DA (Buchau et al. 2009). Bcl3 est en particulier décrit pour son rôle dans l'inhibition de l'expression des PAM et celles de chimiokines et cytokines telles que CXCL8 et IL-6 par les kératinocytes humains (Buchau et al. 2009). Parmi les gènes fortement induits par l'OSM sont aussi retrouvées des séries protéases impliquées dans la protéolyse et le remodelage extracellulaire associé à la différenciation épidermique ainsi que des enzymes du métabolisme cellulaire (sulfatase, glutathion peroxydase). Néanmoins aucun processus biologique commun n'est identifié parmi les gènes fortement induits en réponse à l'OSM.

Une annotation fonctionnelle des gènes modulés par l'OSM permet de mettre en évidence un profil de gènes induits et associés à la réponse inflammatoire des kératinocytes (Figure 24). Parmi ces derniers sont retrouvés des gènes impliqués dans l'angiogenèse, des inhibiteurs de l'apoptose et de la protéolyse, mais surtout des gènes impliqués dans l'activation du système immunitaire, l'adhésion cellulaire et la kératinisation. Les protéines de la différenciation épidermique SPRR et KRT6b dont l'expression est également augmentée dans le psoriasis et la DA sont fortement surexprimées en réponse à l'OSM tout comme les PAM S100A8, S100A9 et la lipocaline 2, un autre senseur de calcium exprimé au cours de la différenciation des kératinocytes et ayant une fonction antimicrobienne par chélation du fer (Seo et al. 2006). Chez l'homme, il a été décrit que l'OSM induit l'expression des serpines codant des inhibiteurs de protéases ainsi que l'expression des intégrines et des laminines associées à l'adhésion des kératinocytes à la JDE. L'expression de ces gènes est également induite pour les NMEK suggérant une forte similitude entre l'activité de l'OSM sur les kératinocytes murins et humains (Finelt et al. 2005).

		<2	<5	<10	
UP REGULATED					6h 24h
Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors (P value 1,3E-6)	death associated protein kinase 1(Dapk1)				
	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)(Nol3)				
	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1(Serpine1)				
	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22(Tnfrsf22)				
Keratinization (P value 6,3E-7)	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 23(Tnfrsf23)				
	keratin 6B(Krt6b)				
	small proline-rich protein 2A1(Sprr2a1)				
	small proline-rich protein 2A2(Sprr2a2)				
	small proline-rich protein 2D(Sprr2d)				
	small proline-rich protein 2E(Sprr2e)				
	small proline-rich protein 2J, pseudogene(Sprr2j-ps)				
Angiogenesis (P value 4,9E-6)	transglutaminase 1, K polypeptide(Tgm1)				
	alanyl (membrane) aminopeptidase(Anpep)				
	angiopoietin-like 4(Angpt4)				
	coiled-coil domain containing 80(Ccdc80)				
	epithelial mitogen(Epgn)				
	extracellular matrix protein 1(Ecm1)				
	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1(Hs6st1)				
	heparin-binding EGF-like growth factor(Hbegf)				
	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit(Hif1a)				
	platelet derived growth factor, alpha(Pdgfa)				
	transforming growth factor, beta induced(Tgfb1)				
	transforming growth factor, beta receptor I(Tgfb1r)				
	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2(Tnfaip2)				
Immune system process (P value 1,3E-5)	vascular endothelial growth factor A(Vegfa)				
	B cell leukemia/lymphoma 3 (Bcl3)				
	E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain(Ets1)				
	Fc receptor, IgA, IgM, high affinity(Fcamr)				
	Janus kinase 2(Jak2)				
	signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)				
	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)(S100a8)				
	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)(S100a9)				
	SAM domain and HD domain, 1(Samhd1)				
	interferon induced transmembrane protein 2(Iftm2)				
	interferon induced transmembrane protein 3(Iftm3)				
	interleukin 1 family, member 9(IL1f9)				
	interleukin 4 receptor, alpha(IL4ra)				
	interleukin 13 receptor, alpha(IL13ra)				
	lipocalin 2(Lcn2)				
	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1(Olr1)				
	ring finger protein 125(Rnf125)				
	secretory leukocyte peptidase inhibitor(Slpi)				
	serine incorporator 5(Serinc5)				
Cell adhesion (P value 9,6E-5)	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21(Tnfrsf21)				
	CD24a antigen(Cd24a)				
	FAT atypical cadherin 2(Fat2)				
	TYRO3 protein tyrosine kinase 3(Tyro3)				
	cell adhesion molecule L1-like(Chl1)				
	contactin 2(Cntr2)				
	flotillin 2(Flot2)				
	integrin alpha 2(Itga2)				
	integrin alpha 6(Itga6)				
	intercellular adhesion molecule 1(Icam1)				
	laminin, alpha 4(Lama4)				
	plakophilin 4(Pkp4)				
	podoplanin(Pdpn)				
Negative regulation of peptidase activity (P value 4,7E-3)	corneodesmosin (Cdsn)				
	secreted phosphoprotein 1(Spp1)				
	sidekick cell adhesion molecule 2(Sdk2)				
	extracellular matrix protein 1(Ecm1)				
	secretory leukocyte peptidase inhibitor(Slpi)				
	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N(Serpina3n)				
	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a(Serpib1a)				

Figure 24 : Annotation fonctionnelle des gènes surexprimés en réponse à l'OSM. La liste des gènes dont l'expression est supérieure à deux fois le contrôle NS a été classée selon le processus biologique impliqué. L'intensité de la couleur rouge indique si les gènes sont surexprimés de plus de deux fois, cinq fois ou dix fois le contrôle.

A l'inverse, l'OSM inhibe l'expression de gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP), dans la différenciation épidermique « classique » comme *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, la *loricrine* ainsi que de nombreuses enzymes impliquées dans la formation de la couche cornée comme les kallikréines (*klk 7, 8, 10*) et la *caspase 14* (Figure 25). L'OSM semble aussi altérer le métabolisme lipidique, en particulier celui des céramides associés à la formation du ciment lipidique, ainsi que l'expression des cytochromes dont l'expression est associée à la différenciation épidermique (Du et al. 2006). Ce profil d'inhibition suggère un rôle majeur de l'OSM dans l'altération de la différenciation épidermique des NMEK comme cela est également décrit chez l'homme (Finelt et al. 2005; Gazel et al. 2006; Boniface et al. 2007a). L'OSM inhibe aussi l'expression des cytokines de la famille de l'IL-1 comme *l'IL-18*, *l'IL-1 α* , *l'IL-1f5* tandis qu'elle induit l'expression des gènes codant les sous-unités IL-4R et IL-13R des récepteurs de l'IL-4 et l'IL-13. Par ce mécanisme, l'OSM pourrait augmenter la sensibilité des kératinocytes murins aux cytokines Th2, comme préalablement suggéré chez l'homme (Finelt et al. 2005).

En conclusion, l'analyse du profil transcriptomique des gènes dont l'expression est modulée par l'OSM met en évidence la forte activité de cette cytokine dans l'altération de la différenciation épidermique, dans l'inhibition de la protéolyse et du métabolisme lipidique. A l'inverse le profil de gènes dont l'expression est augmentée en réponse à l'OSM traduit l'implication de cette cytokine dans les mécanismes de l'angiogenèse, de l'adhésion cellulaire et dans la réponse inflammatoire des kératinocytes murins. Ce profil d'expression montre de nombreuses similitudes à celui décrit chez l'homme (Finelt et al. 2005). Ceci met aussi en évidence la capacité de l'OSM à reproduire certaines caractéristiques moléculaires des kératinocytes de lésions psoriasiques ou de DA suggérant un rôle de cette cytokine dans ces pathologies. Néanmoins, aucun profil transcriptomique en faveur de l'une ou l'autre de ces pathologies ne se distingue. Ceci est à mettre en relation avec la surexpression de cette cytokine dans le psoriasis mais aussi dans la DA (Boniface et al. 2007a). L'ensemble de ces données *in vitro* complètent ainsi les résultats présentés dans l'article précédent (Pohin et al. 2016) et confirment le rôle proinflammatoire de l'OSM sur les kératinocytes murins.

	0,1<	0,2<	0,5<		6h	24h
lipid metabolic process (P value 2,5E-5)	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2(Hmgcs2)					
	7-dehydrocholesterol reductase(Dhcr7)					
	fatty acid desaturase 2-like protein FADS2P1					
	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)(Acaa2)					
	alkaline ceramidase 1(Acer1)					
	alkaline ceramidase 2(Acer2)					
	diacylglycerol O-acyltransferase 2(Dgat2)					
	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 4(Elovl4)					
	enoyl-Coenzyme A delta isomerase 1(Eci1)					
	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial(Gpam)					
	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1(Gdpd1)					
	lipase, member H(Liph)					
	lysophosphatidylcholine acyltransferase 4(Lpcat4)					
	patatin-like phospholipase domain containing 1(Pnpla1)					
	phospholipase C, delta 3(Plcd3)					
	prosaposin-like 1(Psap1)					
	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3(Sptlc3)					
	serine palmitoyltransferase, small subunit A(Sptssa)					
	very low density lipoprotein receptor(Vldlr)					
Proteolysis (P value 7,1E-3)	YOD1 deubiquitinase(Yod1)					
	a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 15(Adamts15)					
	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2(Ace2)					
	carboxypeptidase A4(Cpa4)					
	caspase 14(Casp14)					
	endoplasmic reticulum metalloproteinase 1(Ermp1)					
	kallikrein related-peptidase 7 (chymotryptic, stratum corneum)(Klk7)					
	kallikrein related-peptidase 8(Klk8)					
	kallikrein related-peptidase 10(Klk10)					
	matrix metalloproteinase 10(Mmp10)					
	matrix metalloproteinase 12(Mmp12)					
	matrix metalloproteinase 13(Mmp13)					
	plasminogen activator, urokinase(Plau)					
	protease, serine 23(Prss23)					
	thimet oligopeptidase 1(Thop1)					
	transmembrane protease, serine 2(Tmprss2)					
	ubiquitin specific peptidase 2(Usp2)					
Keratin filament (P value 9,8E-3)	keratin 1(Krt1)					
	keratin 10(Krt10)					
	keratin 78 (keratin 5a Krt5a)					
	keratin 79 (Krt79)					
Cornified enveloppe (P value 3,3E-2)	loricrin(Lor)					
	proline rich 9(Pr9)					
	repetin(Rptn)					
	small proline-rich protein 2H(Sprr2h)					
Immune response	MHC I like leukocyte 1 (Mll1)					
	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2 (Ripk2)					
	interleukin 1 alpha (Il1a)					
	histone cluster 1, H2bg (Hist1h2bg)					
	vanin 1 (Vnn1)					
	interleukin 18 (Il18)					
	interleukin 1 family, member 5 (delta) (Il1f5)					
Negative regulation of proliferation (P value 1,7E-1)	B cell leukemia/lymphoma 2(Bcl2)					
	Kruppel-like factor 4 (gut)(Klf4)					
	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B(Cdkn1b)					
	msh homeobox 2(Msx2)					
	nuclear factor I/B(Nfib)					
	transcription factor AP-2 beta(Tfap2b)					
Heme binding (P value 3,7E-1)	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 19(Cyp2b19)					
	cytochrome P450, family 2, subfamily w, polypeptide 1(Cyp2w1)					
	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13(Cyp3a13)					
	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 39(Cyp4f39)					

Figure 25 : Annotation fonctionnelle des gènes inhibés en réponse à l'OSM. La liste des gènes dont l'expression est inférieure à deux fois le contrôle NS a été classée selon le processus biologique impliqué. L'intensité de la couleur verte indique si les gènes sont inhibés de plus de deux fois, cinq fois ou dix fois le contrôle.

3. Comparaison de l'activité *in vitro* de l'OSM et de l'IL-31 sur des cultures primaires de kératinocytes murins et *in vivo* chez la souris.

Les précédents travaux portant sur le rôle de l'IL-31 dans l'inflammation cutanée ont décrit son action inhibitrice sur l'expression de certains gènes de la différenciation des RHE comme la filaggrine, l'involucrine ou K1 et K10 ainsi qu'une activité inductrice de l'expression de chimiokines et de PAM comme BD3 et BD4 ainsi que les protéines S100 A7, A8 et A9 (Hanel et al. 2016). Le LITEC ayant précédemment montré que la stimulation de NHEK par l'IL-31 induit comme l'OSM, mais à un moindre degré, la phosphorylation de STAT-3 et STAT-1, nous avons souhaité comparer les activités proinflammatoires de l'IL-31 et de l'OSM *in vitro* sur les NMEK ainsi qu'*in vivo* chez la souris par injection d'adénovirus permettant la surexpression de l'IL-31 (AdIL-31), toujours en comparaison avec l'injection d'adénovirus AdOSM et du contrôle AdGFP.

La stimulation de NMEK par des concentrations croissantes d'IL-31 recombinante n'induit aucune modification de l'expression de deux gènes cibles, K1 et S100A9 (Figure 26A). En comparant par rapport aux effets induits par l'OSM, l'IL-31 ne semble donc pas active sur les kératinocytes murins. Ceci peut s'expliquer par le fait que les kératinocytes murins n'expriment pas ou peu la sous-unité IL-31RA spécifique du récepteur de l'IL-31. De fait, dans nos conditions de PCR, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression de cette sous-unité par les NMEK. L'expression de cette sous-unité pouvant être induite par l'IFN-γ sur des cultures de monocytes ou de kératinocytes humains (Dillon et al. 2004; Heise et al. 2009), nous avons également analysé l'expression de l'IL-31RA sur les NMEK pré-stimulés par l'IFN-γ. Une pré-stimulation de 24h ou 48h n'a cependant pas permis d'induire l'expression de cette sous-unité (données non présentées). En revanche, une expression faible de l'IL-31RA est détectée par RT-qPCR dans la peau de souris adulte. Nous avons donc étudié le rôle de l'IL-31 *in vivo* par injection intradermique d'AdIL-31 (Figure 26B C D). Contrairement aux activités de l'OSM dans l'induction d'une inflammation cutanée, l'IL-31 ne modifie pas l'aspect clinique et histologique de l'oreille (Figure 26B C), de même que l'injection d'AdGFP. En revanche, l'expression de certains gènes classiquement exprimés au cours de processus inflammatoire cutané est augmentée par l'IL-31. C'est le cas de K16 (x8,8) ainsi que des molécules proinflammatoires S100A9 (x2,3), CXCL3 (x 6,4) et IL-1β (x 4,5). Néanmoins, les activités de l'IL-31 restent très faibles en comparaison à celles de l'OSM.

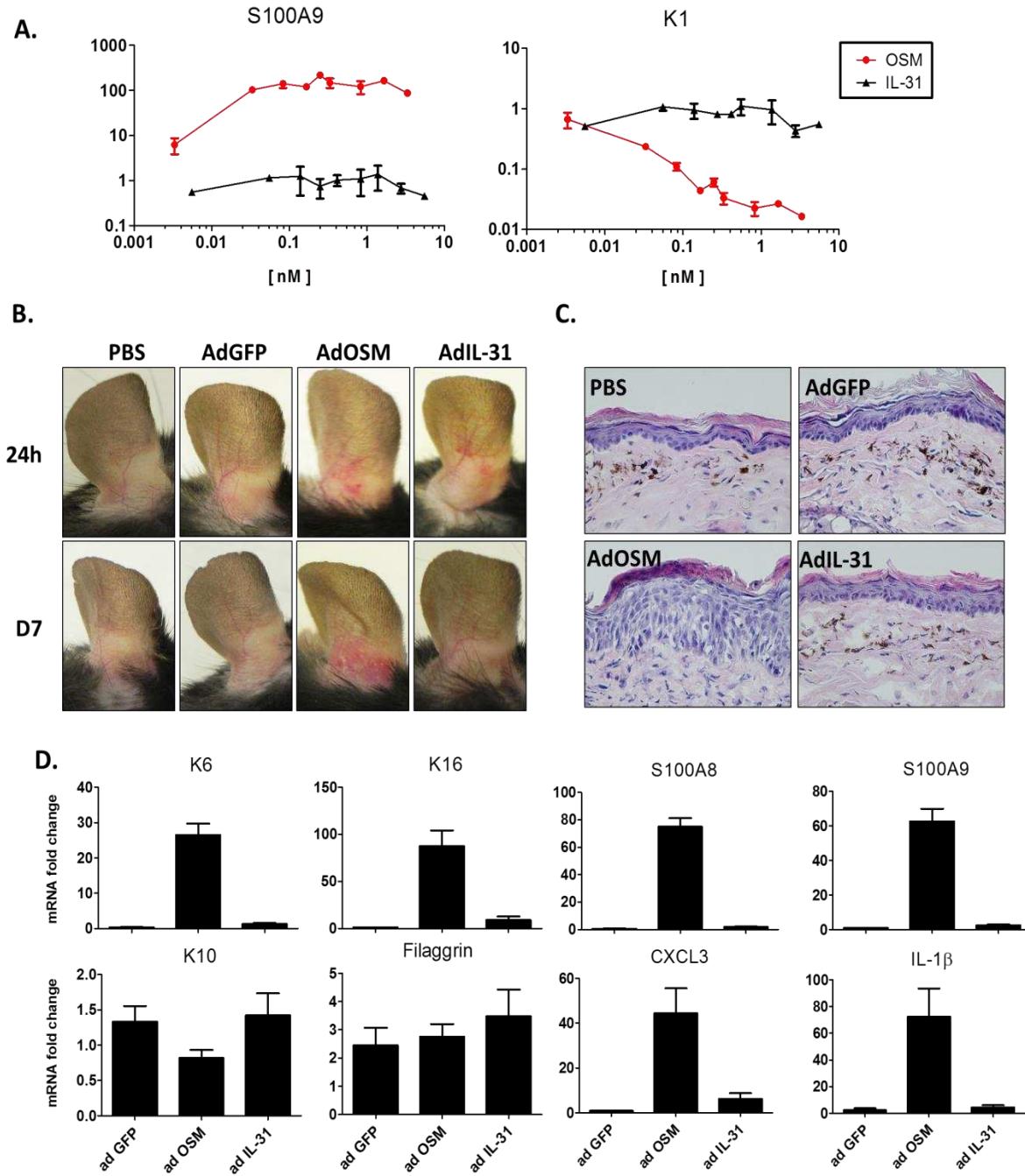


Figure 26. Comparaison des activités de l'IL-31 et de l'OSM dans l'inflammation cutanée chez la souris. (A) Les NMEK ont été stimulés par des concentrations croissantes d'OSM et d'IL-31 recombinantes pendant 24h. Après extraction des ARN, l'expression de deux gènes cibles K1 et S100A9 a été analysée par PCR quantitative ($n=2$, effectué en triplicate). (B) Vingt μ l de PBS ou 20 μ l d'adénovirus recombinants (MOI=10) exprimant la protéine non pertinente GFP, l'OSM ou l'IL-31 ont été injectés en intradermique dans l'oreille de souris C57BL/6J. Les oreilles sont récupérées 24h ou sept jours (D7) après l'injection. Les photographies des oreilles sont représentatives de deux expériences indépendantes. (C) Une analyse histologique des oreilles AdIL-31 et AdOSM a été réalisée sept jours après l'injection après coupe et coloration à l'Hématoxiline de Mayer/Eosine. (D) L'expression de gènes impliqués dans la différenciation, l'hyperprolifération des épidermes ou codant des molécules proinflammatoires a été mesurée par RT-qPCR sept jours après l'injection d'AdGFP, d'AdOSM ou d'AdIL-31. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à l'oreille contrôle ayant reçue une injection de PBS ($n=2$; cinq souris par groupe).

Récemment, Singh et coll. ont étudié le rôle de l'IL-31 dans l'inflammation cutanée en réalisant des injections intradermiques d'IL-31 recombinante (20 µg/jour) dans le dos de souris femelles C57BL/6J durant quatorze jours consécutifs (Singh et al. 2016). Ces auteurs ont ainsi décrit que l'injection de cette cytokine induit une hyperplasie modérée de l'épiderme associée à une augmentation de l'expression de Ki67 par les kératinocytes de la couche basale ainsi qu'une augmentation du TEWL. Dans notre modèle, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression de Ki67 dans les oreilles de souris injectées par AdIL-31. Toutefois, certains marqueurs de l'inflammation comme l'IL-1 β , S100A8 et S100A9 présentent une expression augmentée similaire à celle observée dans notre modèle (Singh et al. 2016). En comparaison au modèle utilisé par cette équipe, notre protocole présente l'avantage d'induire une surexpression d'IL-31 continue et ne nécessitant qu'une seule injection intradermique. De fait, Singh et coll. décrivent que l'augmentation du nombre de kératinocytes Ki67 $^+$ est induit par les injections intradermiques répétées mimant une altération de la barrière cutanée et évoquent un rôle favorisant la prolifération pour l'IL-31 (Singh et al. 2016). En conclusion, la comparaison des activités de l'OSM et de l'IL-31 sur les kératinocytes murins *in vitro* et *in vivo* chez la souris montre un rôle majeur de l'OSM en comparaison à l'IL-31 dans l'induction d'une inflammation cutanée.

4. Rôle de l'OSM dans un modèle de dermatite atopique induite par application de calcipotriol

L'OSM est surexprimée dans les lésions de DA (Boniface et al. 2007a). De plus, nous montrons ici, chez la souris, que l'injection d'adOSM permet de reproduire une inflammation cutanée présentant certaines caractéristiques de la DA, en particulier l'hyperplasie épidermique, une spongiose ainsi qu'un infiltrat dermique massif associé à un profil d'expression cytokinique Th1/Th2. Ceci suggère un rôle potentiel de l'OSM dans cette pathologie. Par ailleurs, l'expression par les NMEK de l'IL-4R et de l'IL-13R étant induite en réponse à l'OSM, celle-ci pourrait avoir un rôle inflammatoire important dans un contexte inflammatoire de polarisation Th2. Afin de valider cette hypothèse, nous avons étudié le rôle de l'OSM dans l'inflammation cutanée en utilisant un modèle murin de DA. Parmi les modèles décrits, nous avons choisi d'utiliser un modèle induit par application de calcipotriol pour sa rapidité de mise en œuvre et par la possibilité d'utiliser les souris OSMKO de fond génétique C57BL/6J. Ce modèle nécessite l'application quotidienne de 4 nmoles de calcipotriol dilué dans de l'éthanol absolu sur l'oreille et le dos préalablement rasés de souris mâles âgées de 6 à 8 semaines. Le protocole décrit par Li et coll. indique que l'application doit être répétée durant quinze jours consécutifs (Li et al. 2006). Cependant, nous avons constaté une perte de poids importante des souris traitées par le calcipotriol au cours de ce protocole. Cette perte était supérieure à 10% après quatre applications, malgré les injections intrapéritonéales de PBS prévenant la déshydratation (Figure 27). La perte de poids ne se stabilisant pas, le sacrifice des souris a été anticipé à six jours d'application. Les données présentées ici sont issues d'une seule expérience, l'analyse qui en est faite est préliminaire (4 souris par condition). Les résultats présentés proviennent des analyses de la peau du dos. L'analyse au niveau transcriptionnel des oreilles présente un profil d'expression similaire à celui du dos, néanmoins les cytokines étant plus facilement détectées dans la peau du dos que dans celle de l'oreille, nous avons choisi de présenter les données relatives aux analyses transcriptionnelles de la zone dorsale.

Afin d'évaluer cliniquement la sévérité de l'inflammation cutanée, nous avons utilisé une adaptation du test PASI décrit par Van der fits et coll dans le modèle d'inflammation

psoriasiforme induite par application d'IMQ (Van der fits, et al. 2009). Après deux jours d'application répétée, le calcipotriol (groupe de souris noté CAL) induit une inflammation cutanée caractérisée par un érythème (Figure 27). Puis un épaississement progressif de la peau accompagnée de l'apparition de fines squames blanches est progressivement détecté après quatre jours d'application du calcipotriol tandis que l'application du solvant seul (groupe ETH) n'induit aucune inflammation cliniquement observable. En présence de calcipotriol, le score PASI augmente progressivement jusqu'à atteindre 10 au cours de l'expérimentation. Par ailleurs, le score PASI des souris OSMKO n'est pas différent des souris sauvage (*wild-type*, WT). Au jour du sacrifice, il est néanmoins observé une légère diminution de l'érythème pour les souris OSMKO en comparaison aux souris WT. A l'inverse, l'aspect squameux de la peau semble plus important pour les souris OSMKO que pour les souris WT (Figure 27).

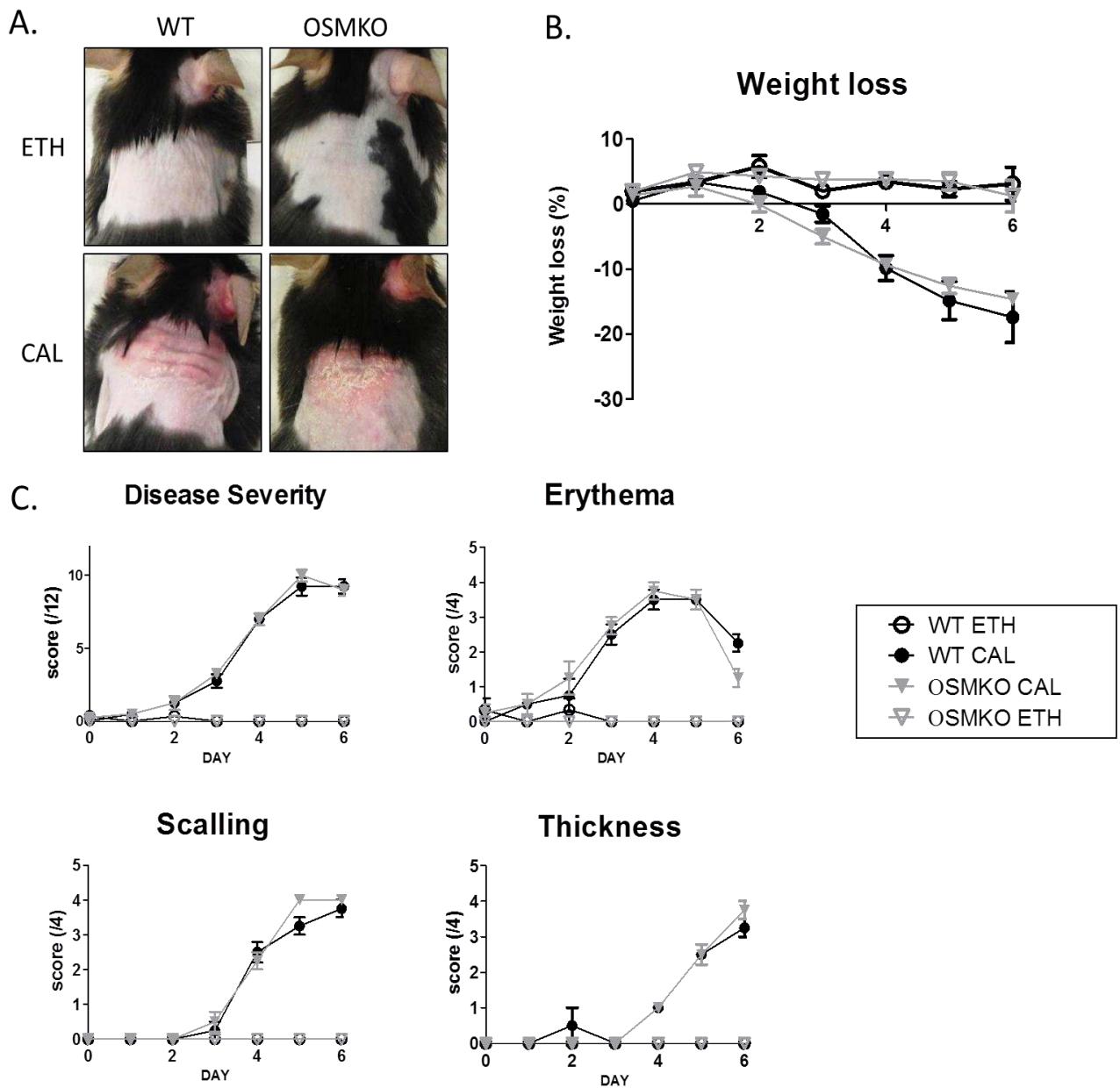


Figure 27 : Comparaison de l'aspect clinique, de la perte de poids et du score de sévérité des souris WT et OSMKO dans un modèle de DA induite par application topique de calcipotriol. Quatre nmoles de calcipotriol dilué en éthanol ont été appliquées sur le dos et l'oreille de souris WT et OSMKO durant six jours consécutifs. (A). Des photographies présentant le phénotype clinique des souris traitées par l'éthanol (ETH) ou le calcipotriol (CAL) ont été réalisées après six jours d'application (B). Une mesure du poids des souris a été effectuée quotidiennement. La courbe représente la perte de poids des souris en pourcentage au cours du traitement. (C). Le score de sévérité a été déterminé quotidiennement avant chaque application selon trois critères comprenant l'érythème, l'aspect squameux et l'épaisseur de la peau du dos. Les courbes présentent l'évolution du score de sévérité au cours du traitement pour les souris traités par l'éthanol ou le calcipotriol pour les souris WT et OSMKO. (ETH : éthanol, CAL : calcipotriol)

En histologie, l'épiderme des souris traitées par le calcipotriol présente une hyperplasie, une spongiose et une hyperkératose. Quelques foyers parakératosiques sont également observés pour les souris WT mais ne sont pas retrouvés sur les coupes histologiques des peaux de souris OSMKO. Des espaces intercellulaires étant aussi observés au niveau de coupes de peaux issues de souris OSMKO traitées par l'éthanol, la spongiose épidermique pourrait être induite par des artefacts lors de la réalisation des coupes et coloration des lames. Dans le derme, un infiltrat est retrouvé mais la nature précise de cet infiltrat n'a toutefois pas été précisée. Les PNE possèdent des granules intracellulaires éosinophiles leurs conférant une intense couleur rose après coloration H/E. Néanmoins, ces derniers n'ont pas pu être mis en évidence dans notre modèle.

Finalement, l'analyse transcriptionnelle du dos des souris traités par le calcipotriol met en évidence un profil cytokinique Th2 caractérisé par une forte expression de TSLP, de l'IL-4 et de l'IL-13. L'expression d'IFN- γ est également augmentée après traitement par le calcipotriol, tout comme l'OSM, l'IL-6, l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24. Comme décrits pour le modèle d'inflammation cutanée induit par application d'IMQ (Pohin et al. 2016), l'expression d'IL-6, d'IL-19, d'IL-20 et d'IL-24 est également retrouvée pour les souris OSMKO traités par le calcipotriol (Figure 28). Ces dernières pourraient avoir des activités redondantes à celles de l'OSM dans ce modèle.

L'application topique de calcipotriol induit bien une inflammation cutanée caractérisée par un profil cytokinique Th2/Th1. Dans ce modèle, l'OSM ne semble pas être impliquée dans l'induction de l'inflammation cutanée bien que quelques points cliniques et histologiques semblent être modifiés par l'absence d'expression d'OSM chez les souris transgéniques. La sévérité de la perte de poids nous ayant contraint au sacrifice des animaux avant la fin du protocole d'application décrit par Li et coll., des modifications du phénotype cutané semblant apparaître à partir du cinquième jour d'application auraient pu s'accentuer sur une cinétique plus longue. Néanmoins, le profil transcriptionnel des souris WT ou OSMKO traitées par le calcipotriol est très similaire.

