

**UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE**

Étude des effets modulateurs  
de *Propionibacterium acnes* sur l'expression  
kératinocytaire d'hormones cutanées

---

Évaluation *in vitro* de l'efficacité d'une molécule  
thérapeutique à visée anti-acnéique

**THESE DE DOCTORAT**

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE  
Discipline Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité Biologie et Pharmacologie Cutanées

présentée et soutenue publiquement par

**Olivia ISARD**

le 28 Octobre 2010, devant le jury ci-dessous

**Président**

**Rapporteurs**

M. Laurent Misery, PU-PH, Brest  
M. Laurent Machet, PU-PH, Tours

**Examineur**

Mme Nathalie Castex-Rizzi, Docteur en Biologie, Toulouse

**Directrice de thèse**

Mme Brigitte Dréno, PU-PH, Nantes

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec  
les Laboratoires PIERRE FABRE dermo-cosmétique, CERPER  
Toulouse, France

## Liste des abréviations

---

Ac: anticorps  
ACTH: adreno-corticotropic hormone  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire  
AEC: 3-amino-9ethylcarbazole  
ARNm: acide ribonucléique messenger  
Bkgd : background  
BPE: bovine pituitary extract  
BPO: peroxyde de benzoyle  
BSA: bovine serum albumine  
CRH: corticotrophin releasing hormone  
CRHBP: corticotrophin releasing hormone binding protein  
CRH-R1: corticotrophin releasing hormone receptor 1  
Da: dalton  
DHT: dihydrotestostérone  
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium  
EDTA: acide ethylene diamine tétracétique  
EGF: epithelial growth factor  
EIA: enzyme immunoassay  
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay  
FI: intensité de fluorescence  
FM: fraction membranaire (MF)  
GM-CSF: granulocyte macrophage colony stimulating factor  
hBD: human beta defensine  
HC: hydrocortisone  
HPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase  
HRP: horseradish peroxydase  
HSP: heat shock protein  
Ig : immunoglobuline  
IGF-1: insulin growth factor-1  
IGF-1R: insulin-like growth factor-1 receptor

IGFBP: insulin-like growth factor binding protein  
IL: interleukine  
IL-1RA: interleukin-1 receptor antagonist  
IFN: interféron  
KGM: keratinocyte growth medium  
KSFM: keratinocyte serum free medium  
LPS: lipopolysaccharide  
LTA: acide lipotéichoïque  
LTB-4: leucotriène B4  
MMP: matrix metalloproteinase  
NHEK: normal human epidermal keratinocyte  
NK: natural killer  
*P.acnes: Propionibacterium acnes*  
PAMP: Pathogen associated molecular pattern  
PBS: phosphate buffer saline  
POLR2A: polymerase RNA II DNA directed polypeptide A  
PPAR: peroxisome proliferator activator receptor  
PPRE: peroxisome proliferator responsive element  
PTG: peptidoglycane  
qRT-PCR: quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction  
RA: acide rétinoïque  
RAL: rétinaldéhyde  
SA: surnageant A (CP)  
SCN : staphylocoques à coagulase négative  
*S.aureus : Staphylococcus aureus*  
*S.epidermidis: Staphylococcus epidermidis*  
SVF: sérum de veau foetal  
TA: acide téichoïque  
TBS: tris buffer saline  
TNF: tumor necrosis factor  
Ucn: urocortine  
Zn: zinc

**INTRODUCTION..... 1**

A.	STRUCTURE ET FONCTIONS GENERALES DE LA PEAU .....	3
1.	<i>Structure de la peau</i> .....	3
a)	L'épiderme : les différents types cellulaires.....	3
b)	L'épiderme : les différentes couches.....	5
c)	Le derme .....	7
d)	L'hypoderme.....	8
e)	Les annexes cutanées .....	8
2.	<i>Fonctions générales de la peau</i> .....	10
a)	Protection .....	10
b)	Régulation de la température corporelle .....	10
c)	Sensations cutanées.....	11
d)	Fonctions métaboliques.....	12
e)	Réservoir sanguin.....	12
f)	Excrétion.....	12
B.	LA FLORE CUTANEE .....	12
1.	<i>La flore résidente</i> .....	13
a)	Staphylocoques .....	13
b)	Corynéformes aérobies .....	14
c)	Corynéformes anaérobies, Propionibacterium acnes.....	15
d)	Autres microorganismes .....	17
2.	<i>La flore transitoire</i> .....	17
a)	Microorganismes provenant des autres flores commensales de l'organisme .....	18
b)	Microorganismes provenant de sources exogènes.....	18
C.	L'ACNE.....	19
1.	<i>Phase 1 : l'hypersécrétion sébacée</i> .....	21
a)	Influence des androgènes .....	21
b)	Influence de différents récepteurs de la glande sébacée.....	21
2.	<i>Phase 2 : la formation du microcomédon</i> .....	23
a)	Influence des hormones kératinocytaires .....	23
b)	Influence des systèmes enzymatiques intra kératinocytaires.....	23
c)	Influence des cytokines .....	23
d)	Influence des intégrines .....	24
e)	Influence de la filaggrine .....	24
f)	Influence des PPARs kératinocytaires .....	24
g)	Influence de la composition du sébum .....	24
3.	<i>Phase 3 : la formation des lésions inflammatoires</i> .....	25
a)	Influence des polynucléaires.....	25
b)	Influence des récepteurs toll-like (TLRs).....	25
c)	Influence du facteur de transcription NFkB .....	26
d)	Influence des cytokines.....	27
e)	Influence des défensines .....	27
f)	Influence des métalloprotéases (MMPs) .....	28
g)	Influence des radicaux libres.....	28
4.	<i>P.acnes et acné</i> .....	28
a)	Généralités .....	28
b)	Rôle de P.acnes dans la phase inflammatoire de l'acné .....	29
c)	Rôle de P.acnes dans la formation du comédon .....	31
d)	Rôle de P.acnes dans l'hyper séborrhée .....	32
e)	Rôle du biofilm de P.acnes.....	33
f)	P.acnes et résistance aux antibiotiques.....	34
D.	LES AXES HORMONAUX CRH/CRH-R1 ET IGF-1/IGF-1R .....	35
1.	<i>Les hormones : généralités</i> .....	35
2.	<i>Le système CRH/CRH-R1</i> .....	36
a)	Généralités .....	36
b)	Le système CRH/CRH-R1 dans la peau.....	37
c)	Le système CRH/CRH-R1 et l'acné.....	38
3.	<i>Le système IGF-1/IGF-1R</i> .....	38
a)	Généralités .....	38
b)	Le système IGF-1/IGF-1R dans la peau.....	39

c)	Le système IGF-1/IGF-1R et l'acné.....	40
E.	ELEMENT TRACE : LE ZINC.....	41
1.	<i>Rôles du zinc dans l'organisme</i> .....	41
a)	Zinc et enzymes.....	41
b)	Zinc et membranes plasmiques.....	42
c)	Zinc et processus immunologiques.....	42
d)	Zinc et hormones.....	42
2.	<i>Zinc et physiologie cutanée</i> .....	42
a)	Rôle du zinc dans l'épiderme.....	43
b)	Rôle du zinc dans le derme.....	43
c)	Rôle du zinc dans la matrice extra-cellulaire.....	43
3.	<i>Zinc et acné</i> .....	43
a)	Activité anti-inflammatoire du zinc.....	44
b)	Activité du zinc sur l'hyperséborrhée.....	44
c)	Activité bactériostatique du zinc.....	44
F.	MODELES CUTANES.....	45
1.	<i>Explants cutanés</i> .....	45
2.	<i>Kératinocytes normaux humains en monocouche (NHEK)</i> .....	45
	<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>46</b>
	<b>RESULTATS</b> .....	<b>48</b>
A.	PREMIERE PARTIE : ROLE DE PROPIONIBACTERIUM ACNES DANS LA MODULATION DE L'EXPRESSION D'HORMONES CUTANÉES ET EFFETS MODULATEURS DU ZINC.....	48
1.	<i>Rôle de P.acnes dans la modulation de l'axe CRH/CRH-R1 et effets modulateurs du zinc</i> .....	48
a)	Etude des effets de P.acnes sur l'expression de CRH dans l'épiderme et effet modulateur du zinc.....	48
b)	Article 1: Cutaneous induction of Corticotropin Releasing Hormone by Propionibacterium acnes extracts.....	50
c)	Travaux complémentaires.....	55
2.	<i>Rôle de P.acnes dans la modulation de l'axe IGF-1/IGF-1R et effets modulateurs du zinc</i> .....	61
a)	Etude des effets de P.acnes sur l'axe IGF-1/IGF-1R et effets modulateurs du zinc.....	61
b)	Article 2: Propionibacterium acnes activates the IGF-1/IGF-1R system in the epidermis and improves keratinocytes proliferation.....	63
c)	Travaux complémentaires.....	72
B.	DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DE L'EFFICACITE D'UNE MOLECULE A VISEE ANTI-ACNEIQUE.....	76
1.	<i>Evaluation de l'efficacité d'une molécule à visée anti-acnéique : APRC11</i> .....	76
a)	Objectif.....	76
b)	Méthodologie.....	76
c)	Résultats.....	77
2.	<i>Article 3: Anti-inflammatory properties of a new undecyl-rhamnoside against P.acnes (APRC11)</i> .....	79
3.	<i>Résultats complémentaires à l'article</i> .....	97
	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>99</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>117</b>
A.	MATERIEL.....	117
1.	<i>Explants cutanés humains</i> .....	117
2.	<i>Kératinocytes normaux humains en monocouches</i> .....	117
3.	<i>Biopsies de peau saine</i> .....	117
4.	<i>Biopsies de patients acnéiques</i> .....	117
5.	<i>Modulateurs</i> .....	118
a)	Extraits bactériens.....	118
b)	Molécules thérapeutiques.....	119
B.	METHODE.....	120
1.	<i>Culture d'explants cutanés</i> .....	120

2.	<i>Culture de kératinocytes normaux humains en monocouche (NHEK)</i> .....	120
3.	<i>Immunohistochimie</i> .....	122
	a) Préparation des lames.....	122
	b) Immunomarquage .....	122
	c) Lecture des lames.....	123
4.	<i>Dosages de cytokines par la technologie Luminex Bio-Plex</i> .....	123
	a) Principe de la méthodologie Luminex.....	123
	b) Dosages réalisés .....	124
	c) Lecture .....	124
5.	<i>Dosages ELISA</i> .....	125
	a) Principe de la technologie ELISA .....	125
	b) Tests ELISA utilisés .....	126
6.	<i>Dosage EIA</i> .....	126
	a) Principe de la technologie EIA .....	126
	b) Test EIA utilisé .....	127
7.	<i>Cytométrie de flux</i> .....	127
8.	<i>Dosage Luminex QuantiGene</i> .....	127
	a) Principe de la technologie Luminex QuantiGene.....	127
	b) Extraction d'ARN totaux des monocouches de kératinocytes.....	128
	c) Capture des ARNm.....	129
	d) Révélation.....	129
	e) Lecture .....	129
	f) Analyse des résultats.....	129
9.	<i>RT-qPCR</i> .....	130
	a) Extraction d'ARN totaux des monocouches de kératinocytes.....	130
	b) Reverse Transcription .....	130
	c) PCR quantitative .....	130
	d) Analyse des résultats.....	131
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....		<b>132</b>
<b>REFERENCES</b> .....		<b>134</b>
<b>ANNEXES</b> .....		<b>149</b>

# Introduction

L'acné est une pathologie inflammatoire chronique du follicule pilo-sébacé, évoluant par poussées, qui constitue le premier motif de consultation en dermatologie dans les pays occidentaux. Elle fait intervenir trois facteurs : une production excessive de sébum, des anomalies de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes du canal infundibulaire et la bactérie *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*), qui est connue pour intervenir dans le développement et le maintien de la phase inflammatoire locale. Cependant, le rôle de la bactérie *P.acnes*, qui a longtemps été attribué uniquement à la phase inflammatoire, est de plus en plus étudié et de récents travaux démontrent son implication dans les phases précoces du développement de l'acné.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons voulu approfondir le rôle de *P.acnes* dans le développement de l'acné en étudiant plus particulièrement son implication dans deux voies qui ont été très récemment décrites comme ayant un lien avec la pathologie : les voies CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R cutanées. D'autre part, le gluconate de zinc étant une molécule utilisée dans le traitement de l'acné inflammatoire minime à modérée et dont les mécanismes d'action restent encore assez peu connus, nous avons voulu évaluer sa capacité à moduler ces deux axes.

Dans un souci d'établir un lien entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée, et dans le cadre de notre collaboration avec les laboratoires Pierre FABRE, nous avons utilisé notre modèle de kératinocytes stimulés par *P.acnes* pour évaluer l'efficacité d'un nouvel actif à visée anti-acnéique : l'APRC11. Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés à la capacité de cette molécule à moduler l'expression de marqueurs pro-inflammatoires qui étaient surexprimés par les kératinocytes suite à une stimulation par la bactérie *P.acnes*.

Le manuscrit débutera par un bref rappel sur la structure et les fonctions générales de la peau ainsi que sur la flore cutanée. Puis, seront exposées les données bibliographiques sur les mécanismes de formation des lésions d'acné et les rôles connus de *P.acnes* dans les

différentes phases du développement de la pathologie. Cette présentation sera suivie d'une brève description des axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R dans la peau et de l'implication potentielle qu'ils pourraient avoir dans le développement de l'acné. Enfin, une présentation du zinc et de ses effets bénéfiques sur la peau ainsi qu'une rapide description des modèles cutanés qui ont été utilisés dans ce travail seront données.

Les résultats de notre étude seront ensuite rapportés dans deux parties distinctes. La première partie concernera l'étude des effets de *P.acnes* sur les axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R et leur modulation par le zinc. La seconde partie sera centrée sur l'étude des propriétés anti-inflammatoires de l'APRC11. Les résultats obtenus dans ces deux parties seront présentés sous forme de trois articles qui seront accompagnés d'une brève introduction rappelant les objectifs de chacune des études, la méthodologie suivie et les principaux résultats obtenus ainsi que les travaux complémentaires qui ont été réalisés, lorsque c'était le cas, et qui nous ont permis d'approfondir ces résultats.

Enfin, une discussion générale permettra de conclure et de discuter de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse, de les restituer dans leur contexte afin d'ouvrir la réflexion en suggérant de nouvelles perspectives d'études.

# A. Structure et fonctions générales de la peau

## 1. Structure de la peau

La peau, qui pèse en moyenne 3 à 4 kg, est à la fois l'organe le plus lourd du corps humain (7% de la masse corporelle totale) mais aussi le plus étendu, puisqu'il couvre une superficie de 1,5 à 2 m<sup>2</sup> chez un jeune adulte. La peau n'est pas un organe homogène. Son épaisseur varie selon les régions du corps, de 1mm au niveau des paupières à plus de 3mm au niveau des plantes. La pilosité diffère aussi selon les régions et permet de distinguer la peau pileuse, qui recouvre la plus grande partie de la surface corporelle, de la peau glabre, limitée aux paumes et plantes. La peau est structurée en 3 couches majeures : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

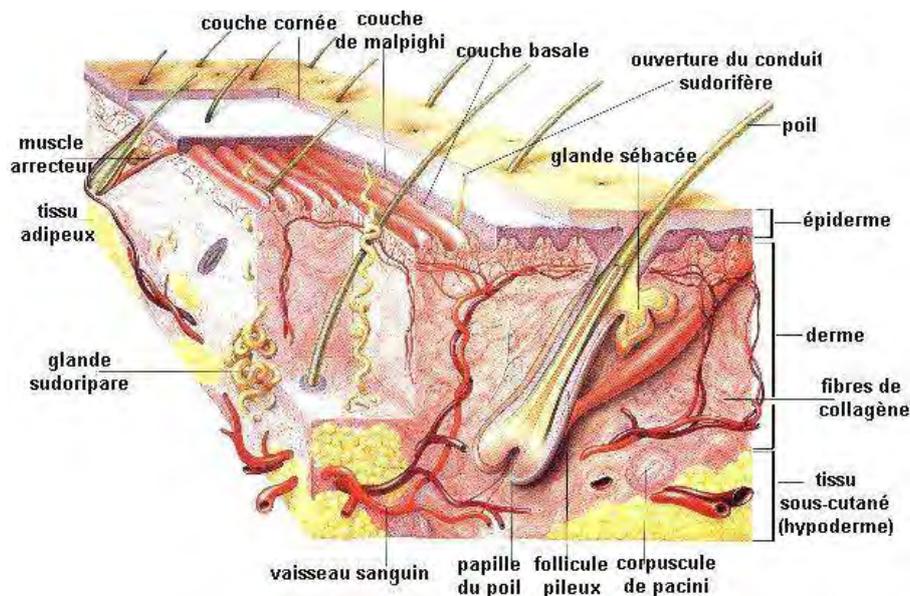


Figure 1. Structure générale de la peau (extrait de [http://www.genko.fr/wp-content/uploads/2008/12/la\\_peau.jpg](http://www.genko.fr/wp-content/uploads/2008/12/la_peau.jpg))

### a) L'épiderme : les différents types cellulaires

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. Son épaisseur, très faible, varie selon la localisation et est principalement déterminée par l'épaisseur de la couche cornée. Cet épithélium stratifié kératinisé squameux est composé de quatre types cellulaires:

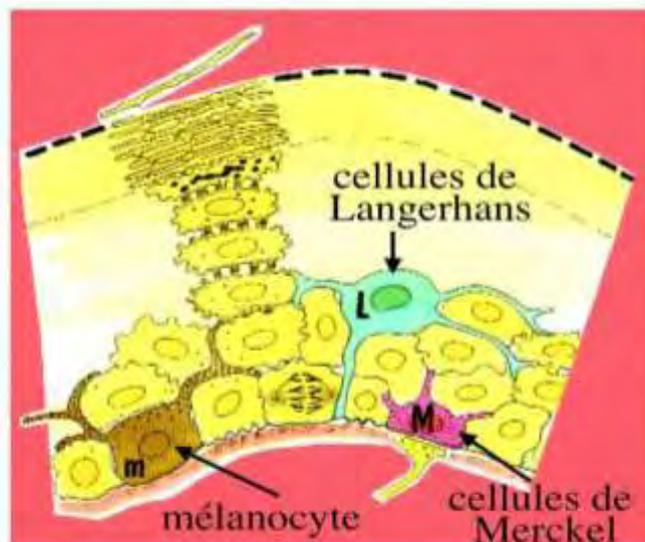


Figure 2. Les différents types cellulaires de l'épiderme (extrait de [http://histoblog.viabloga.com/images/merckel\\_Langherans\\_t.800.jpg](http://histoblog.viabloga.com/images/merckel_Langherans_t.800.jpg))

### ***(1) Les kératinocytes***

Les kératinocytes constituent environ 90% des cellules de l'épiderme et produisent la kératine qui confère aux cellules de l'épiderme leurs propriétés protectrices. Les kératinocytes de la couche la plus profonde de l'épiderme (couche basale) se divisent de façon quasi continue par mitoses puis migrent vers la surface. A mesure qu'ils sont poussés vers la surface de la peau par les nouvelles cellules, ils s'enrichissent en kératine, puis meurent. En surface, les kératinocytes de la couche cornée (cornéocytes) ne sont plus que des membranes plasmiques remplies de kératine. En surface, les kératinocytes de la couche cornée ne sont plus que des membranes plasmiques remplies de kératine. Des millions de ces cellules mortes desquament chaque jour en raison des frottements que subit la peau. L'épiderme est ainsi renouvelé totalement tous les 25 à 45 jours.