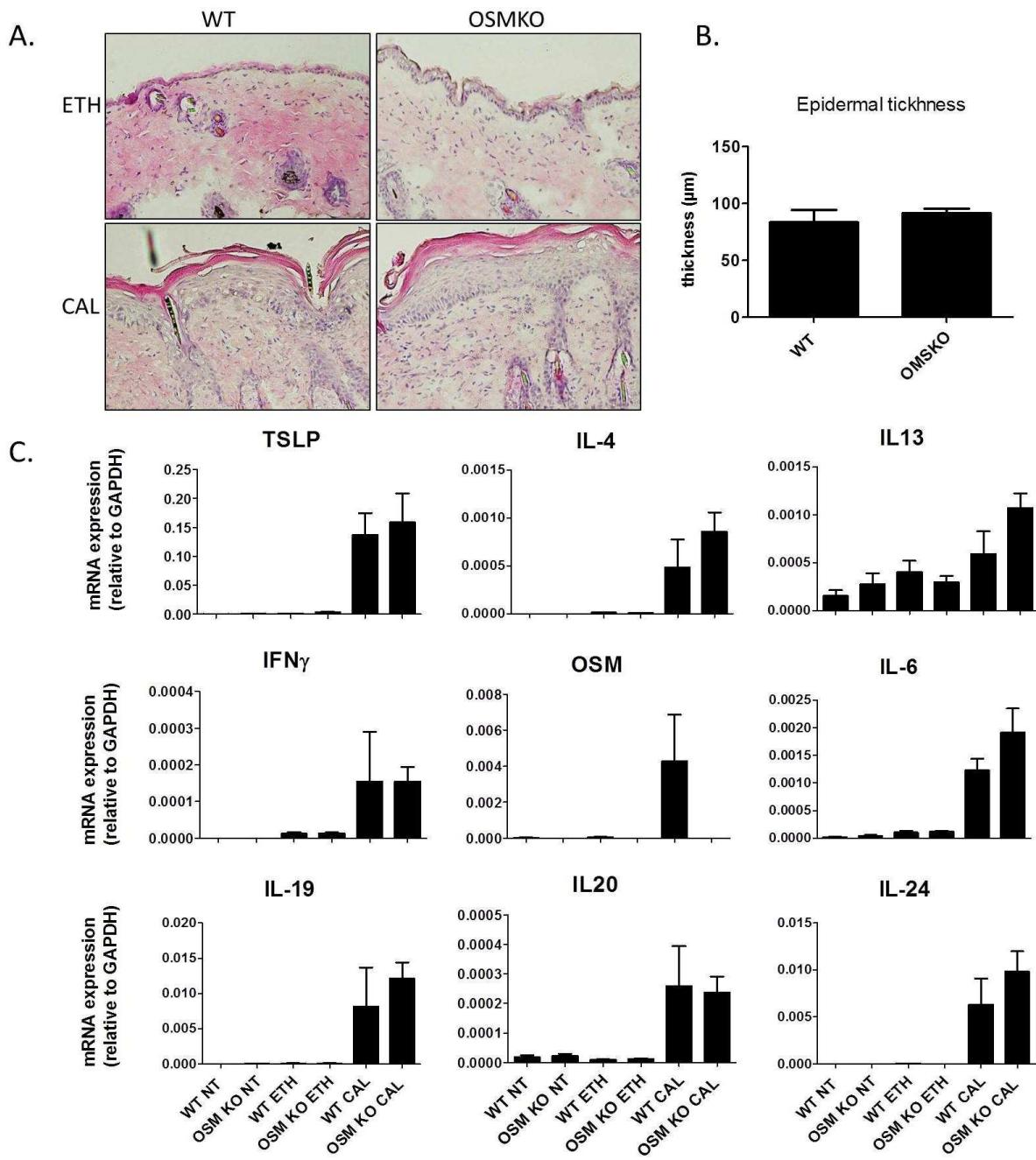


Figure 28 : Comparaison histologique et analyse transcriptionnelle des peaux de souris WT et OSMKO dans un modèle de DA induite par application topique de calcipotriol. Quatre nmoles de calcipotriol dilué en éthanol ont été appliquées sur le dos et l'oreille de souris WT et OSMKO durant six jours consécutifs. (A). Des coupes de peaux du dos de souris WT ou OSMKO traitées par l'éthanol ou le calcipotriol ont été réalisées, colorées à l'hématoxyline de Mayer/Eosine et observées au microscope photonique (x100) (B). L'épaisseur de l'épiderme a été mesurée à partir des images de coupes de peau du dos des souris WT ou OSMKO traités par le calcipotriol. (C). Après extraction des ARN et transcription inverse, une analyse transcriptionnelle par RT-qPCR des gènes codant différentes cytokines a été réalisée à partir de la peau du dos de souris non traitées, traitées par l'éthanol ou par le calcipotriol pour les souches WT et OSMKO. NT : non traitées, ETH : éthanol, CAL : calcipotriol.

Dans leur papier princeps, Li et coll. ont décrit que l'application de la vitamine D3 conduit à une hypercalcémie et à la mort des souris après 5 jours d'application (Li et al. 2006). Afin de limiter la toxicité de leur protocole, ils ont ensuite remplacé la vitamine D3 par le calcipotriol, un dérivé de la vitamine D3 hypocalcémiant. Ceci leur a permis de prolonger la survie des animaux jusqu'à la fin du protocole d'application. Dans notre laboratoire, les modèles d'inflammation cutanée sont généralement réalisés en parallèle, sur le dos et l'oreille de souris, ceci nous permet d'analyser un score PASI à partir du dos tandis que les extractions d'ARN sont préférentiellement réalisées sur l'oreille et permettent de meilleurs rendements d'extraction. L'application de 4 nmoles de calcipotriol sur le dos et de 4 nmoles sur l'oreille des souris semblent avoir eu un effet toxique plus important qu'une seule application sur l'oreille ou le dos. Selon les études, les doses, la cinétique et le lieu d'application du calcipotriol varient, néanmoins cette dose ne semble jamais excéder 4 nmoles par jour pour un traitement prolongée (Li et al. 2006; Li et al. 2009; Zhang et al. 2009; Kim et al. 2013). Ceci pourrait expliquer la perte de poids massive des souris au cours du traitement. La présence de PNE, la production d'IL-5 et l'augmentation des IgE sériques sont trois caractéristiques de la DA. Dans notre étude, aucun de ces trois points n'est retrouvé (données non présentées) tandis que l'application de calcipotriol sur l'oreille de souris durant quinze jours consécutifs met en évidence la présence d'un infiltrat dermique éosinophile, une éosinophilie circulante, une expression cutanée d'IL-5 et une augmentation de la concentration sérique d'IgE (Li et al. 2006). Ce dernier paramètre semble en particulier induit au cours de la deuxième semaine d'application puisqu'à huit jours, les taux sériques d'IgE ne sont pas encore modifiés (Li et al. 2006). Ainsi, le protocole utilisé lors de notre étude n'a pas permis de reproduire toutes les caractéristiques de la DA et doit être optimisé. Néanmoins, dans notre étude un profil cytokinique Th2 a tout de même été mis en évidence. En l'absence d'OSM, ce profil cytokinique ne semble pas altéré suggérant que l'OSM n'est pas impliquée dans la polarisation Th2. De plus en l'absence d'OSM, la présence d'autres cytokines activant le facteur de transcription STAT-3 pourraient avoir une activité redondante à celle de l'OSM. De fait, comme pour le modèle d'inflammation cutanée induit par l'application d'IMQ, l'application de calcipotriol sur le dos des souris WT et OSMKO induit l'expression d'IL-19, d'IL-20 et d'IL-24 décrites pour leur rôle dans l'inhibition de la différenciation épidermique (Sa et al. 2007) ainsi que l'expression d'IL-6 pouvant

partiellement compenser les effets de l'OSM dans un contexte synergique (Guilloteau et al. 2010).

Ces données doivent cependant être confirmées dans un modèle de DA plus pertinent que celui décrit ici.

Axe 2. Mise au point d'un modèle d'épiderme reconstruit murin et applications

Axe 2. Mise au point d'un modèle d'épiderme reconstruit murin et applications

1. Présentation de l'article “Development of a new model of reconstituted mouse epidermis and characterization of its response to proinflammatory cytokines”

Les cultures de kératinocytes primaires en monocouche ne reproduisent pas fidèlement les caractéristiques physiologiques d'un épiderme natif, celles-ci étant majoritairement constituées de kératinocytes indifférenciés. Afin de retrouver les propriétés de kératinocytes dans leurs états de différenciation, des modèles *in vitro* tridimensionnels d'épidermes reconstruits humains ont été rapidement développés chez l'homme (Rosdy and Clauss 1990). Ces modèles sont classiquement utilisés pour décrire le rôle des protéines impliquées dans la différenciation épidermique et la formation de la barrière épidermique (Pendaries et al. 2014), dans la description de l'activité de cytokines sur les kératinocytes (Boniface et al. 2005a; Boniface et al. 2007a) ou encore à des fins plus appliquées telles que les tests de produits dermo-cosmétiques ou d'agents pharmacologiques. Etonnamment, ce modèle couramment utilisé chez l'homme est plus difficile à mettre en œuvre chez la souris et a connu un développement plus limité. En effet, les kératinocytes murins se sont avérés plus difficiles à maintenir en culture que les kératinocytes humains. Par ailleurs, les rares modèles d'épidermes reconstruits murins décrits chez la souris à ce jour sont fastidieux à mettre en place, utilisent des supports dermiques ou ne reproduisent pas fidèlement toutes les caractéristiques d'un épiderme normal de souris. En parallèle de nos travaux sur l'OSM et dans le but d'étudier l'activité des cytokines sur les kératinocytes murins dans des conditions physiologiques proches d'un épiderme murin normal, nous avons mis en place un modèle d'épiderme reconstruit murin (RME) plus rapide et plus simple à mettre en œuvre par rapport aux modèles précédemment décrits.

Nos RME sont réalisés à partir d'épidermes de souriceaux nouveau-nés. Après une courte phase de culture primaire permettant l'expansion des kératinocytes isolés, nous avons adapté le protocole utilisé par BioAlternatives pour la formation d'épidermes reconstruits chez l'homme pour mettre au point un modèle de RME sans support dermique. Après cinq jours d'exposition à l'interface air-liquide, nous montrons que ce modèle permet de reproduire une stratification épidermique, caractérisée par une expression de protéines de différenciation et de jonctions cellulaires similaire à celle décrite dans l'épiderme natif de souris (K14, K10, filaggrine, loricrine, E-cadhérine, Cx43, Cx26). De plus, nous montrons que ce modèle permet de reproduire une barrière physique imperméable suggérant la formation d'une couche cornée fonctionnelle. Enfin, afin de compléter la caractérisation fonctionnelle des RME, nous avons testé l'activité individuelle et synergique de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-17A, l'IL-22, le TNF- α , l'IL-1 α et l'OSM sur l'expression de molécules impliquées dans l'immunité innée et dans l'altération de la différenciation épidermique. Parmi ces cytokines, nous montrons que l'OSM a une activité plus importante que le TNF α ou l'IL-17A sur l'altération de la différenciation des épidermes reconstruits tandis qu'elle présente une activité similaire à l'IL-17A pour la production de PAM. Ce modèle fonctionnel de RME ouvre en outre la perspective d'utiliser des kératinocytes issus d'animaux transgéniques

Ces travaux sont en révision pour publication dans *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* et ont fait l'objet de deux communications écrites (CARD, Lille 2015, ESDR Munich, 2016).

Development of a new model of reconstituted mouse epidermis and characterization of its response to proinflammatory cytokines

Mathilde Pohin¹, Carolina Veaute², Julien Garnier³, Christine Barrault³, Laurent Cronier⁴, Vincent Huguier^{1,5}, Laure Favot¹, Jiad Mcheik^{1,5}, François-Xavier Bernard^{1,3}, Jean-Claude Lecron^{1,5}, Franck Morel¹ and Jean-François Jégou^{1*}

¹Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC), EA 4331, Université de Poitiers, France

²Laboratorio de Inmunología Básica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

³BioAlternatives, Gençay, France

⁴STIM, CNRS ERL 7368, Université de Poitiers, Poitiers, France

⁵CHU de Poitiers, France

Running title: New model of reconstituted mouse epidermis.

Keywords: three-dimensional culture, keratinocyte, reconstituted epidermis, skin inflammation, cytokine.

*Correspondence to: Dr. Jean-François Jégou, Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines, UPRES EA 4331, Pôle Biologie Santé, Université de Poitiers, 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 POITIERS Cedex 9, France; Phone: +33.5.49.45.36.45. ; Fax: +33.5.49.49.86; E-mail address: jean-francois.jegou@univ-poitiers.fr

Abstract

The development of three-dimensional models of reconstituted mouse epidermis (RME) has been hampered by the difficulty to maintain murine primary keratinocyte cultures and to achieve a complete epidermal stratification. In this study, we propose a new protocol for the rapid and convenient generation of RME, which reproduces accurately the architecture of a normal mouse epidermis. During RME morphogenesis, the expression of differentiation markers such as keratins, loricrin, filaggrin, E-cadherin and connexins was followed, showing that RME structure at day 5 was similar to those of a normal mouse epidermis, with the acquisition of the natural barrier function. We also demonstrated that RME responded to skin-relevant proinflammatory cytokines by increasing the expression of antimicrobial peptides and chemokines, and inhibiting epidermal differentiation markers, as in the human system. This new model of RME is therefore suitable to further investigate mouse epidermis physiology and opens new perspectives to generate reconstituted epidermis from transgenic mice.

1. Introduction

In the field of immunodermatology research, standard monolayer cell cultures of human keratinocytes are commonly used for in vitro studies, although they do not completely recapitulate the physiological skin architecture and the features of the different states of cell differentiation. The stratification of keratinocytes is essential to study the physiological response of the epidermis since keratinocytes from the basal layer are widely different from corneocytes in morphology but also in metabolism and response to environmental factors. Regarding those limits, three-dimensional models of reconstituted human epidermis (RHE) have been therefore developed and proved to be more suitable to test cosmetics products, for drug development or cutaneous disease modelling. Mouse is also commonly used to investigate human diseases *in vivo*, offering a large possibility of spontaneous, genetically engineered or inducible murine models of skin pathologies. By contrast to human primary keratinocytes, murine keratinocytes have always been difficult to isolate and to maintain in culture. Likewise, the development of reconstituted murine epidermis (RME) seems to be more problematic to achieve a complete stratification than RHE.

Over the last three decades, the development of RHE consisted in determining the optimal culture conditions to reach a rapid and complete epidermal differentiation. The first attempts described the need for cultivating keratinocytes on irradiated fibroblastic feeder cells, in culture medium supplemented with epidermal growth factor and hydrocortisone, but resulted in an incomplete stratification of keratinocyte colonies (Rheinwald and Green 1975). The capacity of keratinocytes cultivated in monolayer to differentiate into three-dimensional epidermis was further shown to require their transition to an air/liquid interface (Prunieras et al. 1983; Rosdy and Clauss 1990). Then, the modulation of calcium concentrations in culture medium has been identified as key element in regulating the proliferation/differentiation

balance (Hennings et al. 1980). Calcium has also been reported to play a role in adherent junctions through the assembly of the E-cadherins (Tu et al. 2008; Tu and Bikle 2013). Finally, the substitution of the classic fetal bovine serum in culture media by specific growth factors such as keratinocyte growth factor (KGF), bovine pituitary extract, Insulin Growth Factor and L-acid ascorbic acid allowed to get rid of fibroblastic feeders and was shown to induce a better epidermal stratification with the restoration of the natural barrier function (Bertolero et al. 1984; Rosdy and Clauss 1990; Ponec et al. 1997b; Frankart et al. 2012; Borowiec et al. 2013).

Attempting to develop RME, some authors used human dead de-epidermized dermis (Carroll and Moles 2000) or employed mouse dermal fibroblasts as feeders for keratinocyte attachment and growth (Ikuta et al. 2006; Rosenberger et al. 2014a). This fibroblastic support was demonstrated to favor the establishment of the epidermis and to improve long term skin equivalents (Boehnke et al. 2007). With technical progress in the characterization of stem cells, some studies described long-term protocol to generate mouse epidermal stem and precursor cell lines (Segrelles et al. 2011; Vollmers et al. 2012). After several passages, epidermal progenitor cell lines were successfully obtained and used to generate mouse reconstructed epidermis. In these models, the epidermal differentiation remained limited as indicated by the discontinued expression of some differentiation markers such as keratin (K) 10, involucrin or loricrin by suprabasal keratinocytes.

The differentiation of keratinocytes is a complex molecular process which leads to the establishment of a protective barrier. It results in a spatiotemporal expression of epidermal differentiation markers. In the basal layer, K5/K14 are expressed by undifferentiated keratinocytes and K6/16 expressions are restricted to hyperproliferative or activated keratinocytes (Moll et al. 2008), while K1/K10 expressions are found in the differentiated keratinocytes of the suprabasal layers (Simpson et al. 2011). In the granular layer,

keratinocytes expressed progressively involucrin and loricrin which are involved in the formation of the mature cornified envelope. Granular keratinocytes are also characterized by the presence of keratohyalin granules in their cytoplasm, containing the pro-filaggrin. In the upper layers, filaggrin aggregates with the intermediate K1/K10 filaments to form mature corneocytes and contributes to the epidermal barrier function (Candi et al. 2005; Pendaries et al. 2014). In addition, GAP junctions were shown to be essential for the communication between keratinocytes throughout the epidermis. Among the connexins (Cx) found in the epidermis, Cx43 is highly expressed in the basal and spinous layers, whereas Cx26 expression is restricted to the granular layer (Kandyba et al. 2008; Scott et al. 2012).

In inflammatory conditions, this epidermal differentiation is altered and the protective barrier may be disrupted. RHE have been commonly used *in vitro* to study the effect of proinflammatory mediators which were reported to be overexpressed in different skin pathologies. We and others reported the activity of cytokines, such as IL17A, IL-1 α , TNF α , IL-22 and Oncostatin M (OSM), alone or in synergy, on epidermal differentiation, recapitulating some features of psoriasis or atopic dermatitis (Boniface et al. 2007a; Wilson et al. 2007; Guilloteau et al. 2010; Rabeony et al. 2014; Rabeony et al. 2015). OSM and IL-22 induced the expression of K6, classically associated with keratinocyte proliferation, and inhibited the expression of differentiation markers such as K10, filaggrin, involucrin and loricrin leading to epidermis hyperplasia (Rabeony et al. 2014). By contrast, IL-1 α , IL-17A and TNF α were found to be more important for innate immune activation, by inducing higher expressions of proinflammatory mediators by keratinocytes such as chemokines (CXCL-3), or the antimicrobial peptides β -defensin 3 (BD3) and S100A9 (Guilloteau et al. 2010).

Here, we described a fast and convenient method to generate RME using primary keratinocyte cultures from newborn mouse skin, without fibroblastic support, which reproduce accurately the morphological features of a normal murine epidermis. In this study, we characterized the

progressive morphogenesis of the epidermis and the expression profiles of proteins involved in differentiation, as well as the expression of proinflammatory cytokine receptors. Finally, we performed functional studies on RME, by analyzing their natural barrier function and their response to proinflammatory cytokines.

2. Materials and methods

2.1. Generation of Reconstituted Murine Epidermis

Normal Murine Epidermal Keratinocytes (NMEK) were isolated from pooled skins of C57BL/6J newborn mice and cultivated in CnT07 medium (CELLnTEC) as previously described (Pohin et al., 2016). After 5 days, when cells reached 80% of confluence, they were detached with Trypsin LE-express (Invitrogen) and centrifuged at 1500 rpm for 5 min, before resuspension at 1.125×10^6 cells/ml in CnT07 medium. Polycarbonate culture inserts (0.63 cm² of area containing 0.4 μ m diameter pore size, Millipore) were seeded with 400 μ l of cell suspension (0.45×10^6 cells) and deposited in the bottom of six-well plates containing 3 ml of CnT07 medium with 1.5 mM of calcium. After 24 h of incubation at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, keratinocytes were exposed to the air/liquid interface by adding a sterile gaze under the insert in each well and replacing the CnT07 medium by 3 ml of differentiation medium composed of Epilife medium with HKGS supplements (Cascade biologics), 1.5 mM of calcium, 50 μ g/ml of L-ascorbic acid (Sigma) and 3 ng/ml of murine recombinant KGF (R&D systems). This medium was renewed every 2 days until the use of RME.

2.2. Cytokines stimulation

Five days after the air/liquid interface exposure, RME were stimulated with the murine cytokines OSM, IL-22, IL-17A, IL-1 α and TNF α (10 ng/ml, R&D systems) or a mix of the

five cytokines at 10 ng/ml or 1 ng/ml each, for 24 h before transcriptional analyses or for 72 h before histology, ELISA and permeability studies.

2.3. RNA and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from RME using Nucleospin RNA XS kit (Macherey-Nagel). RNA was reverse-transcribed with Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and transcripts were amplified and quantified using the LightCycler-FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit on a LightCycler 480 instrument (Roche). Oligonucleotides were designed with Primer-Blast software, purchased from Eurogentec (Eurogentec) and listed in Supporting Information Table 1. Samples were normalized to the expression of the control housekeeping gene, GAPDH, or reported according to the $\Delta\Delta CT$ method as RNA fold change: $2^{\Delta\Delta CT} = 2^{\Delta CT}$ sample- ΔCT reference, as indicated in the figure legend.

2.4. Histology and immunohistofluorescence

For histological examination, RME were fixed in formaldehyde 4% before inclusion in paraffin and H&E coloration. For immunohistofluorescence, frozen sections (8 μ m-thick) embedded in Cryomatrix compound (Shandon) were fixed either in cold acetone/methanol (20/80, v/v) for 10 min or in 4% paraformaldehyde/PBS solution (only for Cx26, Cx43 and E-Cadherin immunostainings). After blocking with 0.5 to 2% FBS or BSA solutions and permeabilization in 0.5% Triton X-100 diluted in PBS, samples were incubated with primary antibodies directed against the following mouse antigens: K6 (Thermo Scientific), K14, K10, filaggrin, loricrin (all from Covance), Cx26 (Invitrogen), Cx43 (BD Biosciences), E-cadherin (SC-7870, Santa-Cruz). RRX- or FITC- conjugated goat or donkey antibodies were used as secondary antibodies (Jackson Immunoresearch). Cell nuclei were stained with TOPRO (Molecular Probes). Image acquisition was performed with an Olympus FV1000 confocal microscope using FluoView software (ImageUP platform, Université de Poitiers).

2.5. Lucifer Yellow permeability assay and ELISA

Lucifer Yellow (LY, 200 μ l of 1 mM solution; Sigma) was deposited inside the insert on the surface of RME and incubated for 6 h at 37°C, 5% CO₂. Frozen sections were fixed in formaldehyde 4%. Image acquisition was performed with an Olympus FV1000 confocal microscope using FluoView software (ImageUP platform, Université de Poitiers). To assess RME permeability, concentrations of Lucifer Yellow that passed through RME were measured in culture medium using a Varioskan Flash at 550 nm emission (Thermo scientific).

ELISA for mouse S100A9 detection was provided with R&D Systems and carried out according to the manufacturer's instructions.

3. Results

3.1. Epidermal morphogenesis and localization of differentiation markers in RME mimic a normal epidermis

We have designed a new protocol for the rapid, convenient and reproducible generation of RME from keratinocytes isolated from newborn mouse skin, requiring no fibroblastic support or de-epidermised dermis, which allows studying exclusively the physiology of epidermis independently of dermis influence. Freshly isolated murine primary keratinocytes were directly seeded in polycarbonate membrane inserts to form the future RME as described in the experimental procedures. The protocol to reach a complete epidermal stratification in the mouse system has been adapted from protocols previously described for human three-dimensional equivalents (Poumay and Coquette 2007; Guenou et al. 2009; Frankart et al. 2012). This adaptation for RME consisted mainly in incubating firstly keratinocytes in a seeding medium composed of CnT07 medium, adapted for murine cell culture, with an increased calcium concentration (1.5 mM) to obtain a regular cell monolayer, then in

incubating the cells, after their passage to the air-liquid interface, in a differentiation medium composed of complete Epilife medium supplemented with murine KGF, L-ascorbic acid and by maintaining the high calcium concentration. In order to monitor the epidermal morphogenesis of the RME, histological analyses and fluorescent immunostaining of several differentiation markers were performed at day 3, 5 and 8 after exposure to the air/liquid interface, and compared with normal epidermis (Figure 1). Histological examination after H&E staining showed that RME exhibited a single layer of confluent keratinocytes at day 3, covered by a protective layer of acidophilic keratinocytes as previously described in human RHE (Frankart et al. 2012). From day 5, RME were ~ 20 μ m thick and displayed a complete epidermis morphogenesis with the presence of the four expected layers. Notably, we could observe the presence of keratohyalin granules in the granular layer and a thin corneous layer. After 8 days, histological analyses of RME showed a dense corneous layer, RME degenerating progressively in differentiated corneocytes. K6 expression is normally restricted to hyperproliferative cells of the basal layer in normal epidermis but it was expressed throughout the RME at day 3. This expression was maintained at day 5 and clearly lowered at day 8. As expected, K14 expression was restricted to the basal layer at all time points assessed, while K10, loricrin and filaggrin were weakly expressed by RME at day 3. At day 5, RME exhibited a strong K10 immunostaining throughout the suprabasal layer and both expressions of filaggrin and loricrin in the granular and the corneous layers, respectively, were similar to those observed in normal epidermis from adult mice. In conclusion, it appears that RME at day 5 reproduces accurately the morphology of a normal epidermis and the expression profile of epidermal markers.

3.2. RME form a cohesive tissue and an efficient barrier.

The appropriate cohesion of keratinocytes in a three-dimensional reconstituted epidermis is also dependent on the expression of proteins of adherent junctions and connexins (Cx) involved in GAP junctions. All over the epidermis, E-cadherin was expressed in the intercellular space of the RME from day 3 and was maintained up to day 8, like in a normal mouse epidermis (Figure 2A). Cx43 was found in the basal and spinous layers of a mature epidermis from day 3 to day 8, harboring the characteristic punctiform immunostaining observed in the normal epidermis (Figure 2A). RME highly expressed Cx26 at day 5 and 8, with a localization more restricted to the granular layer. Nonetheless, the expression seemed to be more sustained in the in vitro model compared to the normal epidermis (Figure 2A).

To confirm that RME acquired their natural barrier function, we have applied the hydrophilic fluorescent dye Lucifer Yellow (LY) on the top of each RME on day 0, 3, 5 and 8 for 6 h. The analysis of concentrations of LY that diffused through the RME showed that the dye start to be retained at day 0, when keratinocytes form only a monolayer (Figure 2B). RME were effectively impermeable to LY from day 3 to day 8 (Figure 2B), LY being mainly retained in the cornified layer as observed by confocal microscopy in RME sections at day 5 and day 8 (Figure 2C). These results thus confirmed that RME from day 3 to 8 formed a cohesive tissue and efficiently acquired their natural property of impermeable barrier.

3.3. RME response to proinflammatory cytokines

To complete the functional characterization of our RME model, we have investigated their response to cytokines relevant to skin inflammation. Firstly, we analyzed the basal expression of the different subunits of receptors for IL-22, OSM, IL-17A, TNF α and IL-1 α/β by RT-qPCR in RME at day 5 in comparison with normal epidermis. The expressions of TNFR1/R2, IL-10RB, gp130 and OSMR β , IL-17RC, IL-1R1 and IL-1RAcP were similar between RME

and normal epidermis, while IL-17RA and IL-22R1 exhibited a higher expression in the epidermis (Figure 3).

Then, RME at day 5 were stimulated either with IL-22, OSM, IL-17A, TNF- α or IL-1 α at a final concentration of 10 ng/ml or a mix of these five cytokines (M5) at both concentrations of 10 ng/ml and 1 ng/ml. Histological analyses of RME were performed after 72 h of stimulation (Figure 4A). Stimulations with IL-1 α , TNF α or IL-22 did not change the morphological aspect of the epidermis. By contrast, IL-17A, OSM and M5 at the concentration of 1 ng/ml induced a modest hyperplasia with a significant reduction of keratohyalin granules in the granular layer, especially after OSM stimulation, while M5 stimulation at 10 ng/ml completely disrupted the stratified aspect of the RME. In correlation with the histological observations, the analysis of the mRNA expression of differentiation markers showed a strong downregulation of K10, filaggrin and involucrin 24 h after RME stimulation with OSM, IL-17A, M5 at 1 ng/ml and, to a lesser extent, with IL-1 α , TNF α and IL-22 (Figure 4B). M5 at the highest concentration strongly inhibited the expression of K10, loricrin and involucrin, 10-fold more than IL-17A or OSM alone, confirming the synergistic proinflammatory activity of the cytokine mix. In addition, a strong synergistic induction of proinflammatory mediators including S100A9, BD3 and CXCL3 was also observed after RME stimulation with M5 at 10 ng/ml (Figure 4B). IL-1 α , TNF α and IL-22 also induced a modest expression of these proinflammatory markers, while IL-17A and OSM were found to be the most active on RME. These inductions of S100A9 were confirmed, at the protein level, by measuring S100A9 concentrations by ELISA in culture supernatants of RME 72 h after stimulation (Figure 4C). Finally, we performed permeability assays by measuring the concentrations of LY diffusing through RME 72 h after cytokine stimulation. In the non-treated condition, the dye was retained in the cornified layer and RME permeability to LY was very low (< 1% of maximal permeability; Figures 4D and 4E). When RME were stimulated either with OSM or IL-17A

alone, the barrier function was altered as assessed by the increased concentrations of LY in RME culture media reaching ~ 12% and 21% of maximal permeability, respectively (Figure 4E). As expected, in RME stimulated with M5 at the highest concentration, the structure of the epidermis was completely disrupted, allowing the massive diffusion of the dye through RME, as evidenced by the observation of LY staining under the cornified layer and the highest concentrations of LY in the lower chamber (~ 64% of maximal permeability; Figure 4D and 4E). Together these results confirm that RME are sensitive to cytokine stimulation and could be used to reproduce some the features of psoriatic skin, including the production of inflammatory molecules and the altered epidermal differentiation.

4. Discussion

Few models of in vitro reconstituted epidermis from primary mouse keratinocytes are described, mainly due to the difficulty to maintain primary keratinocyte cultures and to reach a complete epidermal stratification, even by using established cultures of keratinocyte progenitors. Here, we propose a new protocol for the rapid and convenient generation of RME from primary NMEK, isolated from newborn mouse skin, harboring the structural and functional features of a normal epidermis. This method abrogates the use of murine keratinocyte progenitor cell lines, obtained after numerous passages as previously described (Segrelles et al. 2011; Vollmers et al. 2012), which need several weeks to reach a full epidermis-like structure. In vitro studies on mice skin equivalent models have also reported the dependence on the presence of a fibroblastic support or de-epidermised dermis for epidermis growth (Ikuta et al. 2006; Boehnke et al. 2007), thus complicating the protocol and introducing an additional inconstant parameter. In humans, the communication between fibroblasts and keratinocytes has been shown to be crucial for the formation of an efficient epidermis and a correct deposition of the basement membrane (El Ghalbzouri and Ponec

2004). However, in human models, this fibroblastic dependence has been abrogated by introducing numerous and specific growth factors in keratinocyte culture media, including bovine pituitary extract, transferrin, hydrocortisone, L-ascorbic acid, CaCl₂ and KGF (Frankart et al. 2012). In our protocol, we determined the optimal concentrations of these factors in the murine system to induce the differentiation and the complete stratification of keratinocytes without fibroblasts feeding.

We further characterized our model of RME by analyzing the expression of a panel of keratins and proteins involved in the formation of a stratified epidermis. Some studies suggested that in vitro murine epidermis equivalents were thicker than a normal murine epidermis (Ikuta et al. 2006). Our protocol generates RME with a thickness comparable to a normal mouse epidermis (~ 20-25 µm) with only two or three layers of stacked keratinocytes. The expression of K14 was normally restricted to the basal layer, as in normal mouse skin. As well, K6 expression was also found close the basement membrane, but presented a higher expression at day 3, which decreased progressively after the complete reconstitution of the epidermis. This high expression of K6 is considered as a feature of reconstituted epidermis models, the protocols mimicking an *in vivo* wound healing process in which K6 is overexpressed (Stark et al. 1999; Segrelles et al. 2011; Rosenberger et al. 2014a). In addition, labeling of K10, filaggrin and loricrin revealed their appropriate localization in the suprabasal and granular layers. For further characterization, we also analyzed the expression of connexins in RME, which play an important role to coordinate keratinocyte proliferation and differentiation during epidermis morphogenesis. A previous report described Cx43 localization in proliferating keratinocytes and a Cx26 labeling in the granular layer (Kandyba et al. 2008). We found the same localization in our model but Cx26 expression level seemed to be more elevated in RME than in normal epidermis. As K6, Cx26 has been also reported to be upregulated in a context of wound healing (Churko and Laird 2013), suggesting the

activated state of isolated primary keratinocytes engaged in a process of epidermis reconstitution. Finally, the cohesive structure of RME was demonstrated by the homogenous expression of E-cadherin throughout the structured epidermis and the constitution of a functional impermeable epidermal barrier.

As most of studies on mice epidermis were carried out *in vivo*, how differentiated murine keratinocytes respond individually to cytokine stimulation *in vitro* is poorly documented. Thus, to complete the functional characterization of our RME, we analyzed their response to proinflammatory cytokines previously described to target keratinocytes and to be involved in psoriasis (Guilloteau et al. 2010). After showing that RME expressed all the subunits of cytokine receptors, we evaluated their individual and synergistic activities, allowing a parallel with the human system. The mix of five cytokine, M5, induced a complete disruption of the structure of the RME and a downregulation of the expression of genes involved in epidermal differentiation. M5 stimulation reproduced also some features of inflammatory keratinocytes through the secretion of antimicrobial peptides and chemokines. These results were comparable to those observed in cytokine-stimulated RHE previously described (Guilloteau et al., 2010), highlighting similarities between human and mouse systems. Nonetheless, some differences could be observed between the two species. In RME stimulated by single cytokines, only IL-17A and OSM could disrupt the cornified layer by inhibiting epidermal differentiation. These cytokines were also shown to be the most active to induce a proinflammatory phenotype in murine keratinocytes (Rabeony et al. 2014; Pohin et al. 2016b). However, in humans, IL-22 and OSM were shown to be the most potent inhibitors of epidermal differentiation, in particular by inducing STAT-3 activation pathway (Rabeony et al. 2014), whereas IL-1, IL-17A and TNF α were mainly involved in the induction of innate immunity mediators (Guilloteau et al. 2010). In our hands, IL-22 was not as active as OSM on RME. This might be explained by the lowered expression of the IL-22R1 chain in our RME

compared to its expression in normal epidermis. Finally, IL-1 α and TNF α were also active on keratinocytes but failed to induce structural changes in RME formation. The regulation of the inflammatory markers induced by these two cytokines alone is limited but in a complex network involving multiple cytokines, such as in atopic dermatitis or psoriasis, it is likely that they contribute to cytokine synergy and to aggravate the disease.

In conclusion, we propose a new protocol for the formation of a complete RME which reproduces closely the tissue architecture of a normal epidermis. These RME have an intact barrier function and are able to respond to cytokines relevant to skin inflammation, similarly to what has been described in the human system. This new model of RME would greatly contribute to study the normal differentiation of epidermis or its alteration in inflammatory conditions. Moreover, this model opens the possibility to generate RME from genetically engineered mice to further dissect the role of the transgene (knock-in or knock-down) on the physiology of the epidermis.

Conflict of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr. Anne Cantereau (ImageUP, Université de Poitiers) for technical assistance in confocal microscopy, Dr. Michel Simon (INSERM U1056, Université de Toulouse) for the protocol of Lucifer Yellow assay and Pr. Guylène Page (Université de Poitiers) for the use of the Varioskan. This study was supported by grants from a clinical research program from Poitiers University Hospital, "La Ligue contre le Cancer", « Le Cancéropôle Grand Ouest », "Association Nationale de Recherche et de la Technologie" and from "Le conseil régional de la région Poitou-Charentes". M. P. is supported by "Le conseil régional de la région Poitou-Charentes".

Author Contributions

MP, CB, JG, JFJ designed protocols for RME generation. MP, CV, JG, CB, JFJ performed the experiments. MP, CV, JG, CB, LC, VH, LF, JM, FXB, FM, JCL, JFJ analyzed and interpreted the data. MP, JFJ wrote the manuscript. JFJ designed the research. All the authors read and approved the final manuscript.

References

- Bertolero, F., M.E. Kaighn, M.A. Gonda, and U. Saffiotti. 1984. Mouse epidermal keratinocytes. Clonal proliferation and response to hormones and growth factors in serum-free medium. *Exp Cell Res.* 155:64-80.
- Boehnke, K., N. Mirancea, A. Pavesio, N.E. Fusenig, P. Boukamp, and H.J. Stark. 2007. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *Eur J Cell Biol.* 86:731-746.
- Boniface, K., C. Diveu, F. Morel, N. Pedretti, J. Froger, E. Ravon, M. Garcia, E. Venereau, L. Preisser, E. Guignouard, G. Guillet, G. D'agregorio, J. Pene, J.P. Moles, H. Yssel, S. Chevalier, F.X. Bernard, H. Gascan, and J.C. Lecron. 2007. Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J Immunol.* 178:4615-4622.
- Borowiec, A.S., P. Delcourt, E. Dewailly, and G. Bidaux. 2013. Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PLoS One.* 8:e77507.
- Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:328-340.
- Carroll, J.M., and J.P. Moles. 2000. A three-dimensional skin culture model for mouse keratinocytes: application to transgenic mouse keratinocytes. *Exp Dermatol.* 9:20-24.
- Churko, J.M., and D.W. Laird. 2013. Gap junction remodeling in skin repair following wounding and disease. *Physiology (Bethesda)*. 28:190-198.
- El Ghalbzouri, A., and M. Ponec. 2004. Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. *Wound Repair Regen.* 12:359-367.
- Frankart, A., J. Malaisse, E. De Vuyst, F. Minner, C.L. de Rouvroit, and Y. Poumay. 2012. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol.* 21:871-875.
- Guenou, H., X. Nissan, F. Larcher, J. Feteira, G. Lemaitre, M. Saidani, M. Del Rio, C.C. Barrault, F.X. Bernard, M. Peschanski, C. Baldeschi, and G. Waksman. 2009. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet.* 374:1745-1753.
- Guilloteau, K., I. Paris, N. Pedretti, K. Boniface, F. Juchaux, V. Huguier, G. Guillet, F.X. Bernard, J.C. Lecron, and F. Morel. 2010. Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 α , and TNF- α Recapitulates Some Features of Psoriasis. *J Immunol.*
- Hennings, H., D. Michael, C. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook, and S.H. Yuspa. 1980. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell.* 19:245-254.
- Ikuta, S., N. Sekino, T. Hara, Y. Saito, and K. Chida. 2006. Mouse epidermal keratinocytes in three-dimensional organotypic coculture with dermal fibroblasts form a stratified sheet resembling skin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70:2669-2675.
- Kandyba, E.E., M.B. Hodgins, and P.E. Martin. 2008. A murine living skin equivalent amenable to live-cell imaging: analysis of the roles of connexins in the epidermis. *J Invest Dermatol.* 128:1039-1049.
- Moll, R., M. Divo, and L. Langbein. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 129:705-733.
- Pendaries, V., J. Malaisse, L. Pellerin, M. Le Lamer, R. Nachat, S. Kezic, A.M. Schmitt, C. Paul, Y. Poumay, G. Serre, and M. Simon. 2014. Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol.* 134:2938-2946.
- Pohin, M., W. Guesdon, A.A. Mekouo, H. Rabeony, I. Paris, H. Atanassov, L. Favot, J. McHeik, F.X. Bernard, C.D. Richards, J. Amiaud, F. Blanchard, J.C. Lecron, F. Morel, and J.F. Jegou. 2016.

- Oncostatin M overexpression induces skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation. *Eur J Immunol.*
- Ponec, M., A. Weerheim, J. Kempenaar, A. Mulder, G.S. Gooris, J. Bouwstra, and A.M. Mommaas. 1997. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *J Invest Dermatol.* 109:348-355.
- Poumay, Y., and A. Coquette. 2007. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch Dermatol Res.* 298:361-369.
- Prunieras, M., M. Regnier, and D. Woodley. 1983. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol.* 81:28s-33s.
- Rabeony, H., I. Petit-Paris, J. Garnier, C. Barrault, N. Pedretti, K. Guilloteau, J.F. Jegou, G. Guillet, V. Huguier, J.C. Lecron, F.X. Bernard, and F. Morel. 2014. Inhibition of keratinocyte differentiation by the synergistic effect of IL-17A, IL-22, IL-1alpha, TNFalpha and oncostatin M. *PLoS One.* 9:e101937.
- Rabeony, H., M. Pohin, P. Vasseur, I. Petit-Paris, J.F. Jegou, L. Favot, E. Frouin, M.A. Boutet, F. Blanchard, D. Togbe, B. Ryffel, F.X. Bernard, J.C. Lecron, and F. Morel. 2015. IMQ-induced skin inflammation in mice is dependent on IL-1R1 and MyD88 signaling but independent of the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol.* 45:2847-2857.
- Rheinwald, J.G., and H. Green. 1975. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell.* 6:317-330.
- Rosdy, M., and L.C. Clauss. 1990. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol.* 95:409-414.
- Rosenberger, S., A. Dick, S. Latzko, I. Hausser, H.J. Stark, M. Rauh, H. Schneider, and P. Krieg. 2014. A mouse organotypic tissue culture model for autosomal recessive congenital ichthyosis. *Br J Dermatol.* 171:1347-1357.
- Scott, C.A., D. Tattersall, E.A. O'Toole, and D.P. Kelsell. 2012. Connexins in epidermal homeostasis and skin disease. *Biochim Biophys Acta.* 1818:1952-1961.
- Segrelles, C., A. Holguin, P. Hernandez, J.M. Ariza, J.M. Paramio, and C. Lorz. 2011. Establishment of a murine epidermal cell line suitable for in vitro and in vivo skin modelling. *BMC Dermatol.* 11:9.
- Simpson, C.L., D.M. Patel, and K.J. Green. 2011. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:565-580.
- Stark, H.J., M. Baur, D. Breitkreutz, N. Mirancea, and N.E. Fusenig. 1999. Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *J Invest Dermatol.* 112:681-691.
- Tu, C.L., and D.D. Bikle. 2013. Role of the calcium-sensing receptor in calcium regulation of epidermal differentiation and function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 27:415-427.
- Tu, C.L., W. Chang, Z. Xie, and D.D. Bikle. 2008. Inactivation of the calcium sensing receptor inhibits E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and calcium-induced differentiation in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 283:3519-3528.
- Vollmers, A., L. Wallace, N. Fullard, T. Hoher, M.D. Alexander, and J. Reichelt. 2012. Two- and three-dimensional culture of keratinocyte stem and precursor cells derived from primary murine epidermal cultures. *Stem Cell Rev.* 8:402-413.
- Wilson, N.J., K. Boniface, J.R. Chan, B.S. McKenzie, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J.C. Lecron, R.A. Kastelein, D.J. Cua, T.K. McClanahan, E.P. Bowman, and R. de Waal Malefyt. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 8:950-957.

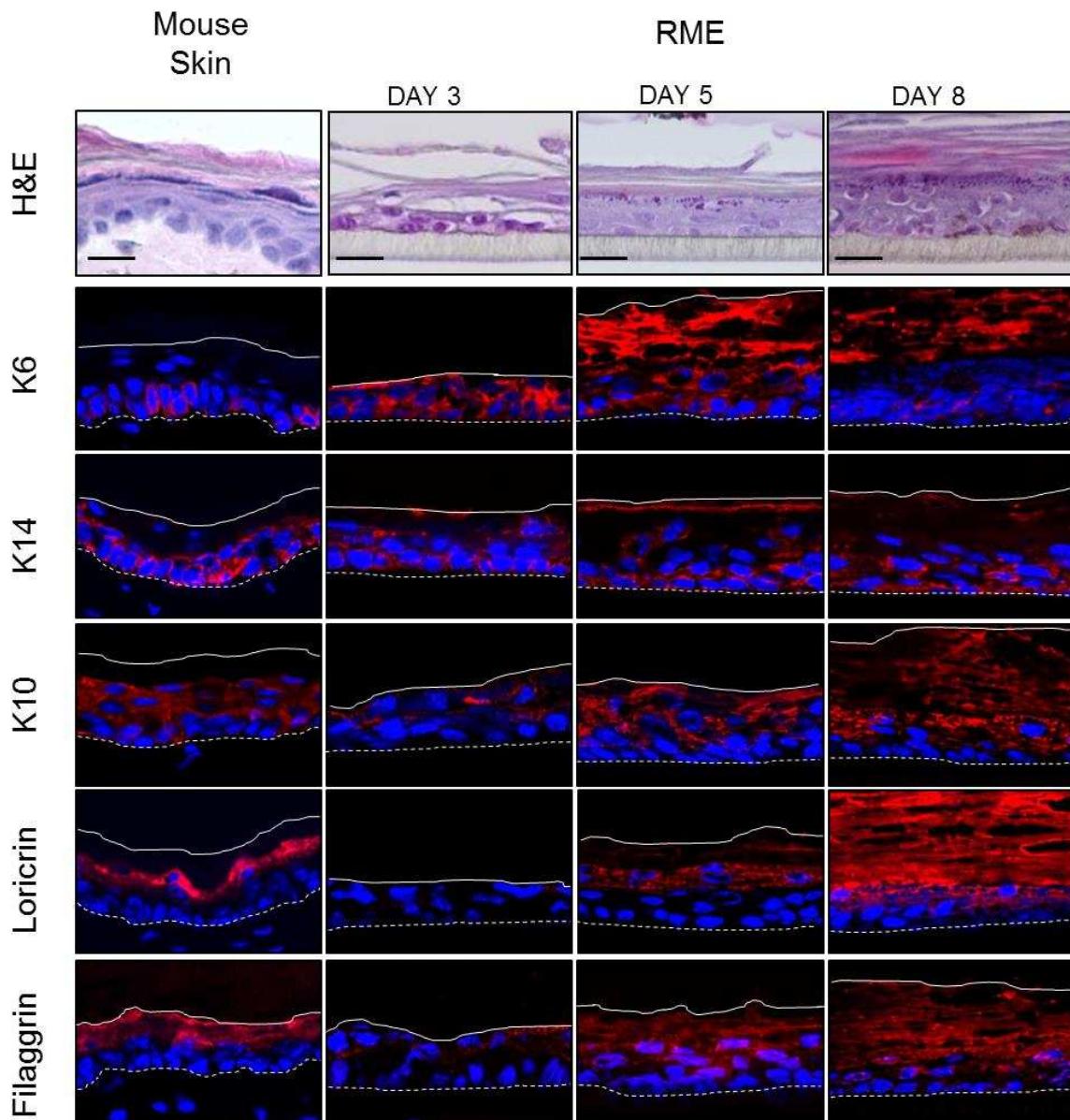


Figure 1. RME reproduce the structure and the expression profiles of differentiation markers of a normal mouse epidermis.

H&E histology of RME at days 3, 5 and 8 and normal mouse skin sections (upper panel). Scale bar, 20 μ m. Immunofluorescent staining for K6, K14 and K10, loricrin and filaggrin (all in red) and TOPRO-3 staining for cell nuclei (in blue). Original magnification: $\times 600$. The dotted white line delineates the dermal-epidermal junction of mouse skin or the membrane of the insert for RME. The solid white line marks the surface of the epidermis of mouse skin and RME. Images are representative of three independent experiments.

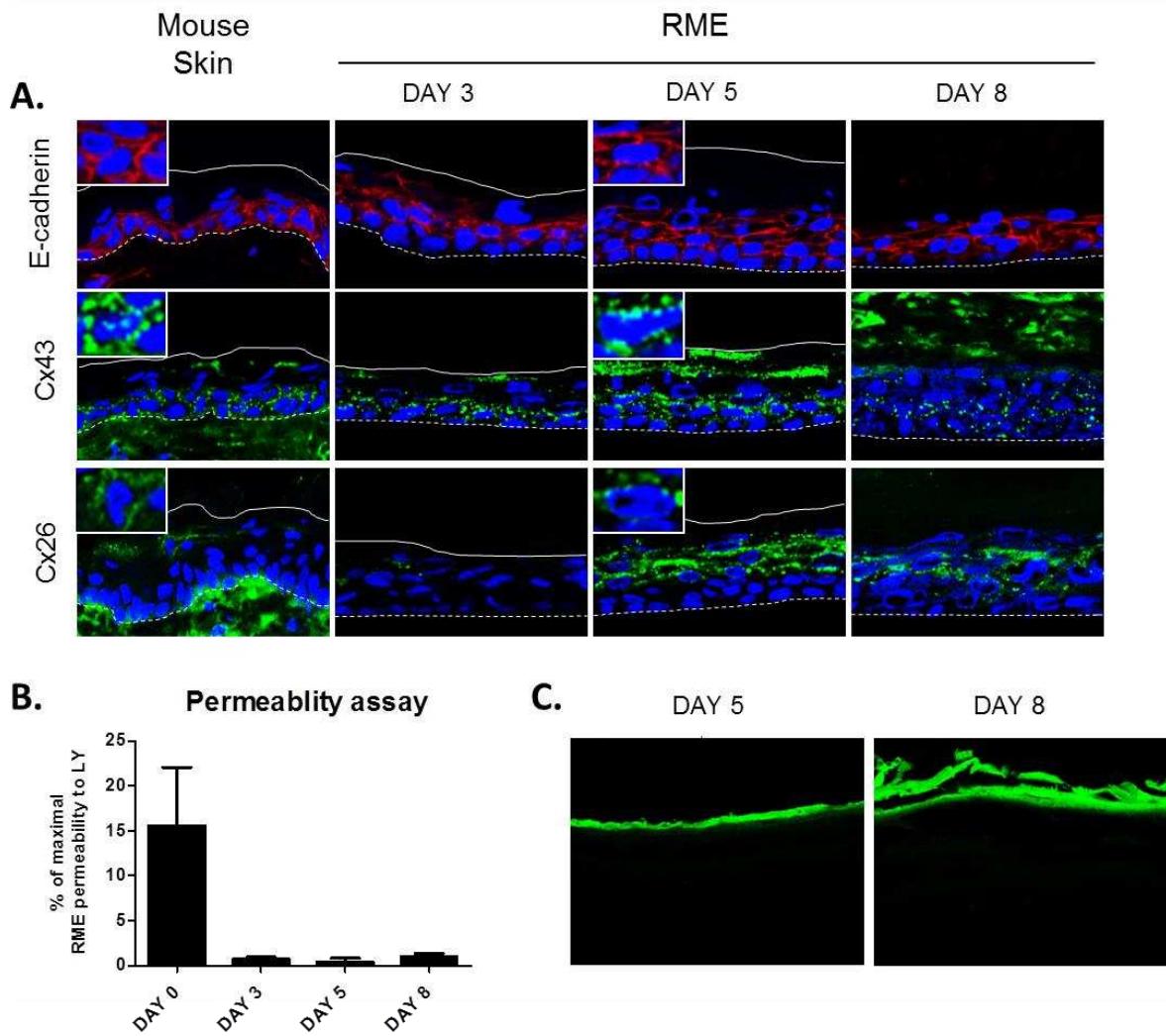


Figure 2. RME express GAP and adherence junctions and acquire their natural barrier function.

(A) Immunofluorescent staining of RME at days 3, 5 and 8 and normal mouse skin sections were performed with primary antibodies specific for E-cadherin (in red), Cx 43 and Cx 26 (both in green) and TOPRO-3 staining for cell nuclei (in blue). For details, see insets. The dotted white line delineates the dermal-epidermal junction of mouse skin or the membrane of the insert for RME. The solid white line marks the surface of the epidermis of mouse skin and RME. Images are representative of three independent experiments. Original magnification: $\times 600$. (B) Quantification of RME permeability to Lucifer Yellow (LY). Concentrations of LY passing through RME were measured in culture media, 6 h after dye deposition on the surface of RME at days 0, 3, 5 and 8 (n=3). Data are expressed as mean \pm SEM percentage of the maximal permeability for LY, previously determined by measuring LY concentrations that diffused through the polycarbonate membrane insert without keratinocytes. Data are from three independent experiments. (C) Lucifer Yellow staining by confocal microscopy, 6 h after dye deposition on the surface of RME at day 5 and day 8. The dotted white delineates the membrane of the insert. Original magnification: $\times 600$.

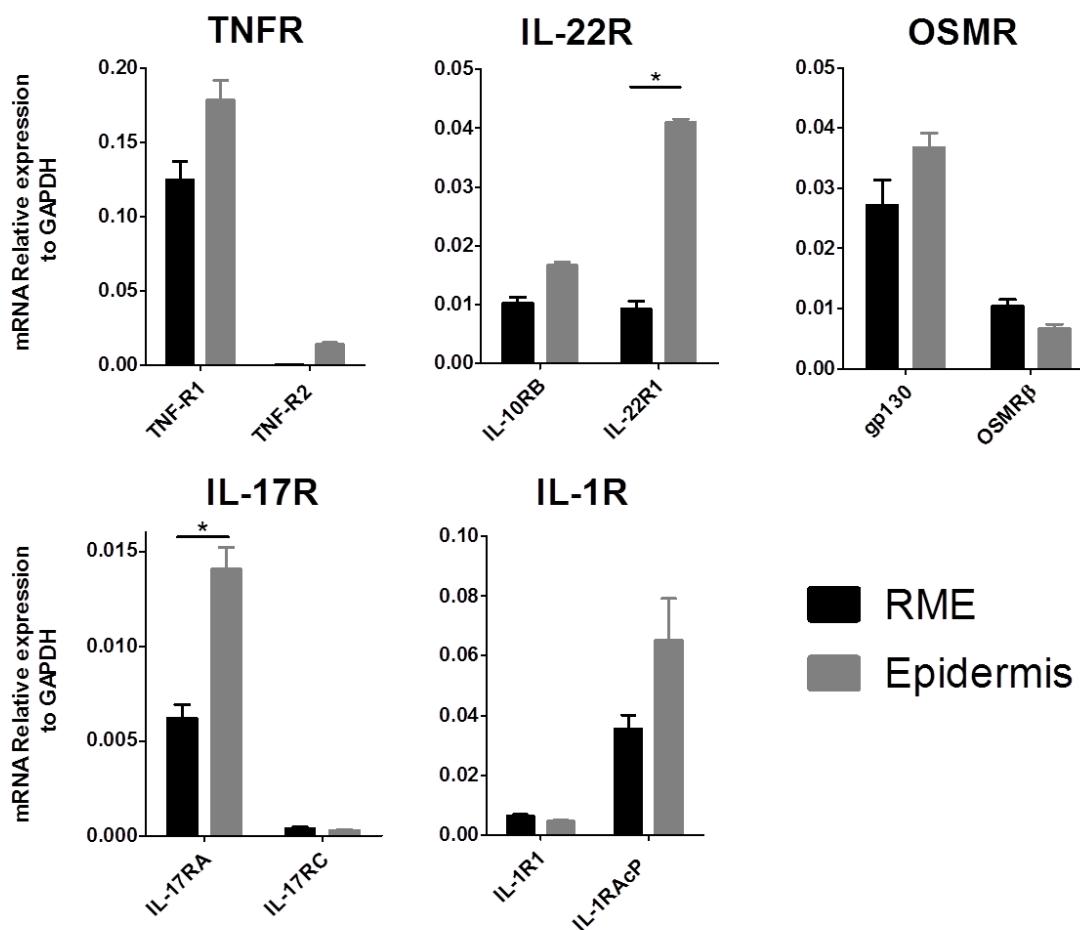


Figure 3. RME express cytokine receptors similarly to a normal epidermis.

Transcriptional analysis by RT-qPCR was performed for the indicated subunits of cytokine receptors in RME at 5 day and in normal epidermis. Data represent mean \pm SEM expression level of the gene of interest relative to the expression of the housekeeping gene GAPDH, from 4 independent experiments. * $p < 0.05$; using two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

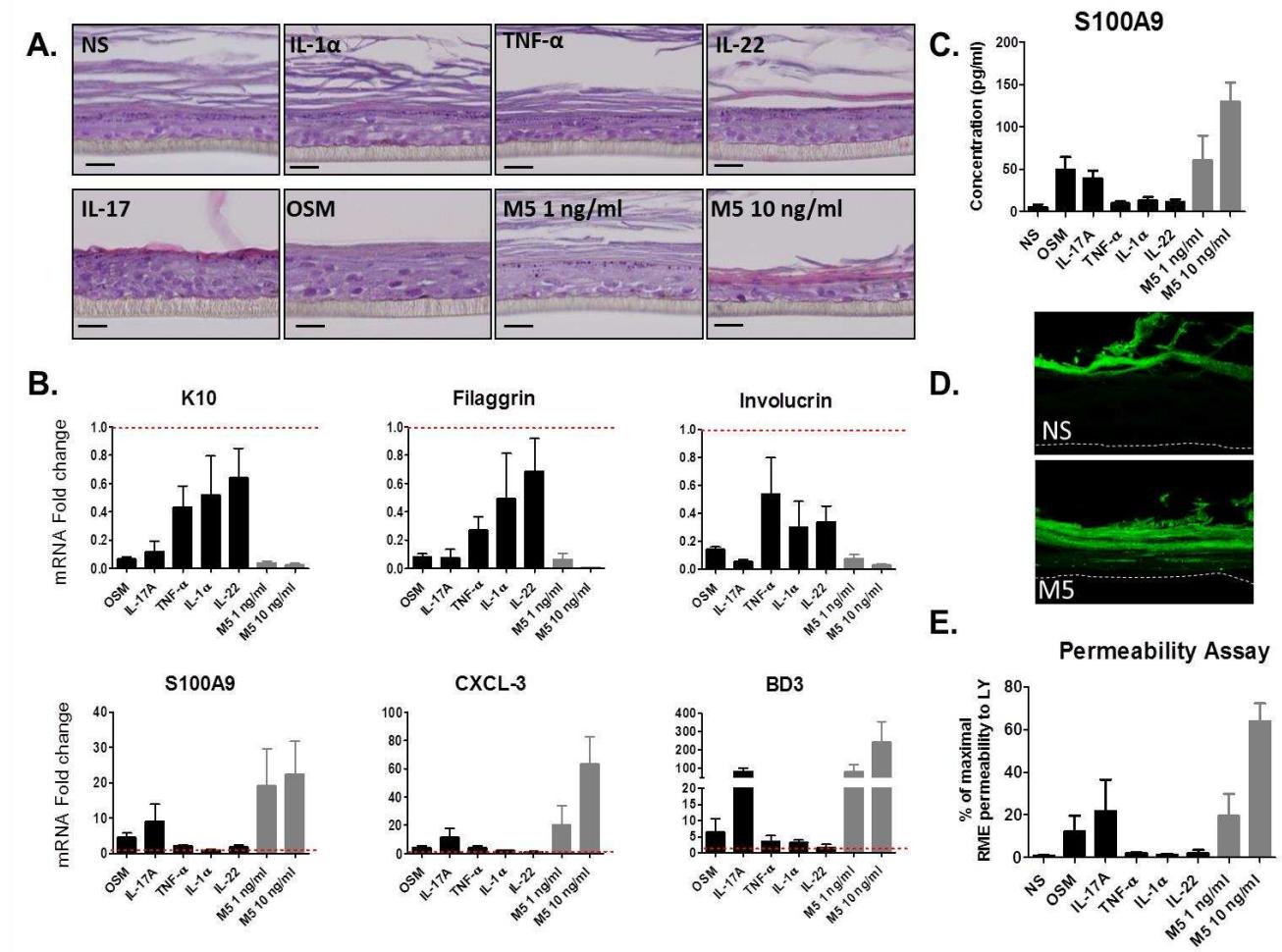


Figure 4. RME respond to skin-relevant proinflammatory cytokines by an altered differentiation and barrier function.

RME at day 5 were stimulated with the indicated single cytokines at 10 ng/ml and the mix of 5 cytokines, M5, at 1 and 10 ng/ml. (A) After 72 h of stimulation, RME histology was examined after H&E staining. Scale bar, 20 μ m. (B) After 24 h of stimulation, the expression of K10, filaggrin, involucrin, S100A9, CXCL-3 and BD3 was determined by RT-qPCR. Data represent mean \pm SEM mRNA fold change above unstimulated RME, from 4 independent experiments. (C) Mean \pm SEM S100A9 concentrations measured by ELISA in culture media of RME 72 h after cytokine stimulation. Data are from three independent experiments. (D) Fluorescence detection by confocal microscopy of LY in sections of non-stimulated (NS) and M5-stimulated RME, 6 h after dye deposition. Original magnification: $\times 600$. (E) Quantification of RME permeability to LY after cytokine stimulation for 72 h. Data are expressed as mean \pm SEM percentage of the maximal permeability for LY, from three independent experiments.

2. Développement des épidermes reconstruits chez la souris et comparaison avec les cultures primaires de kératinocytes en monocouche dans un contexte inflammatoire

En complément de l'article précédent sur la caractérisation histologique et fonctionnelle des RME, nous avons souhaité initier l'écriture d'un manuscrit qui fait la revue des modèles d'épidermes et de peaux reconstruits qui ont été développés chez la souris et qui ont bénéficié des avancées techniques réalisées chez l'homme. Nous souhaitons également mettre l'accent sur les différences de résultats que l'on peut générer, en termes de réponses inflammatoires, à partir de cultures 2D de kératinocytes, majoritairement indifférenciés et de modèles 3D. Les études décrivant l'expression de PRR et de récepteurs de cytokines par les kératinocytes murins, ainsi que leur réponse aux ligands de TLRs et aux cytokines sont rares et fragmentaires. De plus, la majorité d'entre-elles sont réalisées sur des cultures primaires de kératinocytes humains et directement comparées aux données obtenues *in vivo* chez la souris. Ainsi, il est généralement accepté que la réponse des kératinocytes humains aux TLRs est comparable à celle des kératinocytes murins *in vivo*. Or, nos données sur l'expression des TLR par les kératinocytes murins présentées dans ce manuscrit, mettent en évidence de nombreuses différences dans l'expression des TLR par les kératinocytes humains selon qu'ils sont cultivés en 2D ou 3D. Il est important de préciser que cette revue est présentée ici sous sa forme provisoire puisqu'elle ne présente que les données relatives aux TLRs et à l'action de leurs ligands et qu'elle sera complétée ultérieurement par la comparaison de l'expression d'un large panel de récepteurs de cytokines et de l'activité de leurs ligands entre les cultures 2D et 3D.

Development of three-dimensional models of reconstituted murine epidermis and mouse skin equivalents: comparison with monolayer keratinocyte cultures in an inflammatory context.

Mathilde Pohin¹, Carolina Veaute², François-Xavier Bernard^{1, 3}, Jean-Claude Lecron, ^{1,4}, Franck Morel,¹ and Jean-François Jégou¹

¹Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC), EA 4331, Université de Poitiers, France

² Laboratorio de Inmunología Básica, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

³ BioAlternatives, Gençay, France

⁴ CHU de Poitiers, France.

Introduction

Three-dimensional (3D) models of engineered skins are valuable and useful tools in skin biology research. Great technical advances have been done for decades to develop human skin equivalents and epidermal organotypic cultures in order to study normal skin physiology and pathologies. In humans, the fields of applications are wide from basic research to better understand cell biology, skin morphogenesis, ageing and disease modelling, to more applied purposes including in vitro testing for dermocosmetics and drugs, photo-protection and human skin reconstruction (Ali et al. 2015). The use of 3D models represents either an alternative or a complementary approach to in vivo studies aimed at dissecting the mechanisms that underlie the physiopathology of the cutaneous diseases. For example, in the area of skin inflammation, the use of animal models has largely contributed to investigate the role of cytokines in cutaneous diseases, such as psoriasis, atopic dermatitis (AD) and delayed-type hypersensitivity. These pathologies are known to lead to distinct clinical manifestations and characterized by the involvement of specific immune cells and well-defined cytokine secretion profiles. In these in vivo studies, mouse models of skin inflammation are either spontaneous or induced by topical or subcutaneous administration of different sensitizing agents, and mostly use genetic engineered mouse strains overexpressing the cytokine of interest in the skin, or deficient either for the cytokine or for a chain of cytokine receptor (Jin et al. 2009; Wagner et al. 2010; Rabeony et al. 2015; Pohin et al. 2016a). In order to focus on cytokine activity only on keratinocyte populations, complementary in vitro experiments of cell stimulation are often performed and most of them employed two-dimensional (2D) standard monolayer cell cultures to draw their conclusions.