### ***(2) Les mélanocytes***

Les mélanocytes constituent la deuxième grande population cellulaire de l'épiderme. Localisées dans la couche basale de l'épiderme, ces cellules épithéliales spécialisées synthétisent un pigment, la mélanine, dans des organites, les mélanosomes. Ces cellules possèdent de nombreux prolongements cytoplasmiques leur permettant d'entrer en contact avec les kératinocytes. A mesure qu'elle est synthétisée, la mélanine migre vers les

prolongements des mélanocytes et est périodiquement transférée aux kératinocytes. Les granules de mélanine s'accumulent sur la surface du noyau des kératinocytes qui est orienté vers le milieu extérieur. La mélanine forme ainsi un « bouclier » pigmentaire protecteur contre les effets néfastes des rayonnements ultraviolets sur l'ADN. Le nombre de mélanocytes étant relativement constant, les variations observées dans la coloration de la peau relèvent probablement de différences au niveau de la synthèse et/ou de la sécrétion par les mélanocytes, ou encore de la dégradation de la mélanine par les kératinocytes.

### ***(3) Les cellules de Langerhans (macrophagocytes intra épidermiques)***

Les cellules de Langerhans représentent 3 à 8% des cellules de l'épiderme. Elles ont des prolongements cytoplasmiques qui leur confèrent un aspect étoilé et qui s'étendent au milieu des kératinocytes en formant un réseau plus ou moins continu. Ces cellules dendritiques présentatrices d'antigènes sont produites dans la moelle osseuse et migrent vers l'épiderme.

### ***(4) Les cellules de Merkel (épithélioïdocytes du tact)***

Les cellules de Merkel constituent la 4<sup>ème</sup> population cellulaire de l'épiderme. Elles sont de forme hémisphérique et se retrouvent en faible nombre à la jonction dermo-épidermique et sont irrégulièrement réparties à la surface du corps humain : elles sont particulièrement abondantes au niveau des lèvres, de la paume des mains, de la pulpe des doigts et du dos des pieds. Ce sont des cellules neuro-épithéliales. Chaque cellule de Merkel est liée à la terminaison d'une neurofibre sensitive en forme de disque, appelée corpuscule tactile non capsulé (ou disque de Merkel) et l'ensemble joue le rôle de récepteur au toucher.

## **b) L'épiderme : les différentes couches**

Les cellules de l'épiderme sont réparties en quatre couches (cinq couches pour l'épiderme de zone « épaisse » au niveau des paumes ou des plantes) :

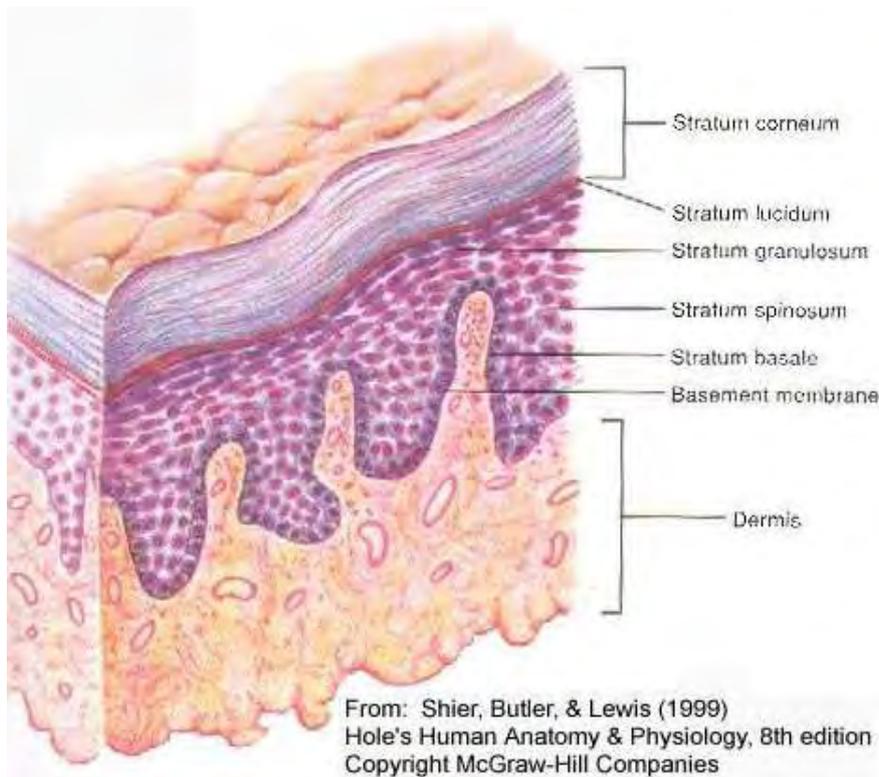


Figure 3. Les différentes couches de l'épiderme (extrait de Hole's Human Anatomy & Physiology, 8th edition Shier, Butler & Lewis, 1999)

### ***(1) La couche basale (stratum basale)***

La couche basale, ou couche germinative (stratum basale), est solidement fixée au derme par une bordure ondulée. Elle est constituée d'une seule couche de cellules, majoritairement les kératinocytes les plus jeunes en phase de prolifération. Les mélanocytes constituent 10 à 25% des cellules de la couche basale et étendent leurs prolongements jusqu'aux cellules épineuses du stratum spinosum. La couche basale comporte également de cellules de Merkel.

### ***(2) La couche épineuse (stratum spinosum)***

Elle est constituée de plusieurs strates de cellules. Les kératinocytes présentent une forme légèrement aplatie et sont reliés entre eux par les desmosomes. Des cellules de Langerhans sont aussi présentes dans cette couche.

### ***(3) La couche granuleuse (stratum granulosum)***

Elle est constituée de 3 à 5 strates de cellules dans lesquelles les kératinocytes poursuivent leur différenciation : ils s'aplatissent, leur noyau et leurs organites commencent à être

dégradés. De plus, ils accumulent des granules de kératohyaline favorisant l'accumulation de kératine dans la couche supérieure, ainsi que des granules lamellées contenant un glycolipide imperméabilisant sécrété dans l'espace extracellulaire qui contribue à limiter la déperdition d'eau.

#### ***(4) La couche claire (stratum lucidum)***

Elle se retrouve uniquement dans les zones où la peau est dite « épaisse », c'est à dire au niveau des paumes et des plantes. Elle est formée de plusieurs strates de kératinocytes clairs, aplatis et morts, aux contours mal définis.

#### ***(5) La couche cornée (stratum corneum)***

C'est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Elle est composée de 20 à 30 strates de cellules mortes, superposées les unes sur les autres, et peut occuper jusqu'aux trois-quarts de l'épaisseur de l'épiderme. Les cellules qui la composent sont kératinisées (ou cornées), c'est-à-dire entièrement constituées de fibrilles de kératine.

### **c) Le derme**

Le derme est un tissu de soutien. Il est composé de tissu conjonctif résistant et flexible. On y retrouve les cellules qui composent habituellement le tissu conjonctif proprement dit : les fibroblastes, les macrophagocytes et, à l'occasion, des mastocytes et des globules blancs. Sa matrice gélatineuse est imprégnée d'une grande quantité de collagène, d'élastine et de réticuline. Le derme est traversé par de nombreux vaisseaux (sanguins et lymphatiques) et neurofibres (beaucoup sont équipées de récepteurs sensoriels), et les annexes cutanées y sont implantées. La zone papillaire du derme (partie supérieure en contact avec l'épiderme) est une mince couche de tissu conjonctif lâche formée de fibres entrelacées qui permettent le passage des vaisseaux sanguins et des neurofibres. Sa partie supérieure est constellée de projections appelées papilles dermiques qui sont pourvues de bouquets capillaires, de terminaisons nerveuses libres (récepteurs à la douleur) et de récepteurs au toucher (corpuscules tactiles capsulés). La zone réticulaire du derme (partie plus profonde) occupe environ 80% du derme. Elle est composée de tissu conjonctif dense. Sa matrice extracellulaire renferme des faisceaux de fibres de collagène qui confèrent à la peau résistance et élasticité. De plus celles-ci fixent l'eau et contribuent ainsi à l'hydratation de la peau.

## **d) L'hypoderme**

L'hypoderme, ou tissu sous-cutané, ne fait pas véritablement partie de la peau, mais il est en interaction fonctionnelle avec celle-ci. Il est constitué de tissu conjonctif lâche, adipeux et aréolaire. L'hypoderme relie la peau aux structures sous-jacentes (en particulier aux muscles) et lui permet de s'adapter aux mouvements de celles-ci. La composition de l'hypoderme lui permet de jouer un rôle de protection. En effet, la couche graisseuse est en mesure d'absorber les chocs et de limiter la déperdition de chaleur des tissus les plus profonds de l'organisme.

## **e) Les annexes cutanées**

### ***(1) Les glandes sudoripares***

Elles sont réparties sur toute la surface du corps à l'exception des mamelons et de certaines parties des organes génitaux externes. Les glandes sudoripares mérocrines (ou eccrines) constituent la majorité des glandes sudoripares. Chacune d'elles est une glande simple, tubuleuse et en spirale, la partie sécrétrice étant enroulée dans le derme et le canal excréteur débouchant sur un pore à la surface de l'épiderme. Elles sécrètent la sueur, filtrat hypotonique du sang. Les glandes sudoripares apocrines sont situées dans les régions axillaires et ano-génito-périnéale. Elles sont plus grosses que les glandes mérocrines et leur conduit débouche dans un follicule pileux. Les sécrétions des glandes apocrines contiennent, en plus des composants de base de la sueur, des lipides et des protéines. Leur fonctionnement débute à la puberté, sous l'influence des androgènes. Les glandes cérumineuses sont des glandes sudoripares apocrines modifiées que l'on trouve dans la peau mince qui tapisse le méat acoustique externe. Elles sécrètent le cérumen. Enfin, les glandes mammaires sont un autre type de glandes sudoripares, spécialisées dans la synthèse et la sécrétion de lait.

### ***(2) Les glandes sébacées***

Ce sont des glandes exocrines holocrines, c'est à dire dont la sécrétion se fait par le détachement et la mort des cellules contenant les produits de sécrétion. Elles sont présentes sur tout le corps à l'exception des paumes et des plantes. Elles sont de petite taille sur le tronc et les membres et plus grosses sur le visage, le cou et la partie supérieure de la poitrine. Elles sécrètent le sébum, constitué de lipides et de débris cellulaires issus de la dégradation des cellules glandulaires. Le sébum a pour fonction d'assouplir et de lubrifier les poils et la surface de la peau, de limiter la déperdition d'eau et possède aussi une action bactéricide. La

sécrétion du sébum est stimulée par les androgènes, plus particulièrement au moment de la puberté.

### (3) Les poils et follicules pileux

Le follicule pileux s'étend de la surface de l'épiderme au derme et peut s'enfoncer jusqu'à l'hypoderme au niveau du cuir chevelu. La paroi du follicule pileux est composée, à l'extérieur, d'une gaine de tissu conjonctif dérivée du derme et, à l'intérieur, d'une gaine de tissu épithélial résultant d'une invagination de l'épiderme. La base du follicule s'élargit pour former le bulbe pileux, zone dans laquelle on retrouve la matrice du poil où sont produites, par mitoses, des cellules qui accumulent de la kératine et permettent l'allongement du poil. La kératine dure qui compose la majeure partie du poil est plus solide que la kératine molle composant l'épiderme. De plus, ses cellules ne desquament pas. L'unité pilo-sébacée est constituée du follicule pileux et de son poil, des glandes sébacées et du muscle érecteur du poil.

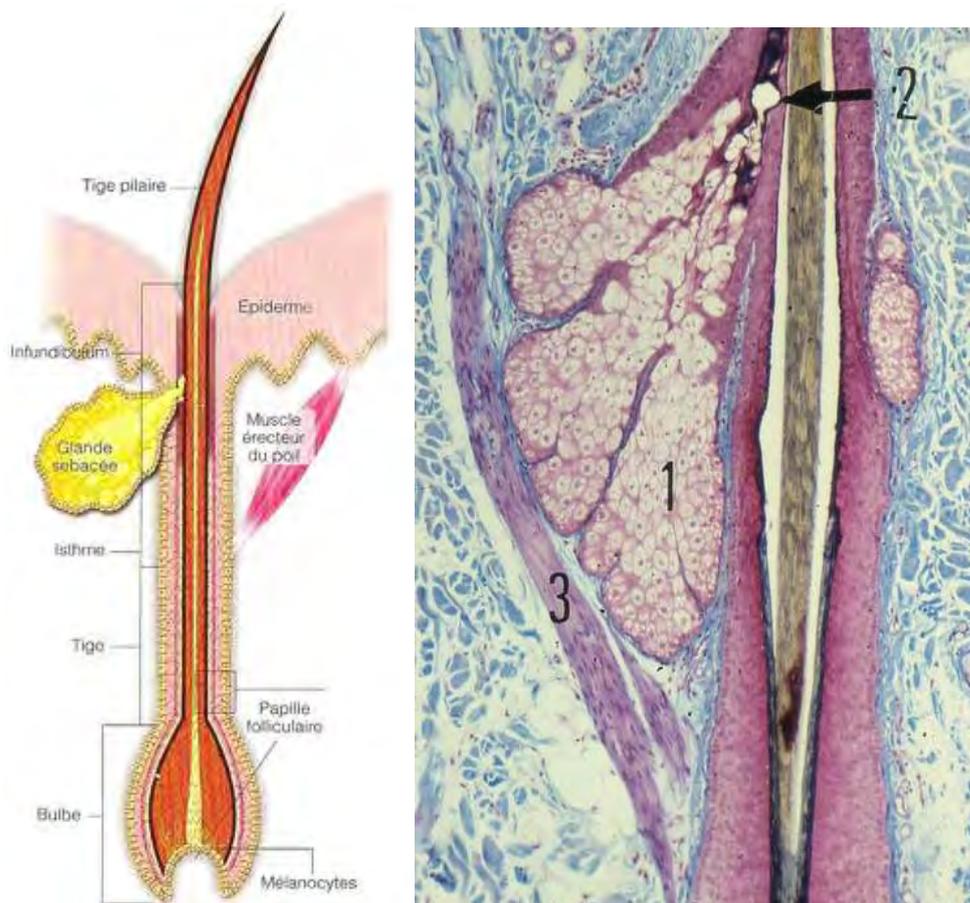


Figure 4. Schéma et coupe histologique de l'unité pilo-sébacée (1 : glandes sébacée ; 2 : canal excréteur ; 3 : muscle érecteur du poil) (extrait de l'atlas d'histologie humaine et animale <http://webapps.fundp.ac.be>)

#### ***(4) Les ongles***

Les ongles sont des modifications écailleuses de l'épiderme qui forment une couverture de protection lisse et translucide et qui protège les extrémités digitales. Comme les poils, ils sont constitués de kératine dure.

## **2. Fonctions générales de la peau**

La peau et ses annexes remplissent de nombreuses fonctions qui influencent le métabolisme et empêchent les facteurs de l'environnement de perturber l'homéostasie de l'organisme.

### **a) Protection**

La peau constitue une première barrière face aux constantes attaques d'agents du milieu externe. Cette barrière physique, ou barrière mécanique, est assurée par la continuité de la peau elle-même et est principalement assurée par les cellules kératinisées, très résistantes à l'abrasion. De plus, elle empêche l'eau de sortir de l'organisme aussi bien que d'y entrer. La desquamation continue des cellules épithéliales permet aussi d'éliminer les microorganismes qui s'y attachent. La barrière chimique est formée par les sécrétions de la peau ainsi que par la mélanine. En effet, le faible pH du film liquide acide sécrété par la peau et les substances bactéricides du sébum permettent à la peau de résister contre les microorganismes. De plus, la sécheresse relative de la peau ralentit le développement microbien. D'autre part, la mélanine permet de préserver la peau des rayonnements ultraviolets. Enfin, la barrière biologique de la peau est composée de la flore cutanée normale qui a une action antagoniste à l'égard de nombreux agents pathogènes et des macrophagocytes intraépidermiques et macrophagocytes du derme, éléments actifs du système immunitaire.

### **b) Régulation de la température corporelle**

La peau permet l'évacuation de la chaleur de l'organisme dans l'air (perspiration) ou par évaporation de la sueur à sa surface (transpiration). Lorsque la perte de chaleur est trop importante, la contraction des vaisseaux sanguins dermiques permet de ralentir cette déperdition de chaleur. Ainsi, la peau joue un rôle primordial dans la thermorégulation de l'organisme.

### c) Sensations cutanées

La peau est riche en récepteurs sensoriels cutanés permettant de percevoir les stimuli issus de l'environnement. La densité de ces récepteurs est variable selon les différentes régions cutanées. Les récepteurs sensoriels cutanés captent les stimuli et les véhiculent jusqu'au cerveau sous la forme d'influx nerveux. Ils prennent la forme de terminaisons nerveuses encapsulées comme les corpuscules de Meissner, de Pacini et de Ruffini ou de terminaisons nerveuses libres dont certaines, associées aux cellules de Merkel, se prolongent jusqu'à l'épiderme. Les corpuscules de Meissner sont situés directement sous l'épiderme et sont très représentés sur la face palmaire des doigts. Ils répondraient surtout aux frôlements et sont particulièrement sensibles à la vitesse du stimulus. Les corpuscules de Ruffini, situés dans le derme et les articulations, sont sensibles aux vibrations et à l'étirement de la peau et des tendons. Les corpuscules de Pacini sont des mécanorécepteurs présents dans le derme profond et l'hypoderme et sont sensibles uniquement aux variations rapides d'intensité de déformation. Les cellules de Merkel répondent à de faibles pressions localisées tandis que les terminaisons libres des fibres nerveuses perçoivent la douleur et représentent le système d'alarme de la peau.