To explore the innate immune functions of keratinocytes to microbial agents, few studies reported their response to Toll-like receptor (TLR) stimulations using human 3D

models. TLR2 agonists have been reported to induce the expression of cathelicidin in organotypic cultures of human epidermis (Schauber et al. 2007). The synthetic TLR3 agonist Poly(I:C) was shown to induce the expression of TSLP in reconstituted human epidermis (RHE) (Lee et al. 2011). However, most data on the response of keratinocytes to TLR stimulations were obtained from 2D cultures of keratinocytes in the humans and the mouse systems (Miller 2008).

The major inconvenient of these 2D keratinocyte cultures, commonly used for in vitro studies, is that they do not fully recapitulate the epidermis architecture and the physiological properties of differentiated keratinocytes, which are naturally present in stratified epidermis. Thus, results obtained from undifferentiated keratinocyte cultures stimulated by cytokines or TLR agonists might be incomplete and do not reflect the real response of a native epidermis. To overcome the limitations of 2D cultures and to get closer to the physiological conditions, 3D epidermis and skin models have also been developed in mouse.

Here, we will review the different mouse 3D models of skin equivalents and reconstituted epidermis which have been reported over the two past decades and which have benefited from the technical advances for the development of human 3D models. Then, in a context of skin inflammation, we will focus on the difference between 2D and 3D cultures of keratinocytes with regards to their Toll-like receptor (TLR) expression profiles and their differential response to some TLR agonists.

History of the development of reconstituted murine epidermis and skin equivalent models

In humans, the development of 3D models of keratinocyte culture has been marked by important technical advances which have been previously reviewed in an extended fashion

(Poumay and Coquette 2007; Ali et al. 2015; Arnette et al. 2016). Among them, in their first trials to induce keratinocyte colony stratification, Rheinwald and Green reported in 1975 the use of irradiated 3T3 fibroblasts as feeder cells to support keratinocyte growth and stratification, and the need to supplement culture medium with serum, epidermal growth factor (EGF) and insulin. Then, Prunieras et al. improved the fibroblastic support by using de-epidermized dermis (Prunieras et al. 1983) or a matrix composed of collagen and fibroblasts (Asselineau and Prunieras 1984). In these studies, the authors raised keratinocyte cultures up to the air-liquid interface (ALI) to trigger differentiation and stratification; nonetheless, the patterns of keratin expression did not reproduce accurately those of native human epidermis. The calcium concentration was also identified as regulator of keratinocyte proliferation/differentiation balance. Cultivating mouse epidermal keratinocytes in low CaCl_2 concentration (0.07 mM) favors cell growth while cell differentiation is promoted with high CaCl_2 concentration (up to 1.5mM). Finally, an efficient way to obtain reconstituted epidermis without fibroblastic support consisted in substituting serum in media by specific growth factors, leading to a better stratification and a functional cutaneous barrier (Bertolero et al. 1984; Rosdy and Clauss 1990; Ponec et al. 1997a).

In the mouse system, Carroll and Molès adapted a protocol from Prunieras' model to reconstruct within 2-3 weeks a mature epidermis on a human dead de-epidermised dermis. This neoepidermis expressed keratins (K) 1/6/14 and involucrin at their expected locations, but harbored a thickness closer to a human epidermis than a normal mouse epidermis (Carroll and Moles 2000). Thereafter, Ikuta et al developed a stable organotypic coculture, in which mouse primary keratinocytes are grown on a collagen gel containing fibroblasts, as dermis equivalent, and raised up on the ALI to trigger epidermal differentiation. These 3D cocultures presented normal K5, K1 and loricrin expressions two weeks after ALI exposure, and expressed some cytokines involved in inflammation and wound repair such as $\text{IL-1}\alpha/\beta$, $\text{TGF}\beta$

and KGF1/2 (Ikuta et al. 2006). As these models do not allow following the morphological events of epidermal differentiation *in situ*, Kandyba et al developed 3D organotypic skin equivalents by seeding primary keratinocytes onto Transwell polyester culture inserts with a transparent semipermeable membrane in the presence of fibroblasts on the underside (Kandyba et al. 2008). Seven days after the ALI exposure, small areas of stratification with large flattened differentiating cells could be observed. By confocal microscopy, the expression of the Ki67 proliferation marker was detected in the basal layer, as well as those of K10, filaggrin and loricrin in the upper terminally differentiating layers. In this study, the expression of connexins (Cx) was also analyzed and revealed a predominant expression of Cx43 in the basal layer that extended slightly to the suprabasal keratinocytes, while the expression of Cx26 and Cx30 was restricted to the upper layer between the large flattened differentiating keratinocytes. With its optical transparency, this model of organotypic epidermis is particularly suited for the vital *in situ* visualization of cell-cell interactions and 3D organization of the epidermis and for wound healing *in vitro* studies with the possibility to follow daily the process of wound closure and restratification.

By contrast to human primary keratinocytes, the difficulty to cultivate mouse primary keratinocytes prompted Segrelles et al to establish a model of murine epidermal cell line, termed COCA cells, which retain their ability to differentiate for more than 75 passages to form a full epidermis-like structure in 3 weeks when cultivated in medium with high calcium concentration (Segrelles et al. 2011). Although the histological study showed that differentiated keratinocytes were well-organized in a multiple layered structure, the patched expression pattern, and not continuous as expected, of some differentiation markers such as K10, filaggrin and loricrin could be a limitation to this model. In *in vivo* grafting assays, COCA keratinocytes seeded on the subcutaneous fascia were able to regenerate an epidermis-like structure which expressed some early and late differentiation markers correctly but

presented some hyperplasia. In another study, Vollmers et al used multipotent keratinocyte stem and precursor cell cultures (KSPC) (Vollmers et al. 2012). These cells were obtained from primary cultures derived from neonatal mouse skin after cultivation up to 55 passages. KSPC were grown on filter inserts at the ALI to form epidermal equivalents. The epidermal stratification was quite similar to those observed in the Segrelle's model, the epidermis presenting a slight hyperplasia and a patched expression of K10, filaggrine and involucrin.

Other 3D mouse models have been developed to reproduce the features of pathological skins. Thus, a mouse organotypic tissue culture model for autosomal recessive congenital ichthyosis has been established by cocultivating primary keratinocytes from 12(R)-lipoxygenase-deficient mice and mouse dermal fibroblasts embedded in a scaffold of collagen type I (Rosenberger et al. 2014a). Two weeks after ALI exposure, the skin equivalents generated from both wild-type and transgenic mice showed a normal morphogenesis with a well-organized stratification of keratinocytes. As well, the expression pattern of proliferation, differentiation and maturation, basal lamina and adhesion markers was similar between the two strains of mice. However, skin equivalents from 12(R)-lipoxygenase-deficient mice presented some ultrastructural anomalies, including the number and size of keratohyaline granules and the presence of unusual vacuoles in the granular layer. This finding was correlated with an altered lipid composition and an impaired epidermal barrier function in transgenic mice-derived skin equivalents.

More recently, we also proposed a protocol adapted from these previous studies which allow the simple, rapid and reproducible formation of a reconstituted mouse epidermis (RME) which recapitulates precisely the architecture of a normal mouse epidermis (Pohin et al, submitted). This protocol has the advantage to generate epidermis equivalents within 5 days by cultivating sequentially normal primary murine keratinocytes isolated from newborn in a proliferation medium then in a differentiation medium after ALI exposure, without requiring

the use of fibroblastic scaffold. In this study, we have characterized the expression pattern of differentiation markers and showed that they were correctly expressed at their expected localization. Particularly, the expression of K10 and the late differentiation markers was shown to be continuous throughout the RME and not patchy, as previously observed in other 3D models (Segrelles et al. 2011; Vollmers et al. 2012). This RME model is particularly suitable to study the epidermis morphology and its changes in response to growth factors. In addition, in an inflammatory context, the response of RME to exogenous stimulations such as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or the influence proinflammatory cytokines could be analyzed without interference by factors secreted from a dermis equivalent.

Differential TLR expression patterns and response to TLR agonists between 2D and 3D keratinocytes cultures

In order to compare the capacity of undifferentiated and differentiated keratinocytes to elicit an inflammatory response to a stimulus of infectious origin, we analyzed the expression levels of TLRs by RT-qPCR in unstimulated monolayer NMEK cultures and RME, as well as in isolated mouse epidermis (Figure 1). We could observe clear differences between 2D cultures of undifferentiated keratinocytes and keratinocytes which are engaged in a process of stratification. Thus, the expression of TLR4, TLR5, TLR7 and TLR8 is higher in NMEK cultures than in RME and native epidermis. By contrast, the expression of TLR3 in NMEK was found at a lower level by comparison with a native epidermis and with RME, although this difference was not significant. No significant difference could be observed for TLR2 expression. In addition, in our hands, we could not detect TLR1, TLR6 and TLR9 in the three groups of samples, excepted for TLR6 expression in the native epidermis (data not shown). Of note, the TLRs expression levels were almost similar in RME and native epidermis, the

only significant difference being observed for TLR5, significantly higher in the epidermis than in RME ($p < 0.01$). These differences in TLR expression levels between the native and reconstituted tissues might be explained by their cellular composition. Indeed, the native epidermis contains other cell types than keratinocytes, absent in RME, such as epidermal Langerhans cells which are known to express TLR2, TLR4 and TLR9, but not TLR7 in mouse (Mitsui et al. 2004), or dermal epithelial T cells, although their TLR expression pattern is not well characterized in mouse to date. Likewise, few data are available on the expression of TLRs by murine keratinocytes by contrast to human keratinocytes which are reported to express most TLRs, except TLR7 and TLR8 (Lebre et al. 2007; Miller 2008).

To further compare the inflammatory response of 2D and 3D cultures of keratinocytes to TLR agonists, we decided to perform stimulations with the synthetic double-stranded RNA, Poly(I:C), an agonist of TLR3, whose expression was found higher in RME than NMEK (Figure 1), and the flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* which binds to TLR5, whose expression is higher in NMEK than RME (Figure 1). The innate immune response of keratinocytes was assessed at the transcriptional level by analyzing the expression of antimicrobial peptides, chemokines and proinflammatory cytokines 24 hours after stimulations (Figure 2). Both expressions of the Th1-attracting chemokine CXCL10 and the type I interferon, IFN β , were upregulated in NMEK after Poly(I:C) stimulation, but not in RME. By contrast, the expression of CXCL22 and CXCL20, chemotactic for Th2 and Th17 cells respectively, was induced in RME after flagellin exposure. More surprisingly, the expression of the antimicrobial peptides S100A8 and β defensin-3 (BD3) were not modified after the exposure of NMEK and RME to TLR agonists. Nonetheless, unstimulated RME presented higher levels of basal expression of antimicrobial peptides than unstimulated NMEK.

These results are surprising and interesting with regards to the expression levels of TLR. Indeed, NMEK although presenting a lower expression of TLR3 are the cells that respond to the synthetic agonist Poly(I:C), a molecular pattern associated with viral infection. This finding might be explained by the possibility that the TL3 agonist could also be recognized via others pathways in the mouse system, involving the protein kinase R (PKR), the cytosolic RNA helicases retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), as previously shown in the human system (Prens et al. 2008). However, the induction of IFN β and CXCL10 in stimulated NMEK is consistent with an anti-viral response of the keratinocyte and is in agreement with studies reporting the induction of CXCL10 by human primary skin and oral keratinocytes in response to Poly(I:C) (Olaru and Jensen 2010; Fukui et al. 2013). Conversely, only RME, which present a lower expression of TLR5 than NMEK, were found to respond to the bacterial flagellin by an increased expression of CCL20 and CCL22, although in the human system, CCL20 was found upregulated by primary keratinocytes after flagellin exposure (Olaru and Jensen 2010). Unexpectedly, flagellin failed to induce the expression of antimicrobial peptides in murine keratinocytes, both in the 2D and the 3D model of cultures. This finding differs from previous studies showing that human epidermal keratinocytes upregulate S100A7 and the heterodimer S100A8/S100A9 in response to bacterial flagellin (Abtin et al. 2008; Abtin et al. 2010).

Conclusion

Together, these contrasting results between 2D and 3D cultures highlight the importance to study the inflammatory response of keratinocytes in both models to have a representative view of their innate immune functions.

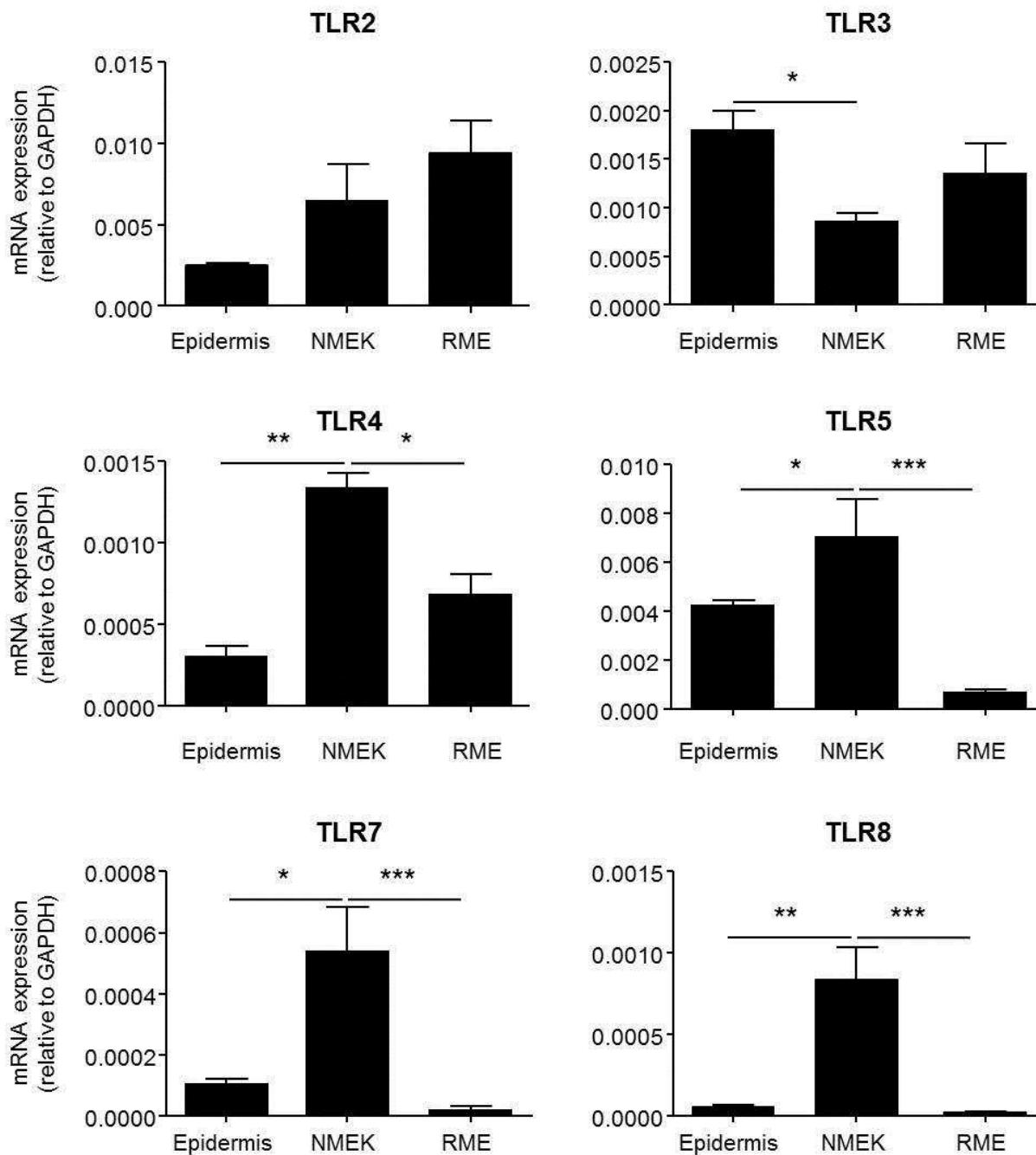


Figure 1. Differential expression patterns of Toll-like receptors (TLR) between 2D and 3D cultures of keratinocytes. Monolayer cell cultures of normal murine epidermal keratinocytes (NMEK), reconstituted mouse epidermis (RME) and isolated native epidermis were obtained and total RNA from unstimulated NMEK, RME and epidermis was extracted and reverse-transcribed, as previously described (Pohin et al, submitted), for the transcriptional analysis by quantitative PCR of TLR basal expression. Expressions are presented as relative to GAPDH expression and data are from three independent experiments done in triplicate for each sample. Statistical analysis was done using Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test. *, p < 0.05 ; **, p < 0.01 ; ***, p < .001.

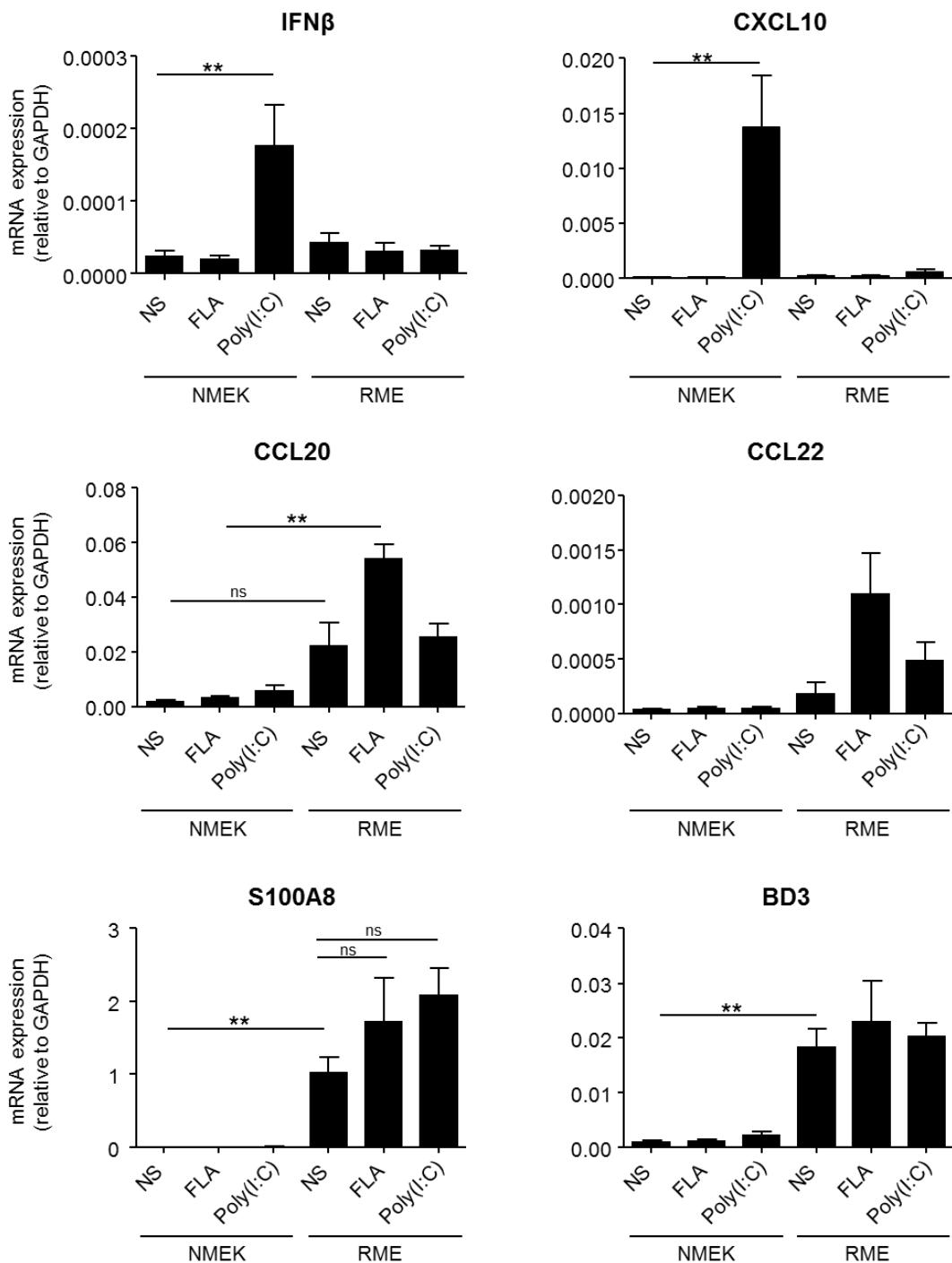


Figure 2. Inflammatory response of NMEK and RME to flagellin and Poly(I:C) exposure. NMEK and RME cultures were stimulated with 100 pg/ml of flagellin (FLA) from *Pseudomonas aeruginosa* (Invivogen) or 10 μ g/ml of Poly(I:C), high molecular weight (Invivogen) for 24 h. Total RNA was extracted and reverse-transcribed as previously described (Pohin et al, submitted), for the transcriptional analysis by quantitative PCR of IFN β , chemokines (CXCL10, CCL22, CCL20) and the antimicrobial peptides S100A8 and β -defensin 3 (BD3). Expressions are presented as relative to GAPDH expression and data are from three independent experiments done in triplicate for each sample. Statistical analysis was done using Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test. *, p < 0.05 ; **, p < 0.01 ; ns, p < .001.

References

- Abtin, A., L. Eckhart, R. Glaser, R. Gmeiner, M. Mildner, and E. Tschachler. 2010. The antimicrobial heterodimer S100A8/S100A9 (calprotectin) is upregulated by bacterial flagellin in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **130**:2423-2430.
- Abtin, A., L. Eckhart, M. Mildner, F. Gruber, J. M. Schroder, and E. Tschachler. 2008. Flagellin is the principal inducer of the antimicrobial peptide S100A7c (psoriasin) in human epidermal keratinocytes exposed to *Escherichia coli*. *FASEB J* **22**:2168-2176.
- Ali, N., M. Hosseini, S. Vainio, A. Taieb, M. Cario-Andre, and H. R. Rezvani. 2015. Skin equivalents: skin from reconstructions as models to study skin development and diseases. *Br J Dermatol* **173**:391-403.
- Arnette, C., J. L. Koetsier, P. Hoover, S. Getsios, and K. J. Green. 2016. In Vitro Model of the Epidermis: Connecting Protein Function to 3D Structure. *Methods Enzymol* **569**:287-308.
- Asselineau, D. and M. Prunieras. 1984. Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication. *Br J Dermatol* **111 Suppl 27**:219-222.
- Bertolero, F., M. E. Kaighn, M. A. Gonda, and U. Saffiotti. 1984. Mouse epidermal keratinocytes. Clonal proliferation and response to hormones and growth factors in serum-free medium. *Exp Cell Res* **155**:64-80.
- Carroll, J. M. and J. P. Moles. 2000. A three-dimensional skin culture model for mouse keratinocytes: application to transgenic mouse keratinocytes. *Exp Dermatol* **9**:20-24.
- Fukui, A., K. Ohta, H. Nishi, H. Shigeishi, K. Tobiume, M. Takechi, and N. Kamata. 2013. Interleukin-8 and CXCL10 expression in oral keratinocytes and fibroblasts via Toll-like receptors. *Microbiol Immunol* **57**:198-206.
- Ikuta, S., N. Sekino, T. Hara, Y. Saito, and K. Chida. 2006. Mouse epidermal keratinocytes in three-dimensional organotypic coculture with dermal fibroblasts form a stratified sheet resembling skin. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:2669-2675.
- Jin, H., R. He, M. Oyoshi, and R. S. Geha. 2009. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **129**:31-40.
- Kandyba, E. E., M. B. Hodgins, and P. E. Martin. 2008. A murine living skin equivalent amenable to live-cell imaging: analysis of the roles of connexins in the epidermis. *J Invest Dermatol* **128**:1039-1049.
- Lebre, M. C., A. M. van der Aar, L. van Baarsen, T. M. van Capel, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* **127**:331-341.
- Lee, K. H., K. A. Cho, J. Y. Kim, J. H. Baek, S. Y. Woo, and J. W. Kim. 2011. Filaggrin knockdown and Toll-like receptor 3 (TLR3) stimulation enhanced the production of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) from epidermal layers. *Exp Dermatol* **20**:149-151.
- Miller, L. S. 2008. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol* **24**:71-87.
- Mitsui, H., T. Watanabe, H. Saeki, K. Mori, H. Fujita, Y. Tada, A. Asahina, K. Nakamura, and K. Tamaki. 2004. Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol* **122**:95-102.
- Olaru, F. and L. E. Jensen. 2010. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. *Exp Dermatol* **19**:e314-316.
- Pohin, M., W. Guesdon, A. A. Mekouo, H. Rabeony, I. Paris, H. Atanassov, L. Favot, J. McHeik, F. X. Bernard, C. D. Richards, J. Amiaud, F. Blanchard, J. C. Lecron, F. Morel, and J. F. Jegou. 2016. Oncostatin M overexpression induces skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation. *Eur J Immunol* **46**:1737-1751.
- Ponec, M., S. Gibbs, A. Weerheim, J. Kempenaar, A. Mulder, and A. M. Mommaas. 1997. Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res* **289**:317-326.

- Poumay, Y. and A. Coquette. 2007. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch Dermatol Res* **298**:361-369.
- Prens, E. P., M. Kant, G. van Dijk, L. I. van der Wel, S. Mourits, and L. van der Fits. 2008. IFN-alpha enhances poly-IC responses in human keratinocytes by inducing expression of cytosolic innate RNA receptors: relevance for psoriasis. *J Invest Dermatol* **128**:932-938.
- Prunieras, M., M. Regnier, and D. Woodley. 1983. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol* **81**:28s-33s.
- Rabeony, H., M. Pohin, P. Vasseur, I. Petit-Paris, J. F. Jegou, L. Favot, E. Frouin, M. A. Boutet, F. Blanchard, D. Togbe, B. Ryffel, F. X. Bernard, J. C. Lecron, and F. Morel. 2015. IMQ-induced skin inflammation in mice is dependent on IL-1R1 and MyD88 signaling but independent of the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol* **45**:2847-2857.
- Rosdy, M. and L. C. Clauss. 1990. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol* **95**:409-414.
- Rosenberger, S., A. Dick, S. Latzko, I. Hausser, H. J. Stark, M. Rauh, H. Schneider, and P. Krieg. 2014. A mouse organotypic tissue culture model for autosomal recessive congenital ichthyosis. *Br J Dermatol* **171**:1347-1357.
- Schauber, J., R. A. Dorschner, A. B. Coda, A. S. Buchau, P. T. Liu, D. Kiken, Y. R. Helfrich, S. Kang, H. Z. Elalieh, A. Steinmeyer, U. Zugel, D. D. Bikle, R. L. Modlin, and R. L. Gallo. 2007. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* **117**:803-811.
- Segrelles, C., A. Holguin, P. Hernandez, J. M. Ariza, J. M. Paramio, and C. Lorz. 2011. Establishment of a murine epidermal cell line suitable for in vitro and in vivo skin modelling. *BMC Dermatol* **11**:9.
- Vollmers, A., L. Wallace, N. Fullard, T. Hoher, M. D. Alexander, and J. Reichelt. 2012. Two- and three-dimensional culture of keratinocyte stem and precursor cells derived from primary murine epidermal cultures. *Stem Cell Rev* **8**:402-413.
- Wagner, E. F., H. B. Schonthaler, J. Guinea-Viniegra, and E. Tschachler. 2010. Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* **6**:704-714.

1. Comparaison de l'activité de l'OSM sur les NMEK et sur les RME

Chez l'homme, la comparaison du profil transcriptomique de NHEK et de RHE en réponse à l'OSM montre de nombreuses différences concernant les profils de gènes associés à la différenciation épidermique (Finelt et al. 2005; Gazel et al. 2006). Ces auteurs ont ainsi montré que les RHE stimulés par l'OSM présentent des modifications de l'expression des gènes mimant certains aspects du psoriasis tandis que la réponse des NMEK à l'OSM est associée à une régulation de voies métaboliques, du cycle cellulaire et de l'adhésion cellulaire. Néanmoins, la réponse inflammatoire des cultures primaires de kératinocytes en comparaison à celle d'épiderme reconstruit est peu détaillée par ces auteurs.

Afin de poursuivre la description du modèle d'épiderme reconstruit murin et compléter l'étude du rôle *in vitro* de l'OSM, développée dans l'axe I, une analyse comparative des profils d'expression des NMEK et des RME en réponse à l'OSM a été réalisée dans le but d'identifier des gènes différentiellement induits par l'OSM entre ces deux modèles. Ces données montrent ainsi la pertinence de l'utilisation d'un modèle de RME dans la description de la réponse inflammatoire des kératinocytes aux cytokines. Pour cela, nous avons effectué une large analyse transcriptionnelle des gènes impliqués dans la différenciation épidermique, de chimiokines, de PAM et de cytokines induits ou inhibés en réponse à une stimulation par l'OSM.

Les RME et les NMEK expriment les sous-unités gp130, OSM-R β et LIF-R β du récepteur de l'OSM de type I et de type II (Figure 29). Les niveaux d'expression transcriptionnelle de ces sous-unités sont identiques chez les NMEK et les RME. En outre, l'OSM semble induire une augmentation de l'expression d'OSM-R β par les NMEK et les RME tandis que le LIF-R β semble être légèrement diminué en réponse à cette cytokine (Figure 29). En revanche, l'expression de la sous-unité gp130 commune n'est pas modifiée par l'OSM. Ceci confirme que l'OSM est aussi bien active sur les NMEK que sur les kératinocytes présentant tous les stades de différenciation des RME.

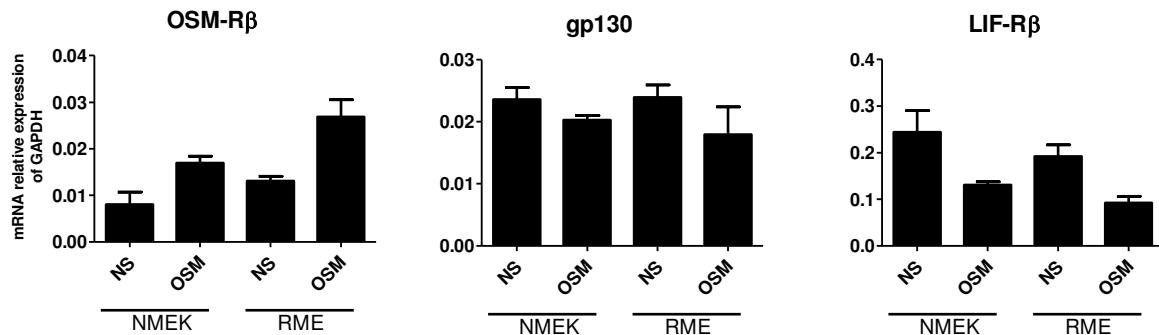


Figure 29 : Comparaison de l'expression des sous-unités des récepteurs de l'OSM par les NMEK et les RME. Les NMEK et les RME sont issus des mêmes cultures primaires de kératinocytes et ont été ensemencés à raison de 100 000 cellules/puits pour les NMEK et $1.125.10^6$ cellules par insert pour les RME. A 80% de confluence pour les NMEK et après cinq jours de culture à l'interface air/liquide pour les RME, les kératinocytes ont été stimulés à l'aide d'OSM recombinante (10ng/ml) pendant 24h. Les ARN ont été extraits et analysés par RT-qPCR pour l'expression des chaînes des récepteurs de l'OSM . NS : non stimulés, OSM : oncostatine M, NMEK : *Normal Murine Epidermal Keratinocytes*, RME : *Reconstituted Murine Epidermis*.

Les niveaux d'expression de K6 et 16 sont très similaires entre les NMEK et les RME tandis que l'expression de K16 est plus importante pour les RME en comparaison aux NMEK. Ceci est en accord avec le fait que K16 est majoritairement exprimée dans les couches suprabasales des épidermes hyperprolifératifs tandis que K6 est exprimée dès la couche basale (Moll et al. 2008). De plus, l'expression de ces kératines est importante dans ces modèles *in vitro* aussi bien pour les NMEK que pour les RME, en accord avec la forte expression de K6 par immunohistofluorescence pour le modèle RME (Pohin et al. 2016 en révision JTERM). Cette expression est associée au caractère activé des kératinocytes formant les épidermes reconstruits, similaire à celui décrit au cours de la cicatrisation (Stark et al. 1999 ; Segrelles et al. 2011; Rosenberger et al. 2014). Du fait de ces niveaux d'expression basale élevés, l'OSM entraîne une légère augmentation de l'expression de K6 et K16 alors que l'induction de ces kératines est importante *in vivo* après surexpression d'OSM (Pohin et al. 2016). De manière attendue, les niveaux d'expression de K1 et K10 sont bien plus importants dans les RME comparé aux NMEK, de même que la filaggrine et l'involucrine. En réponse à l'OSM, l'expression de ces marqueurs est fortement diminuée pour les NMEK mais aussi pour les RME. Néanmoins, cette diminution est beaucoup plus marquée pour les RME qui expriment plus fortement ces marqueurs de la différenciation au niveau basal (NS) (Figure 30). Le niveau d'expression de DSG3 exprimée majoritairement dans la couche basale, est comparable entre les NMEK et les RME tandis que le niveau expression de DSG1

associée à la formation de la couche cornée, est plus important pour les RME que pour les NMEK. L'OSM inhibe l'expression de DSG1 mais n'a pas d'effet sur l'expression de DSG3. L'ensemble de ces données valident l'intérêt de l'utilisation des RME *in vitro* dans l'étude de la différenciation épidermique en réponse aux cytokines.

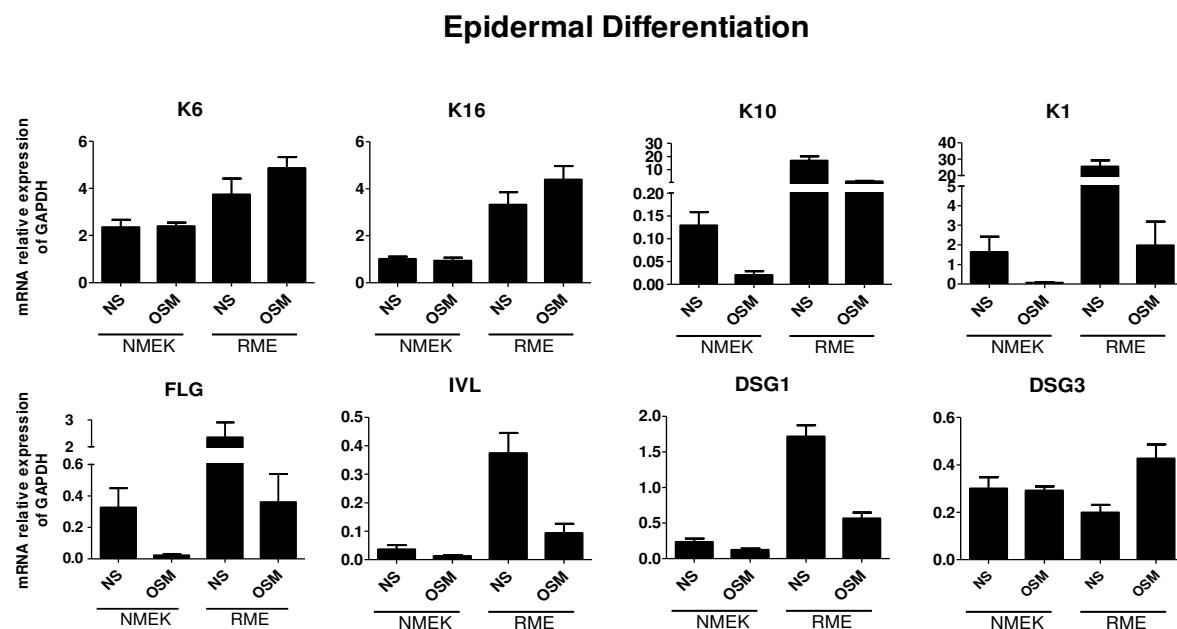


Figure 30 : Comparaison de l'expression de gènes associés à la différenciation épidermique par les NMEK et les RME en réponse à l'OSM. Les NMEK et les RME sont issus des mêmes cultures primaires de kératinocytes et ont été ensemencés à raison de 100 000 cellules/puits pour les NMEK et $1.125.10^6$ cellules par insert pour les RME. A 80% de confluence pour les NMEK et après cinq jours de culture à l'interface air/liquide pour les RME, les kératinocytes ont été stimulés à l'aide d'OSM recombinante (10ng/ml) pendant 24h. Les ARN ont été extraits et analysés par RT-qPCR pour l'expression des gènes de différenciation. NS : non stimulés, OSM : oncostatine M, NMEK : *Normal Murine Epidermal Keratinocytes*, RME : *Reconstituted Murine Epidermis*.

En réponse à des stimuli divers incluant les DAMPS, les PAMPs et les cytokines, les kératinocytes expriment de nombreuses chimiokines impliquées dans le recrutement de leucocytes circulants. L'identification de ces chimiokines est, là aussi, souvent réalisée à partir de cultures primaires de kératinocytes en monocouche. Toutefois, la comparaison du profil d'expression de chimiokines entre les NMEK et les RME stimulés par l'OSM montre de nombreuses différences. Hormis la chimiokine CCL5 impliquée dans le recrutement des monocytes, les chimiokines (CCL2, CXCL3, CCL11, CXCL10, CCL20 et CCL22) semblent plus fortement exprimées par les RME que par les NMEK (Figure 31). Parmi ces dernières, le niveau d'expression de CCL20 est plus important que le niveau d'expression basal des autres chimiokines testées. Ceci pourrait être expliqué par l'importance de cette chimiokine dans le

recrutement de DC et de LT dans la peau (Esche et al. 2005). Parmi les chimiokines étudiées, seules CXCL3 impliquée dans le recrutement des PNN et CCL11 impliquée dans le recrutement des PNE sont augmentées en réponse à l'OSM et en particulier pour les RME. A l'inverse, les chimiokines recrutant les monocytes (CCL2, CCL5), les LTh1 (CXCL10), les LTh17 (CCL20) et les LTh2 (CCL22) sont inhibées en réponse à l'OSM. La forte expression de CXCL3 en réponse à l'OSM pourrait être associée à la présence d'infiltrats de PNN dans les couches supérieures de l'épiderme dans certaines pathologies inflammatoires et notamment dans le psoriasis où ces cellules forment des micro-abcès de Munro-Sabouraud (Di Meglio et al. 2014b). Les PAM S100A8 et S100A9 sont eux-aussi fortement exprimés en réponse à l'OSM, davantage par les RME que par les NMEK. L'expression de ces PAM dans les couches différenciées de l'épiderme pourrait être associée à leurs propriétés bactéricides contre de potentiels pathogènes situés à la surface de l'épiderme.

Par ailleurs, parmi les cytokines étudiées, l'OSM induit l'expression d'IL-24 et d'IL-33 (Figure 31) tandis que l'expression de TSLP, de l'IL-1 α et du TNF- α n'est pas régulée par l'OSM (données non présentées). L'IL-24 est une cytokine proinflammatoire dont les activités *via* la phosphorylation de STAT-3 sont redondantes à celle de l'IL-22 (Sa et al. 2007). Cette cytokine est également produite par les kératinocytes murins en réponse à l'IL-17 (données non montrées) ainsi qu'au TNF- α (Kumari et al. 2013). L'IL-24 pourrait contribuer à amplifier la réponse inflammatoire par action autocrine et ainsi aggraver l'altération de la différenciation épidermique. L'IL-33 est une cytokine de la famille de l'IL-1 présente dans le cytoplasme de nombreuses cellules, en particulier dans la peau, et libérée lors de la nécrose cellulaire. Elle est à ce titre considérée comme une alarmine (Miller 2011). L'expression d'IL-33 en réponse à l'OSM a été mise en évidence pour de nombreux types cellulaires comme les ostéoblastes (Saleh et al. 2011), les cellules épithéliales bronchiques (Richards et al. 2016) et les cellules épithéliales hépatiques (Arshad et al. 2015). Dans la DA, l'IL-33 est fortement exprimée par les kératinocytes et serait impliquée dans l'activation des mastocytes ainsi que dans l'activation des ILC2 favorisant ainsi la polarisation de Th2 (Salimi et al. 2013). L'expression de l'IL-33 est également retrouvée dans le psoriasis et dans l'arthrite rhumatoïde, toutefois l'expression d'IL-33 n'est pas requise dans les modèles murins d'arthrite rhumatoïde induit par le collagène ou dans le modèle de dermatite psoriasiforme induit par l'IMQ (Athari et al. 2016). Dans ces modèles, ces auteurs suggèrent que l'IL-33

serait une cytokine impliquée dans l'amplification de la réponse immunitaire innée plutôt que dans la réponse immunitaire acquise. L'expression d'IL-33 induite par l'OSM pourrait donc contribuer à l'amplification de la réponse immunitaire innée ou bien contribuer à amplifier une réponse immunitaire de profil Th2.

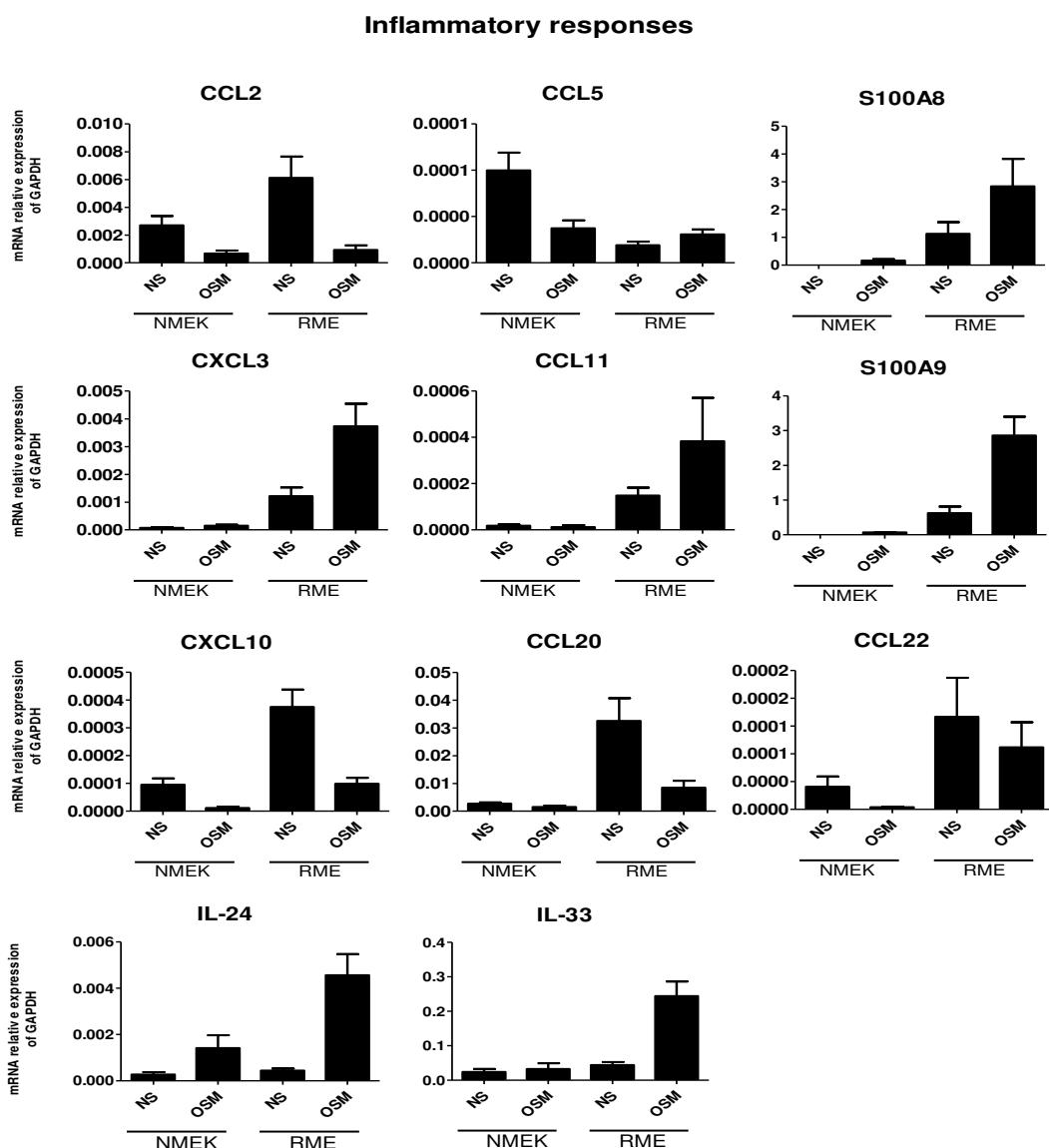


Figure 31 : Comparaison de l'expression de gènes par les NMEK et les RME impliqués dans la réponse immune innée du kératinocyte en réponse à l'OSM. Les NMEK et les RME sont issus des mêmes cultures primaires de kératinocytes et ont été ensemencés à raison de 100 000 cellules/puits pour les NMEK et $1.125 \cdot 10^6$ cellules par insert pour les RME. A 80% de confluence pour les NMEK et après cinq jours de culture à l'interface air/liquide pour les RME, les kératinocytes ont été stimulés à l'aide d'OSM recombinante (10ng/ml) pendant 24h. Les ARN ont été extraits et analysés par RT-qPCR pour l'expression des gènes impliqués dans la réponse immune innée du kératinocyte. NS : non stimulés, OSM : oncostatine M, NMEK : *Normal Murine Epidermal Keratinocytes*, RME : *Reconstituted Murine Epidermis*.

Ces données suggèrent qu'en réponse aux cytokines, l'expression de gènes est modulée de manière distincte selon l'état de différenciation des kératinocytes. Ce constat a par ailleurs été décrit pour d'autres cytokines chez l'homme. Pour exemple, les NHEK répondent peu à l'IL-17A tandis que cette cytokine induit la régulation de plus de 500 gènes par les RHE (Chiricozzi et al. 2014). L'une des hypothèses pour expliquer cette différence serait que certaines protéines impliquées dans les voies de signalisation induite par l'IL-17A sont spécifiquement induites lors de la différenciation épidermique. Parmi ces dernières, l'expression du facteur de transcription C-EBP est fortement détectée dans les couches suprabasales d'un épiderme normal tandis qu'il se semble pas exprimé par les kératinocytes indifférenciés de la couche basale (Chiricozzi et al. 2014). La description des voies de signalisation activées par l'OSM sur les NMEK et sur les RME semble être une piste intéressante pour approfondir la comparaison de ces deux modèles. Par ailleurs, nous projetons d'étendre cette analyse à différentes cytokines proinflammatoires en particulier l'IL-1 α , le TNF- α , l'IL-17A, l'IL-22, l'IFN- γ et l'IL-4 seules ou additionnées dans des mélanges cytokiniques pouvant mimer des pathologies inflammatoires cutanées.

Discussion générale et conclusion

Discussion générale et Conclusion

Par leur présence à l'interface entre l'environnement et l'organisme, les kératinocytes assurent à la fois une fonction de barrière physique et chimique contre les agressions de l'environnement, forment une enveloppe hydrophobe régulant les pertes hydriques (Madison 2003) et participent à l'immunosurveillance cutanée (Nestle et al. 2009). En lien avec cette dernière fonction, les kératinocytes sont aujourd'hui considérés comme des acteurs à part entière de l'immunité innée et ont un rôle majeur dans l'initiation de la réponse inflammatoire. Lors d'un traumatisme, d'une infection ou d'une exposition à un composé chimique ou aux UV, les kératinocytes sont dotés de récepteurs leurs permettant de détecter une large variété de PAMPs ou de DAMPS et de produire des médiateurs de l'inflammation impliqués dans la défense antimicrobienne, le recrutement et l'activation de nouvelles cellules immunitaires en provenance de la circulation sanguine et la réparation tissulaire. En réponse à ces médiateurs de l'inflammation, les cellules immunitaires résidentes cutanées ou infiltrées produisent des cytokines influençant l'homéostasie épidermique et permettent ainsi l'élimination du danger et le retour à l'état initial d'homéostasie. Dans ce processus complexe, les cytokines assurent la communication entre les kératinocytes et les cellules immunitaires et jouent un rôle fondamental dans la coordination de la réponse immunitaire. Néanmoins, l'action des cytokines proinflammatoires sur les kératinocytes, ainsi que leur expression incontrôlée et chronique s'avèrent délétères dans de nombreuses pathologies inflammatoires cutanées. Parmi ces cytokines, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de l'OSM dont l'expression est retrouvée dans la peau de patients atteints de psoriasis et de DA (Boniface et al. 2007a) mais dont les fonctions au sein de ces pathologies sont peu décrites. Ainsi, nous avons étudié les activités de l'OSM *in vitro* sur les kératinocytes murins primaires en préalable des études effectuées *in vivo* chez la souris, en comparaison avec celles de l'IL-6 et de l'IL-31 également exprimées dans les peaux psoriasiques et atopiques.

1. Activité de l'OSM sur la différenciation des kératinocytes

Chez l'homme, des études rapportent que la stimulation de cultures primaires de kératinocytes ou d'épidermes reconstruits par l'OSM module l'expression de gènes impliqués dans l'altération de la différenciation épidermique, dans la régulation du métabolisme cellulaire, en particulier celui des lipides, ainsi que dans l'angiogenèse, la migration cellulaire et la réponse inflammatoire (Finelt et al. 2005; Gazel et al. 2006; Boniface et al. 2007a). En réponse à l'OSM, nous montrons que le profil transcriptomique des kératinocytes murins est très similaire à celui décrit chez l'homme et comprend également des modifications de la différenciation épidermique, de l'adhésion cellulaire, du métabolisme des lipides, de la protéolyse et de la réponse immunitaire. Ceci suggère que la souris est un modèle approprié pour étudier le rôle de cette cytokine dans l'inflammation cutanée.

L'altération de la différenciation épidermique et la production de molécules proinflammatoires étant deux caractéristiques majeures des kératinocytes dans un contexte inflammatoire, nous nous sommes focalisés sur les profils d'expression de gènes modulés par l'OSM au sein de ces deux processus biologiques. Ainsi, nous montrons *in vitro* que l'OSM inhibe fortement l'expression des marqueurs de la différenciation épidermique comme K1 et K10, la filaggrine, l'involucrine et la DSG1, en particulier au niveau des RME où l'expression de ces protéines est plus importante par rapport à des cultures de kératinocytes indifférenciés en monocouche. Dans ce modèle d'épiderme reconstruit, l'altération de la différenciation épidermique s'identifie également par la perte de la couche granuleuse et une hyperplasie modérée de l'épiderme, comme cela est décrit pour les RHE (Rabeony et al. 2014). Ces caractéristiques histologiques sont aussi retrouvées *in vivo* après surexpression de l'OSM par injection intradermique d'adénovirus codant l'OSM. Dans ce modèle, une parakératose, une hyperkératose et une spongiose épidermique sont aussi identifiées. *In vivo*, l'hyperplasie épidermique induite par l'OSM est associée à la prolifération des kératinocytes de la couche basale, mise en évidence par un marqueur de la prolifération (Ki67). En revanche, le marquage Ki67 n'est pas retrouvé pour les RME stimulés par l'OSM (données non présentées), ceci est également décrit pour les RHE (Rabeony et al. 2014). L'absence de marquage suggère que les épidermes reconstruits ne permettent pas la mise en évidence d'une prolifération des kératinocytes en réponse aux cytokines, ou que le

marquage Ki67 n'est pas adapté à la détection de cellules en prolifération dans ce modèle. Il serait intéressant de réaliser d'autres types de marquages de prolifération sur les RME, soit à l'aide d'anticorps dirigés contre l'antigène PCNA, soit par un marquage à le bromodésoxyuridine. Une dernière hypothèse pour expliquer la présence de kératinocytes basaux en prolifération *in vivo* en réponse à l'OSM serait une action indirecte de l'OSM sur d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes, dont la production de facteurs de croissance ou de cytokines pourrait induire la prolifération des kératinocytes. De même, l'expression de K6, K16 et K17 souvent associée aux épidermes hyperprolifératifs a été mise en évidence *in vivo* en réponse à la surexpression d'OSM mais n'est pas retrouvée dans les modèles *in vitro*. En effet, il est décrit que dans les modèles d'épidermes reconstruits, l'expression de ces kératines est constitutive suggérant que les kératinocytes ne sont pas à proprement parlé dans un état physiologique normal mais seraient plus proches d'un état activé, similaire à celui décrit dans la cicatrisation ou dans des contextes inflammatoires chroniques (Stark et al. 1999; Segrelles et al. 2011; Rosenberger et al. 2014b). Les épidermes reconstruits ne semblent donc pas constituer un modèle approprié pour l'étude d'événements liés à l'activation du cycle cellulaire et la prolifération des kératinocytes mais ils conviennent davantage à l'étude de la différenciation épidermique. En effet, une analyse comparative du profil transcriptomique de NHEK, de RHE et de peau humaine a permis de montrer que le modèle de RHE mime mieux l'altération de la différenciation épidermique, tandis que les NHEK expriment plus fortement des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et la réplication de l'ADN en comparaison aux deux autres tissus (Gazel et al. 2003). En outre, cette même équipe a aussi comparé les profils d'expression de gènes régulés par l'OSM dans les deux modèles et ainsi montré que l'OSM régule des processus de migration, d'adhésion cellulaire et d'angiogenèse par les NHEK tandis qu'elle est majoritairement impliquée dans l'altération de la différenciation épidermique et dans l'induction de molécules proinflammatoires par les RHE, mimant certains aspects du psoriasis (Finelt et al. 2005; Gazel et al. 2006).

L'altération de la différenciation épidermique associée à une hyperplasie et une hypogranulose des RHE ainsi que l'augmentation de l'expression de PAM par les kératinocytes sont deux caractéristiques partagées par l'OSM et l'IL-22 (Boniface et al. 2007a; Boniface et al. 2007b; Rabeony et al. 2014). Ces activités redondantes pourraient être

associées à l'activation de STAT-3 et des MAPK par ces cytokines. De manière intéressante, l'activité de l'IL-22 sur les kératinocytes murins semble moins importante que celle induite par l'OSM (Pohin et al, JTERM en révision). En outre, à concentration égale et saturante, la stimulation de NMEK par l'OSM induit une phosphorylation plus importante que celle induite par l'IL-22 (données non présentées) suggérant que l'OSM est plus puissante que l'IL-22 sur les kératinocytes murins. Ceci est en accord avec les données obtenues sur les NHEK montrant qu'au sein du mélange M5, le retrait de l'OSM permet une récupération partielle de la différenciation des kératinocytes tandis que le retrait de l'IL-22 a un effet mineur sur l'activité synergique de ce mélange (Rabeony et al. 2014).

2. Activité de l'OSM sur la production de médiateurs de l'inflammation par les kératinocytes.

L'OSM est également active sur la production de médiateurs de l'inflammation par les kératinocytes *in vitro*, en particulier celle des PAM (BD3, S100A8/9) dont l'expression est aussi retrouvée *in vivo*. Toutefois, l'expression de PAM par les RME en réponse à l'OSM est faible en comparaison à celle induite par l'IL-17A. Ces données sont également en accord avec l'activité de ces cytokines sur les RHE montrant que l'IL-17 est majoritairement impliquée dans la production de médiateurs de l'inflammation *via* l'activation de NF- κ B et des MAPK tandis que l'OSM est majoritairement impliquée dans l'altération de la différenciation épidermique *via* la phosphorylation de STAT-3 (Guilloteau et al. 2010; Lecron et al. 2013; Rabeony et al. 2014). L'OSM induit aussi l'expression de chimiokines impliquées dans le recrutement des PNN (CXCL3) et éosinophiles (CCL11) par les RME tandis qu'elle inhibe l'expression de chimiokines associées au recrutement des monocytes circulants (CCL2, CCL5, CCL3), des LTh1 (CXCL10), Th2 (CCL22) et Th17 (CCL20). Dans l'inflammation, la présence d'OSM est souvent associée à celle de PNN. Chez l'homme, nous avons précédemment montré que l'OSM induit l'expression de CXCL5 par les NHEK (Boniface et al. 2007a), tandis que l'expression d'OSM est fortement associée à l'influx de PNN dans la peau au cours de la cicatrisation (Goren et al. 2006). Dans ce modèle, il est décrit que les PNN sont les principales cellules productrices d'OSM durant la phase de cicatrisation précoce, alors que l'expression d'OSM est colocalisée avec les macrophages et les kératinocytes jouxtant les berges de la lésion après 3 à 4 jours de cicatrisation (Goren et al. 2006). La production de chimiokine CXCL5 par les cellules épithéliales bronchiques en réponse à l'OSM a aussi été

mise en évidence dans la pneumonie induite chez la souris (Traber et al. 2015) et par les fibroblastes cardiaques murins *in vitro* (Lafontant et al. 2006). L'OSM pourrait être indirectement responsable du recrutement de PNN et ainsi être impliquée dans les phases précoces de la réponse inflammatoire. Contrairement aux modèles *in vitro*, l'expression de chimiokines CCL2 et CCL5, associées au recrutement des monocytes, est retrouvée dans l'oreille de souris surexprimant l'OSM. Ceci suggère que d'autres types cellulaires répondant à l'OSM pourraient produire ces chimiokines ou que les cytokines induites par la surexpression d'OSM *in vivo* pourraient induire la production de ces chimiokines par les kératinocytes. Le fait que l'OSM induise l'expression de chimiokines impliquées dans le recrutement de PNN renforce l'idée d'une contribution de cette cytokine à la physiopathologie du psoriasis et aussi à celle de la DA lorsque la peau est surinfectée. En effet, il est décrit que les PNN sont fortement présents dans la peau de patients psoriasiques et sont associés à la formation de vésicules épidermiques appelées micro-abcès de Munro-Sabouraud, tandis que chez les patients atteints de DA, un infiltrat de PNN est observé lorsque la peau est surinfectée par *S.aureus* (Dhingra et al. 2013). Le lien majeur entre les PNN et l'OSM est aussi étayé par de nombreuses études montrant que l'OSM est produite par les PNN en réponse au LPS (Grenier et al. 1999) et que les cellules endothéliales répondent à l'OSM en activant spécifiquement la transmigration des PNN (Kerfoot et al. 2001). Enfin, l'OSM pourrait amplifier l'inflammation en induisant l'expression d'autres cytokines par les kératinocytes, telles que l'IL-33 et l'IL-24. En effet, ces cytokines sont actives sur les kératinocytes et induisent une réponse proinflammatoire impliquée dans l'altération de la différenciation épidermique pour l'IL-24 et la production de médiateurs de l'inflammation pour l'IL-33 (Sa et al. 2007; Balato et al. 2012). L'OSM pourrait aussi accroître la sensibilité des kératinocytes à certaines cytokines en augmentant l'expression de sous-unités de leurs récepteurs en particulier pour l'IFN- γ (IFN- γ R1) et pour l'IL-4 et l'IL-13 (IL-4R et IL-13R). La complémentarité de ces approches méthodologiques a ainsi permis de confirmer que l'OSM est fortement impliquée dans l'induction d'un phénotype inflammatoire par les kératinocytes et qu'elle pourrait avoir un rôle majeur dans la physiopathologie du psoriasis et de la DA.

3. Comparaison des activités de l'OSM à celles d'autres cytokines de la famille de l'IL-6

Notre étude est également la première à comparer l'activité de l'IL-6, de l'OSM et de l'IL-31 *in vitro* sur les kératinocytes murins et *in vivo* dans la peau. Malgré, l'expression de la chaîne IL-6R α par les kératinocytes murins, les effets de l'IL-6 sur la phosphorylation de STAT-3 (données non présentées), sur l'inhibition de la différenciation épidermique et sur l'expression de molécules proinflammatoires sont très faibles en comparaison à celles de l'OSM. Ces travaux *in vitro* démontrent que l'OSM est plus active que l'IL-6 sur les kératinocytes en accord avec une étude antérieure décrivant une expression des « *Multidrug Resistance-associated Proteins* » plus importante en réponse à l'OSM qu'en réponse à l'IL-6 par les NHEK (Drew et al. 2005). De plus, nous montrons que la stimulation combinée de NMEK par l'IL-6 et l'OSM n'a pas d'action additive, ni synergique sur l'induction d'une réponse inflammatoire suggérant une action redondante de ces cytokines sur ces cellules (Pohin et al. 2016). De plus, nous montrons que la surexpression d'IL-6 *in vivo* dans la peau de souris induit une inflammation mineure en comparaison à celle induite par l'OSM. L'activité proinflammatoire de l'OSM plus importante que celle de l'IL-6 a aussi été décrite sur d'autres types cellulaires notamment sur les fibroblastes pulmonaires (Langdon et al. 2003) et synoviaux (Langdon et al. 2000). Un rôle de l'IL-31 sur l'altération de la différenciation épidermique et la production de molécules proinflammatoires ayant été décrit chez l'homme, nous avons également comparé l'activité de l'IL-31 et de l'OSM sur les NMEK. Dans cette étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression par les kératinocytes murins d'IL-31RA, la seconde sous-unité composant le récepteur de l'IL-31. En accord avec cette observation, les kératinocytes murins ne répondent pas à la stimulation par l'IL-31. Ceci suggère des divergences de profil d'expression de récepteurs de cytokines entre les kératinocytes murins et humains. De même, la sous-unité LIF-R β du récepteur de type I à l'OSM est fortement exprimée par les kératinocytes murins, tandis que cette sous-unité n'est pas exprimée par les kératinocytes humains (Boniface et al. 2007a). Le rôle du LIF dans l'inflammation cutanée est peu décrit. Nous montrons que le LIF est actif sur les kératinocytes murins et induit une inhibition de l'expression de K1 et une induction de S100A9 dose-dépendante (données non présentées). L'injection de LIF dans l'oreille de souris induit un épaissement de l'oreille associé à la présence d'un infiltrat immunitaire dermique, suggérant un rôle proinflammatoire du LIF dans l'inflammation cutanée.

(McKenzie et al. 1996). Néanmoins, ces auteurs ne précisent pas la cellule cible du LIF dans ce modèle. A l'inverse, le LIF a été décrit pour son rôle anti-inflammatoire dans un modèle d'inflammation cutanée aiguë induite par injection de *Mycobacterium tuberculosis* chez le rat (Zhu et al. 2001). Nos données *in vitro* sur les kératinocytes suggèrent un rôle proinflammatoire direct du LIF sur les NMEK en accord avec le modèle murin décrit par Mackenzie et coll. (Mackenzie et al. 1996). Néanmoins, comme pour l'IL-6, l'activité du LIF par rapport à l'OSM est minime sur les kératinocytes murins (Pohin et al. 2016). Récemment, il a été décrit qu'en l'absence de la sous-unité OSM-R β , le récepteur de type I de l'OSM, composé du LIF-R β et de gp130, est capable de transduire un signal par la phosphorylation de STAT-3 sur les ostéoblastes murins en réponse à l'OSM (Walker et al. 2010; Walker et al. 2016). Au niveau transcriptionnel, l'expression du LIF-R β par les NMEK étant quantitativement aussi importante que celle de l'OSM-R β , il serait intéressant de tester l'activité de l'OSM sur les NMEK issus de souris OSM-R β KO et de souris LIF-R β KO, ou encore d'utiliser dans anticorps bloquants anti-OSM-R β KO et anti- LIF-R β KO afin de déterminer la part de ces deux récepteurs dans la transduction d'un signal induit par l'OSM. Toutefois, l'injection intradermique d'AdOSM dans les oreilles de souris OSM-R β KO n'induit pas d'hyperplasie épidermique suggérant que les activités proinflammatoires de l'OSM sur la peau sont majoritairement dépendantes du récepteur de type II, OSM-R β /gp130 (Pohin et al. 2016).