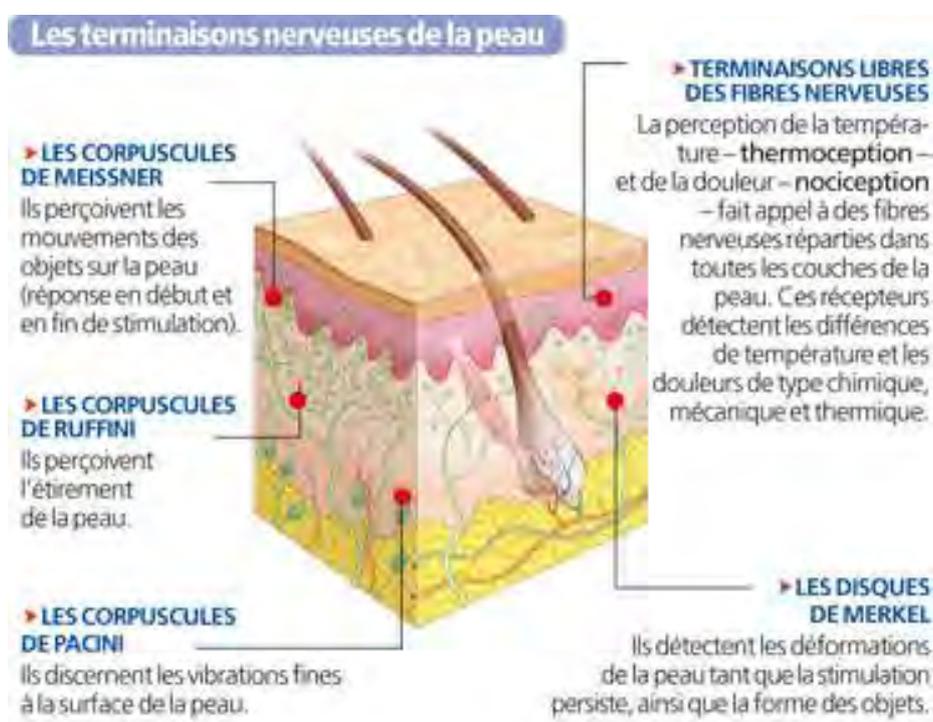


Figure 5. Schéma des terminaisons nerveuses de la peau (extrait de <http://www.lecorpshumain.fr/corpshumain/1-peau.html>)

#### **d) Fonctions métaboliques**

La peau possède diverses fonctions métaboliques telles que la synthèse de la vitamine D, la synthèse de diverses protéines, hormones et enzymes, qui jouent différents rôles au niveau de la peau.

#### **e) Réservoir sanguin**

La peau peut contenir jusqu'à 5% du volume sanguin total. Lorsque d'autres parties du corps ont besoin d'un plus grand apport sanguin, le système nerveux provoque une constriction des vaisseaux sanguins du derme afin que le sang qu'ils contiennent soit réparti dans les autres vaisseaux sanguins de la circulation sanguine systémique.

#### **f) Excrétion**

Une faible quantité de déchets azotés (ammoniac, urée et acide urique) est éliminée du corps par l'intermédiaire de la sueur, la grande majorité étant excrétée par les urines. Une importante quantité d'eau et de sel peut être éliminée lorsque la quantité de sueur excrétée augmente.

### **B. La flore cutanée**

La peau est un support pour le développement microbien. La flore cutanée est constituée d'un grand nombre d'espèces bactériennes et fongiques qui colonisent la surface de la peau au niveau des couches superficielles de l'épiderme ainsi que des annexes. L'anatomie et la physiologie de la peau variant d'une partie à l'autre du corps, la microflore résidente reflète ces variations. Les microorganismes aérobies se développent dans les couches externes tandis que les micro-organismes anaérobies sont principalement localisés dans les follicules pileux. Le derme est exempt de micro-organismes. La composition de cet écosystème complexe résulte d'un équilibre entre les conditions locales et les propriétés métaboliques de ces micro-organismes. La flore cutanée est variable en qualité et en quantité ( $10^2$  à  $10^6$  micro-organismes/cm<sup>2</sup>) selon la topographie : zones lipidiques (riches en glandes sébacées), zones humides (riches en glandes sudoripares), zones sèches (pauvres en glandes sébacées et sudoripares).

# 1. La flore résidente

La flore commensale, ou flore résidente, peuple la couche cornée et les couches superficielles de l'épiderme. C'est une flore normale, non pathogène, qui est propre à chaque individu et qui se renouvelle régulièrement. Sa composition et sa répartition sont relativement stables. Elles varient qualitativement et quantitativement d'une région à l'autre chez un même individu, ainsi que d'un individu à un autre. Elle participe activement au maintien de la santé notamment en inhibant la colonisation de la surface cutanée par des bactéries pathogènes (barrière biologique). La flore résidente a une faible virulence mais un geste invasif peut la modifier et induire un processus infectieux. Cet écosystème stable est contrôlé en partie par les caractéristiques physico-chimiques de la peau (température, pH, oxygène, ions, concentrations en substrats, rayonnements ultraviolets...) mais également par la présence de substances issues de l'hôte ou de sa flore microbienne (sébum, sueur, bactériocines, enzymes...). La flore commensale est dominée par les espèces à Gram positif, principalement les staphylocoques et les bactéries corynéformes.

## a) Staphylocoques

Le genre *Staphylococcus* regroupe des coques à Gram positifs, facultativement anaérobies, non mobiles et qui sont classiquement disposés en amas irréguliers.

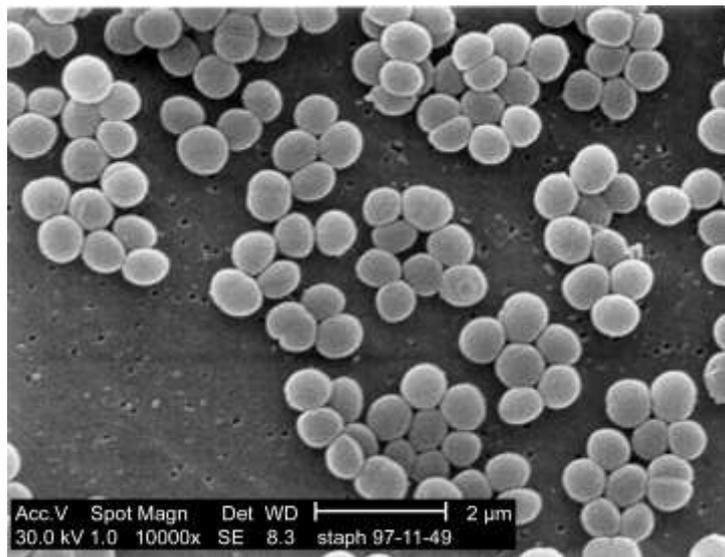


Figure 6. Colonie de *staphylococcus aureus* (extrait de [http://en.academic.ru/pictures/enwiki/83/Staphylococcus\\_aureus\\_01.jpg](http://en.academic.ru/pictures/enwiki/83/Staphylococcus_aureus_01.jpg))

### **(1) Les staphylocoques à coagulase négative (SNC)**

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont les espèces les plus fréquemment isolées dans la flore commensale cutanée. Trois espèces sont prédominantes au niveau de la peau : *Staphylococcus epidermidis*, principal germe aérobic de la flore cutanée résidente, colonise l'ensemble des zones mais est principalement présent sur la face, les narines et le creux axillaire. *Staphylococcus hominis* est isolé au niveau axillaire, inguinal et périnéal, et *Staphylococcus haemolyticus* est plus fréquemment présent au niveau des membres et des espaces interdigitaux. D'autres espèces sont parfois retrouvées telles que *S.warneri*, *S.simulans*, *S.capitis* (au niveau du cuir chevelu), *S.saprophyticus* (au niveau du périnée)... Ces SNC se peuvent se montrer pathogènes dans certains cas : colonisation de valves cardiaques artificielles, infections de cathéters ou prothèses.

### **(2) Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*)**

L'espèce *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) se distingue des SCN par la présence d'une coagulase. Une résistance naturelle à la colonisation cutanée par *S.aureus* est à noter chez l'homme, bien qu'un portage soit détectable chez 20 à 40% de la population, principalement au niveau des muqueuses nasales et du périnée. Il est important de distinguer *S.aureus* des SNC. En effet, son pouvoir pathogène est plus important que celui des SCN et de récentes résistances aux antibiotiques ont été détectées. Il peut causer des furoncles, des abcès, des infections de blessures, un syndrome de choc toxique ou encore des empoisonnements alimentaires.

### **b) Corynéformes aérobies**

Le genre *Corynebacterium* regroupe de petits bacilles à Gram positif, droits ou légèrement incurvés, présentant des extrémités en forme de massue, aéro-anaérobie, non mobiles, formant des palissades. Les corynébactéries lipophiles (*C. jeikeium*, *C. urealyticum*...) sont les plus importantes en bactériologie clinique et sont rencontrées très fréquemment sur tout le territoire cutané avec une prédilection pour certaines régions anatomiques telles que le périnée, les narines antérieures ou le creux axillaire.

## c) Corynéformes anaérobies, *Propionibacterium acnes*

### (1) *Les propionibactéries*

Les espèces *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*), *P.avidum*, *P.granulosum*, *P.propionicum* et *P.lympholicum* représentent la famille des propionibactéries cutanées. Au cours des années elles ont été successivement classées comme *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp, diphtéroïdes anaérobies et *Propionibacterium* spp. Les propionibactéries cutanées ne sont pas strictement anaérobies. La structure de la paroi de propionibactéries leur confère une grande stabilité structurale et ainsi une résistance au dessèchement, aux chocs osmotiques et aux stress mécaniques. Ainsi, elles sont adaptées au milieu hostile que représente la peau, qui est relativement déficiente en eau disponible, sujette aux variations de température, aux rayonnements solaires, aux concentrations importantes en sels et en ions.

### (2) *Propionibacterium acnes*

*P.acnes* est le principal germe anaérobie de la flore cutanée résidente. Il colonise préférentiellement les zones cutanées riches en glandes sébacées, au niveau desquelles le taux de triglycérides et d'acides gras libres est élevé (cuir chevelu, face, ailes du nez, tronc) et est concentré dans le follicule pilo-sébacé où il cohabite avec *S.epidermidis* et *Malassezia furfur*. *P.acnes* est une bactérie Gram positive appartenant à la famille des propionibactéries cutanées. Elle ne forme pas de spores et est microaérophile. En effet, bien que cette bactérie soit souvent décrite comme anaérobie, elle peut supporter la présence d'oxygène jusqu'à un taux de 100% mais sa croissance est alors ralentie (Cove *et al.*, 1983). *In vitro*, *P.acnes* est capable de survivre jusqu'à 8 mois dans des conditions anaérobies sans repiquage ce qui laisse supposer qu'il pourrait aussi se maintenir pendant des durées longues dans le corps humain au niveau de zones anaérobies (Csukas *et al.*, 2004). Cette bactérie est relativement difficile à cultiver puisque sa croissance est lente (temps de doublement : 5,1 heure) et est qu'elle est optimale en conditions anaérobies bien qu'elle tolère la présence d'oxygène. Il existe cependant divers milieux de culture dans lesquels elle est capable de se multiplier.

<i>Propionibacterium acnes</i>	
Règne	Bactéries
Embranchement	Actinobacteria
Ordre	Actinomycetales
Famille	Propionibacteriaceae
Genre	<i>Propionibacterium</i>
Espèce	<i>P.acnes</i>

Figure 7. Classification scientifique de *P.acnes*

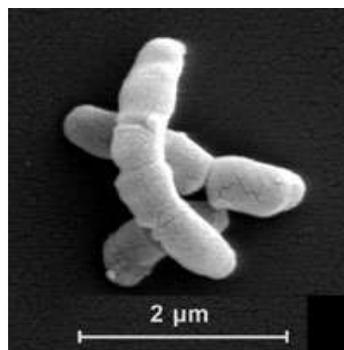


Figure 8. *Propionibacterium acnes* (extrait de <http://www.innovations-report.de/>)

Le génome de *P.acnes* a été séquencé en 2004 (Bruggemann et al., 2004). Il n'est composé que d'un seul chromosome contenant 2333 gènes potentiels. Cette étude a permis de mettre en évidence des gènes codant pour des facteurs de virulence tels que des enzymes de dégradation des tissus de l'hôte (inflammation), des protéines de surface représentant des facteurs antigéniques essentiels pour son adaptation à des conditions hostiles *in vivo*, mais qui lui confèrent aussi une capacité d'adhésion en présence de matériel étranger (formation de biofilms). *P.acnes* est une bactérie de la flore commensale mais elle peut se comporter comme pathogène opportuniste lorsqu'elle colonise des zones où elle n'est normalement pas présente et elle peut être à l'origine de syndromes inflammatoires. Si son rôle dans la phase inflammatoire de l'acné est aujourd'hui largement décrit, cette bactérie est aussi associée à des infections profondes telles que les infections ostéo-articulaires, spondylodiscites, abcès cérébraux, kératites, infections ORL, endocardites, souvent à la suite d'une intervention chirurgicale, d'un traumatisme physique ou à la présence d'un corps étranger (implant) (Perry and Lambert, 2006).

## **d) Autres microorganismes**

### ***(1) Bactéries à Gram positif***

Les microcoques tels que *Micrococcus kristinae* et *M.sedentarius*, les streptocoques ou le genre *Brevibacterium* (*B.epidermidis*, *B.casei*) qui est parfois isolé au niveau des espaces interdigitaux, sont retrouvés sur la surface cutanée.

### ***(2) Bactéries à Gram négatif***

Les *Acinetobacter* (*A.johnsonii*, *A.lwoffii*) sont les seules bactéries à Gram négatif isolées sur la peau humaine : 25% des adultes sains sont colonisés au niveau du creux inguinal et du creux axillaire. Le portage d'*Acinetobacter* spp est plus fréquent pendant les périodes chaudes de l'année mais reste relativement faible chez les individus sains

### ***(3) Levures***

La levure *Malassezia furfur* est également isolée sur la peau, principalement au niveau des zones lipidiques. Cette levure lipophile a été impliquée dans diverses pathologies telles que le pityriasis versicolor, la dermatite séborrhéique ou les folliculites et, tout comme *P.acnes*, se développe principalement à partir de la puberté.

## **2. La flore transitoire**

Les autres microorganismes que l'on peut retrouver à la surface cutanée appartiennent pour la plupart à la flore de transit. Cette flore, plus polymorphe que la flore résidente, est composée de germes saprophytes accidentels de la peau qui proviennent d'autres flores commensales de l'organisme ou de sources exogènes et qui vivent librement à la surface des téguments, en particulier sur les parties découvertes. Le temps de séjour de ces microorganismes sur la peau est très bref car ils ne peuvent s'y multiplier que très rarement et ne peuvent pas y survivre très longtemps du fait de l'effet protecteur de la peau (flore résidente, sécrétions, environnement froid, sec, etc.). Certains de ces germes sont des bactéries pathogènes opportunistes, c'est-à-dire qu'elles ne provoquent une maladie qu'en cas de déficience de l'hôte ou grâce à la constitution particulière de l'écologie bactérienne de l'hôte. Cette flore peut comporter des germes résistants ou multi résistants aux agents antimicrobiens. Elle peut être largement maîtrisée par une hygiène rigoureuse.

### **a) Microorganismes provenant des autres flores commensales de l'organisme**

La flore transitoire est constituée de microorganismes provenant d'autres flores commensales de l'individu: flore buccale, génito-urinaire, digestive, du rhinopharynx. On y retrouve des bactéries à Gram négatif telles que les entérobactéries (*Klebsiela*, *Enterococcus* etc.), et des bactéries à Gram positif telles que *S.aureus* ou *Streptococcus*. *Candida* spp est rarement isolé de la flore cutanée des individus sains. Lorsque qu'il y a colonisation, le plus souvent chez des patients immunodéprimés, diabétiques ou atteints de psoriasis, c'est *C.albicans* qui est l'espèce la plus fréquemment rencontrée.

### **b) Microorganismes provenant de sources exogènes**

La flore transitoire contient aussi des bactéries provenant de sources exogènes qui peuvent être multiples : environnement, autres individus colonisés ou infectés, matériel contaminé. On y retrouve les genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. Elle peut aussi contenir des spores de *Bacillus* spp et *Clostridium* spp qui proviennent de l'environnement.

## C. L'acné

L'acné est la première cause de consultation en dermatologie dans les pays occidentaux. Cette dermatose inflammatoire chronique du follicule pilo-sébacé évoluant par poussées débute typiquement à la puberté et cesse spontanément, le plus souvent à la fin de l'adolescence. Si selon les études, l'acné touche de 60% à 100% des adolescents, une enquête par sondage en 2002 en France a montré que la prévalence de l'acné était de 10,81%, tous âges confondus, au cours des deux années qui avaient précédé le sondage (Wolkenstein *et al.*, 2003; Wolkenstein and Revuz, 2004) et que celle-ci persistait de manière notable au-delà de l'adolescence, surtout chez les femmes. La répartition des prévalences par tranches d'âge était la suivante :

12-17 ans	47%
18-24 ans	25%
25-34 ans	18%
35-54 ans	10%

Figure 9. Tableau représentant la répartition des prévalences de l'acné par tranche d'âge entre 2000 et 2002, en France

Généralement bénigne, l'acné peut néanmoins nécessiter, dans certains cas, des traitements intensifs et contraignants et peut être parfois à l'origine de troubles psychologiques graves.

L'acné se développe suivant trois étapes :

1<sup>ère</sup> étape : Une hyper séborrhée débutant le plus souvent à la puberté.

2<sup>ème</sup> étape : Des anomalies de la kératinisation du follicule pilo-sébacé induisant la formation de la lésion élémentaire de l'acné : le microcomédon qui aboutit au développement du comédon ouvert ou fermé.

3<sup>ème</sup> étape : Une hyper prolifération de la bactérie *Propionibacterium acnes* induisant le développement et le maintien de la phase inflammatoire qui aboutit à la formation de papules, pustules ou nodules.

De plus, des facteurs génétiques influencent très probablement ces trois étapes et sont certainement capables de moduler l'initiation, l'intensité et la durée de l'acné (Ballanger *et al.*, 2006).