4. Activité de l'OSM sur d'autres type cellulaires

Dans nos travaux, nous nous sommes focalisés sur les activités proinflammatoires de l'OSM sur les kératinocytes. Néanmoins, *in vivo*, cette cytokine pourrait également cibler d'autres types cellulaires présents dans la peau et décrits pour leur rôle dans l'inflammation cutanée. Parmi ces derniers, les cellules endothéliales composant la paroi des vaisseaux sanguins ont été décrites pour leur forte expression d'OSM-R β (Brown et al. 1991). La stimulation de cellules endothéliales humaines par l'OSM induit l'expression d'IL-6, de CXCL1, CXCL2 et CXCL5 ainsi que l'expression membranaire de P-selectine à partir d'un stock intracytoplasmique préformé et la synthèse *de novo* d'E-selectine, d'ICAM-1 et de VCAM-1 (Modur et al. 1997). L'ensemble de ces évènements participent à l'adhésion, à la transmigration et à l'activation des PNN. L'activité de l'OSM sur les cellules endothéliales apparaît très spécifique en comparaison des activités d'autres cytokines de la famille de l'IL-6

ainsi qu'aux activités de l'IL-1 ou du TNF- α (Modur et al. 1997). Dans la peau et par ce mécanisme, l'OSM pourrait favoriser l'adhésion et le recrutement de PNN. En accord avec ces études, la surexpression d'OSM *in vivo* génère un infiltrat dermique et épidermique majoritairement composé de PNN (Pohin et al. 2016). De plus, l'OSM a aussi été décrite pour son activité pro-fibrotique sur les fibroblastes dermiques humains et pour son rôle potentiel dans la sclérodermie et les cicatrices chéloïdes (Canady et al. 2013). L'OSM induit l'expression de collagène de type I *via* la phosphorylation de STAT-3 ainsi que la migration des fibroblastes dermiques. L'OSM est aussi promitogénique pour les fibroblastes dermiques humains (Ihn and Tamaki 2000). A l'inverse, des données non publiées du LITEC montrent que l'OSM est surexprimée dans les cicatrices hypertrophiques mais pas dans les cicatrices chéloïdes (Huguier et al. en préparation). De plus *in vitro*, l'OSM inhibe partiellement l'activité du TGF- β sur l'expression d' α -SMA par les fibroblastes humains et sur l'expression de collagène de type I, II et III. Ceci suggère un rôle protecteur de l'OSM dans le dépôt excessif de collagène par les fibroblastes et préventif sur la formation de cicatrices chéloïdes (Huguier et al. en préparation). Afin d'étudier le rôle de l'OSM sur les fibroblastes et l'interrelation entre ces cellules et les kératinocytes, nous tentons de développer un modèle de peau reconstruite murine, composé d'une matrice de collagène de type I dans laquelle sont ensemencés des fibroblastes provenant du derme de souriceaux nouveau-nés et sur laquelle sont déposés des kératinocytes formant un épiderme reconstruit. A l'avenir, les peaux reconstruites murines pourront permettre d'étudier l'activité des cytokines proinflammatoires sur les fibroblastes et les activités paracrine de ces cellules sur l'épiderme. De plus, l'utilisation de cellules issues de souriceaux ouvre la possibilité de générer des fibroblastes et/ou des kératinocytes issus de souris transgéniques et ainsi de pouvoir étudier spécifiquement l'activité d'un type cellulaire au sein d'un modèle plus représentatif de la physiologie cutanée.

Les effets de l'OSM sur la production de collagène et sur celle de MMP par les fibroblastes ont été décrits dans de nombreux tissus incluant les articulations, le cœur, le foie et les poumons (Langdon et al. 2000; Levy et al. 2000; Weiss et al. 2005; Mozaffarian et al. 2008). Ces effets parfois contradictoires pourraient être associés à la présence des deux récepteurs, de type I et de type II, chez l'homme. Chez la souris, il a été montré que les activités anti-inflammatoires de l'OSM initialement décrites dans des modèles murins de

polyarthrite rhumatoïde et d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale ont été réalisées à l'aide d'OSM humaine recombinante (Wallace et al. 1999) et ont en réalité mimé l'activité du LIF murin (Ichihara et al. 1997). A l'inverse, les activités de l'OSM murine sur le récepteur de type II sont majoritairement associées à des effets proinflammatoires dans le poumon, les articulations ainsi que sur le cœur. Ceci pourrait suggérer que le récepteur de type I est impliqué dans un rôle anti-inflammatoire de l'OSM chez l'homme et le récepteur de type II dans un rôle proinflammatoire. Cette description n'est toutefois qu'hypothétique, l'expression du récepteur associée aux activités de l'OSM étant rarement décrite dans les études. Enfin, l'OSM induit de nombreuses voies de signalisation et présente des activités spécifiques par rapport à d'autres cytokines de la famille de l'IL-6 (Heinrich et al. 2003; Richards 2013; Hermanns 2015). Ainsi, en fonction des types cellulaires, les voies de signalisation et leurs conséquences biologiques sont très variables. Pour exemple, l'OSM induit majoritairement la phosphorylation de STAT-1 par les fibroblastes synoviaux humains *in vitro* et inhibe l'expression d'IL-1 β et de CXCL8 (Dumas et al. 2012). Par contre, l'OSM stimule la production de CCL11 par les fibroblastes pulmonaires murins en activant les protéines ERK de la voie des MAPK (Langdon et al. 2003). Ces exemples illustrent la complexité des voies de signalisation induites par l'OSM et la nécessité d'identifier ces dernières afin de comprendre les effets spécifiques de l'OSM sur différents types cellulaires. Une étude préliminaire visant à comparer les voies de signalisation activées en réponse au LIF, à l'OSM ou à l'IL-6 sur les NMEK est actuellement en cours au LITEC et semble indiquer que le LIF est, comme l'OSM, capable d'activer la voie ERK des MAPK en plus de la phosphorylation de STAT-3, suggérant une activité redondante de ces cytokines sur les kératinocytes murins.

Dans la peau, l'OSM pourrait aussi exercer une fonction sur les cellules immunitaires résidentes cutanées. Les activités de l'OSM sur les cellules immunitaires sont toutefois peu décrites. Dillon et coll ont décrit l'expression de l'OSM-R β sur les monocytes circulants chez la souris et chez l'homme tandis que les LT n'expriment pas la sous-unité OSM-R β . Ainsi, l'OSM pourrait avoir une activité sur ces monocytes/macrophages. L'OSM a aussi été décrite pour induire la maturation de DC différenciées *in vitro* à partir de précurseurs issus de moelle osseuse de souris (Jung et al. 2010). Cette maturation se caractérise par une inhibition des capacités d'endocytose des DC et l'activation de l'expression des molécules de

costimulation CD80/86. De plus, l'OSM induit la sécrétion d'IL-12 par ces DC et promeut ainsi la production d'IFN- γ par les LT dans un modèle de co-culture de LT et DC (Jung et al. 2010). L'ensemble de ces données suggèrent que l'OSM pourrait favoriser la polarisation Th1 en activant la maturation des DC. La relevance biologique *in vivo* de cette fonction reste toutefois à démontrer.

Parmi les caractéristiques inflammatoires mise en évidence par la surexpression d'OSM *in vivo* chez la souris, nous montrons que la polarisation cytokinique induite en réponse à l'OSM met en évidence un profil de type 1 et de type 2 caractérisés respectivement par une forte expression d'IFN- γ et d'IL-4, ainsi qu'une surexpression plus faible d'IL-5, d'IL-13 et de TNF- α . A l'inverse, l'IL-22 et l'IL-17 ne sont pas exprimées en réponse à l'OSM *in vivo*. Ceci suggère que l'OSM est associée à un profil cytokinique de type Th1 et de type Th2 et non de type Th17. De plus, les cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-4 sont produites par de nombreuses cellules immunitaires et en particulier par les LT et les macrophages. Ainsi, les macrophages retrouvés dans le derme en réponse à la surexpression d'OSM, pourraient être responsables de la production de ces cytokines et présenteraient donc un phénotype M1 et M2. Ceci pourrait être confirmé par des expériences de cytométrie en flux permettant de préciser le phénotype des cellules immunitaires présentes dans le derme des oreilles après injection intradermique d'AdOSM.

5. Activité de l'OSM dans les pathologies inflammatoires cutanées

Au regard des activités majeures de l'OSM dans l'induction d'une réponse inflammatoire *in vitro* sur les kératinocytes murins et *in vivo* chez la souris, il semble manifeste que l'OSM puisse être une cible thérapeutique dans les pathologies inflammatoires cutanées comme le psoriasis ou la DA. Afin d'apporter la preuve de concept que le blocage de l'OSM est pertinent dans ces pathologies, nous avons étudié l'implication de l'OSM dans des modèles murins de psoriasis et de DA. Néanmoins, dans ces modèles, l'inhibition ou l'absence d'OSM ne permet pas de réduire le phénotype cutané suggérant que d'autres cytokines ayant des activités redondantes à celles décrites pour l'OSM puissent compenser l'absence de celle-ci. Parmi les cytokines candidates activant STAT-3, l'IL-6, l'IL-19, l'IL-20 et l'IL-24 sont exprimées dans les deux modèles d'inflammation cutanée étudiés tandis que l'IL-22 n'est exprimée que dans le modèle de psoriasis induit par l'IMQ. Toutefois, en

comparaison avec les souris WT, l'expression de ces cytokines n'est pas particulièrement augmentée chez les souris OSM-KO. Ceci suggère que l'absence d'OSM n'entraîne pas la surexpression d'une cytokine compensatrice, mais que la seule présence de ces nombreuses cytokines ayant des activités redondantes est responsable de l'inflammation cutanée chez les souris OSM-KO traitées par l'IMQ ou le calcipotriol. Parmi, les cytokines présentant de nombreuses activités redondantes à celles de l'OSM, l'IL-22 semblait être une candidate de choix, de par ces activités majeures sur les kératinocytes chez l'homme (Boniface et al. 2007b). Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé les souris IL-22KO et les anticorps bloquants anti-OSM murine dont nous disposions pour étudier l'impact d'un double blocage dans le modèle de dermatite psoriasiforme induite par application d'IMQ. Néanmoins, cette expérience n'a pas permis de mettre en évidence de diminution de la sévérité de l'inflammation dans les souris IL-22KO ayant reçu l'anticorps anti-OSM que dans les souris IL-22KO ayant reçu l'IgG contrôle (données non présentées).

Dans le modèle de dermatite psoriasiforme, il a été récemment décrit que le traitement d'une grande surface sur le dos induit une inflammation systémique caractérisée par des taux sériques élevés d'IL-6 et de SAA1/3, plus importante que celle induite par l'application restreinte à l'oreille (Cochez et al. 2016). Ceci expliquerait que l'application d'IMQ restreinte à l'oreille réduit le phénotype cutané chez les souris AHR KO tandis que l'application dorsale d'IMQ induit une exacerbation du phénotype chez ces souris (Di Meglio et al. 2014a; Cochez et al. 2016). Ces auteurs suggèrent ainsi que le modèle de dermatite psoriasiforme induit par application d'IMQ sur l'oreille de souris est plus pertinent que le modèle induit par application dorsale. Notre protocole comprend le traitement de la peau du dos et de l'oreille par l'IMQ durant sept jours. Par analogie, il serait intéressant de traiter uniquement l'oreille de souris WT et OSM-KO et comparer l'inflammation cutanée obtenue à celle induite par une application dorsale.

Avant de conclure sur le rôle de l'OSM dans la DA, il apparaît nécessaire de mettre au point un modèle murin capable de reproduire de nombreux aspects de la DA humaine en particulier la présence de PNE, l'expression d'IL-5 ainsi que l'augmentation sérique des IgE ; ces caractéristiques n'ayant pas été obtenues dans le modèle utilisé dans notre étude. Le modèle de DA induite par application de calcipotriol présente l'avantage d'être peu onéreux et rapide dans sa mise en œuvre. Néanmoins, nos résultats concernant la mise au point de

ce modèle montre que la concentration de calcipotriol utilisée en application topique doit être précisément calibrée et ne doit pas dépasser 4 nmoles par souris sous peine d'induire une perte de poids conduisant aux sacrifices des animaux. En outre, l'aspect répétitif de l'application ne mime pas fondamentalement la physiopathologie de la DA décrite pour être induite par la sensibilisation à un allergène ou un antigène particulier. A l'inverse le modèle de DA induit par application d'ovalbumine après lésion de la barrière cutanée mime plus étroitement les étapes initiant cette pathologie (Spergel et al. 1998). La mise au point de ce modèle a été initiée dans notre laboratoire, néanmoins les premiers essais ne nous ont pas permis d'induire une inflammation cutanée. Il semblerait que l'adhésif utilisé dans notre protocole pour réaliser l'étape de « *tape-stripping* » ne soit pas efficace dans l'altération de la barrière cutanée. A court terme, les objectifs sont donc de mettre au point un modèle plus pertinent de DA chez la souris, afin de pouvoir conclure sur le rôle de l'OSM dans cette pathologie.

Parmi les cytokines testées dans notre étude, l'IFN- γ est la cytokine la plus fortement induite en réponse à l'OSM (Pohin et al. 2016). Ceci est en accord le fait que l'OSM serait majoritairement produite dans un contexte de polarisation cytokinique de type 1 (Rogge et al. 2000; Broxmeyer et al. 2002). Un profil cytokinique Th1 et M1 étant décrit dans le psoriasis et la DA, l'expression d'OSM retrouvée dans ces pathologies pourraient être associée à ces polarisations. Dans le psoriasis, l'axe Th1 serait fortement impliqué dans la physiopathologie des plaques chroniques tandis que l'axe Th17 serait responsable de la phase aigüe et de l'apparition de nouvelles plaques (Christophers et al. 2014). Une étude portant sur une petite cohorte de patients atteints de psoriasis a toutefois montré que le blocage de l'IFN- γ par injection d'un anticorps humanisé anti-IFN- γ est moins efficace cliniquement que le blocage de l'IL-17 ou de l'IL-23 dans l'amélioration du score PASI (Harden et al. 2015a). Ces données suggèrent que malgré la présence d'IFN- γ , l'axe Th17 est prédominant dans la physiopathologie du psoriasis. Le modèle de dermatite psoriasiforme induite par application d'IMQ est à ce titre un bon modèle murin pour l'étude des autres cytokines. Il permet en effet de mimer de nombreux aspects du psoriasis et en accord avec l'importance de l'axe Th17 chez l'homme, les souris déficientes pour les gènes codant l'IL-23, l'IL-22 et l'IL-17RA présentent une réduction de la sévérité de l'inflammation cutanée induite par l'IMQ (van der Fits et al. 2009; Van Belle et al. 2012). Néanmoins, le blocage de l'axe IL-

23/IL-17 ne permet pas le retour à un état non inflammatoire suggérant que d'autres cytokines sont impliquées dans l'inflammation cutanée dans ce modèle. Ainsi, El Malki et coll. proposent qu'en l'absence de la signalisation médiée par l'IL-17 pour les souris IL-17RA KO, une voie d'activation alternative contribuerait à l'inflammation cutanée (El Malki et al. 2013). Pour ces auteurs, cette voie alternative serait dépendante de l'IL-6 et de l'IL-22 dont l'expression semble augmentée chez les souris IL-17RA KO en comparaison aux souris WT. En accord avec leurs études, l'application d'IMQ sur l'oreille de souris IL-17RA KO ne nous a pas permis de mettre en évidence de diminution de l'hyperplasie épidermique en comparaison aux souris WT (données non présentées). En revanche et de manière très intéressante, l'analyse transcriptionnelle des cytokines dans l'oreille de souris IL-17RA KO traités par l'IMQ montre une forte expression de l'IFN- γ , du facteur de transcription T-bet et de l'OSM en comparaison aux souris WT traités par IMQ (données non présentées). Ces données préliminaires nous laissent penser qu'en l'absence d'IL-17, un mécanisme de compensation associée à une polarisation Th1 est responsable de l'inflammation cutanée chez ces souris. Chez l'homme, une étude transcriptomique par microarray montre que le traitement par le Brodalumab (anti-IL-17RA) induit une forte diminution de la signature transcriptionnelle associée à l'IL-17 mais une faible diminution de la signature transcriptionnelle associée à l'IFN- γ dans les lésions psoriasiques (Russell et al. 2014). Ces données suggèrent que la polarisation Th1 n'est pas essentielle à l'amélioration clinique du psoriasis puisque la très grande majorité des patients atteints de psoriasis traités par le Brodalumab voient leurs lésions blanchies par ce traitement. Finalement, si l'OSM est bien associée à une polarisation cytokinique Th1, un modèle murin de dermatite de contact induite par application de Dinitrofluorobenzène, de Trinitro-chloro-benzene ou d'oxazolone fortement associée à une polarisation Th1 devrait permettre d'étudier l'implication de l'OSM dans cette polarisation.

L'ensemble de nos résultats conforte l'idée d'une activité majeure de l'OSM dans l'inflammation cutanée mais la fonction précise de cette cytokine au sein du réseau cytokinique caractérisant les pathologies inflammatoires cutanées nécessite d'être étudiée plus en détails.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abtin, A., L. Eckhart, et al. (2010). "The antimicrobial heterodimer S100A8/S100A9 (calprotectin) is upregulated by bacterial flagellin in human epidermal keratinocytes." *J Invest Dermatol* **130**(10): 2423-2430.
- Abtin, A., L. Eckhart, et al. (2008). "Flagellin is the principal inducer of the antimicrobial peptide S100A7c (psoriasin) in human epidermal keratinocytes exposed to Escherichia coli." *FASEB J* **22**(7): 2168-2176.
- Agrawal, R. and J. A. Woodfolk (2014). "Skin barrier defects in atopic dermatitis." *Curr Allergy Asthma Rep* **14**(5): 433.
- Aho, S., K. Li, et al. (2004). "Periplakin gene targeting reveals a constituent of the cornified cell envelope dispensable for normal mouse development." *Mol Cell Biol* **24**(14): 6410-6418.
- Albanesi, C., H. R. Fairchild, et al. (2007). "IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3." *J Immunol* **179**(2): 984-992.
- Albanesi, C. and S. Pastore (2010). "Pathobiology of chronic inflammatory skin diseases: interplay between keratinocytes and immune cells as a target for anti-inflammatory drugs." *Curr Drug Metab* **11**(3): 210-227.
- Albanesi, C., C. Scarponi, et al. (2000). "IL-4 enhances keratinocyte expression of CXCR3 agonistic chemokines." *J Immunol* **165**(3): 1395-1402.
- Ali, N., M. Hosseini, et al. (2015). "Skin equivalents: skin from reconstructions as models to study skin development and diseases." *Br J Dermatol* **173**(2): 391-403.
- Arakawa, A., K. Siewert, et al. (2015). "Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis." *J Exp Med* **212**(13): 2203-2212.
- Arnette, C., J. L. Koetsier, et al. (2016). "In Vitro Model of the Epidermis: Connecting Protein Function to 3D Structure." *Methods Enzymol* **569**: 287-308.
- Arshad, M. I., P. Guihard, et al. (2015). "Oncostatin M induces IL-33 expression in liver endothelial cells in mice and expands ST2+CD4+ lymphocytes." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **309**(7): G542-553.
- Asselineau, D. and M. Prunieras (1984). "Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication." *Br J Dermatol* **111 Suppl 27**: 219-222.
- Athari, S. K., E. Poirier, et al. (2016). "Collagen-induced arthritis and imiquimod-induced psoriasis develop independently of interleukin-33." *Arthritis Res Ther* **18**(1): 143.
- Baker, B. S., A. V. Powles, et al. (1988). "An altered response by psoriatic keratinocytes to gamma interferon." *Scand J Immunol* **28**(6): 735-740.
- Balato, A., S. Lembo, et al. (2012). "IL-33 is secreted by psoriatic keratinocytes and induces pro-inflammatory cytokines via keratinocyte and mast cell activation." *Exp Dermatol* **21**(11): 892-894.
- Banno, T., A. Gazel, et al. (2004). "Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling." *J Biol Chem* **279**(31): 32633-32642.
- Bar, J., V. Kumar, et al. (2014). "Skin fragility and impaired desmosomal adhesion in mice lacking all keratins." *J Invest Dermatol* **134**(4): 1012-1022.
- Barker, J. N., R. S. Mitra, et al. (1991). "Keratinocytes as initiators of inflammation." *Lancet* **337**(8735): 211-214.
- Bernard, F. X., F. Morel, et al. (2012). "Keratinocytes under Fire of Proinflammatory Cytokines: Bona Fide Innate Immune Cells Involved in the Physiopathology of Chronic Atopic Dermatitis and Psoriasis." *J Allergy (Cairo)* **2012**: 718725.

- Bertolero, F., M. E. Kaighn, et al. (1984). "Mouse epidermal keratinocytes. Clonal proliferation and response to hormones and growth factors in serum-free medium." *Exp Cell Res* **155**(1): 64-80.
- Bilsborough, J., D. Y. Leung, et al. (2006). "IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* **117**(2): 418-425.
- Black, A. P., M. R. Ardern-Jones, et al. (2007). "Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells." *Eur J Immunol* **37**(6): 1485-1493.
- Blanpain, C. and E. Fuchs (2009). "Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(3): 207-217.
- Boehncke, W. H., S. Boehncke, et al. (2011). "The 'psoriatic march': a concept of how severe psoriasis may drive cardiovascular comorbidity." *Exp Dermatol* **20**(4): 303-307.
- Boehnke, K., N. Mirancea, et al. (2007). "Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents." *Eur J Cell Biol* **86**(11-12): 731-746.
- Bogiatzi, S. I., I. Fernandez, et al. (2007). "Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes." *J Immunol* **178**(6): 3373-3377.
- Boltjes, A. and F. van Wijk (2014). "Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation." *Front Immunol* **5**: 131.
- Boniface, K., F. X. Bernard, et al. (2005a). "IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes." *J Immunol* **174**(6): 3695-3702.
- Boniface, K., C. Diveu, et al. (2007a). "Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation." *J Immunol* **178**(7): 4615-4622.
- Boniface, K., E. Guignouard, et al. (2007b). "A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation." *Clin Exp Immunol* **150**(3): 407-415.
- Boniface, K., J. C. Lecron, et al. (2005b). "Keratinocytes as targets for interleukin-10-related cytokines: a putative role in the pathogenesis of psoriasis." *Eur Cytokine Netw* **16**(4): 309-319.
- Bonneville, M., R. L. O'Brien, et al. (2010). "Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity." *Nat Rev Immunol* **10**(7): 467-478.
- Borowiec, A. S., P. Delcourt, et al. (2013). "Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control." *PLoS One* **8**(10): e77507.
- Bos, J. D. and M. L. Kapsenberg (1986). "The skin immune system Its cellular constituents and their interactions." *Immunol Today* **7**(7-8): 235-240.
- Botelho, F. M., J. Rangel-Moreno, et al. (2013). "Pulmonary expression of oncostatin M (OSM) promotes inducible BALT formation independently of IL-6, despite a role for IL-6 in OSM-driven pulmonary inflammation." *J Immunol* **191**(3): 1453-1464.
- Bouameur, J. E., B. Favre, et al. (2014). "Plakins, a versatile family of cytolinkers: roles in skin integrity and in human diseases." *J Invest Dermatol* **134**(4): 885-894.
- Boulais, N. and L. Misery (2007). "Merkel cells." *J Am Acad Dermatol* **57**(1): 147-165.
- Bour, H., I. Puisieux, et al. (1999). "T-cell repertoire analysis in chronic plaque psoriasis suggests an antigen-specific immune response." *Hum Immunol* **60**(8): 665-676.
- Bousquet, O. and P. A. Coulombe (2002). " « Les kératines : un autre regard sur la biologie de la peau »." *Médecine/Sciences* **18**: 45-54.
- Boutet, M. A., G. Bart, et al. (2016). "Distinct expression of interleukin (IL)-36alpha, beta and gamma, their antagonist IL-36Ra and IL-38 in psoriasis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease." *Clin Exp Immunol* **184**(2): 159-173.
- Bowcock, A. M. and J. G. Krueger (2005). "Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis." *Nat Rev Immunol* **5**(9): 699-711.

- Boyman, O., H. P. Hefti, et al. (2004). "Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha." *J Exp Med* **199**(5): 731-736.
- Braff, M. H., A. Bardan, et al. (2005). "Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides." *J Invest Dermatol* **125**(1): 9-13.
- Bragulla, H. H. and D. G. Homberger (2009). "Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia." *J Anat* **214**(4): 516-559.
- Brandner, J. M., M. Haftek, et al. (2010). "Adherens Junctions, Desmosomes and Tight Junctions in Epidermal Barrier Function." *The Open Dermatology Journal* **4**: 14-20.
- Brandner, J. M., M. Zorn-Kruppa, et al. (2015). "Epidermal tight junctions in health and disease." *Tissue Barriers* **3**(1-2): e974451.
- Breitkreutz, D., I. Koxholt, et al. (2013). "Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan." *Biomed Res Int* **2013**: 179784.
- Brown, S. J. and W. H. McLean (2012). "One remarkable molecule: filaggrin." *J Invest Dermatol* **132**(3 Pt 2): 751-762.
- Brown, T. J., J. M. Rowe, et al. (1991). "Regulation of IL-6 expression by oncostatin M." *J Immunol* **147**(7): 2175-2180.
- Broxmeyer, H. E., H. A. Bruns, et al. (2002). "Th1 cells regulate hematopoietic progenitor cell homeostasis by production of oncostatin M." *Immunity* **16**(6): 815-825.
- Buchau, A. S., D. T. MacLeod, et al. (2009). "Bcl-3 acts as an innate immune modulator by controlling antimicrobial responses in keratinocytes." *J Invest Dermatol* **129**(9): 2148-2155.
- Buckley, C. D., D. Pilling, et al. (2001). "Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation." *Trends Immunol* **22**(4): 199-204.
- Bulfone-Paus, S. and R. Bahri (2015). "Mast Cells as Regulators of T Cell Responses." *Front Immunol* **6**: 394.
- Canady, J., S. Arndt, et al. (2013). "Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis." *J Invest Dermatol* **133**(3): 647-657.
- Candi, E., R. Schmidt, et al. (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 328-340.
- Carow, B. and M. E. Rottenberg (2014). "SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation." *Front Immunol* **5**: 58.
- Carroll, J. M. and J. P. Moles (2000). "A three-dimensional skin culture model for mouse keratinocytes: application to transgenic mouse keratinocytes." *Exp Dermatol* **9**(1): 20-24.
- Cawston, T. E., V. A. Curry, et al. (1998). "The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint." *Arthritis Rheum* **41**(10): 1760-1771.
- Cevikbas, F., X. Wang, et al. (2014). "A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1." *J Allergy Clin Immunol* **133**(2): 448-460.
- Chan, J. R., W. Blumenschein, et al. (2006). "IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis." *J Exp Med* **203**(12): 2577-2587.
- Chan, L. S., N. Robinson, et al. (2001). "Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis." *J Invest Dermatol* **117**(4): 977-983.
- Chang, J. C., L. R. Smith, et al. (1997). "Persistence of T-cell clones in psoriatic lesions." *Arch Dermatol* **133**(6): 703-708.

- Chattopadhyay, S., E. Tracy, et al. (2007). "Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells." *J Biol Chem* **282**(5): 3014-3026.
- Cherrier, M. (2014). "[Innate lymphoid cells: new players of the mucosal immune response]." *Med Sci (Paris)* **30**(3): 280-288.
- Cheuk, S., M. Wiken, et al. (2014). "Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis." *J Immunol* **192**(7): 3111-3120.
- Cheung, P. F., C. K. Wong, et al. (2010). "Activation of human eosinophils and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31: implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis." *Int Immunol* **22**(6): 453-467.
- Chiricozzi, A., E. Guttman-Yassky, et al. (2011). "Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis." *J Invest Dermatol* **131**(3): 677-687.
- Chiricozzi, A., K. E. Nogales, et al. (2014). "IL-17 induces an expanded range of downstream genes in reconstituted human epidermis model." *PLoS One* **9**(2): e90284.
- Chollangi, S., T. Mather, et al. (2012). "A unique loop structure in oncostatin M determines binding affinity toward oncostatin M receptor and leukemia inhibitory factor receptor." *J Biol Chem* **287**(39): 32848-32859.
- Christophers, E., G. Metzler, et al. (2014). "Bimodal immune activation in psoriasis." *Br J Dermatol* **170**(1): 59-65.
- Chu, C. C., P. Di Meglio, et al. (2011). "Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases." *Semin Immunol* **23**(1): 28-41.
- Churko, J. M. and D. W. Laird (2013). "Gap junction remodeling in skin repair following wounding and disease." *Physiology (Bethesda)* **28**(3): 190-198.
- Cianferoni, A. and J. Spergel (2014). "The importance of TSLP in allergic disease and its role as a potential therapeutic target." *Expert Rev Clin Immunol* **10**(11): 1463-1474.
- Cichorek, M., M. Wachulska, et al. (2013). "Skin melanocytes: biology and development." *Postepy Dermatol Alergol* **30**(1): 30-41.
- Clark, R. A. (2010). "Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity." *J Invest Dermatol* **130**(2): 362-370.
- Clark, R. A. (2015). "Resident memory T cells in human health and disease." *Sci Transl Med* **7**(269): 269rv261.
- Clausen, B. E. and P. Stoitzner (2015). "Functional Specialization of Skin Dendritic Cell Subsets in Regulating T Cell Responses." *Front Immunol* **6**: 534.
- Clegg, C. H., J. T. Rulffes, et al. (1996). "Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M." *Nature* **384**(6606): 261-263.
- Cochez, P. M., C. Michiels, et al. (2016). "AhR modulates the IL-22-producing cell proliferation/recruitment in imiquimod-induced psoriasis mouse model." *Eur J Immunol* **46**(6): 1449-1459.
- Cornelissen, C., Y. Marquardt, et al. (2012). "IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models." *J Allergy Clin Immunol* **129**(2): 426-433, 433 e421-428.
- Coulombe, P. A., M. E. Hutton, et al. (1991). "A function for keratins and a common thread among different types of epidermolysis bullosa simplex diseases." *J Cell Biol* **115**(6): 1661-1674.
- Croxford, A. L., S. Karbach, et al. (2014). "IL-6 regulates neutrophil microabscess formation in IL-17A-driven psoriasiform lesions." *J Invest Dermatol* **134**(3): 728-735.
- Danso, M. O., V. van Drongelen, et al. (2014). "TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents." *J Invest Dermatol* **134**(7): 1941-1950.
- Davies, L. C., S. J. Jenkins, et al. (2013). "Tissue-resident macrophages." *Nat Immunol* **14**(10): 986-995.
- Denecker, G., P. Ovaere, et al. (2008). "Caspase-14 reveals its secrets." *J Cell Biol* **180**(3): 451-458.