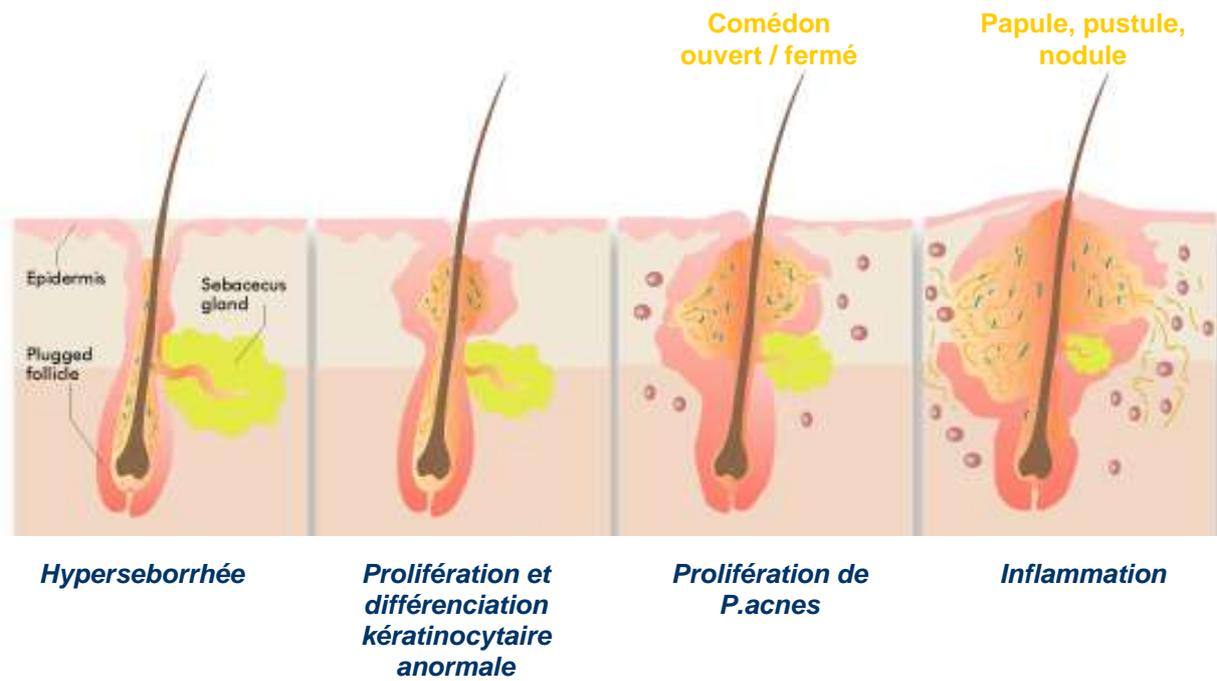


Figure 10. Les étapes de la formation des lésions d'acné (inspiré de <http://www.indianwomenshealth.com/Acne-121.aspx>)



Figure 11. Acné inflammatoire du visage : papules et papulo-pustules (extrait de <http://e-medicaltextbook.blogspot.com/2008/09/acne-vulgaris.html>)

# 1. Phase 1 : l'hypersécrétion sébacée

## a) Influence des androgènes

L'acné est toujours associée à une hyper séborrhée qui est stimulée par les androgènes : la testostérone et sa forme active, la dihydrotestostérone (DHT), issue de la transformation de cette dernière par la 5- $\alpha$  réductase de type I. La DHT est capable de se fixer aux récepteurs de la glande sébacée et d'induire l'activation des gènes impliqués dans la production de sébum. Il est intéressant de noter que la plupart des patients acnéiques ont un taux normal de testostérone circulant. L'hyper séborrhée peut donc s'expliquer par une hypersensibilité des récepteurs aux androgènes au niveau de la peau ou par une hyperactivité des systèmes enzymatiques qui assurent une production intracellulaire d'androgènes à partir de sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA) et qui se situent au niveau de la glande sébacée et des kératinocytes de l'infundibulum pileaire.

## b) Influence de différents récepteurs de la glande sébacée

Indépendamment des androgènes, dont les récepteurs ont été les premiers à être identifiés sur la glande sébacée, d'autres voies ont été suggérées comme favorisant l'hyper séborrhée via l'activation de différents récepteurs.

### *(1) Les récepteurs PPARs*

Les PPARs (Peroxisome Proliferator Activator Receptor) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones (NRH). Il existe 3 sous-types de PPARs :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les 3 types de PPARs ont été identifiés sur les sébocytes et la forme  $\gamma$  est la plus abondante (Kuenzli and Saurat, 2003). Après fixation sur le récepteur aux rétinoïdes X (RXR) puis hétérodimérisation, ces récepteurs intranucléaires se lient à l'ADN et activent l'expression de gènes possédant un promoteur équipé d'un « Peroxisome Proliferator Responsive Element » (PPRE). Les PPARs régulent l'expression de gènes impliqués dans diverses fonctions telles que la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que la réponse immunitaire, notamment la phase inflammatoire. Les acides gras libres, l'acide linoléique et les androgènes activent les PPARs en se liant avec les récepteurs RXR des rétinoïdes. Cela a pour effet d'induire des modifications de la prolifération et de la différenciation des sébocytes, la

synthèse d'acides gras libres ainsi que la production d'IL-1 $\alpha$  et de TNF- $\alpha$  par la glande sébacée, participant ainsi à sa maturation (Zouboulis et al., 2005).

### ***(2) Les récepteurs aux neuromédiateurs***

Les récepteurs aux neuromédiateurs ont été suggérés comme impliqués dans le développement de l'hyper séborrhée. C'est le cas des récepteurs aux neuromédiateurs tels que la substance P qui est libérée par des terminaisons nerveuses péri sébacées et dont le nombre est augmenté chez les sujets acnéiques. La substance P entraîne l'expression d'une endopeptidase neutre dans le sébocyte et de l'E-selectine autour de la glande sébacée. *In vitro*, elle stimule la sécrétion sébacée. Les poussées d'acné provoquées par le stress pourraient donc s'expliquer par une hyper séborrhée liée à la production de substance P.

### ***(3) Les récepteurs aux endorphines***

Des récepteurs aux endorphines tels que le CRH (corticotropin releasing hormone) ou l' $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocortin stimulating hormone) ont été identifiés au niveau de la glande sébacée et pourraient être impliqués dans la modulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire mais aussi dans la modulation de la réaction inflammatoire. Ces mécanismes restent encore assez peu décrits dans l'acné.

### ***(4) Les récepteurs à l'IGF-1***

Le rôle de l'alimentation est de plus en plus suggéré dans le développement de l'acné. Stimulés par l'augmentation du taux d'insuline, les récepteurs à l'IGF-1 (insulin-like growth factor), les IGF-1R (insulin-like growth factor-1 receptor), pourraient être impliqués dans le développement des lésions d'acné via une modulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Ces mécanismes sont encore peu connus aujourd'hui.

### ***(5) Les récepteurs à l'histamine***

Des récepteurs à l'histamine-1 ont été mis en évidence sur les sébocytes et des études ont montré que le blocage de ces récepteurs par un antagoniste anti-H1, tel que la diphenhydramine (PDH), permettait de réduire de manière significative les taux de squalène, substance du sébum connue pour sa comédogénicité et son pouvoir irritant (Pelle et al., 2008).

## **2. Phase 2 : la formation du microcomédon**

Le microcomédon est la lésion élémentaire de l'acné qui est le plus souvent cliniquement invisible. Sa formation débute par l'obstruction du canal du follicule pilo-sébacé. Une augmentation de l'activité proliférative des kératinocytes de l'épithélium du canal infundibulaire est associée à des anomalies de leur adhésion et de leur différenciation, entraînant une desquamation anormale des cornéocytes. La glande sébacée continuant de produire d'importantes quantités de sébum qui ne peuvent plus être évacuées, il s'ensuit une dilatation du follicule pilo-sébacé, aboutissant à des lésions cliniquement visibles : les comédons. Des études immunohistochimiques ont montré une hyper prolifération kératinocytaire au niveau de lésions d'acné (Knaggs *et al.*, 1994).

### **a) Influence des hormones kératinocytaires**

Les anomalies de la prolifération et de la différenciation kératinocytaire pourraient être directement liées à des anomalies du métabolisme des androgènes au niveau des kératinocytes du canal pilo-sébacé. Des phénomènes hormonaux locaux accélèreraient la transformation du cholestérol en testostérone et pourraient participer à la formation du microcomédon (Gingras *et al.*, 2003; Thiboutot, 2004)

### **b) Influence des systèmes enzymatiques intra kératinocytaires**

Les kératinocytes sont pourvus de systèmes enzymatiques leur permettant de métaboliser à la fois les androgènes et le cholestérol. Les concentrations cellulaires des androgènes et du cholestérol influencent la maturation des kératinocytes. De ce fait, des anomalies de l'activation de ces systèmes enzymatiques pourraient, en modulant la concentration intracellulaire de ces molécules, être à l'origine d'une modification de la prolifération et de la différenciation kératinocytaire.

### **c) Influence des cytokines**

L'activité comédogène de l'interleukine-1 $\alpha$  (IL-1  $\alpha$ ) a été démontrée *in vitro*. De par l'hyperkératinisation qu'elle entraîne, elle favoriserait la formation du microcomédon (Kurokawa *et al.*, 2009). *In vivo*, l'IL-1 $\alpha$  est libérée par les kératinocytes activés et les sébocytes. La

production d'IL-1 $\alpha$  par les kératinocytes peut être renforcée par un grattage répété des lésions ou une irritation liée aux traitements.

#### **d) Influence des intégrines**

Les intégrines kératinocytaires sont des molécules de jonction entre les kératinocytes qui assurent leur cohésion. Elles jouent un rôle important dans la prolifération et la différenciation kératinocytaire. Des modifications de leur régulation pourraient être à l'origine d'une desquamation anormale des cornéocytes favorisant ainsi la formation du microcomédon. Des anomalies de l'expression de certaines intégrines telle que les intégrines  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  ont été observées au niveau des follicules pilo-sébacés et des comédons de patients acnéiques (Cunliffe *et al.*, 2000; Jeremy *et al.*, 2003).

#### **e) Influence de la filaggrine**

La filaggrine est un marqueur de la différenciation terminale des kératinocytes. Localisée au niveau de la couche cornée en peau normale, elle est retrouvée dans les couches suprabasales en peau acnéique et en quantités plus importantes (Jarrousse *et al.*, 2007a). Sa répartition a aussi été rapportée comme anormale dans les follicules pilo-sébacés de patients acnéiques (Kurokawa *et al.*, 1988). De telles modulations de son expression pourraient entraîner des anomalies de la différenciation terminale, et conduire ainsi à une mauvaise desquamation.

#### **f) Influence des PPARs kératinocytaires**

Le récepteur PPAR  $\beta/\delta$  est le sous-type dominant dans les kératinocytes et est utilisé comme marqueur de prolifération. En ce qui concerne les sous-types  $\alpha$  et  $\gamma$ , ils sont faiblement exprimés par les kératinocytes mais leur expression augmente lors de la différenciation. Des anomalies de l'expression des différents PPARs kératinocytaires pourraient être associées à une prolifération et une différenciation anormale des kératinocytes, aboutissant à la formation du microcomédon (Mao-Qiang *et al.*, 2004; Schmuth *et al.*, 2004).

#### **g) Influence de la composition du sébum**

La composition du sébum elle-même favorise le développement des lésions d'acné. Le sébum est constitué de squalène, de triglycérides et de cires. Au cours de l'hyper séborrhée, la composition du sébum est modifiée. L'augmentation du volume de sébum entraîne une

dilution de l'acide linoléique qui se trouve alors à une concentration plus faible, ce qui pourrait entraîner des troubles de la différenciation kératinocytaire favorisant ainsi la formation du microcomédon. Enfin, le sébum des patients acnéiques est riche en squalène et en cires, substances connues pour être comédogènes et irritantes. En effet, les peroxydes de squalène, résultant de la photo-oxydation du squalène, induisent une libération de cytokines pro-inflammatoires par les kératinocytes.

### **3. Phase 3 : la formation des lésions inflammatoires**

L'immunité innée joue un rôle fondamental dans le développement de la phase inflammatoire de l'acné et la plupart de ses acteurs sont activés dans les lésions inflammatoires d'acné.

#### **a) Influence des polynucléaires**

Le chimiotactisme des polynucléaires et leur attraction vers le follicule sébacé dépendent en partie des acides gras libres. Cependant, *P.acnes* produit un grand nombre de substances et 15% d'entre elles ont un poids moléculaire inférieur à 3000 kDa ce qui leur confère la capacité de diffuser à travers la paroi du follicule pilo-sébacé attirant ainsi les polynucléaires.

#### **b) Influence des récepteurs toll-like (TLRs)**

Les TLRs reconnaissent certains ligands endogènes mais surtout un large panel de PAMPs (pathogen associated molecular patterns) tels que le peptidoglycane, les lipoprotéines, les lipopeptides, ou encore le zymosan, et sont impliqués dans l'immunité innée (Takeuchi *et al.*, 1999). Dix récepteurs Toll-like ont été identifiés chez l'homme (TLR1 à TLR10) et les kératinocytes ont été montrés comme exprimant les TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 et 10. Les principaux pathogènes de la surface cutanée étant des bactéries à Gram positif, le TLR-2 a été identifié comme jouant un rôle prédominant au niveau kératinocytaire (Lew *et al.*, 2009).

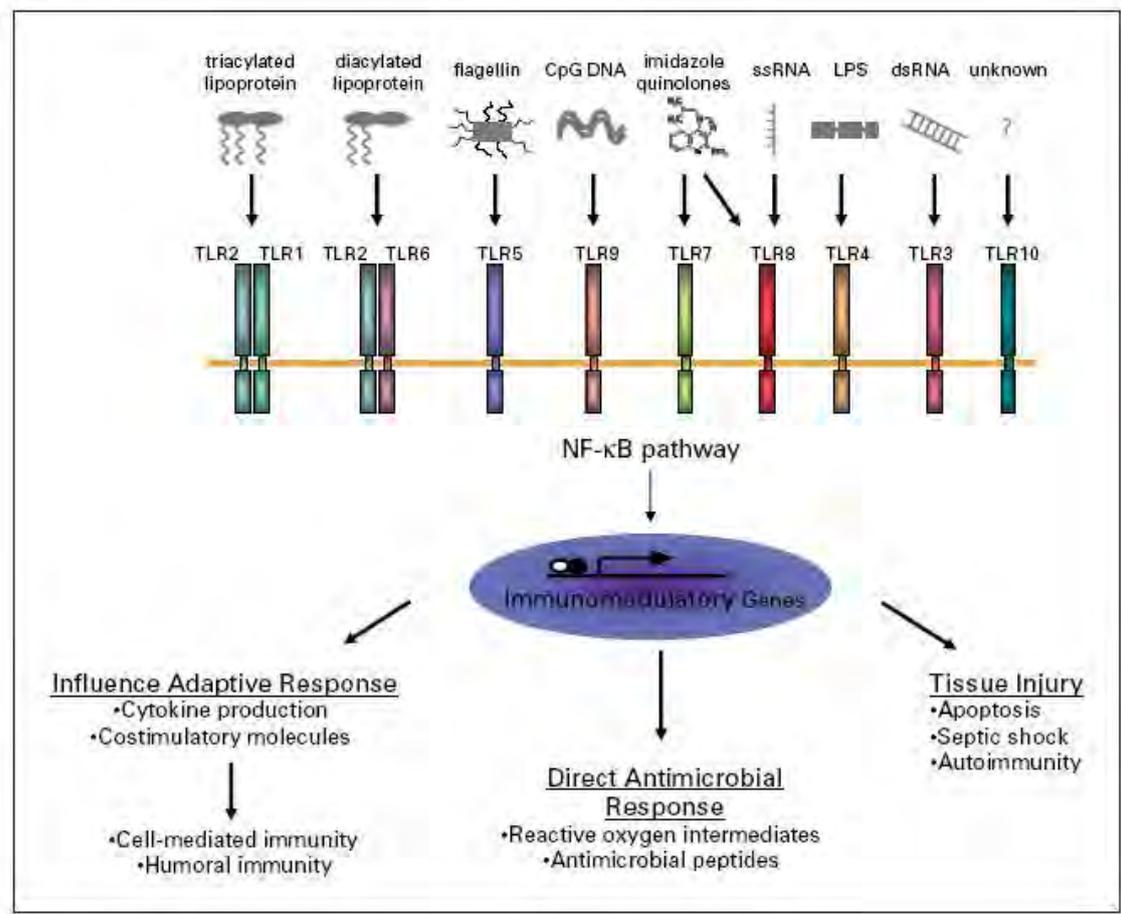


Figure 12. Les TLRs humains et leurs ligands (CpG :Cytosine guanine nucléotides) (extrait de *Review of the innate immune response in acne vulgaris*, Kim., *Dermatology*, 2005 ; 211 : 193-198)

L'activation d'un TLR induit une forte réaction inflammatoire entraînant le déclenchement d'une réponse anti-microbienne et une production de cytokines via différentes voies d'activation. Les TLRs déclenchent l'activation précoce ou tardive du facteur de transcription NF-κB et conduisent à la production de cytokines pro-inflammatoires, d'IFN-β et à l'expression des gènes IFN dépendants (Kawai and Akira, 2005; Takeda and Akira, 2005).

### c) Influence du facteur de transcription NFκB

Le facteur de transcription NF-κB intervient dans de nombreux mécanismes : immunité innée et adaptative, développement, prolifération et survie cellulaire. La voie NF-κB peut être déclenchée par de nombreux stimuli extracellulaires tels que certaines cytokines (IL-1, TNF-

$\alpha$ ), stress, bactéries ou virus, et entraîne l'activation de plus de 150 gènes dont les gènes codant pour des protéines pouvant elles-mêmes activer NF- $\kappa$ B (IL-1 et TNF- $\alpha$ ).

#### **d) Influence des cytokines**

De nombreuses cytokines jouent un rôle important dans le développement du processus inflammatoire de l'acné. L'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-8 ou encore le TNF- $\alpha$  sont sécrétés par les kératinocytes activés et stimulent l'immunité innée, amplifient la réaction inflammatoire et le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles. *P.acnes* est lui-même capable de sécréter des facteurs IL-1 $\alpha$ -like, IL-8-like et TNF- $\alpha$ -like. De plus, il a été montré très récemment que la DHT impliquée dans l'hypersecretion sébacée serait aussi capable de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou encore le TNF- $\alpha$  par les sébocytes (Lee et al., 2010). Ainsi, l'IL-1  $\alpha$  joue un rôle dans la formation du comédon, l'IL-8 a une activité mitogène sur les kératinocytes via son récepteur IL-8R (Nagy *et al.*, 2005) et attire les neutrophiles, qui, en sécrétant des enzymes lysosomales participent à la rupture du follicule et à la réaction inflammatoire, le TGF- $\alpha$  favorise la rupture du comédon et l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  la diffusion de la réaction inflammatoire. Dans un second temps, ces mêmes cytokines inhibent la production de sébum par différenciation épithéliale des sébocytes, expliquant ainsi la régression spontanée des lésions d'acné.

#### **e) Influence des défensines**

Les défensines sont des peptides antimicrobiens. Elles sont divisées en trois sous-catégories :  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\theta$  défensines. Il a été identifié 30 gènes de hBD (human  $\beta$  défensines) chez l'homme. Les hBD sont largement exprimées au niveau des épithéliums et des leucocytes, de manière constitutive ou inductible selon leur site d'expression. L'expression des  $\alpha$  et  $\theta$  défensines est constitutive alors que l'expression des  $\beta$  défensines est inductible et l'activation des TLRs conduit à l'expression de  $\beta$  défensines dans de nombreux tissus. Dans les biopsies d'acné, il a été décrit que les  $\beta$  défensines hBD1 et de hBD2 étaient surexprimées en comparaison aux peaux saines. De plus, hBD2 était plus fortement exprimée dans les papules et les pustules que dans les comédons (Chronnell *et al.*, 2001; Philpott, 2003). Enfin, une étude récente a montré que les acides gras libres du sébum étaient capables de stimuler l'expression de hBD2 par les sébocytes (Nakatsuji *et al.*, 2010).

### **f) Influence des métalloprotéases (MMPs)**

Les kératinocytes et les polynucléaires synthétisent des métalloprotéases matricielles (collagénases, gélatinases, stromelysines, matrilysines) qui sont des endopeptidases zinc dépendantes impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines matricielles, en particulier MMP-9. Un grand nombre de MMPs telles que MMP-1, MMP-9, ou encore MMP-13, sont présentes dans le sébum de lésions d'acné ce qui suggère leur rôle dans la rupture de la paroi du follicule pilo-sébacé qui permet la diffusion de l'inflammation vers les tissus plus profonds (Papakonstantinou *et al.*, 2005). Une récente analyse génique en microarray a montré que les MMP-1 et 3 étaient surexprimées dans les lésions de patients acnéiques (Trivedi *et al.*, 2006). Enfin, ces métalloprotéases pourraient avoir un rôle dans la formation des cicatrices d'acné.

### **g) Influence des radicaux libres**

Les polynucléaires des patients acnéiques produisent des radicaux libres en quantités plus importantes que ceux provenant de sujets sains. Ceci s'accompagne d'une augmentation de l'activité des enzymes anti radicalaires (glutathion peroxydase et superoxyde dismutase). Enfin, l'acide linoléique, qui a une activité inhibitrice de la production de radicaux libres, est en concentration plus faible dans le sébum des patients acnéiques.

## **4. P.acnes et acné**

### **a) Généralités**

L'implication des micro-organismes dans l'acné est décrite depuis une centaine d'années. En 1896, *P.acnes* (alors appelé *Bacillus acnes*) a été isolé de lésions d'acné et il a été suggéré que cette bactérie pourrait être impliquée dans le développement de cette pathologie. Aujourd'hui, des éléments concrets tels que l'utilisation avec succès des antibiotiques dans le traitement de l'acné et une efficacité réduite en présence de souches résistantes de *P.acnes* suggèrent un rôle direct de la bactérie dans le développement de cette pathologie. De plus, le séquençage du génome complet de *P.acnes* a permis de mettre en évidence la présence de différents gènes qui pourraient être impliqués dans le développement de l'acné tels que des gènes pro-inflammatoires, des gènes impliqués dans la virulence ou encore dans l'organisation en biofilms de la bactérie (Bruggemann *et al.*, 2004; Burkhart and Burkhart, 2006). La

pathogénicité de *P.acnes* est principalement liée à sa capacité à sécréter des enzymes et des métabolites ainsi qu'à sa capacité à interagir avec le système immunitaire.

## **b) Rôle de *P.acnes* dans la phase inflammatoire de l'acné**

Le rôle de *P.acnes* dans la phase inflammatoire de l'acné est aujourd'hui totalement admis et bien documenté.

### ***(1) Les facteurs enzymatiques***

*P.acnes* sécrète des lipases qui hydrolysent, dans le canal pilo-sébacé, les triglycérides du sébum et les transforment en glycérol et acides gras libres qui présentent une activité pro-inflammatoire et chimiotactique pour les polynucléaires. En effet, les acides gras libres et d'autres fragments de *P.acnes* diffusent à travers la paroi du comédon et induisent un afflux de polynucléaires neutrophiles par chimiotactisme. Ces derniers produisent aussi des enzymes, notamment des métalloprotéases qui entraînent la rupture de la paroi du follicule pilo-sébacé diffusant ainsi l'inflammation en profondeur (Schaller *et al.*, 2005). *P.acnes* produit aussi des protéases, des hyaluronidases qui hydrolysent les acides hyaluroniques, des composants majeurs des liaisons inter cellulaires (Puhvel and Reisner, 1972).

### ***(2) Les facteurs chimiotactiques***

*P.acnes* libère des facteurs chimiotactiques qui attirent les polynucléaires. Ces facteurs chimiotactiques sont de faible poids moléculaire (<3000kDa) ce qui permet leur diffusion à travers la paroi du follicule pilo-sébacé (Puhvel and Sakamoto, 1980; Webster and Leyden, 1980).

### ***(3) Les protéines du choc thermique***

Les HSP (heat shock proteins) GroEL (56,8kDa) et DnaK (66,4kDa) et les lipoglycanes sont issus de l'enveloppe de *P.acnes* et pourraient être impliquées dans la phase inflammatoire de l'acné, notamment via des interactions avec les TLRs. Ces protéines sont sécrétées sous l'effet d'un stimulus tel que l'hypoxie locale au niveau de comédon qui favoriserait la prolifération de *P.acnes* (Farrar *et al.*, 2000). GroEL est capable de stimuler la synthèse kératinocytaire de cytokines pro-inflammatoires (Graham *et al.*, 2004).

#### ***(4) Les récepteurs Toll-like (TLR)***

Il a été montré que *P.acnes* stimule l'expression des TLRs tels que TLR-2 et TLR-4 (Jugeau *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2005) par les kératinocytes et les monocytes. Leur activation permet la translocation du facteur NF- $\kappa$ B et l'induction et le maintien de la phase inflammatoire et nécessiterait l'activation conjointe de TLR-9 (Kalis *et al.*, 2005).

#### ***(5) Les cytokines pro-inflammatoires***

*P.acnes* stimule la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes, les kératinocytes et les sébocytes (Nagy *et al.*, 2006). Cette induction par *P.acnes* de l'expression massive de cytokines pro-inflammatoires pourrait découler de trois mécanismes. Premièrement, l'hydrolyse des triglycérides du sébum en acides gras libres stimulerait l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les kératinocytes de l'infundibulum pileaire. Deuxièmement, des anticorps anti-*P.acnes* étant présents de manière ubiquitaire dans le sérum, *P.acnes* et ses composants cellulaires pourraient propager l'inflammation via l'activation des voies classiques et alternes du complément. Troisièmement, des antigènes microbiens issus de *P.acnes* (peptidoglycanes solubles, acides lipoteichoïques) pourraient directement stimuler l'expression de cytokines pro-inflammatoires via l'activation des TLRs. Ainsi, *P.acnes* provoque la sécrétion d'un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires par les différents types cellulaires de la peau : l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le TNF- $\alpha$  ou encore le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) qui est un facteur de croissance pour les globules blancs (Graham *et al.*, 2004; Jeremy *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002).

#### ***(6) Les peptides antimicrobiens***

*P.acnes* stimule l'expression kératinocytaire de peptides antimicrobiens. L'activation des TLRs conduisant à l'expression de  $\beta$  défensines, il a été montré que *P.acnes* était capable d'induire l'expression des ARNm de la  $\beta$  défensine-2. De plus, les acides gras libres du sébum étant aussi capables de stimuler l'expression de hBD2 par les sébocytes (Nakatsuji *et al.*, 2010), *P.acnes* est probablement impliqué dans la surexpression de cette défensine observée dans les lésions d'acné, de manière indirecte, via l'hydrolyse des triglycérides du sébum (Nagy *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 2005).

### ***(7) Les métalloprotéases (MMPs)***

Il est décrit que *P.acnes* stimule l'expression épidermique de la métalloprotéase MMP-9 (Jugeau *et al.*, 2005) qui aide à la diffusion de l'inflammation dans le tissu dermique avoisinant et qui pourrait jouer un rôle important dans la formation des cicatrices observées dans l'acné. Une étude décrit aussi que *P.acnes* stimule la synthèse du TNF-  $\alpha$  par les fibroblastes, ce qui entraînerait une stimulation de la synthèse de la pro-MMP-2 par ces cellules (Choi *et al.*, 2008). De plus, des études indiquent que des antibiotiques tels que la doxycycline et certains macrolides, sont capable d'inhiber la synthèse de la MMP-2 et de la MMP-9 de manière dose dépendante confirmant le rôle important de la bactérie dans l'induction de l'expression de ces protéines (Burggraf *et al.*, 2007; Kanai *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005).

### ***(8) L'immunité humorale***

*P.acnes* est capable d'activer la voie classique du complément par l'intermédiaire d'anticorps, mais aussi par la voie alterne. Il en résulte la formation de facteurs chimiotactiques C5-dépendants (Scott *et al.*, 1979; Webster *et al.*, 1978) ainsi qu'une production d'anticorps dirigés contre un polysaccharide acide libéré pendant la phase de croissance stationnaire de la bactérie. Ce taux d'anticorps est retrouvé à un taux plus élevé chez les patients acnéiques que chez les sujets sains et il est corrélé à la gravité de l'acné (Ashbee *et al.*, 1997; Iversen *et al.*, 1985).

### ***(9) L'immunité adaptative***

L'existence d'un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes T CD4+ a été mis en évidence au sein des follicules pilo-sébacés, et ce avant le début de la formation du microcomédon. Ceci laisse supposer que, en plus de l'immunité innée, l'immunité adaptative pourrait intervenir de manière précoce dans la formation des lésions d'acné. De plus, il a été montré que plus cet infiltrat est intense et prolongé, plus les risques cicatriciels sont importants.

### **c) Rôle de *P.acnes* dans la formation du comédon**

Si le rôle de *P.acnes* dans le développement et le maintien de la phase inflammatoire est aujourd'hui assez bien décrit, des études plus récentes suggèrent son implication dans les

phases précoces du développement de l'acné, dès la formation du microcomédon, qui résulte d'une hyper prolifération kératinocytaire associée à une mauvaise desquamation et à une différenciation anormale des kératinocytes.

### **(1) La prolifération kératinocytaire**

*P.acnes* stimule la production d'IL-1 $\alpha$  par les kératinocytes. Il en résulte une augmentation de la prolifération de ces derniers qui pourrait aboutir à la formation du microcomédon (Guy *et al.*, 1996). De plus, il est décrit que *P.acnes* induit une augmentation de l'expression du facteur Ki-67 dans les kératinocytes en monocouches, indiquant une stimulation de la prolifération kératinocytaire (Jugeau *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2005).

### **(2) La différenciation kératinocytaire**

Il a été montré que *P.acnes* était capable de modifier l'expression kératinocytaire des intégrines  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V\beta 6$ . De plus, les extraits de *P.acnes* induisent une surexpression de la filaggrine des couches basales et intermédiaires de l'épiderme tandis qu'elle est localisée dans la couche cornée en peau normale (Akaza *et al.*, 2009; Jarrousse *et al.*, 2007a). De plus, une récente étude a permis de confirmer le rôle de *P.acnes* sur la modulation de l'expression kératinocytaire des ARNm de l'involucrine (Akaza *et al.*, 2009; Nagy *et al.*, 2005), ainsi que des transglutaminases TGases 1, 3 et 5, des protéines impliquées dans la différenciation kératinocytaire. Cette même étude a montré que *P.acnes* influençait l'expression des ARNm de certaines kératines en stimulant l'expression de K1, K10 et K17, et en inhibant celle de K6 et K16, conduisant ainsi à une différenciation anormale des kératinocytes. Enfin, il a été montré que les acides gras libres qui résultent de l'hydrolyse des triglycérides du sébum par les lipases de *P.acnes* ont la capacité de modifier la différenciation kératinocytaire (Thiboutot, 2004).

### **d) Rôle de P.acnes dans l'hyper séborrhée**

A ce jour, très peu d'études décrivent la potentielle implication de *P.acnes* dans l'hyper séborrhée observée dans l'acné. Cependant, il a été décrit très récemment que *P.acnes*, via des facteurs solubles, pourrait stimuler la production de sébum par les sébocytes *in vitro* et *in vivo* (Iinuma *et al.*, 2009; Zouboulis, 2009).

### e) Rôle du biofilm de *P.acnes*

Comme la majorité des micro-organismes, *P.acnes* est capable de s'organiser en biofilm à la fois *in vitro* et *in vivo* (Burkhart, 2005; Burkhart and Burkhart, 2003). Un biofilm est une communauté de microorganismes organisés de manière complexe, adhérant à la fois à une surface et les uns aux autres, englobés dans une matrice extracellulaire composée de polysaccharides qu'ils sécrètent eux-mêmes. Ce changement d'organisation permet aux microorganismes de mieux résister aux agressions du milieu et de sécréter différents facteurs. Ainsi, en réponse aux changements dans leur environnement (augmentation de la séborrhée par exemple), *P.acnes* pourrait s'organiser en biofilm, seul, ou en association avec les autres microorganismes présents dans le follicule pilo-sébacé. Le séquençage du génome de *P.acnes* a mis en évidence des gènes impliqués dans la formation du biofilm (Burkhart and Burkhart, 2006) et il a été montré que cette organisation permettrait à *P.acnes* de mieux résister aux agressions tels que les défenses immunitaires de l'organisme ou encore les traitements antibiotiques (Coenye *et al.*, 2007). Enfin, il a été suggéré que les polysaccharides produits par *P.acnes* pourraient favoriser la formation du microcomédon en augmentant la cohésion des cornéocytes et en empêchant leur bonne desquamation (Burkhart and Burkhart, 2007).

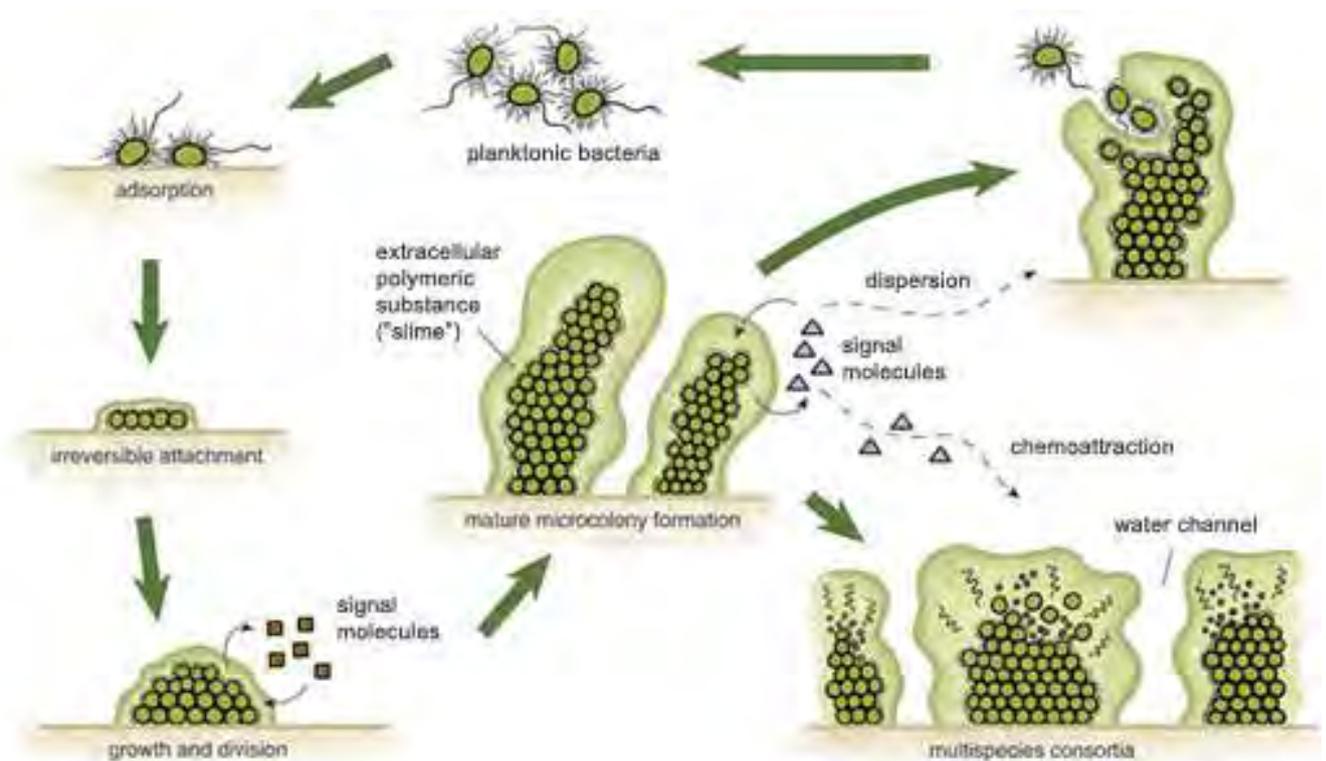


Figure 13. Etapes de la formation d'un biofilm

## **f) P.acnes et résistance aux antibiotiques**

Dans l'acné, les traitements par antibiotiques sont souvent longs (3 à 12 mois) et utilisés, soit par voie locale (érythromycine, clindamycine), soit par voie générale (cyclines telles que la doxycycline, minocycline, lymécycline). Ces traitements exercent une pression de sélection sur les bactéries de la flore commensale de l'organisme et notamment sur *P.acnes* (Coates *et al.*, 2002; Eady *et al.*, 1989) ainsi que sur *S.epidermidis* (Harkaway *et al.*, 1992; Vowels *et al.*, 1996) induisant ainsi des résistances de ces bactéries aux antibiotiques. Ces données pourraient augmenter le risque d'infections graves à germes multi-résistants et les antibiotiques doivent donc être prescrits avec beaucoup de précautions.

## **D. Les axes hormonaux CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R**

### **1. Les hormones : généralités**

Les hormones sont des messagers chimiques sécrétés par les cellules du système endocrinien, véhiculés par le système circulatoire, et qui peuvent agir sur différents organes cibles incluant la peau en se liant à des récepteurs spécifiques. Certains organes ou tissus comportent des cellules capables de sécréter des hormones, mais ils ne sont pas exclusivement des glandes endocrines : c'est le cas de la peau par exemple. Les hormones endocrines circulent dans le sang et agissent à distance de leur lieu de production tandis que les hormones paracrines agissent sur les cellules situées à proximité, sans passer par le système circulatoire, et que les hormones autocrines agissent sur la cellule même qui les a sécrétées. Les hormones jouent un rôle de communication primordial dans l'organisme puisqu'elles régulent de nombreuses fonctions essentielles (métabolisme, homéostasie, différenciation cellulaire, développement, croissance, reproduction, régulation des rythmes chronobiologiques...), agissent sur la quasi totalité des tissus, et ce, tout au long de la vie. Elles exercent une influence physiologique fondamentale et vitale sur la peau. Des facteurs endogènes (prédisposition génétique, puberté, grossesse...) ou exogènes (stress, alimentation...) peuvent déclencher, chez les personnes prédisposées, des modifications hormonales et conduire à des altérations pathologiques de la peau. Dans l'acné c'est principalement les androgènes qui jouent un rôle prépondérant. En effet, le follicule pilo-sébacé est non seulement une cible privilégiée des androgènes naturels mais aussi le siège d'une stéroïdogénèse, conduisant à la synthèse de la DHT. Les récepteurs aux androgènes et les enzymes clés de cette stéroïdogénèse ont été mis en évidence dans les sébocytes mais aussi dans les kératinocytes du canal infundibulaire. De ce fait, un hyper androgénisme s'accompagne très souvent d'acné. Ainsi, si l'acné est principalement observée chez des adolescents, elle peut être aussi associée à la grossesse mais certaines études mettent en cause d'autres causes de modifications hormonales telles que le stress ou encore l'alimentation. En effet, diverses causes pourraient être à l'origine de changements hormonaux et influencer ainsi directement l'apparition ou la persistance de l'acné.