- Depianto, D., M. L. Kerns, et al. (2010). "Keratin 17 promotes epithelial proliferation and tumor growth by polarizing the immune response in skin." *Nat Genet* **42**(10): 910-914.
- Dhingra, N., M. Suarez-Farinis, et al. (2013). "Attenuated neutrophil axis in atopic dermatitis compared to psoriasis reflects TH17 pathway differences between these diseases." *J Allergy Clin Immunol* **132**(2): 498-501 e493.
- Di Meglio, P., J. H. Duarte, et al. (2014a). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions." *Immunity* **40**(6): 989-1001.
- Di Meglio, P., G. K. Perera, et al. (2011). "The multitasking organ: recent insights into skin immune function." *Immunity* **35**(6): 857-869.
- Di Meglio, P., F. Villanova, et al. (2016). "Targeting CD8(+) T cells prevents psoriasis development." *J Allergy Clin Immunol* **138**(1): 274-276 e276.
- Di Meglio, P., F. Villanova, et al. (2014b). "Psoriasis." *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**(8).
- Dillon, S. R., C. Sprecher, et al. (2004). "Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice." *Nat Immunol* **5**(7): 752-760.
- Diveu, C., E. Venereau, et al. (2006). "Molecular and functional characterization of a soluble form of oncostatin M/interleukin-31 shared receptor." *J Biol Chem* **281**(48): 36673-36682.
- Djian, P., K. Easley, et al. (2000). "Targeted ablation of the murine involucrin gene." *J Cell Biol* **151**(2): 381-388.
- Donato, R., B. R. Cannon, et al. (2013). "Functions of S100 proteins." *Curr Mol Med* **13**(1): 24-57.
- Dreuw, A., H. M. Hermanns, et al. (2005). "Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts." *J Invest Dermatol* **124**(1): 28-37.
- Du, L., M. M. Neis, et al. (2006). "Effects of the differentiated keratinocyte phenotype on expression levels of CYP1-4 family genes in human skin cells." *Toxicol Appl Pharmacol* **213**(2): 135-144.
- Dumas, A., S. Lagarde, et al. (2012). "Oncostatin M decreases interleukin-1 beta secretion by human synovial fibroblasts and attenuates an acute inflammatory reaction in vivo." *J Cell Mol Med* **16**(6): 1274-1285.
- Eckert, R. L., A. M. Broome, et al. (2004). "S100 proteins in the epidermis." *J Invest Dermatol* **123**(1): 23-33.
- Eckert, R. L., M. T. Sturniolo, et al. (2005). "Transglutaminase function in epidermis." *J Invest Dermatol* **124**(3): 481-492.
- Edukulla, R., B. Singh, et al. (2015). "Th2 Cytokines Augment IL-31/IL-31RA Interactions via STAT6-dependent IL-31RA Expression." *J Biol Chem* **290**(21): 13510-13520.
- Egawa, G. and K. Kabashima (2011). "Skin as a peripheral lymphoid organ: revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues." *J Invest Dermatol* **131**(11): 2178-2185.
- Egwuagu, C. E. and J. Larkin Iii (2013). "Therapeutic targeting of STAT pathways in CNS autoimmune diseases." *JAKSTAT* **2**(1): e24134.
- El Ghalbzouri, A. and M. Ponec (2004). "Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components." *Wound Repair Regen* **12**(3): 359-367.
- El Malki, K., S. H. Karbach, et al. (2013). "An alternative pathway of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in the absence of interleukin-17 receptor a signaling." *J Invest Dermatol* **133**(2): 441-451.
- Elias, P. M. and M. Schmuth (2009). "Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis." *Curr Allergy Asthma Rep* **9**(4): 265-272.
- Enk, C. D., S. Mahanty, et al. (1996). "UVB induces IL-12 transcription in human keratinocytes in vivo and in vitro." *Photochem Photobiol* **63**(6): 854-859.
- Enk, C. D., D. Sredni, et al. (1995). "Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro." *J Immunol* **154**(9): 4851-4856.
- Esashi, E., H. Ito, et al. (2009). "Oncostatin M deficiency leads to thymic hypoplasia, accumulation of apoptotic thymocytes and glomerulonephritis." *Eur J Immunol* **39**(6): 1664-1670.

- Esche, C., C. Stellato, et al. (2005). "Chemokines: key players in innate and adaptive immunity." *J Invest Dermatol* **125**(4): 615-628.
- Etemadi, N., M. Chopin, et al. (2015). "TRAF2 regulates TNF and NF-kappaB signalling to suppress apoptosis and skin inflammation independently of Sphingosine kinase 1." *Elife* **4**.
- Eyerich, K. and N. Novak (2013). "Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm." *Allergy* **68**(8): 974-982.
- Eyerich, S., K. Eyerich, et al. (2009). "Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling." *J Clin Invest* **119**(12): 3573-3585.
- Faffe, D. S., L. Flynt, et al. (2005). "Oncostatin M causes eotaxin-1 release from airway smooth muscle: synergy with IL-4 and IL-13." *J Allergy Clin Immunol* **115**(3): 514-520.
- Federici, M., M. L. Giustizieri, et al. (2002). "Impaired IFN-gamma-dependent inflammatory responses in human keratinocytes overexpressing the suppressor of cytokine signaling 1." *J Immunol* **169**(1): 434-442.
- Feingold, K. R. (2007). "Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis." *J Lipid Res* **48**(12): 2531-2546.
- Feldman, S., S. M. Behnam, et al. (2005). "Involving the patient: impact of inflammatory skin disease and patient-focused care." *J Am Acad Dermatol* **53**(1 Suppl 1): S78-85.
- Feldmeyer, L., M. Keller, et al. (2007). "The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes." *Curr Biol* **17**(13): 1140-1145.
- Finelt, N., A. Gazel, et al. (2005). "Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to Oncostatin-M." *Cytokine* **31**(4): 305-313.
- Flutter, B. and F. O. Nestle (2013). "TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis." *Eur J Immunol* **43**(12): 3138-3146.
- Foster, A. M., J. Baliwag, et al. (2014). "IL-36 promotes myeloid cell infiltration, activation, and inflammatory activity in skin." *J Immunol* **192**(12): 6053-6061.
- Frankart, A., J. Malaisse, et al. (2012). "Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface." *Exp Dermatol* **21**(11): 871-875.
- Fritz, D. K., C. Kerr, et al. (2011). "A mouse model of airway disease: oncostatin M-induced pulmonary eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and airway hyperresponsiveness are STAT6 dependent, and interstitial pulmonary fibrosis is STAT6 independent." *J Immunol* **186**(2): 1107-1118.
- Fuchs, E., R. A. Esteves, et al. (1992). "Transgenic mice expressing a mutant keratin 10 gene reveal the likely genetic basis for epidermolytic hyperkeratosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(15): 6906-6910.
- Fuentes-Duculan, J., M. Suarez-Farinias, et al. (2010). "A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis." *J Invest Dermatol* **130**(10): 2412-2422.
- Fujishima, S., H. Watanabe, et al. (2010). "Involvement of IL-17F via the induction of IL-6 in psoriasis." *Arch Dermatol Res* **302**(7): 499-505.
- Fukui, A., K. Ohta, et al. (2013). "Interleukin-8 and CXCL10 expression in oral keratinocytes and fibroblasts via Toll-like receptors." *Microbiol Immunol* **57**(3): 198-206.
- Furuse, M., M. Hata, et al. (2002). "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice." *J Cell Biol* **156**(6): 1099-1111.
- Gabbiani, G. (2003). "The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases." *J Pathol* **200**(4): 500-503.
- Galli, S. J. and M. Tsai (2012). "IgE and mast cells in allergic disease." *Nat Med* **18**(5): 693-704.
- Ganguly, D., G. Chamilos, et al. (2009). "Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8." *J Exp Med* **206**(9): 1983-1994.
- Garrod, D. and M. Chidgey (2008). "Desmosome structure, composition and function." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 572-587.
- Gazel, A., P. Ramphal, et al. (2003). "Transcriptional profiling of epidermal keratinocytes: comparison of genes expressed in skin, cultured keratinocytes, and reconstituted epidermis, using large DNA microarrays." *J Invest Dermatol* **121**(6): 1459-1468.

- Gazel, A., M. Rosdy, et al. (2006). "A characteristic subset of psoriasis-associated genes is induced by oncostatin-M in reconstituted epidermis." *J Invest Dermatol* **126**(12): 2647-2657.
- Gerber, P. A., B. A. Buhren, et al. (2014). "The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes." *Biol Chem* **395**(6): 577-591.
- Getsios, S., A. C. Huen, et al. (2004). "Working out the strength and flexibility of desmosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 271-281.
- Ghannam, S., C. Dejou, et al. (2011). "CCL20 and beta-defensin-2 induce arrest of human Th17 cells on inflamed endothelium in vitro under flow conditions." *J Immunol* **186**(3): 1411-1420.
- Ghilardi, N., J. Li, et al. (2002). "A novel type I cytokine receptor is expressed on monocytes, signals proliferation, and activates STAT-3 and STAT-5." *J Biol Chem* **277**(19): 16831-16836.
- Gilliet, M., C. Conrad, et al. (2004). "Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors." *Arch Dermatol* **140**(12): 1490-1495.
- Giot, J. P., I. Paris, et al. (2013). "Involvement of IL-1 and oncostatin M in acanthosis associated with hypertensive leg ulcer." *Am J Pathol* **182**(3): 806-818.
- Giustizieri, M. L., F. Mascia, et al. (2001). "Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines." *J Allergy Clin Immunol* **107**(5): 871-877.
- Gordon, S., A. Pluddemann, et al. (2014). "Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions." *Immunol Rev* **262**(1): 36-55.
- Goren, I., H. Kampfer, et al. (2006). "Oncostatin M expression is functionally connected to neutrophils in the early inflammatory phase of skin repair: implications for normal and diabetes-impaired wounds." *J Invest Dermatol* **126**(3): 628-637.
- Grenier, A., M. Dehoux, et al. (1999). "Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils." *Blood* **93**(4): 1413-1421.
- Grewe, M., W. Czech, et al. (1998). "Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses." *J Immunol* **161**(1): 415-420.
- Grimstad, O., Y. Sawanobori, et al. (2009). "Anti-interleukin-31-antibodies ameliorate scratching behaviour in NC/Nga mice: a model of atopic dermatitis." *Exp Dermatol* **18**(1): 35-43.
- Grine, L., L. Dejager, et al. (2015a). "Dual Inhibition of TNFR1 and IFNAR1 in Imiquimod-Induced Psoriasisform Skin Inflammation in Mice." *J Immunol* **194**(11): 5094-5102.
- Grine, L., L. Dejager, et al. (2015b). "An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17." *Cytokine Growth Factor Rev* **26**(1): 25-33.
- Grossman, R. M., J. Krueger, et al. (1989). "Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(16): 6367-6371.
- Gudjonsson, J. E., J. Ding, et al. (2010). "Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample: additional regulated genes and comparisons with in vitro models." *J Invest Dermatol* **130**(7): 1829-1840.
- Guenou, H., X. Nissan, et al. (2009). "Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study." *Lancet* **374**(9703): 1745-1753.
- Guihard, P., M. A. Boutet, et al. (2015). "Oncostatin m, an inflammatory cytokine produced by macrophages, supports intramembranous bone healing in a mouse model of tibia injury." *Am J Pathol* **185**(3): 765-775.
- Guilloteau, K., I. Paris, et al. (2010). "Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 α , and TNF- α Recapitulates Some Features of Psoriasis." *J Immunol*.
- Gunderson, A. J., J. Mohammed, et al. (2013). "CD8(+) T cells mediate RAS-induced psoriasis-like skin inflammation through IFN-gamma." *J Invest Dermatol* **133**(4): 955-963.
- Guttman-Yassky, E., K. E. Nograles, et al. (2011a). "Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: clinical and pathologic concepts." *J Allergy Clin Immunol* **127**(5): 1110-1118.

- Guttman-Yassky, E., K. E. Nograles, et al. (2011b). "Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part II: immune cell subsets and therapeutic concepts." *J Allergy Clin Immunol* **127**(6): 1420-1432.
- Guttman-Yassky, E., M. Suarez-Farinis, et al. (2009). "Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis." *J Allergy Clin Immunol* **124**(6): 1235-1244 e1258.
- Hanel, K. H., C. M. Pfaff, et al. (2016). "Control of the Physical and Antimicrobial Skin Barrier by an IL-31-IL-1 Signaling Network." *J Immunol* **196**(8): 3233-3244.
- Hara, T., M. Ichihara, et al. (1997). "Cloning and biological activity of murine oncostatin M." *Leukemia* **11 Suppl 3**: 449-450.
- Harden, J. L., L. M. Johnson-Huang, et al. (2015a). "Humanized anti-IFN-gamma (HuZAF) in the treatment of psoriasis." *J Allergy Clin Immunol* **135**(2): 553-556.
- Harden, J. L., J. G. Krueger, et al. (2015b). "The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review." *J Autoimmun* **64**: 66-73.
- Harder, J. and G. Nunez (2009). "Functional expression of the intracellular pattern recognition receptor NOD1 in human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **129**(5): 1299-1302.
- Hartwig, T., S. Pantelyushin, et al. (2015). "Dermal IL-17-producing gammadelta T cells establish long-lived memory in the skin." *Eur J Immunol* **45**(11): 3022-3033.
- Has, C. and A. Nystrom (2015). "Epidermal Basement Membrane in Health and Disease." *Curr Top Membr* **76**: 117-170.
- Heath, W. R. and F. R. Carbone (2013). "The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells." *Nat Immunol* **14**(10): 978-985.
- Heenen, M., S. Thiriar, et al. (1998). "Ki-67 immunostaining of normal human epidermis: comparison with 3H-thymidine labelling and PCNA immunostaining." *Dermatology* **197**(2): 123-126.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." *Biochem J* **374**(Pt 1): 1-20.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." *Biochem J* **334 (Pt 2)**: 297-314.
- Heise, R., M. M. Neis, et al. (2009). "IL-31 receptor alpha expression in epidermal keratinocytes is modulated by cell differentiation and interferon gamma." *J Invest Dermatol* **129**(1): 240-243.
- Hennings, H., D. Michael, et al. (1980). "Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture." *Cell* **19**(1): 245-254.
- Hennino, A., M. Vocanson, et al. (2007). "Skin-infiltrating CD8+ T cells initiate atopic dermatitis lesions." *J Immunol* **178**(9): 5571-5577.
- Hermanns, H. M. (2015). "Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology." *Cytokine Growth Factor Rev* **26**(5): 545-558.
- Hernandez-Quintero, M., W. Kuri-Harcuch, et al. (2006). "Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture." *Cell Tissue Res* **325**(1): 77-90.
- Hijnen, D., E. F. Knol, et al. (2013). "CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN-gamma, IL-13, IL-17, and IL-22." *J Invest Dermatol* **133**(4): 973-979.
- Hobbs, R. M., V. Silva-Vargas, et al. (2004). "Expression of activated MEK1 in differentiating epidermal cells is sufficient to generate hyperproliferative and inflammatory skin lesions." *J Invest Dermatol* **123**(3): 503-515.
- Horejs-Hoeck, J., H. Schwarz, et al. (2012). "Dendritic cells activated by IFN-gamma/STAT1 express IL-31 receptor and release proinflammatory mediators upon IL-31 treatment." *J Immunol* **188**(11): 5319-5326.

- Horikawa, T., T. Nakayama, et al. (2002). "IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis." *Int Immunol* **14**(7): 767-773.
- Horiuchi, Y., S. J. Bae, et al. (2006). "Overexpression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) in severe atopic dermatitis." *Clin Exp Dermatol* **31**(1): 100-104.
- Hunter, C. A. (2005). "New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 521-531.
- Hunter, C. A. and S. A. Jones (2015). "IL-6 as a keystone cytokine in health and disease." *Nat Immunol* **16**(5): 448-457.
- Hurst, S. M., T. S. Wilkinson, et al. (2001). "IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation." *Immunity* **14**(6): 705-714.
- Ichihara, M., T. Hara, et al. (1997). "Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice." *Blood* **90**(1): 165-173.
- Ihn, H. and K. Tamaki (2000). "Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway." *J Immunol* **165**(4): 2149-2155.
- Ikuta, S., N. Sekino, et al. (2006). "Mouse epidermal keratinocytes in three-dimensional organotypic coculture with dermal fibroblasts form a stratified sheet resembling skin." *Biosci Biotechnol Biochem* **70**(11): 2669-2675.
- Inkeles, M. S., P. O. Scumpia, et al. (2015). "Comparison of molecular signatures from multiple skin diseases identifies mechanisms of immunopathogenesis." *J Invest Dermatol* **135**(1): 151-159.
- Ippagunta, S. K., R. Gangwar, et al. (2016). "Keratinocytes contribute intrinsically to psoriasis upon loss of Tnip1 function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(41): E6162-E6171.
- Italiani, P. and D. Boraschi (2014). "From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation." *Front Immunol* **5**: 514.
- Jackson, M., S. E. Howie, et al. (1999). "Psoriatic keratinocytes show reduced IRF-1 and STAT-1alpha activation in response to gamma-IFN." *FASEB J* **13**(3): 495-502.
- Jameson, J. and W. L. Havran (2007). "Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing." *Immunol Rev* **215**: 114-122.
- Janson, D. G., G. Saintigny, et al. (2012). "Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts." *J Invest Dermatol* **132**(11): 2565-2572.
- Jin, H., R. He, et al. (2009). "Animal models of atopic dermatitis." *J Invest Dermatol* **129**(1): 31-40.
- Johansen, C., P. A. Usher, et al. (2009). "Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin." *Br J Dermatol* **160**(2): 319-324.
- Johnson-Huang, L. M., M. Suarez-Farinias, et al. (2012). "A single intradermal injection of IFN-gamma induces an inflammatory state in both non-lesional psoriatic and healthy skin." *J Invest Dermatol* **132**(4): 1177-1187.
- Jones, G. W., R. M. McLoughlin, et al. (2010). "Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells." *J Immunol* **184**(4): 2130-2139.
- Jordan, C. T., L. Cao, et al. (2012). "PSORS2 is due to mutations in CARD14." *Am J Hum Genet* **90**(5): 784-795.
- Jung, I. D., K. T. Noh, et al. (2010). "Oncostatin M induces dendritic cell maturation and Th1 polarization." *Biochem Biophys Res Commun* **394**(2): 272-278.
- Kalinin, A. E., A. V. Kajava, et al. (2002). "Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope." *Bioessays* **24**(9): 789-800.
- Kamsteeg, M., M. Bergers, et al. (2011). "Type 2 helper T-cell cytokines induce morphologic and molecular characteristics of atopic dermatitis in human skin equivalent." *Am J Pathol* **178**(5): 2091-2099.
- Kanda, N., T. Shimizu, et al. (2007). "IL-18 enhances IFN-gamma-induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes." *Eur J Immunol* **37**(2): 338-350.

- Kandyba, E. E., M. B. Hodgins, et al. (2008). "A murine living skin equivalent amenable to live-cell imaging: analysis of the roles of connexins in the epidermis." *J Invest Dermatol* **128**(4): 1039-1049.
- Kaplan, D. H., A. Kissenpfennig, et al. (2008). "Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models." *Eur J Immunol* **38**(9): 2369-2376.
- Kaplanski, G., V. Marin, et al. (2003). "IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation." *Trends Immunol* **24**(1): 25-29.
- Kasraie, S. and T. Werfel (2013). "Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis." *Mediators Inflamm* **2013**: 942375.
- Kasutani, K., E. Fujii, et al. (2014). "Anti-IL-31 receptor antibody is shown to be a potential therapeutic option for treating itch and dermatitis in mice." *Br J Pharmacol* **171**(22): 5049-5058.
- Kendall, R. T. and C. A. Feghali-Bostwick (2014). "Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators." *Front Pharmacol* **5**: 123.
- Kennedy-Crispin, M., E. Billick, et al. (2012). "Human keratinocytes' response to injury upregulates CCL20 and other genes linking innate and adaptive immunity." *J Invest Dermatol* **132**(1): 105-113.
- Kerfoot, S. M., E. Raharjo, et al. (2001). "Exclusive neutrophil recruitment with oncostatin M in a human system." *Am J Pathol* **159**(4): 1531-1539.
- Kerr, C., C. Langdon, et al. (1999). "Adenovirus vector expressing mouse oncostatin M induces acute-phase proteins and TIMP-1 expression in vivo in mice." *J Interferon Cytokine Res* **19**(10): 1195-1205.
- Kim, B. E., D. Y. Leung, et al. (2008). "Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6." *Clin Immunol* **126**(3): 332-337.
- Kim, B. S. (2015). "Innate lymphoid cells in the skin." *J Invest Dermatol* **135**(3): 673-678.
- Kim, B. S., F. Miyagawa, et al. (2009). "Keratinocytes function as accessory cells for presentation of endogenous antigen expressed in the epidermis." *J Invest Dermatol* **129**(12): 2805-2817.
- Kim, B. S., M. C. Siracusa, et al. (2013). "TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation." *Sci Transl Med* **5**(170): 170ra116.
- Kim, J. E., J. S. Kim, et al. (2016a). "Molecular Mechanisms of Cutaneous Inflammatory Disorder: Atopic Dermatitis." *Int J Mol Sci* **17**(8).
- Kim, J. H., Y. Hu, et al. (2016b). "CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease." *Nat Immunol* **17**(10): 1159-1166.
- Kimura, A. and T. Kishimoto (2010). "IL-6: regulator of Treg/Th17 balance." *Eur J Immunol* **40**(7): 1830-1835.
- Kinoshita, H., T. Takai, et al. (2009). "Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA." *J Allergy Clin Immunol* **123**(1): 179-186.
- Kirschner, N., C. Bohner, et al. (2010). "Tight junctions: is there a role in dermatology?" *Arch Dermatol Res* **302**(7): 483-493.
- Kishimoto, T. (1989). "The biology of interleukin-6." *Blood* **74**(1): 1-10.
- Klechevsky, E. (2013). "Human dendritic cells - stars in the skin." *Eur J Immunol* **43**(12): 3147-3155.
- Koch, P. J., P. A. de Viragh, et al. (2000). "Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein." *J Cell Biol* **151**(2): 389-400.
- Kolarsick, P. A., M. A. Kolarsick, et al. (2011). "Anatomy and Physiology of the Skin" *JDNA* **3**: 203-213.
- Koster, M. I. (2009). "Making an epidermis." *Ann N Y Acad Sci* **1170**: 7-10.
- Kragballe, K. and L. Iversen (1993). "Calcipotriol. A new topical antipsoriatic." *Dermatol Clin* **11**(1): 137-141.
- Kretz, M., K. Maass, et al. (2004). "Expression and function of connexins in the epidermis, analyzed with transgenic mouse mutants." *Eur J Cell Biol* **83**(11-12): 647-654.

- Krieg, T. and M. Aumailley (2011). "The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions." *Exp Dermatol* **20**(8): 689-695.
- Kryczek, I., A. T. Bruce, et al. (2008). "Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis." *J Immunol* **181**(7): 4733-4741.
- Kumar, V., J. E. Bouameur, et al. (2015). "A keratin scaffold regulates epidermal barrier formation, mitochondrial lipid composition, and activity." *J Cell Biol* **211**(5): 1057-1075.
- Kumari, S., M. C. Bonnet, et al. (2013). "Tumor Necrosis Factor Receptor Signaling in Keratinocytes Triggers Interleukin-24-Dependent Psoriasis-like Skin Inflammation in Mice." *Immunity* **39**(5): 899-911.
- Kuo, C. H., H. F. Kuo, et al. (2013). "Early life exposure to antibiotics and the risk of childhood allergic diseases: an update from the perspective of the hygiene hypothesis." *J Microbiol Immunol Infect* **46**(5): 320-329.
- Kupper, T. S. and R. C. Fuhlbrigge (2004). "Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences." *Nat Rev Immunol* **4**(3): 211-222.
- Kuramoto, N., T. Takizawa, et al. (2002). "Development of ichthyosiform skin compensates for defective permeability barrier function in mice lacking transglutaminase 1." *J Clin Invest* **109**(2): 243-250.
- Lafontant, P. J., A. R. Burns, et al. (2006). "Oncostatin M differentially regulates CXC chemokines in mouse cardiac fibroblasts." *Am J Physiol Cell Physiol* **291**(1): C18-26.
- Laggner, U., P. Di Meglio, et al. (2011). "Identification of a novel proinflammatory human skin-homing Vgamma9Vdelta2 T cell subset with a potential role in psoriasis." *J Immunol* **187**(5): 2783-2793.
- Lande, R., E. Botti, et al. (2014). "The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis." *Nat Commun* **5**: 5621.
- Lande, R., J. Gregorio, et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." *Nature* **449**(7162): 564-569.
- Langdon, C., C. Kerr, et al. (2000). "Murine oncostatin M stimulates mouse synovial fibroblasts in vitro and induces inflammation and destruction in mouse joints in vivo." *Am J Pathol* **157**(4): 1187-1196.
- Langdon, C., C. Kerr, et al. (2003). "Oncostatin M regulates eotaxin expression in fibroblasts and eosinophilic inflammation in C57BL/6 mice." *J Immunol* **170**(1): 548-555.
- Le Goff, B., S. Singbrant, et al. (2014). "Oncostatin M acting via OSMR, augments the actions of IL-1 and TNF in synovial fibroblasts." *Cytokine* **68**(2): 101-109.
- Le Lamer, M., L. Pellerin, et al. (2015). "Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis." *Biol Chem* **396**(11): 1163-1179.
- Le, T. A., T. Takai, et al. (2011). "Flagellin induces the expression of thymic stromal lymphopoietin in human keratinocytes via toll-like receptor 5." *Int Arch Allergy Immunol* **155**(1): 31-37.
- Lebre, M. C., A. M. van der Aar, et al. (2007). "Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9." *J Invest Dermatol* **127**(2): 331-341.
- Lecron, J. C., P. I., et al. (2013). "Contribution of IL-22 to Experimental Skin Inflammation." *Progress in Inflammation Research : IL-17, IL-22 and Their Producing Cells: Role in Inflammation and Autoimmunity*: 305-317.
- Lee, E., W. L. Trepicchio, et al. (2004). "Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris." *J Exp Med* **199**(1): 125-130.
- Lee, K. H., K. A. Cho, et al. (2011). "Filaggrin knockdown and Toll-like receptor 3 (TLR3) stimulation enhanced the production of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) from epidermal layers." *Exp Dermatol* **20**(2): 149-151.
- Lessard, J. C. and P. A. Coulombe (2012). "Keratin 16-null mice develop palmoplantar keratoderma, a hallmark feature of pachyonychia congenita and related disorders." *J Invest Dermatol* **132**(5): 1384-1391.
- Lessard, J. C., S. Pina-Paz, et al. (2013). "Keratin 16 regulates innate immunity in response to epidermal barrier breach." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(48): 19537-19542.

- Levy, M. T., M. Trojanowska, et al. (2000). "Oncostatin M: a cytokine upregulated in human cirrhosis, increases collagen production by human hepatic stellate cells." *J Hepatol* **32**(2): 218-226.
- Li, M., P. Hener, et al. (2009). "Induction of thymic stromal lymphopoietin expression in keratinocytes is necessary for generating an atopic dermatitis upon application of the active vitamin D3 analogue MC903 on mouse skin." *J Invest Dermatol* **129**(2): 498-502.
- Li, M., P. Hener, et al. (2006). "Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(31): 11736-11741.
- Lindroos, J., L. Svensson, et al. (2011). "IL-23-mediated epidermal hyperplasia is dependent on IL-6." *J Invest Dermatol* **131**(5): 1110-1118.
- Linsley, P. S., J. Kallestad, et al. (1990). "Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M." *Mol Cell Biol* **10**(5): 1882-1890.
- Liu, F. T., H. Goodarzi, et al. (2011). "IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis." *Clin Rev Allergy Immunol* **41**(3): 298-310.
- Lopez-Pajares, V., K. Yan, et al. (2013). "Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation." *Trends Genet* **29**(1): 31-40.
- Luger, T. A. and T. Schwarz (1990). "Evidence for an epidermal cytokine network." *J Invest Dermatol* **95**(6 Suppl): 100S-104S.
- Lynde, C. W., Y. Poulin, et al. (2014). "Interleukin 17A: toward a new understanding of psoriasis pathogenesis." *J Am Acad Dermatol* **71**(1): 141-150.
- Maas-Szabowski, N., A. Shimotoyodome, et al. (1999). "Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism." *J Cell Sci* **112** (Pt 12): 1843-1853.
- Maatta, A., T. DiColandrea, et al. (2001). "Gene targeting of envoplakin, a cytoskeletal linker protein and precursor of the epidermal cornified envelope." *Mol Cell Biol* **21**(20): 7047-7053.
- Mabuchi, T., T. P. Singh, et al. (2013). "CCR6 is required for epidermal trafficking of gammadelta-T cells in an IL-23-induced model of psoriasiform dermatitis." *J Invest Dermatol* **133**(1): 164-171.
- Mabuchi, T., T. Takekoshi, et al. (2011). "Epidermal CCR6+ gammadelta T cells are major producers of IL-22 and IL-17 in a murine model of psoriasiform dermatitis." *J Immunol* **187**(10): 5026-5031.
- Madison, K. C. (2003). "Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis." *J Invest Dermatol* **121**(2): 231-241.
- Malik, N., J. C. Kallestad, et al. (1989). "Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M." *Mol Cell Biol* **9**(7): 2847-2853.
- Malissen, B., S. Tamoutounour, et al. (2014). "The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin." *Nat Rev Immunol* **14**(6): 417-428.
- Marionnet, C., C. Pierrard, et al. (2006). "Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin." *J Invest Dermatol* **126**(5): 971-979.
- Martin, P. E. and M. van Steensel (2015). "Connexins and skin disease: insights into the role of beta connexins in skin homeostasis." *Cell Tissue Res* **360**(3): 645-658.
- Mashiko, S., S. Bouguermouh, et al. (2015). "Human mast cells are major IL-22 producers in patients with psoriasis and atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* **136**(2): 351-359 e351.
- Matsui, T. and M. Amagai (2015). "Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum." *Int Immunol* **27**(6): 269-280.
- Mazzalupo, S., P. Wong, et al. (2003). "Role for keratins 6 and 17 during wound closure in embryonic mouse skin." *Dev Dyn* **226**(2): 356-365.
- McKee, P. H., Ed. (2012). *McKee's Pathology of the Skin. – 4th ed.*, SAUNDERS an imprint of Elsevier Limited.
- McKee, S. J., S. R. Mattarollo, et al. (2014). "Immunosuppressive roles of natural killer T (NKT) cells in the skin." *J Leukoc Biol* **96**(1): 49-54.

- McKenzie, R. C., D. Paglia, et al. (1996). "A novel endogenous mediator of cutaneous inflammation: leukemia inhibitory factor." *Acta Derm Venereol* **76**(2): 111-114.
- McKenzie, R. C. and E. Sabin (2003). "Aberrant signalling and transcription factor activation as an explanation for the defective growth control and differentiation of keratinocytes in psoriasis: a hypothesis." *Exp Dermatol* **12**(4): 337-345.
- McLoughlin, R. M., J. Witowski, et al. (2003). "Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation." *J Clin Invest* **112**(4): 598-607.
- Mihara, M., M. Hashizume, et al. (2012). "IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions." *Clin Sci (Lond)* **122**(4): 143-159.
- Miller, A. M. (2011). "Role of IL-33 in inflammation and disease." *J Inflamm (Lond)* **8**(1): 22.
- Miller, L. S. (2008). "Toll-like receptors in skin." *Adv Dermatol* **24**: 71-87.
- Mitsui, H., T. Watanabe, et al. (2004). "Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells." *J Invest Dermatol* **122**(1): 95-102.
- Modur, V., M. J. Feldhaus, et al. (1997). "Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules." *J Clin Invest* **100**(1): 158-168.
- Moll, I., M. Roessler, et al. (2005). "Human Merkel cells--aspects of cell biology, distribution and functions." *Eur J Cell Biol* **84**(2-3): 259-271.
- Moll, R., M. Divo, et al. (2008). "The human keratins: biology and pathology." *Histochem Cell Biol* **129**(6): 705-733.
- Moran, E. M., R. Mullan, et al. (2009). "Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies." *Arthritis Res Ther* **11**(4): R113.
- Morasso, M. I. and M. Tomic-Canic (2005). "Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing." *Biol Cell* **97**(3): 173-183.
- Moreira, L. O. and D. S. Zamboni (2012). "NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation." *Front Immunol* **3**: 328.
- Morikawa, Y., S. Tamura, et al. (2004). "Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia." *J Neurosci* **24**(8): 1941-1947.
- Morizane, S. and R. L. Gallo (2012). "Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis." *J Dermatol* **39**(3): 225-230.
- Morizane, S., K. Yamasaki, et al. (2012). "TH2 cytokines increase kallikrein 7 expression and function in patients with atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* **130**(1): 259-261 e251.
- Mozaffarian, A., A. W. Brewer, et al. (2008). "Mechanisms of oncostatin M-induced pulmonary inflammation and fibrosis." *J Immunol* **181**(10): 7243-7253.
- Musette, P., I. Auquit Auckbur, et al. (2006). "[Innate immunity: cutaneous expression of Toll-like receptors]." *Med Sci (Paris)* **22**(2): 149-152.
- Nagahama, K. Y., S. Togo, et al. (2013). "Oncostatin M modulates fibroblast function via signal transducers and activators of transcription proteins-3." *Am J Respir Cell Mol Biol* **49**(4): 582-591.
- Nakajima, K., T. Kanda, et al. (2011). "Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model." *J Immunol* **186**(7): 4481-4489.
- Naylor, E. C., R. E. Watson, et al. (2011). "Molecular aspects of skin ageing." *Maturitas* **69**(3): 249-256.
- Nestle, F. O., C. Conrad, et al. (2005). "Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production." *J Exp Med* **202**(1): 135-143.
- Nestle, F. O., P. Di Meglio, et al. (2009). "Skin immune sentinels in health and disease." *Nat Rev Immunol* **9**(10): 679-691.
- Nestle, F. O. and B. J. Nickoloff (2005). "Animal Models of T Cell-Mediated Skin Diseases chapter 11 From classical mouse models of psoriasis to a spontaneous xenograft model featuring use of AGR mice" *Ernst Schering Res Found Workshop*(50): 203-215.