## 2. Le système CRH/CRH-R1

### a) Généralités

Les systèmes nerveux et endocriniens sont coordonnés de telle sorte qu'ils forment un système appelé système neuroendocrinien. Certaines parties du système nerveux peuvent stimuler la libération d'hormones qui, à leur tour, peuvent favoriser ou contrer la libération d'influx nerveux. Les influx nerveux régulent les contractions musculaires et les libérations d'hormones par les glandes du système endocrinien tandis que les hormones agissent sur presque tous les tissus de l'organisme. Contrairement aux neurotransmetteurs libérés rapidement en réponse à un influx nerveux, les hormones sont libérées de manière lente, continue et diffuse. Les hormones libérées par les neurones sont appelées des neurohormones.

L'axe HPA (hypothalamic pituitary adrenal) est activé suite à un stress via des transporteurs sanguins, des signaux neurosensoriels et musculaires, ou via les cytokines libérées au niveau des sites d'inflammation, principalement l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Turnbull and Rivier, 1999). Lorsque l'axe HPA est activé, la libération de CRH (corticotropin releasing hormone, ou corticolibérine), peptide de 41 acides aminés synthétisés au niveau hypothalamique, induit la production d'ACTH (adreno corticotrophine hormone ou corticotropine) à partir de l'hypophyse. Le CRH agit en se fixant à ses récepteurs CRH-R1 et CRH-R2 (corticotropin releasing hormone receptor 1 et 2) et son action peut être modulée par la CRHBP (corticotropin releasing hormone binding protein). L'ACTH est un polypeptide de 39 acides aminés libéré par les cellules de l'hypophyse antérieure par hydrolyse de son précurseur, la POMC (pro-opiomélanocortine). Elle agit sur le cortex surrénalien et induit la libération de cortisol, principal glucocorticoïde endogène, qui possède des activités cataboliques et des effets immunosuppresseurs qui limitent donc l'inflammation médiée par l'immunité. L'élévation du taux de cortisol plasmatique ou l'administration de glucocorticoïdes de synthèse freine la libération de CRH et de l'ACTH. Le CRH joue donc un rôle important dans la réponse (comportementale, endocrine, immunitaire) de l'organisme au stress. Les urocortines (Ucns) 1, 2 et 3 sont des molécules proches du CRH avec des pourcentages d'homologie importants (45% pour l'Ucn 1). Elles sont donc appelées protéines « CRH-like ». Si CRH-R1 lie le CRH et l'Ucn 1, il ne lie pas les Ucns 2 et 3. D'autre part, CRH-R2 lie les trois types d'Ucns avec une affinité plus importante que pour CRH.

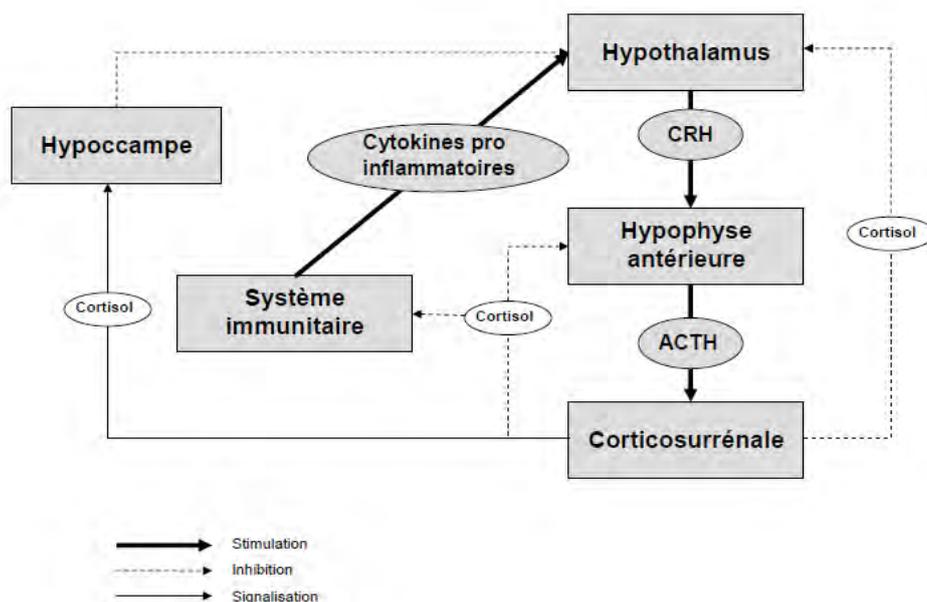


Figure 14. Physiologie des boucles de rétroaction au sein de l'axe HPA

### b) Le système CRH/CRH-R1 dans la peau

La peau est la principale barrière contre les stress environnementaux (rayonnements solaires, stress mécaniques, thermiques, biologiques). C'est donc un organe cible important pour de nombreux signaux neuroendocriniens qui permettent le maintien de l'homéostasie locale et globale, avec des activités tampon ou de restauration de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la peau. Les cellules de la peau produisent des hormones ainsi que leurs récepteurs (Slominski, 2005). Dans des circonstances normales, la réponse au stress systémique est active mais suite à des stress physiques ou émotionnels importants, cette activité augmente. Dans les organes périphériques, incluant la peau et ses appendices, on retrouve plusieurs composants de l'axe HPA tels que CRH, les peptides POMC et leurs récepteurs. La peau est capable de générer les mêmes médiateurs utilisés lors des réponses au stress systémique et est capable d'établir un équivalent périphérique de l'axe HPA totalement fonctionnel qui agit par des mécanismes para- ou autocrines pour des fonctions locales (Slominski *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007).

### **c) Le système CRH/CRH-R1 et l'acné**

Une susceptibilité de la peau au stress physiologique chronique ou aigu a été décrite dans de nombreuses pathologies cutanées comme l'acné. En effet, il est décrit que l'acné peut être déclenchée ou exacerbée chez les personnes souffrant de stress chroniques ou aigus (Chiu *et al.*, 2003). Le stress psycho-émotionnel ainsi que l'hyper prolifération de *P.acnes*, les constituants de la bactérie ou encore les produits qu'elle sécrète pourraient représenter un facteur de stress pour la peau et déclencher une réponse de l'axe HPA (O'Kane *et al.*, 2006). Il a déjà été montré que des neuropeptides comme CRH pouvaient être impliqués dans l'hyper sécrétion sébacée observée dans l'acné (Zouboulis *et al.*, 2002). Cela suggère que CRH pourrait être une hormone autocrine qui stimule la sécrétion sébacée. De plus, il est décrit que les molécules du système CRH sont surexprimées dans la peau de patients acnéiques (Ganceviciene *et al.*, 2009) et que, contrairement à son rôle indirect immunosuppresseur (effets anti-inflammatoires), CRH est capable de stimuler l'inflammation *in vitro* et *in vivo* de manière autocrine et paracrine (Karalis *et al.*, 1991; Webster *et al.*, 1998; Zbytek and Slominski, 2007), par exemple, via la dégranulation des mastocytes (Theoharides *et al.*, 2004; Theoharides *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 1998). De plus, il est décrit que CRH est capable d'augmenter la synthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol et d'interagir avec la testostérone et l'hormone de croissance (Slominski *et al.*, 2005), de moduler la prolifération (Slominski *et al.*, 2006) et la différenciation des kératinocytes (Zbytek and Slominski, 2005) et de stimuler le facteur NF- $\kappa$ B des kératinocytes (Zbytek *et al.*, 2004). Ainsi, de par les multiples rôles qu'il joue dans la peau, l'axe CRH/CRH-R1 pourrait être fortement impliqué dans le développement de l'acné (Ganceviciene *et al.*, 2008).

## **3. Le système IGF-1/IGF-1R**

### **a) Généralités**

Les IGFs (insulin-like growth factor) IGF-1 et IGF-2 sont des hormones ayant une structure comparable à celle de l'insuline. Majoritairement sécrétées par le foie, elles influencent le métabolisme cellulaire via leur récepteurs IGF-1R (insulin-like growth factor 1 receptor) et IGF-2R (insulin-like growth factor 2 receptor). Les IGF-BPs (insulin-like growth factor binding proteins), au nombre de 6, influencent la biodisponibilité des IGFs et diminuent leur signalisation. La production d'IGF-1 par le foie est stimulée par l'hormone de croissance (GH : growth hormone). L'axe GH-IGF, étroitement lié à l'axe HPA puisque la GH est

produite par l'hypophyse, joue un rôle important pour la physiologie de l'organisme. Il stimule notamment la prolifération cellulaire, la synthèse protéique, la migration cellulaire et inhibe l'apoptose. L'IGF-2 a une action plus spécifique que l'IGF-1 et joue un rôle surtout dans le développement précoce du fœtus, et le développement de certains organes comme le cerveau, le foie ou les reins. L'IGF-1, qui a une plus forte affinité que l'IGF-2 ou que l'insuline pour le récepteur IGF-1R (Hodak *et al.*, 1996), est nécessaire à toutes les cellules de l'organisme et en particulier aux cellules musculaires, du cartilage, de l'os, du foie, des reins, des poumons ou encore de la peau. L'IGF-2R se lie à l'IGF-2 avec une affinité plus importante que l'IGF-1 et ne se lie pas à l'insuline. Le taux d'IGF-1 circulant est modulé par de multiples facteurs tels que l'âge, le sexe, l'exercice, l'indice de masse corporelle, le stress, les facteurs génétiques, l'alimentation, certaines pathologies...

### **b) Le système IGF-1/IGF-1R dans la peau**

Comme tous les autres tissus de l'organisme, les cellules de la peau expriment l'IGF-1R et l'IGF-1 y joue un rôle important. Bien que l'IGF-1 soit majoritairement sécrété par le foie, d'autres tissus, incluant la peau, sont capables de le produire. Il a notamment été montré que l'IGF-1 est exprimé par les cellules endothéliales, les fibroblastes, les mélanocytes, les lymphocytes T infiltrant la peau, les kératinocytes ou encore les macrophages et qu'il est aussi exprimé au niveau du follicule pilo-sébacé (Hodak *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 2010; Tavakkol *et al.*, 1992; Tavakkol *et al.*, 1999). Si certaines études décrivent que l'IGF-1 n'est pas exprimé par les kératinocytes, notamment ceux de la couche basale (Tavakkol *et al.*, 1992) d'autres stipulent que cette hormone pourrait être exprimée par les kératinocytes plus différenciés (Rudman *et al.*, 1997). L'IGF-1 est l'un des facteurs de croissance les plus importants dans la peau et l'axe IGF-1/IGF-1R y joue un rôle fondamental. L'IGF-1 stimule la prolifération des sébocytes, kératinocytes *in vitro* (Barreca *et al.*, 1992; Krane *et al.*, 1991; Kratz *et al.*, 1992; Ristow and Messmer, 1988) et *in vivo* (Gilhar *et al.*, 1994) et inhibe leur apoptose (Koyama *et al.*, 2010; Thumiger *et al.*, 2005). Le système IGF-1/IGF-1R est nécessaire pour la prolifération kératinocytaire et le développement de l'épiderme et l'absence d'IGF-1R conduit à un épiderme fin anormal (Liu *et al.*, 1993). A l'inverse, une stimulation de l'axe IGF-1/IGF-1R permettrait d'accélérer les processus de cicatrisation (Etheredge *et al.*, 2009) et une surexpression de l'IGF-1 pourrait conduire à des anomalies de prolifération et de différenciation kératinocytaire (Stachelscheid *et al.*, 2008).

### c) Le système IGF-1/IGF-1R et l'acné

L'alimentation a toujours été considérée comme un facteur susceptible d'aggraver l'acné bien que peu de preuves soient disponibles dans la littérature (Davidovici and Wolf, 2010). Des études ont mis en évidence l'absence d'acné chez des populations « primitives » en contraste avec son extrême fréquence dans les pays développés (Cordain *et al.*, 2002) et de nombreuses études épidémiologiques ont pointé le lait, et particulièrement l'abondance des sucres à absorption rapide, de l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1), des androgènes et de la progestérone qu'il contient comme responsables de la haute prévalence de l'acné dans les pays riches (Adebamowo *et al.*, 2008; Berra and Rizzo, 2009; Melnik, 2009; Qin *et al.*, 2009). D'autre part, il est à noter que le taux d'IGF-1 est maximal pendant la puberté, période à laquelle l'acné est la plus sévère et des travaux démontrent une corrélation directe entre le taux sérique d'IGF-1 et la sévérité et/ou la persistance de l'acné chez des femmes (Aizawa and Niimura, 1995; Cappel *et al.*, 2005; Vora *et al.*, 2008). D'autre part, il a été décrit qu'un traitement à base d'IGF-1 recombinante chez des jeunes femmes conduisait au développement d'une acné associée à un hyper androgénisme et que ce problème cessait à l'arrêt du traitement (Klinger *et al.*, 1998). De plus, de par le rôle que l'axe IGF-1/IGF-1R joue sur la prolifération et la différenciation des kératinocytes du canal infundibulaire ainsi que sur l'inhibition de l'apoptose, il pourrait être impliqué dans l'hyper prolifération kératinocytaire qui conduit à la formation du microcomédon dans les étapes précoces du développement de l'acné. Enfin, l'axe IGF-1/IGF-1R joue aussi un rôle important au niveau du follicule pilo-sébacé (Rudman *et al.*, 1997). Il a en effet été décrit que cet axe pourrait stimuler la production de sébum par les sébocytes (Deplewski and Rosenfield, 2000; Smith *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2008) et la production d'androgènes (Melnik and Schmitz, 2009). Ainsi, une surexpression de l'IGF-1 par les cellules de la peau pourrait stimuler de manière paracrine les kératinocytes et sébocytes avoisinants, favorisant ainsi une hyper prolifération kératinocytaire et une hyper séborrhée et conduire au développement des lésions d'acné.

## **E. Élément trace : le zinc**

### **1. Rôles du zinc dans l'organisme**

Les oligo-éléments, ou éléments trace, jouent un rôle essentiel dans le développement de l'organisme et le maintien de son homéostasie. Leur déficit peut être à l'origine de lésions cutanées (Michaelsson and Ljunghall, 1990). Les oligo-éléments dont le déficit peut avoir un retentissement sur la peau sont le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse, le silicium et le lithium. A ce jour, c'est le zinc qui est l'oligo-élément le mieux connu. L'organisme humain contient environ 2 à 3g de zinc qui est présent dans tous les tissus, notamment dans les glandes surrénales, la peau, certaines zones du cerveau, le pancréas, la prostate. Le zinc a un rôle essentiel dans l'organisme puisqu'il agit à différents niveaux et joue un rôle dans la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines, dans les processus de division et de mort cellulaire, immunitaires, de guérison des blessures, de coagulation sanguine, de reproduction, de croissance ou encore le métabolisme de certaines hormones. Il joue aussi un rôle au niveau de l'humeur, de l'apprentissage, de la vue, du goût et de l'odorat. Il est décrit que des « zinc binding motifs » sont retrouvés dans plus de 10% des protéines codées par le génome humain (Andreini *et al.*, 2006). Les apports en zinc sont d'origine alimentaire et proviennent essentiellement des protéines d'origine animale. Les besoins journaliers sont variables suivant l'âge et sont normalement couverts par l'alimentation.

#### **a) Zinc et enzymes**

Le zinc est nécessaire à de nombreux processus enzymatiques vitaux au sein du corps humain (Berg and Shi, 1996). Il intervient dans l'activité de près de 300 enzymes et peut avoir un rôle catalytique, co-catalytique et/ou structural. Il est donc impliqué dans l'activité des enzymes clés de la synthèse et de la dégradation des acides nucléiques et des protéines (ADN et ARN polymérases, transcriptase reverse, ARN synthase, thymidine kinase...) et il est nécessaire à la stabilisation de la structure tridimensionnelle de près de 1000 facteurs de transcription (protéines « à doigts de zinc »). De par son action sur différentes enzymes, le zinc intervient dans le cycle cellulaire, les métabolismes glucidique et lipidique (Horrobin and Cunnane, 1980) et protège également les cellules des dommages induits par les radicaux libres puisqu'il

est un constituant des superoxyde dismutases Cu/Zn qui piègent les radicaux libres (Leccia *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 1993).

### **b) Zinc et membranes plasmiques**

Le zinc est un stabilisateur de membrane (Prasad, 1979). Il agit en contrôlant la structure et la fonction de certaines protéines membranaires telles que l'ATPase membranaire ou la phospholipase A2 (Chvapil, 1973).

### **c) Zinc et processus immunologiques**

Le zinc joue un rôle fondamental dans le système immunitaire et est un facteur de résistance aux maladies infectieuses, aux parasites, aux allergies ou encore aux maladies auto-immunes. L'acrodermatitis enteropathica est une maladie génétique autosomale récessive dans laquelle une mutation de la protéine intestinale Zrt/Irt-like empêche l'organisme de prélever le zinc au niveau intestinal. Cette sévère déficience en zinc chez les individus atteints a de graves conséquences immunologiques puisqu'elle entraîne une atrophie du thymus, une réduction du nombre de lymphocytes T et une altération de leur fonction. Enfin, il est à noter que, chez les sujets âgés, un déclin des fonctions immunitaires est souvent associé à une déficience en zinc et que celui-ci peut être partiellement restauré par une supplémentation en zinc. Tous ces éléments montrent que le zinc joue donc un rôle prépondérant dans les processus immunologiques de par son action sur le thymus, les polynucléaires et les lymphocytes T (Chvapil *et al.*, 1977; Crea *et al.*, 1990; Haase and Rink, 2009).

### **d) Zinc et hormones**

Le zinc intervient dans le métabolisme et module l'expression d'un grand nombre d'hormones : entre autres, les hormones thyroïdiennes, l'insuline, les androgènes, l'ACTH, la gustine, les glucocorticoïdes ou encore les oestrogènes (Cesur *et al.*, 2009; Jalali *et al.*, 2010; Pathak *et al.*, 2010).

## **2. Zinc et physiologie cutanée**

20% du zinc de l'organisme se trouve dans la peau, principalement sous la forme de métalloenzyme à zinc (Lansdown, 1996). La majorité du zinc cutané siège dans l'épiderme avec une concentration moyenne d'environ 60µg/g et est plus importante dans la couche

granuleuse (Michaelsson *et al.*, 1980). Une prise orale de zinc augmente cette teneur au bout de 72h (Dreno *et al.*, 1984).