- Neveu, W. A., J. B. Allard, et al. (2009). "IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens." *J Immunol* **183**(3): 1732-1738.
- Newby, C. S., R. M. Barr, et al. (2000). "Cytokine release and cytotoxicity in human keratinocytes and fibroblasts induced by phenols and sodium dodecyl sulfate." *J Invest Dermatol* **115**(2): 292-298.
- Nickoloff, B. J. (2006). "Keratinocytes regain momentum as instigators of cutaneous inflammation." *Trends Mol Med* **12**(3): 102-106.
- Nickoloff, B. J. and Y. Naidu (1994). "Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin." *J Am Acad Dermatol* **30**(4): 535-546.
- Nickoloff, B. J., J. M. Schroder, et al. (2000). "Is psoriasis a T-cell disease?" *Exp Dermatol* **9**(5): 359-375.
- Nickoloff, B. J. and L. A. Turka (1994). "Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes." *Immunol Today* **15**(10): 464-469.
- Nicolas, J. F. (2014). "[Psoriasis: how the epithelium influences the immune response: keratinocytes, dendritic cells and T lymphocytes]." *Bull Acad Natl Med* **198**(1): 17-29; discussion 29-30.
- Niebuhr, M., K. Baumert, et al. (2010a). "TLR-2-mediated cytokine and chemokine secretion in human keratinocytes." *Exp Dermatol* **19**(10): 873-877.
- Niebuhr, M., H. Scharonow, et al. (2010b). "Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* **126**(6): 1176-1183 e1174.
- Niehues, H., I. M. van Vlijmen-Willems, et al. (2016). "Late cornified envelope (LCE) proteins: distinct expression patterns of LCE2 and LCE3 members suggest nonredundant roles in human epidermis and other epithelia." *Br J Dermatol* **174**(4): 795-802.
- Niessen, C. M. (2007). "Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function." *J Invest Dermatol* **127**(11): 2525-2532.
- Nishimoto, S., H. Kotani, et al. (2013). "Th17 cells carrying TCR recognizing epidermal autoantigen induce psoriasis-like skin inflammation." *J Immunol* **191**(6): 3065-3072.
- Nograles, K. E., L. C. Zaba, et al. (2009). "IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells." *J Allergy Clin Immunol* **123**(6): 1244-1252 e1242.
- Nomura, T., K. Kabashima, et al. (2014). "The panoply of alphabetaT cells in the skin." *J Dermatol Sci* **76**(1): 3-9.
- Novak, N. and T. Bieber (2005). "The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis." *J Am Acad Dermatol* **53**(2 Suppl 2): S171-176.
- Novak, N., T. Bieber, et al. (2003). "Immune mechanisms leading to atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* **112**(6 Suppl): S128-139.
- Ogura, H., M. Murakami, et al. (2008). "Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction." *Immunity* **29**(4): 628-636.
- Olaru, F. and L. E. Jensen (2010). "Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors." *Exp Dermatol* **19**(8): e314-316.
- Omori-Miyake, M., M. Yamashita, et al. (2014). "In vitro assessment of IL-4- or IL-13-mediated changes in the structural components of keratinocytes in mice and humans." *J Invest Dermatol* **134**(5): 1342-1350.
- Onoufriadiis, A., M. A. Simpson, et al. (2011). "Mutations in IL36RN/IL1F5 are associated with the severe episodic inflammatory skin disease known as generalized pustular psoriasis." *Am J Hum Genet* **89**(3): 432-437.
- Oyoshi, M. K., R. He, et al. (2009). "Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis." *Adv Immunol* **102**: 135-226.
- Oyoshi, M. K., R. P. Larson, et al. (2010). "Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a T(H)2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression." *J Allergy Clin Immunol* **126**(5): 976-984, 984 e971-975.

- Pantelyushin, S., S. Haak, et al. (2012). "Rorgammat+ innate lymphocytes and gammadelta T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice." *J Clin Invest* **122**(6): 2252-2256.
- Paramio, J. M., C. Segrelles, et al. (2001). "Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest." *Mol Cell Biol* **21**(21): 7449-7459.
- Park, C. O. and T. S. Kupper (2015). "The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease." *Nat Med* **21**(7): 688-697.
- Pasparakis, M., G. Courtois, et al. (2002). "TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2." *Nature* **417**(6891): 861-866.
- Pasparakis, M., I. Haase, et al. (2014). "Mechanisms regulating skin immunity and inflammation." *Nat Rev Immunol* **14**(5): 289-301.
- Pazyar, N., A. Feily, et al. (2012). "An overview of interleukin-1 receptor antagonist, anakinra, in the treatment of cutaneous diseases." *Curr Clin Pharmacol* **7**(4): 271-275.
- Pendares, V., J. Malaisse, et al. (2014). "Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation." *J Invest Dermatol* **134**(12): 2938-2946.
- Perera, G. K., P. Di Meglio, et al. (2012). "Psoriasis." *Annu Rev Pathol* **7**: 385-422.
- Peters, B., J. Kirfel, et al. (2001). "Complete cytolysis and neonatal lethality in keratin 5 knockout mice reveal its fundamental role in skin integrity and in epidermolysis bullosa simplex." *Mol Biol Cell* **12**(6): 1775-1789.
- Piskin, G., R. M. Sylva-Steenland, et al. (2006). "In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin." *J Immunol* **176**(3): 1908-1915.
- Plater-Zyberk, C., J. Buckton, et al. (2001). "Amelioration of arthritis in two murine models using antibodies to oncostatin M." *Arthritis Rheum* **44**(11): 2697-2702.
- Pohin, M., W. Guesdon, et al. (2016a). "Oncostatin M overexpression induces skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation." *Eur J Immunol* **46**(7): 1737-1751.
- Pohin, M., W. Guesdon, et al. (2016b). "Oncostatin M overexpression induces skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation." *Eur J Immunol*.
- Poling, J., P. Gajawada, et al. (2014). "Therapeutic targeting of the oncostatin M receptor-beta prevents inflammatory heart failure." *Basic Res Cardiol* **109**(1): 396.
- Ponec, M., S. Gibbs, et al. (1997a). "Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation." *Arch Dermatol Res* **289**(6): 317-326.
- Ponec, M., A. Weerheim, et al. (1997b). "The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C." *J Invest Dermatol* **109**(3): 348-355.
- Pothoven, K. L., J. E. Norton, et al. (2015). "Oncostatin M promotes mucosal epithelial barrier dysfunction, and its expression is increased in patients with eosinophilic mucosal disease." *J Allergy Clin Immunol* **136**(3): 737-746 e734.
- Poumay, Y. and A. Coquette (2007). "Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research." *Arch Dermatol Res* **298**(8): 361-369.
- Prens, E. P., M. Kant, et al. (2008). "IFN-alpha enhances poly-IC responses in human keratinocytes by inducing expression of cytosolic innate RNA receptors: relevance for psoriasis." *J Invest Dermatol* **128**(4): 932-938.
- Proksch, E., J. M. Brandner, et al. (2008). "The skin: an indispensable barrier." *Exp Dermatol* **17**(12): 1063-1072.
- Prost-Squarcioni, C. (2006). "[Histology of skin and hair follicle]." *Med Sci (Paris)* **22**(2): 131-137.
- Prunieras, M., M. Regnier, et al. (1983). "Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface." *J Invest Dermatol* **81**(1 Suppl): 28s-33s.
- Purwar, R., T. Werfel, et al. (2006). "IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4+CCR4+ T cells: possible role in atopic dermatitis." *J Invest Dermatol* **126**(5): 1043-1051.

- Quaranta, M., B. Knapp, et al. (2014). "Intraindividual genome expression analysis reveals a specific molecular signature of psoriasis and eczema." *Sci Transl Med* **6**(244): 244ra290.
- Raap, U., K. Wichmann, et al. (2008). "Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* **122**(2): 421-423.
- Rabe, B., A. Chalaris, et al. (2008). "Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation." *Blood* **111**(3): 1021-1028.
- Rabeony, H., I. Petit-Paris, et al. (2014). "Inhibition of keratinocyte differentiation by the synergistic effect of IL-17A, IL-22, IL-1alpha, TNFalpha and oncostatin M." *PLoS One* **9**(7): e101937.
- Rabeony, H., M. Pohin, et al. (2015). "IMQ-induced skin inflammation in mice is dependent on IL-1R1 and MyD88 signaling but independent of the NLRP3 inflammasome." *Eur J Immunol* **45**(10): 2847-2857.
- Ramirez-Carrozzi, V., A. Sambandam, et al. (2011). "IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner." *Nat Immunol* **12**(12): 1159-1166.
- Ray, S., H. P. Foote, et al. (2013). "beta-Catenin protects the epidermis from mechanical stresses." *J Cell Biol* **202**(1): 45-52.
- Rebholz, B., I. Haase, et al. (2007). "Crosstalk between keratinocytes and adaptive immune cells in an IkappaBalph protein-mediated inflammatory disease of the skin." *Immunity* **27**(2): 296-307.
- Reichelt, J., H. Bussow, et al. (2001). "Formation of a normal epidermis supported by increased stability of keratins 5 and 14 in keratin 10 null mice." *Mol Biol Cell* **12**(6): 1557-1568.
- Reichelt, J. and T. M. Magin (2002). "Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice." *J Cell Sci* **115**(Pt 13): 2639-2650.
- Repovic, P. and E. N. Benveniste (2002). "Prostaglandin E2 is a novel inducer of oncostatin-M expression in macrophages and microglia." *J Neurosci* **22**(13): 5334-5343.
- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma." *Cell* **6**(3): 317-330.
- Richards, C. D. (2013). "The enigmatic cytokine oncostatin m and roles in disease." *ISRN Inflamm* **2013**: 512103.
- Richards, C. D., L. Izakelian, et al. (2016). "Regulation of IL-33 by Oncostatin M in Mouse Lung Epithelial Cells." *Mediators Inflamm* **2016**: 9858374.
- Rincon, M. (2012). "Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases." *Trends Immunol* **33**(11): 571-577.
- Roberson, E. D. and A. M. Bowcock (2010). "Psoriasis genetics: breaking the barrier." *Trends Genet* **26**(9): 415-423.
- Robinette, M. L. and M. Colonna (2016). "Immune modules shared by innate lymphoid cells and T cells." *J Allergy Clin Immunol* **138**(5): 1243-1251.
- Roediger, B., R. Kyle, et al. (2014). "Dermal group 2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis and allergy." *Curr Opin Immunol* **31**: 108-114.
- Rogge, L., E. Bianchi, et al. (2000). "Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays." *Nat Genet* **25**(1): 96-101.
- Romani, N., B. E. Clausen, et al. (2010). "Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin." *Immunol Rev* **234**(1): 120-141.
- Rosdy, M. and L. C. Clauss (1990). "Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface." *J Invest Dermatol* **95**(4): 409-414.
- Rose-John, S., J. Scheller, et al. (2015). ""Family reunion"--A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines." *Cytokine Growth Factor Rev* **26**(5): 471-474.
- Rose, T. M., M. J. Lagrou, et al. (1993). "The genes for oncostatin M (OSM) and leukemia inhibitory factor (LIF) are tightly linked on human chromosome 22." *Genomics* **17**(1): 136-140.
- Rosenberger, S., A. Dick, et al. (2014a). "A mouse organotypic tissue culture model for autosomal recessive congenital ichthyosis." *Br J Dermatol* **171**(6): 1347-1357.

- Rosenberger, S., A. Dick, et al. (2014b). "A mouse organotypic tissue culture model for autosomal recessive congenital ichthyosis." *Br J Dermatol.*
- Roth, S. A., M. Simanski, et al. (2014). "The pattern recognition receptor NOD2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced IL-17C expression in keratinocytes." *J Invest Dermatol* **134**(2): 374-380.
- Roth, W., V. Kumar, et al. (2012). "Keratin 1 maintains skin integrity and participates in an inflammatory network in skin through interleukin-18." *J Cell Sci* **125**(Pt 22): 5269-5279.
- Rowan, A. D., W. Hui, et al. (2003). "Adenoviral gene transfer of interleukin-1 in combination with oncostatin M induces significant joint damage in a murine model." *Am J Pathol* **162**(6): 1975-1984.
- Rozieres, A., A. Hennino, et al. (2006). "[TNF alpha in the physiopathology of psoriasis]." *Ann Dermatol Venereol* **133**(2): 174-180.
- Russell, C. B., H. Rand, et al. (2014). "Gene expression profiles normalized in psoriatic skin by treatment with brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody." *J Immunol* **192**(8): 3828-3836.
- Rutz, S., X. Wang, et al. (2014). "The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis." *Nat Rev Immunol* **14**(12): 783-795.
- Ryan, R. E., B. Martin, et al. (2015). "Oncostatin M binds to extracellular matrix in a bioactive conformation: Implications for inflammation and metastasis." *Cytokine* **72**(1): 71-85.
- Sa, S. M., P. A. Valdez, et al. (2007). "The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis." *J Immunol* **178**(4): 2229-2240.
- Saalbach, A., C. Klein, et al. (2007). "Dermal fibroblasts induce maturation of dendritic cells." *J Immunol* **178**(8): 4966-4974.
- Saggini, A., S. Chimenti, et al. (2014). "IL-6 as a druggable target in psoriasis: focus on pustular variants." *J Immunol Res* **2014**: 964069.
- Said, A. and G. Weindl (2015). "Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation." *J Immunol Res* **2015**: 743169.
- Saito, M., K. Yoshida, et al. (1992). "Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo." *J Immunol* **148**(12): 4066-4071.
- Salomon, P., N. G. Shoham, et al. (2008). "Human mast cells release oncostatin M on contact with activated T cells: possible biologic relevance." *J Allergy Clin Immunol* **121**(2): 448-455 e445.
- Saleh, H., D. Eeles, et al. (2011). "Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation in vitro." *Endocrinology* **152**(5): 1911-1922.
- Salimi, M., J. L. Barlow, et al. (2013). "A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis." *J Exp Med* **210**(13): 2939-2950.
- Salimi, M. and G. Ogg (2014). "Innate lymphoid cells and the skin." *BMC Dermatol* **14**: 18.
- Sano, S., K. S. Chan, et al. (2005). "Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model." *Nat Med* **11**(1): 43-49.
- Sawamura, D., X. Meng, et al. (1998). "Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocyte gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes." *J Immunol* **161**(10): 5633-5639.
- Schäuber, J., R. A. Dorschner, et al. (2007). "Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism." *J Clin Invest* **117**(3): 803-811.
- Scheller, J., A. Chalaris, et al. (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." *Biochim Biophys Acta* **1813**(5): 878-888.
- Schirmer, C., C. Klein, et al. (2010). "Human fibroblasts support the expansion of IL-17-producing T cells via up-regulation of IL-23 production by dendritic cells." *Blood* **116**(10): 1715-1725.

- Schlapbach, C., A. Gehad, et al. (2014). "Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity." *Sci Transl Med* **6**(219): 219ra218.
- Schottelius, A. J., L. L. Moldawer, et al. (2004). "Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis." *Exp Dermatol* **13**(4): 193-222.
- Schroder, J. M. and J. Harder (2006). "[Innate antimicrobial peptides in the skin]." *Med Sci (Paris)* **22**(2): 153-157.
- Scolletta, S., M. Colletti, et al. (2013). "Vitamin D receptor agonists target CXCL10: new therapeutic tools for resolution of inflammation." *Mediators Inflamm* **2013**: 876319.
- Scott, C. A., D. Tattersall, et al. (2012). "Connexins in epidermal homeostasis and skin disease." *Biochim Biophys Acta* **1818**(8): 1952-1961.
- Segrelles, C., A. Holguin, et al. (2011). "Establishment of a murine epidermal cell line suitable for in vitro and in vivo skin modelling." *BMC Dermatol* **11**: 9.
- Seo, S. J., J. Y. Ahn, et al. (2006). "Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in skin epidermis." *J Invest Dermatol* **126**(2): 510-512.
- Sevilla, L. M., R. Nachat, et al. (2007). "Mice deficient in involucrin, envoplakin, and periplakin have a defective epidermal barrier." *J Cell Biol* **179**(7): 1599-1612.
- Shen, F. and S. L. Gaffen (2008). "Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy." *Cytokine* **41**(2): 92-104.
- Shepherd, J., M. C. Little, et al. (2004). "Psoriasis-like cutaneous inflammation in mice lacking interleukin-1 receptor antagonist." *J Invest Dermatol* **122**(3): 665-669.
- Silver, J. S. and C. A. Hunter (2010). "gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer." *J Leukoc Biol* **88**(6): 1145-1156.
- Silverberg, N. B. and J. I. Silverberg (2015). "Inside out or outside in: does atopic dermatitis disrupt barrier function or does disruption of barrier function trigger atopic dermatitis?" *Cutis* **96**(6): 359-361.
- Simpson, C. L., D. M. Patel, et al. (2011). "Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(9): 565-580.
- Simpson, J. L., K. J. Baines, et al. (2009). "Oncostatin M (OSM) is increased in asthma with incompletely reversible airflow obstruction." *Exp Lung Res* **35**(9): 781-794.
- Simpson, R. J., A. Hammacher, et al. (1997). "Interleukin-6: structure-function relationships." *Protein Sci* **6**(5): 929-955.
- Singer, K. H., D. T. Tuck, et al. (1989). "Epidermal keratinocytes express the adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 in inflammatory dermatoses." *J Invest Dermatol* **92**(5): 746-750.
- Singh, B., A. G. Jegga, et al. (2016). "IL-31-Driven Skin Remodeling Involves Epidermal Cell Proliferation and Thickening That Lead to Impaired Skin-Barrier Function." *PLoS One* **11**(8): e0161877.
- Solanas, G. and S. A. Benitah (2013). "Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(11): 737-748.
- Somasundaram, R., M. Ruehl, et al. (2002). "Interstitial collagens I, III, and VI sequester and modulate the multifunctional cytokine oncostatin M." *J Biol Chem* **277**(5): 3242-3246.
- Sonkoly, E., A. Muller, et al. (2006). "IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation." *J Allergy Clin Immunol* **117**(2): 411-417.
- Sonnenberg, G. F. and D. Artis (2015). "Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation." *Nat Med* **21**(7): 698-708.
- Sorrell, J. M. and A. I. Caplan (2004). "Fibroblast heterogeneity: more than skin deep." *J Cell Sci* **117**(Pt 5): 667-675.
- Spergel, J. M., E. Mizoguchi, et al. (1998). "Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice." *J Clin Invest* **101**(8): 1614-1622.
- Spergel, J. M., E. Mizoguchi, et al. (1999). "Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis." *J Clin Invest* **103**(8): 1103-1111.

- Spiekstra, S. W., M. J. Toebak, et al. (2005). "Induction of cytokine (interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure." *Exp Dermatol* **14**(2): 109-116.
- Spits, H., D. Artis, et al. (2013). "Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature." *Nat Rev Immunol* **13**(2): 145-149.
- Sriram, G., P. L. Bigliardi, et al. (2015). "Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro." *Eur J Cell Biol* **94**(11): 483-512.
- Stark, H. J., M. Baur, et al. (1999). "Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation." *J Invest Dermatol* **112**(5): 681-691.
- Stoitzner, P., M. Zanella, et al. (1999). "Migration of langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures: augmentation by TNF-alpha and IL-1beta." *J Leukoc Biol* **66**(3): 462-470.
- Stratis, A., M. Pasparakis, et al. (2006). "Pathogenic role for skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation." *J Clin Invest* **116**(8): 2094-2104.
- Streilein, J. W. (1983). "Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions." *J Invest Dermatol* **80 Suppl**: 12s-16s.
- Suda, T., K. Chida, et al. (2002). "Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products." *Cytokine* **17**(6): 335-340.
- Sumaria, N., B. Roediger, et al. (2011). "Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal gammadelta T cells." *J Exp Med* **208**(3): 505-518.
- Sumigray, K., K. Zhou, et al. (2014). "Cell-cell adhesions and cell contractility are upregulated upon desmosome disruption." *PLoS One* **9**(7): e101824.
- Suwanpradid, J., Z. E. Holcomb, et al. (2016). "Emerging Skin T-Cell Functions in Response to Environmental Insults." *J Invest Dermatol*.
- Swiecki, M. and M. Colonna (2015). "The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells." *Nat Rev Immunol* **15**(8): 471-485.
- Swindell, W. R., A. Johnston, et al. (2011). "Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis." *PLoS One* **6**(4): e18266.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* **140**(6): 805-820.
- Tamura, S., Y. Morikawa, et al. (2002). "Developmental expression pattern of oncostatin M receptor beta in mice." *Mech Dev* **115**(1-2): 127-131.
- Tanaka, M., Y. Hirabayashi, et al. (2003). "Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis." *Blood* **102**(9): 3154-3162.
- Tay, S. S., B. Roediger, et al. (2014). "The Skin-Resident Immune Network." *Curr Dermatol Rep* **3**: 13-22.
- Teng, M. W., E. P. Bowman, et al. (2015). "IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases." *Nat Med* **21**(7): 719-729.
- Teunissen, M. B., C. W. Koomen, et al. (1998). "Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **111**(4): 645-649.
- Teunissen, M. B., J. M. Munneke, et al. (2014). "Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients." *J Invest Dermatol* **134**(9): 2351-2360.
- Theoharides, T. C., K. D. Alysandratos, et al. (2012). "Mast cells and inflammation." *Biochim Biophys Acta* **1822**(1): 21-33.
- Tinkle, C. L., H. A. Pasolli, et al. (2008). "New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(40): 15405-15410.
- Tonel, G., C. Conrad, et al. (2010). "Cutting edge: A critical functional role for IL-23 in psoriasis." *J Immunol* **185**(10): 5688-5691.
- Tortola, L., E. Rosenwald, et al. (2012). "Psoriasisiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk." *J Clin Invest* **122**(11): 3965-3976.

- Traber, K. E., K. L. Hilliard, et al. (2015). "Induction of STAT3-Dependent CXCL5 Expression and Neutrophil Recruitment by Oncostatin-M during Pneumonia." *Am J Respir Cell Mol Biol* **53**(4): 479-488.
- Treuting, P. and S. Dintzis, Eds. (2011). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas (Expert Consult)*, Elsevier 2012.
- Trifari, S., C. D. Kaplan, et al. (2009). "Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells." *Nat Immunol* **10**(8): 864-871.
- Tsuruta, D., T. Hashimoto, et al. (2011). "Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing." *J Dermatol Sci* **62**(1): 1-7.
- Tu, C. L. and D. D. Bikle (2013). "Role of the calcium-sensing receptor in calcium regulation of epidermal differentiation and function." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **27**(3): 415-427.
- Tu, C. L., W. Chang, et al. (2008). "Inactivation of the calcium sensing receptor inhibits E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and calcium-induced differentiation in human epidermal keratinocytes." *J Biol Chem* **283**(6): 3519-3528.
- Tunggal, J. A., I. Helfrich, et al. (2005). "E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions." *EMBO J* **24**(6): 1146-1156.
- Turksen, K., T. Kupper, et al. (1992). "Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 5068-5072.
- Valdimarsson, H., R. H. Thorleifsdottir, et al. (2009). "Psoriasis--as an autoimmune disease caused by molecular mimicry." *Trends Immunol* **30**(10): 494-501.
- Van Belle, A. B., M. de Heusch, et al. (2012). "IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasisiform skin inflammation in mice." *J Immunol* **188**(1): 462-469.
- van der Fits, L., S. Mourits, et al. (2009). "Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis." *J Immunol* **182**(9): 5836-5845.
- Vely, F., V. Barlogis, et al. (2016). "Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans." *Nat Immunol*.
- Villanova, F., B. Flutter, et al. (2014). "Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis." *J Invest Dermatol* **134**(4): 984-991.
- Vocanson, M., A. Hennino, et al. (2006). "CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice." *J Invest Dermatol* **126**(4): 815-820.
- Vollmer, S., A. Menssen, et al. (2001). "Dominant lesional T cell receptor rearrangements persist in relapsing psoriasis but are absent from nonlesional skin: evidence for a stable antigen-specific pathogenic T cell response in psoriasis vulgaris." *J Invest Dermatol* **117**(5): 1296-1301.
- Vollmers, A., L. Wallace, et al. (2012). "Two- and three-dimensional culture of keratinocyte stem and precursor cells derived from primary murine epidermal cultures." *Stem Cell Rev* **8**(2): 402-413.
- von Burg, N., G. Turchinovich, et al. (2015). "Maintenance of Immune Homeostasis through ILC/T Cell Interactions." *Front Immunol* **6**: 416.
- Vu, A. T., T. Baba, et al. (2010). "Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway." *J Allergy Clin Immunol* **126**(5): 985-993, 993 e981-983.
- Wagner, E. F., H. B. Schonthaler, et al. (2010). "Psoriasis: what we have learned from mouse models." *Nat Rev Rheumatol* **6**(12): 704-714.
- Walker, E. C., R. W. Johnson, et al. (2016). "Murine Oncostatin M acts via Leukemia Inhibitory Factor Receptor to phosphorylate STAT3 but not STAT1, an effect that protects bone mass." *J Biol Chem*.
- Walker, E. C., N. E. McGregor, et al. (2010). "Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice." *J Clin Invest* **120**(2): 582-592.

- Wallace, L., L. Roberts-Thompson, et al. (2012). "Deletion of K1/K10 does not impair epidermal stratification but affects desmosomal structure and nuclear integrity." *J Cell Sci* **125**(Pt 7): 1750-1758.
- Wallace, P. M., J. F. MacMaster, et al. (1999). "Regulation of inflammatory responses by oncostatin M." *J Immunol* **162**(9): 5547-5555.
- Walter, A., M. Schafer, et al. (2013). "Aldara activates TLR7-independent immune defence." *Nat Commun* **4**: 1560.
- Wang, B., P. Amerio, et al. (1999). "Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration." *J Leukoc Biol* **66**(1): 33-39.
- Wang, H., T. Peters, et al. (2006). "Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasisform skin inflammation." *J Clin Invest* **116**(8): 2105-2114.
- Wang, X. P., M. Schunck, et al. (2004). "The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis." *J Invest Dermatol* **123**(1): 124-131.
- Watanabe, H., S. Gehrke, et al. (2008). "Danger signaling through the inflammasome acts as a master switch between tolerance and sensitization." *J Immunol* **180**(9): 5826-5832.
- Watanabe, R., A. Gehad, et al. (2015). "Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells." *Sci Transl Med* **7**(279): 279ra239.
- Weidinger, S. and N. Novak (2016). "Atopic dermatitis." *Lancet* **387**(10023): 1109-1122.
- Weiss, T. W., H. Kvakan, et al. (2005). "The gp130 ligand oncostatin M regulates tissue inhibitor of metalloproteinases-1 through ERK1/2 and p38 in human adult cardiac myocytes and in human adult cardiac fibroblasts: a possible role for the gp130/gp130 ligand system in the modulation of extracellular matrix degradation in the human heart." *J Mol Cell Cardiol* **39**(3): 545-551.
- Werfel, T., J. P. Allam, et al. (2016). "Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* **138**(2): 336-349.
- Williams, I. R. and T. S. Kupper (1996). "Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system." *Life Sci* **58**(18): 1485-1507.
- Wilson, N. J., K. Boniface, et al. (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." *Nat Immunol* **8**(9): 950-957.
- Witherden, D. A. and W. L. Havran (2013). "Cross-talk between intraepithelial gammadelta T cells and epithelial cells." *J Leukoc Biol* **94**(1): 69-76.
- Wojcik, S. M., D. S. Bundman, et al. (2000). "Delayed wound healing in keratin 6a knockout mice." *Mol Cell Biol* **20**(14): 5248-5255.
- Wong, S., F. M. Botelho, et al. (2014). "Oncostatin M overexpression induces matrix deposition, STAT3 activation, and SMAD1 Dysregulation in lungs of fibrosis-resistant BALB/c mice." *Lab Invest* **94**(9): 1003-1016.
- Wrone-Smith, T. and B. J. Nickoloff (1996). "Dermal injection of immunocytes induces psoriasis." *J Clin Invest* **98**(8): 1878-1887.
- Yao, C., J. H. Oh, et al. (2015). "Toll-like receptor family members in skin fibroblasts are functional and have a higher expression compared to skin keratinocytes." *Int J Mol Med* **35**(5): 1443-1450.
- Yawalkar, N., G. G. Tscharner, et al. (2009). "Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis." *J Dermatol Sci* **54**(2): 99-105.
- Ye, L., C. Lv, et al. (2014). "Abnormal epidermal barrier recovery in unininvolved skin supports the notion of an epidermal pathogenesis of psoriasis." *J Invest Dermatol* **134**(11): 2843-2846.
- Yoo, J., M. Omori, et al. (2005). "Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin." *J Exp Med* **202**(4): 541-549.
- Yoon, J., J. M. Leyva-Castillo, et al. (2016). "IL-23 induced in keratinocytes by endogenous TLR4 ligands polarizes dendritic cells to drive IL-22 responses to skin immunization." *J Exp Med*.
- Yoshimura, A., M. Ichihara, et al. (1996). "Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway." *EMBO J* **15**(5): 1055-1063.

- Yoshizaki, K., N. Nishimoto, et al. (1990). "Interleukin 6 and expression of its receptor on epidermal keratinocytes." *Cytokine* **2**(5): 381-387.
- Yu, N., S. Liu, et al. (2015). "Serum amyloid A induces interleukin-1beta secretion from keratinocytes via the NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 inflammasome." *Clin Exp Immunol* **179**(2): 344-353.
- Zaba, L. C., J. Fuentes-Duculan, et al. (2009a). "Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells." *J Invest Dermatol* **129**(1): 79-88.
- Zaba, L. C., J. G. Krueger, et al. (2009b). "Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin." *J Invest Dermatol* **129**(2): 302-308.
- Zarling, J. M., M. Shoyab, et al. (1986). "Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(24): 9739-9743.
- Zeitvogel, J., A. Dalpke, et al. (2012). "Human primary keratinocytes show restricted ability to up-regulate suppressor of cytokine signaling (SOCS)3 protein compared with autologous macrophages." *J Biol Chem* **287**(13): 9923-9930.
- Zenz, R., R. Eferl, et al. (2005). "Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins." *Nature* **437**(7057): 369-375.
- Zhang, L. J., G. L. Sen, et al. (2016). "Antimicrobial Peptide LL37 and MAVS Signaling Drive Interferon-beta Production by Epidermal Keratinocytes during Skin Injury." *Immunity* **45**(1): 119-130.
- Zhang, Y., Q. Li, et al. (2015). "Epidermal Fatty Acid binding protein promotes skin inflammation induced by high-fat diet." *Immunity* **42**(5): 953-964.
- Zhang, Z., P. Hener, et al. (2009). "Thymic stromal lymphopoitin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(5): 1536-1541.
- Zheng, T., M. H. Oh, et al. (2009). "Transgenic expression of interleukin-13 in the skin induces a pruritic dermatitis and skin remodeling." *J Invest Dermatol* **129**(3): 742-751.
- Zheng, Y., D. M. Danilenko, et al. (2007). "Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis." *Nature* **445**(7128): 648-651.
- Zhu, M., K. Oishi, et al. (2001). "Studies using leukemia inhibitory factor (LIF) knockout mice and a LIF adenoviral vector demonstrate a key anti-inflammatory role for this cytokine in cutaneous inflammation." *J Immunol* **166**(3): 2049-2054.
- Ziegler, S. F. and D. Artis (2010). "Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity." *Nat Immunol* **11**(4): 289-293.