### **a) Rôle du zinc dans l'épiderme**

Au niveau de l'épiderme, le zinc favorise la prolifération, la différenciation et la migration kératinocytaire (Tenaud *et al.*, 2000). L'efficacité des sels de zinc dans la cicatrisation peut s'expliquer par leur activité sur la prolifération des kératinocytes et la modulation des cytokines et intégrines kératinocytaires. De plus, le zinc joue un rôle dans l'apoptose des kératinocytes. En effet, il joue un rôle de cofacteur auprès de facteurs transcriptionnels intervenant dans l'apoptose cellulaire comme p53, et, le zinc étant un antagoniste du calcium, il empêche l'activation de l'endonucléase spécifique de l'apoptose. Enfin, les sels de zinc ont une activité anti-inflammatoire et c'est pourquoi ils sont utilisés pour le traitement de l'acné inflammatoire minime à modérée.

### **b) Rôle du zinc dans le derme**

Dans le compartiment dermique, le zinc stimule la prolifération fibroblastique et augmente la production de collagène et synthèse d'élastine par les fibroblastes (Mahoney *et al.*, 2009; Weismann, 1978).

### **c) Rôle du zinc dans la matrice extra-cellulaire**

Au niveau de la matrice extracellulaire, le zinc a une action co-enzymatique auprès de plusieurs métalloprotéases.

## **3. Zinc et acné**

Le zinc est utilisé depuis plusieurs années pour le traitement de l'acné inflammatoire minime à modérée et par voie systémique, le gluconate de zinc est utilisé car il a l'avantage d'une bonne biodisponibilité associée à une bonne tolérance digestive, ou par voie topique (sulfate de zinc). Il est décrit que le sérum et l'épiderme des patients acnéiques présentent des taux plus faibles en zinc que ceux des sujets sains (Amer *et al.*, 1982; Michaelsson and Ljunghall, 1990; Nasiri *et al.*, 2009).

### **a) Activité anti-inflammatoire du zinc**

Les sels de zinc sont principalement utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires (James *et al.*, 2009; Stephan and Revuz, 2004). Le zinc a une activité anti-inflammatoire au niveau de la peau qui fait intervenir plusieurs mécanismes : l'inhibition du chimiotactisme des polynucléaires (Dreno *et al.*, 1992), l'inhibition de l'expression de TLR-2 par les kératinocytes (Jarrousse *et al.*, 2007b), l'inhibition de la production de certaines cytokines kératinocytaires pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Sainte-Marie *et al.*, 1998), l'inhibition de l'expression de certaines intégrines kératinocytaires exprimées par l'épiderme des lésions inflammatoires cutanées telles que ICAM-1 et LFA-3 (Gueniche *et al.*, 1995; Tenaud *et al.*, 2000), l'induction de l'expression de la superoxyde dismutase intrakératinocytaire, enzyme intervenant dans l'élimination des radicaux libres (Coudray *et al.*, 1993) l'inhibition de l'activité des MMPs (Santos *et al.*, 2001), et la stimulation des cellules NK et l'activité de phagocytose des macrophages (Crea *et al.*, 1990).

### **b) Activité du zinc sur l'hyperséborrhée**

Il a été montré que le zinc est aussi capable de moduler l'expression de la 5- $\alpha$  réductase de type I qui intervient directement dans la transformation de la testostérone en dihydrotestostérone et qu'ils ont donc une activité anti-androgène. Ainsi, ils pourraient avoir la capacité de réduire l'hyper séborrhée retrouvée chez les patients acnéiques (Stamatiadis *et al.*, 1988; Sugimoto *et al.*, 1995). De plus, il a été montré que l'application topique d'acétate de zinc permettait de réduire la production de sébum (Pierard and Pierard-Franchimont, 1993).

### **c) Activité bactériostatique du zinc**

Enfin, il est décrit que le gluconate de zinc, de par son activité bactériostatique contre *P.acnes*, permet d'augmenter l'efficacité de l'érythromycine dans le traitement de l'acné inflammatoire, tout en diminuant les risques d'apparition de résistances bactériennes (Dreno *et al.*, 2005; Fluhr *et al.*, 1999).

## **F. Modèles cutanés**

### **1. Explants cutanés**

Les explants cutanés sont obtenus à partir de plasties abdominales. Ce sont des modèles de peaux saines qui comprennent à la fois le derme et l'épiderme. Ce modèle *ex vivo* est celui qui se rapproche le plus des conditions *in vivo*. En effet, dans les explants cutanés, les conditions physiologiques sont très proches de celles de la peau normale puisque les interactions entre les différents types cellulaires de l'épiderme et du derme sont conservées.

### **2. Kératinocytes normaux humains en monocouche (NHEK)**

Les cultures cellulaires de kératinocytes en monocouches sont obtenues à partir de fragments de peaux saines. Bien que les kératinocytes ne soient plus dans les conditions physiologiques de la peau, ce modèle permet toutefois d'étudier l'influence des modulateurs (extraits de *P.acnes*, molécules thérapeutiques) sur ce type cellulaire uniquement. Dans ce modèle, la totalité de la culture est constituée de kératinocytes au même stade de différenciation. Cette particularité rend ce modèle plus homogène que les explants cutanés. Dans l'ensemble des études il s'agit de kératinocytes peu différenciés (concentration en calcium dans le milieu de culture faible : 0,09mM), ce qui permet donc de modéliser les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme.

# Objectifs

Dans le projet fondamental, qui constituait la première partie de ce travail, le premier objectif était de déterminer les effets induits par la bactérie commensale *Propionibacterium acnes* sur la modulation des axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R dans la peau. Pour cela, nous avons utilisé, dans un premier temps, un modèle de culture d'explants cutanés *in vitro*, modèle proche des conditions *in vivo* afin d'étudier le rôle de la bactérie sur la peau totale. Puis, dans un second temps, nous avons utilisé des cultures de kératinocytes en monocouches issus de peaux saines afin d'étudier plus particulièrement les modulations qui pourraient exister au niveau des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. Des explants de peau saine et des kératinocytes ont été incubés avec deux extraits de *P.acnes* : une fraction membranaire (FM) de la bactérie et une fraction cytosolique (SA). Ces deux extraits ont été obtenus par lyse de la bactérie après plusieurs cycles de congélation / décongélation et de traitements aux ultrasons, suivie d'une centrifugation. Ces modèles avaient déjà été utilisés au laboratoire et avaient permis de montrer que l'expression des intégrines  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ , et  $\alpha V\beta 6$  et de la filaggrine était stimulée par *P.acnes* au niveau des explants cutanés et des monocouches de kératinocytes (Jarrousse et al., 2007a). D'autre part, ces mêmes extraits bactériens avaient permis de montrer que l'expression par les kératinocytes en monocouche de TLR-2, TLR-4 et MMP-9 ainsi que le facteur de prolifération Ki-67 étaient stimulés par *P.acnes* (Jugeau et al., 2005). L'objectif de ce premier axe était donc d'étudier les potentiels effets de cette bactérie sur deux axes récemment évoqués dans la pathologie de l'acné : l'axe CRH/CRH-R1 et l'axe IGF-1/IGF-1R.

Le second objectif du projet fondamental était de déterminer les effets modulateurs du gluconate de zinc, utilisé comme traitement de l'acné inflammatoire, sur ces modulations, et plus particulièrement son action préventive. En effet, les effets préventifs du zinc sur l'inhibition de l'expression du TLR-2 ont déjà été mis en évidence sur notre modèle (Jarrousse et al., 2007b). Enfin, des études immunohistochimiques *in vivo* nous ont permis de comparer l'expression des protéines des axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R entre des peaux saines et des peaux pathologiques d'acné.

Le projet pharmacologique a constitué la seconde partie de ce travail. Cette étude a consisté à évaluer l'efficacité d'une molécule à visée anti-acnéique des laboratoires Pierre Fabre,

l'APRC11, sur les kératinocytes. Pour cela, le modèle de culture de kératinocytes en monocouches stimulés par la fraction FM de *P.acnes*, a été utilisé. L'efficacité préventive de la molécule APRC11 a ensuite été évaluée par l'étude des modulations qu'elle induisait sur différentes cibles de l'immunité innée dont les expressions étaient stimulées par *P.acnes*. En parallèle de l'APRC11, l'efficacité du gluconate de zinc ainsi que celle du rétinaldéhyde (RAL), molécule utilisée dans les formulations Fabre de l'axe acné, ont été testées en suivant le même protocole et leur efficacité respective a été comparée.

# Résultats

## **A. Première partie : Rôle de *Propionibacterium acnes* dans la modulation de l'expression d'hormones cutanées et effets modulateurs du zinc**

### **1. Rôle de *P.acnes* dans la modulation de l'axe CRH/CRH-R1 et effets modulateurs du zinc**

#### **a) Etude des effets de *P.acnes* sur l'expression de CRH dans l'épiderme et effet modulateur du zinc**

##### ***(1) Objectifs***

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la potentielle influence de *P.acnes* sur l'expression de CRH, particulièrement au niveau de l'épiderme. D'autre part, nous avons souhaité évaluer le possible effet modulateur du gluconate de zinc sur l'expression de cette hormone.

##### ***(2) Méthodologie***

Nous avons utilisé des explants cutanés de peau saine que nous avons incubés en présence de deux extraits de *P.acnes* : la fraction membranaire (FM) qui contient les protéines de la paroi de la bactérie telles que le peptidoglycane (PTG) ou les acides téichoïques (TA) et lipotéichoïques (LTA), et un surnageant A (SA) contenant les protéines cytosoliques de la bactérie. En parallèle, les effets du lipopolysaccharide (LPS) de *E.coli* et gluconate de zinc seul sur la sécrétion de CRH ont été évalués dans l'épiderme. Une analyse en immunohistochimie a été réalisée.

### **(3) Résultats**

Dès 3h d'incubation, nous avons observé que les extraits de *P.acnes* induisaient une augmentation de l'expression du CRH dans l'épiderme des explants de peau saine. Cet effet était plus important avec la fraction membranaire de *P.acnes* FM qu'avec la fraction cytosolique SA ou qu'avec le LPS. De plus, nous avons noté une régulation négative du taux épidermique basal de CRH par le gluconate de zinc. Ces résultats ont été présentés dans un premier article.

**b) Article 1: Cutaneous induction of Corticotropin  
Releasing Hormone by Propionibacterium acnes  
extracts**

**Dermato-Endocrinology 1:2, 96-99; March/April 2009; ©2009 Landes Bioscience**

Isard O, Knol AC, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charvéron M, Dréno B

## Special Focus Report

# Cutaneous induction of corticotropin releasing hormone by *Propionibacterium acnes* extracts

Olivia Isard,<sup>1</sup> Anne-Chantal Knol,<sup>1</sup> Nathalie Castex-Rizzi,<sup>3</sup> Amir Khammari,<sup>1,2</sup> Marie Charveron<sup>3</sup> and Brigitte Dréno<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U892; Nantes, France; <sup>2</sup>Clinique dermatologique, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France; <sup>3</sup>Institut de Recherche Pierre Fabre, Laboratoire de Biologie Cellulaire Cutanée, Toulouse, France

**Abbreviations:** *P. acnes*, *Propionibacterium acnes*; *E. coli*, *Escherichia coli*; CRH, corticotropin releasing hormone; FM, membrane fraction; SA, supernatant A; Zn, zinc; LPS, lipopolysaccharide; Ctrl, control; HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal; ACTH, adrenocorticotropic hormone; POMC, proopiomelanocortin; CRH-R1, corticotropin receptor type 1; PSU, pilosebaceous unit; PBS, phosphate-buffered saline; TBS, tris-buffered saline; DMEM, dulbecco's modified eagle medium; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; IL-1 $\alpha$ , interleukin-1 alpha; IL-8, interleukin-8; TLR-2, toll-like receptor-2

**Key words:** acne, *Propionibacterium acnes*, stress, corticotropin releasing hormone, zinc

The skin commensal bacillus *Propionibacterium acnes* is known to play a major role in the development of acne vulgaris and it is established that this bacteria is involved both in the induction and maintenance of the inflammatory phase of acne. The corticotropin releasing hormone (CRH), a neuropeptide originally isolated from the hypothalamus, is also produced by the skin. CRH has been reported to play a role in the inflammation, the production of sebum and finally the differentiation of keratinocytes. At the therapeutic level, zinc is known to act specifically on inflammatory lesions with still partially known mechanisms and thus could play an important role in the development of inflammatory acne lesions. Our objective was to study the modulation of CRH expression by keratinocytes induced by *P. acnes* extracts. CRH expression was examined using immunohistochemistry technique on deep-frozen sections of normal human skin explants incubated with two different extracts of *P. acnes* and with or without zinc salts. We observed that the membrane fraction (FM) of *P. acnes* increased the CRH expression in the epidermis. This result indicates that *P. acnes*, by stimulating the production of CRH, can both modulate the differentiation of keratinocytes and increase the local inflammation, arguing that this bacterium plays a role not only in the development of inflammatory acne lesions but also in the formation of the microcomedo in the early stages of acne.

## Introduction

Acne vulgaris, the most common pathology of the skin, is a chronic inflammatory disease of the pilosebaceous unit (PSU). Several pathogenic factors such as ductal hypercornification, increased sebum production, abnormality of the microbial flora within the PSU and

secretion of mediators of inflammation contribute to the aetiology of this multifactorial disease.<sup>1</sup> Although *P. acnes* has been associated with acne, the precise mechanisms governing the development and progression of acne remain unclear.

In response to systemic stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is activated.<sup>2</sup> The process begins with the hypothalamic release of corticotropin releasing hormone (CRH) which stimulates the production of adrenocorticotropic hormone (ACTH) and other proopiomelanocortin (POMC) peptides via the activation of CRH receptor type 1 (CRH-R1). It was reported that ACTH is also produced outside the pituitary tissue, including the skin.<sup>3-6</sup> Interestingly it has been proposed that skin has an equivalent of the central HPA axis.<sup>5,7-10</sup> There is increasing evidence that the cutaneous nervous system modulates physiologic and pathophysiologic effects in the skin.<sup>11</sup> Although similar to its systemic equivalent, the cutaneous HPA axis is responsive to local stressors (solar, thermal, chemical, biological, etc.) and resultantly activates the neuronal, endocrine and immune systems in the skin.

As acne is obviously exacerbated under acute or chronic psychological stress<sup>11-13</sup> the role of CRH in this pathology appears as an important point in the development of lesions. In humans, CRH is synthesized among others by keratinocytes,<sup>14</sup> immune cells<sup>15</sup> and human mast cells<sup>16,17</sup> under the influence of a stress. Interestingly, CRH is also reported to play a role in the regulation of keratinocytes proliferation and differentiation representing an important step in the early stages of the development of acne lesions. Moreover CRH is known to act on inflammation by inducing the degranulation of mast cells, the release of inflammatory cytokines and the modulation of immune cells.<sup>18-20</sup> And finally CRH acts also on sebum production by promoting lipogenesis in human sebocytes and thus by increasing the seborrhoea.<sup>21,22</sup> Consequently, CRH could be strongly implicated in the development of acne.

Furthermore, several studies have underlined an important role of *P. acnes* in the pathophysiology of inflammatory lesions.<sup>23-29</sup>

In this context, we hypothesized that *P. acnes* is able to increase CRH expression by keratinocytes, representing a local stress in acne. We thus evaluated the modulation of CRH

\*Correspondence to: Brigitte Dréno, Department of Dermatology, CHU Hôtel Dieu, Place Alexis Ricardou, Nantes Cedex 01 44035 France; Tel.: 0033240062118; Fax: 0033240083117; Email: brigitte.dreno@wanadoo.fr

Submitted: 01/15/09; Accepted: 02/09/09

Previously published online as a *Dermatol Endocrinol* E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/dermatolendocrinology/article/8102>

expression in the epidermis induced by the microbial stressor *P. acnes*.

## Results

In all cases, we observed that the mean expression of CRH was moderate ( $1.25 \pm 0.50$ ) in control medium and was significantly increased ( $p < 0.05$ ) in presence of *P. acnes* FM ( $3.50 \pm 1.00$ ). However the slight overexpression detected in the presence of SA ( $1.75 \pm 0.96$ ) was not significant ( $p > 0.05$ ). This increased expression of CRH was observed after an incubation of three hours with *P. acnes* extracts.

Concerning LPS which is a proinflammatory substance, a slight increase ( $1.88 \pm 0.25$ ) in the expression of CRH was noted while zinc gluconate decreased this expression ( $0.50 \pm 0.50$ ) in comparison with the control medium, for all donors. However the modulations observed were not significant (Figs. 1 and 2).

## Discussion

In the present work, we demonstrate that *P. acnes* stimulates the production of CRH by keratinocytes. In addition we observe that zinc gluconate used in inflammatory acne decreases the epidermal CRH production.

Concerning *P. acnes* extracts, the stimulating effect is specifically obtained with FM and not with SA. While FM contains *P. acnes* membrane components, in particular peptidoglycan and lipoteichoic acid, Supernatant A (SA) contains only cytosolic proteins. Our result thus confirms that the CRH overexpression is mediated by at least one component of FM, suggesting that *P. acnes* acts on the CRH production through a direct contact with keratinocytes membranes. Notably, the induction of CRH in the presence of FM is more important than this obtained in the presence of LPS which is considered as a reference among proinflammatory substances.

It is widely accepted that inflammatory acne may be mainly mediated by different factors secreted by *P. acnes*, such as lipases which induce the liberation of proinflammatory free fatty acids from sebum.<sup>30,31</sup> Recently, it has also been described that *P. acnes* triggers anti-microbial peptide and cytokine secretion of keratinocytes in vitro.<sup>23–25</sup> *P. acnes*, itself, is able to induce cytokines-like such as TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  and IL-8.<sup>26,27</sup> Moreover the genome sequence of *P. acnes* is known to encode many factors that may have inflammatory potential.<sup>28</sup> But, recently it has also been shown that *P. acnes* was able to induce keratinocytes proliferation and filaggrin expression by keratinocytes,<sup>29</sup> indicating that this bacterium could play a role not only in the development of inflammation in acne lesions but also in the formation of the comedo.

The role of zinc salts has already been reported in several studies and beneficial effects were described on inflammatory lesions in mild to moderate acne. It has been shown until now that its anti-inflammatory activity has different targets.<sup>32</sup> Indeed zinc acts via an inhibition of polynuclear cells chemotaxis.<sup>33</sup> The anti-inflammatory effects of zinc could be attributed to its ability to decrease TNF $\alpha$  and IL-6 production<sup>34,35</sup> or to inhibit TLR-2 expression by keratinocytes.<sup>36</sup> The modulation of integrins expression by zinc is

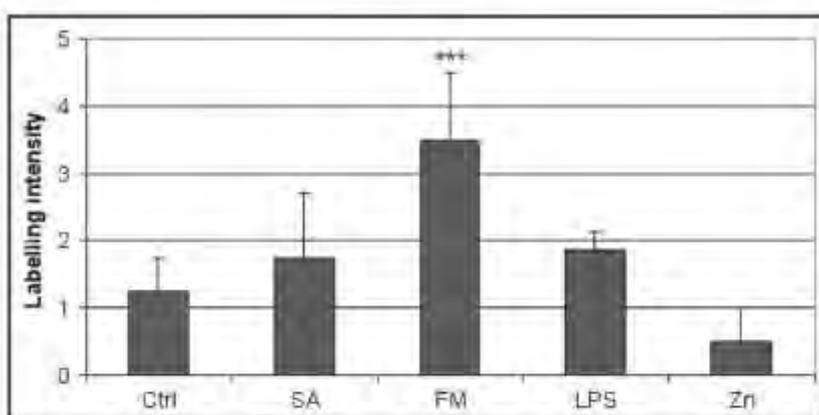


Figure 1. Evaluation of the expression of corticotrophin-releasing hormone in the epidermis of 4 donors after an incubation of 3 hours in the presence of Medium (Ctrl), SA (*P. acnes* supernatant A), FM (*P. acnes* membrane fraction), LPS (*E. coli* Lipopolysaccharide), Zn (Zinc Gluconate) (scale: null labelling (0), very weak labelling (1), weak labelling (2), moderate labelling (3), strong labelling (4) and very strong labelling (5)). (\*\*\*)  $p$  value  $< 0.05$ .

also described.<sup>37,38</sup> At the same time, zinc is known to have a direct influence on *P. acnes* development by its antimicrobial activities<sup>39</sup> and its ability to reduce the resistance of *P. acnes* strains to erythromycin.<sup>40</sup> Finally, zinc is also able to modulate the 5 $\alpha$ -reductase, a key enzyme implicated in the transformation of testosterone leading to an exacerbated seborrhoea.<sup>41</sup> By these many actions, zinc is able to improve inflammatory acne. In this study, we suggest another mechanism by which zinc salts could be able to improve acne by decreasing the epidermal CRH expression. The fact that the modulation observed with zinc salts was not significant can be mainly due to the low level of basal CRH production in skin control but interestingly the decreased expression of CRH was noted for all the four donors studied. Moreover, the model used was very close to in vivo. In this context, zinc salts could represent a potential new way to counteract acne by targeting CRH.

The potential interest of CRH in acne was recently suggested by the discovery of an overexpression of CRH in the PSU.<sup>21</sup> Indeed, CRH has been reported to play several roles potentially strongly implicated in the development of acne lesions. First, as CRH was reported to promote lipogenesis in human sebocytes and thus to increase the seborrhoea, it could represent a key factor in the development of acne.<sup>21,22</sup> Moreover, CRH is also known to act as a growth factor in the skin by activating the CRH-R1. CRH is thus described as an activator of keratinocytes differentiation.<sup>42</sup> It is also an inhibitor of the early and late apoptosis of many skin cell types such as keratinocytes, dermal fibroblasts and melanocytes.<sup>43</sup> Finally CRH has also a pro-inflammatory activity.<sup>18</sup> Interestingly, it was suggested that CRH could act as a local endocrine mediator that enhances inflammatory responses to bacterial antigens.<sup>44</sup>

In this study, we demonstrate for the first time that *P. acnes* acts as a strong local stressor at the origin of CRH overexpression by keratinocytes, in the epidermis. Thus, as CRH modifies the differentiation of keratinocytes, we confirm that this bacterium has a spectrum of action, not limited to inflammation but also in the early stages of the formation of acne lesions.<sup>29</sup> This confirms the fundamental role played by this bacterium which can be detected as a local

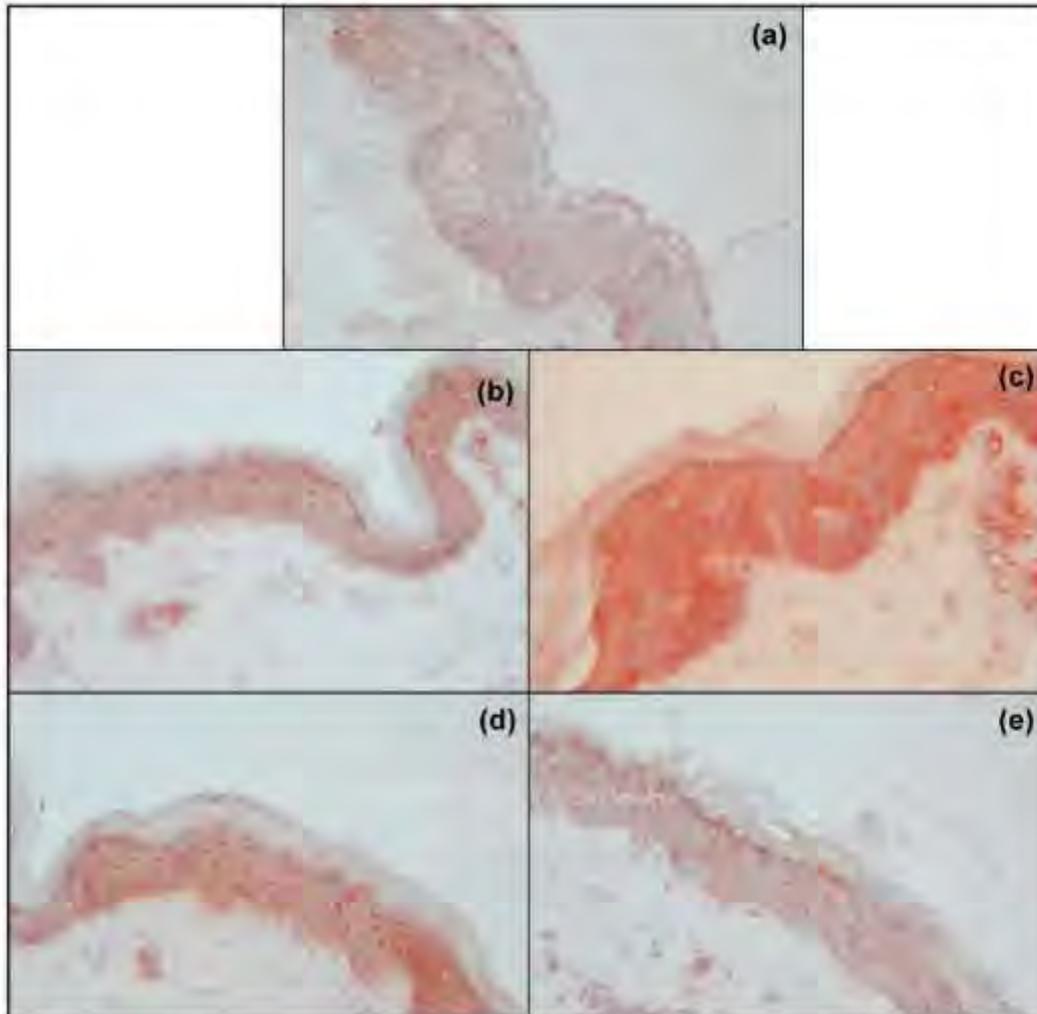


Figure 2. Detection of the expression of corticotropin-releasing hormone in the skin after an incubation of three hours in the presence of Medium (Ctrl) (A), SA (*P. acnes* supernatant A) (B), FM (*P. acnes* membrane fraction) (C), LPS (*E. coli* Lipopolysaccharide) (D), Zn (Zinc Gluconate) (E). (Magnification x40).

stressor by the skin and could potentially lead to the development of acne lesions.

In conclusion, CRH represents a new target for *P. acnes* in the formation of both retentional and inflammatory lesions. Zinc gluconate seems to be able to decrease the production of CRH by keratinocytes, thus explaining its role in the improvement of acne. But this point has to be confirmed by further studies.

### Materials and Methods

**Bacterial extracts.** Two extracts of *P. acnes* IP53113T (Pierre Fabre, Toulouse, France) were made available to us. The strain was first described in 1968. The membrane fraction (FM) contained peptidoglycan and lipoteichoic acid. Supernatant A (SA) contained cytosolic proteins. The membrane fractions of the bacteria were resuspended in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

LPS extracted from *E. coli* 0111:B4 (Sigma, St. Louis, USA), was reconstituted in PBS (Phosphate-Buffered Saline). As LPS is a

pro inflammatory substance, it was used as positive control of the inflammation. LPS was diluted in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich) medium with a final concentration of 1 µg/mL and incubated with cutaneous explants.

**Trace element.** As zinc salts are an anti inflammatory treatment of acne lesions it was used as negative control. Zinc gluconate (Labcatal, Montrouge, France), was diluted in DMEM with a final zinc concentration of 1 µg/mL and incubated with cutaneous explants.

**Skin explants technique.** Punches (4 mm in diameter) from abdominal skin of 6 healthy donors, considered as an healthy skin model, were incubated at 37°C in a moist atmosphere in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for 3, 6 or 24 hours in DMEM. The medium contained *P. acnes* extracts at the following concentrations: FM 1/2 or SA 1/5 or Zn 1 µg/mL. Medium alone was used as a control. After incubation of 3, 6 or 24 h, explants were removed from the culture medium and frozen at -80°C.

**Immunoperoxidase.** Sections (5 µm thick) were then cut with a cryostat, fixed in acetone at 4°C for 10 min and frozen at

-20°C. The non-specific sites were saturated for 30 min with TBS (Tris-Buffered Saline) 0.05% Tween20 w/v (Sigma-Aldrich), 0.1% BSA w/v (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich). CRH was detected with an immunoperoxidase technique, using PBS for dilution and TBS for washes. The rabbit anti-CRH Serum (1/50) (Phoenix Pharmaceuticals, Strasbourg, France) was deposited upon the slides for one hour in a humid environment at room temperature. Rinses of 10 min were made between each stage using TBS, 0.1% BSA, 0.1%. The slides were incubated successively with a secondary biotinylated antibody (DAKO ChemTek detection kit peroxidase/AEC, Rabbit/Mouse, Trappes, France) (30 min) and streptavidin coupled with peroxidase (30 min). Reaction was stopped with distilled water (10 min) and counter-staining was done with Mayer haemalun (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) for about two minutes. Slides were rinsed with distilled water, and mounted in an aqueous medium. The control section included omission of primary antibody. Two different examiners read the slides. Labelling intensity was scored on a five-point scale: null labelling (0), very weak labelling (1), weak labelling (2), moderate labelling (3), strong labelling (4) and very strong labelling (5).

**Statistical analysis.** CRH protein levels were expressed as the mean  $\pm$  SD. To determine the differences among all experimental groups (Ctrl, SA, FM, LPS, Zn), a Kruskal-Wallis test was performed, followed by Dunnnett's test to isolate the group(s) that differed from the control group. Significance for stimulating effects of SA, FM, LPS or Zn compared with controls, was assessed at the p-value <0.05.

#### Acknowledgements

We thank Pierre Fabre Dermatologie laboratories for their financial support. Zinc Gluconate was kindly provided by Labcatal laboratories.

#### References

- Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, et al. What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol* 2005; 14:143-52.
- Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995; 332:1351-62.
- Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, et al. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: Regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1313:130-8.
- Wakamatsu K, Graham A, Cook D, Thody AJ. Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor. *Pigment Cell Res* 1997; 10:288-97.
- Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev* 2000; 80:979-1020.
- Ito N, Ito T, Krommings A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, et al. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol. *FASEB J* 2005; 19:1332-4.
- Slominski A, Mihm MC. Potential mechanism of skin response to stress. *Int J Dermatol* 1996; 35:849-51.
- Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, et al. Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin and CRH receptors. *FASEB J* 2001; 15:1678-93.
- Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J. Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 2004; 145:941-50.
- Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, Paus R. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 266:143-9.
- Zouboulis CC, Bohm M. Neuroendocrine regulation of sebocytes—A pathogenetic link between stress and acne. *Exp Dermatol* 2004; 13:31-5.
- Kraus SJ. Stress, acne and skin surface free fatty acids. *Psychosom Med* 1970; 32:503-8.
- Koo JY, Smith LL. Psychologic aspects of acne. *Pediatr Dermatol* 1991; 8:185-8.
- Slominski A, Ermak G, Mazurkiewicz JE, Baker J, Wortsman J. Characterization of corticotropin-releasing hormone (CRH) in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1020-4.
- Karalis K, Muglia LJ, Bae D, Hilderbrand H, Majzoub JA. CRH and the immune system. *J Neuroimmunol* 1997; 72:131-6.
- Slominski AT. Proopiomelanocortin signaling system is operating in mast cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126:1934-6.
- Kalantaridou S, Makriganakis A, Zoumakis E, Chrousos GP. Peripheral corticotropin-releasing hormone is produced in the immune and reproductive systems: Actions, potential roles and clinical implications. *Front Biosci* 2007; 12:572-80.
- O'Kane M, Murphy EP, Kirby B. The role of corticotropin-releasing hormone in immune-mediated cutaneous inflammatory disease. *Exp Dermatol* 2006; 15:143-53.
- Theoharides TC, Donegan JM, Papadopoulos N, Cao J, Kempuraj D, Conti P. Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25:563-8.
- Theoharides TC, Kalogeromitros D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1088:78-99.
- Ganceviciene R, Graziene V, Fimmel S, Zouboulis CC. Involvement of the corticotropin-releasing hormone system in the pathogenesis of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 2008.
- Zouboulis CC, Seltmann H, Hirai N, Chen W, Young M, Oeff M, et al. Corticotropin-releasing hormone: An autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:7148-53.
- Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Szell M, Urban E, Kemeny L. Distinct strains of *Propionibacterium* acnes induce selective human  $\beta$ -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol* 2005; 124:931-8.
- Schaller M, Loewenstein M, Bonelli C, Jacob K, Vogeser M, Burgdorf WH, et al. Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with *Propionibacterium* acnes and coproporphyrin III. *Br J Dermatol* 2005; 153:66-71.
- Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, Jarrousse V, Quecux G, Khammari A, et al. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium* acnes. *Br J Dermatol* 2005; 53:1105-13.
- Vowels BR, Yang S, Leyden JJ. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium* acnes: Implications for chronic inflammatory acne. *Infect Immun* 1995; 63:3158-65.
- Graham GM, Farrar MD, Cruse-Sawyer JE, Holland KT, Ingham E. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium* acnes and *P. acnes* GroEL. *Br J Dermatol* 2004; 150:421-8.
- Beuggemann H, Henne A, Hofer F, Liesegang H, Wierer A, Strittmatter A, et al. The complete genome sequence of *Propionibacterium* acnes, a commensal of human skin. *Science* 2004; 305:671-3.
- Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dreno B. Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium* acnes extracts on keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2007; 299:441-7.
- Zouboulis CC. Exploration of retinoid activity and the role of inflammation in acne: Issues dominating future directions for acne therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15:63-7.
- Farrar MD, Ingham E. Acne: Inflammation. *Clin Dermatol* 2004; 22:380-4.
- Dreno B, Moysé D, Alirezai M, Amblard P, Auffret N, Beylor C, et al. Multicenter randomized comparative double-blind controlled clinical trial of the safety and efficacy of zinc gluconate versus minocycline hydrochloride in the treatment of inflammatory acne vulgaris. *Dermatology* 2001; 203:135-40.
- Dreno B, Trossaert M, Boiteau HL, Litoux P. Zinc salts effects on granulocyte zinc concentration and chemotaxis in acne patients. *Acta Derm Venereol* 1992; 72:250-2.
- Gueniche A, Vac J, Lizard G, Charveron M, Schmitt D. Protective effect of zinc on keratinocyte activation markers induced by interferon or nickel. *Acta Derm Venereol* 1995; 75:19-23.
- Sainte-Marie I, Jumbou O, Tenaud I, Dreno B. Comparative study of the in vitro inflammatory activity of three nickel salts on keratinocytes. *Acta Derm Venereol* 1998; 78:169-72.
- Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dreno B. Zinc salts inhibit in vitro Toll-like receptor 2 surface expression by keratinocytes. *Eur J Dermatol* 2007; 17:492-6.
- Tenaud I, Sainte-Marie I, Jumbou O, Litoux P, Dreno B. In vitro modulation of keratinocyte wound healing integrins by zinc, copper and manganese. *Br J Dermatol* 1999; 140:26-34.
- Tenaud I, Leroy S, Chebassier N, Dreno B. Zinc, copper and manganese enhanced keratinocyte migration through a functional modulation of keratinocyte integrins. *Exp Dermatol* 2000; 9:407-16.
- Strauss JS, Stranieri AM. Acne treatment with topical erythromycin and zinc: effect of *Propionibacterium* acnes and free fatty acid composition. *J Am Acad Dermatol* 1984; 11:86-9.
- Dreno B, Foule P, Reynaud A, Moysé D, Habert H, Richet H. Effect of zinc gluconate on *propionibacterium* acnes resistance to erythromycin in patients with inflammatory acne: in vitro and in vivo study. *Eur J Dermatol* 2005; 15:152-5.
- Sugimoto Y, Lopez-Solache I, Labrie F, Luu-The V. Cations inhibit specifically type I 5 $\alpha$ -reductase found in human skin. *J Invest Dermatol* 1995; 104:775-8.
- Zbytek B, Pikula M, Slominski RM, Mysliwski A, Wei E, Wortsman J, Slominski AT. Corticotropin-releasing hormone triggers differentiation in HaCaT keratinocytes. *Br J Dermatol* 2005; 152:474-80.
- Slominski A, Zbytek B, Pisarchik A, Slominski RM, Zmijewski MA, Wortsman J. CRH functions as a growth factor/cytokine in the skin. *J Cell Physiol* 2006; 206:780-91.
- Zbytek B, Slominski AT. CRH mediates inflammation induced by lipopolysaccharide in human adult epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2007; 127:730-2.

## **c) Travaux complémentaires**

### ***(1) Objectifs***

Afin d'approfondir cette étude, nous avons comparé le taux d'expression de CRH et de son récepteur CRH-R1 *in vivo*, entre des peaux saines de dos et des lésions acnéiques de dos. Dans un second temps, nous avons aussi souhaité compléter le premier résultat que nous avons obtenu *in vitro*, qui indiquait la capacité de *P.acnes* à stimuler l'expression kératinocytaire de CRH, en étudiant les modulations que la bactérie pouvait induire au niveau de l'expression de son récepteur CRH-R1. Dans cette étude complémentaire nous avons également cherché à évaluer le potentiel effet préventif du gluconate de zinc dans l'induction de l'axe CRH/CRH-R1 par *P.acnes*. D'autre part, nous avons souhaité approfondir notre premier résultat en étudiant la sécrétion de CRH par les kératinocytes stimulés ou non par *P.acnes* et pré incubés ou non en présence de gluconate de zinc. Enfin, nous souhaitons vérifier l'ensemble des résultats obtenus au niveau protéique *in vitro* par une analyse des transcrits du CRH et du CRH-R1.

### ***(2) Méthodologie***

En ce qui concerne l'étude des deux cibles CRH et CRH-R1 *in vivo*, nous avons utilisé des biopsies de peaux saines de patients non acnéiques ainsi que de patients acnéiques et de lésions d'acné de dos afin d'évaluer, par immunohistochimie, le niveau d'expression de ces deux molécules.

Concernant l'étude *in vitro*, une analyse immunohistochimique a été menée sur des explants incubés avec les deux extraits de *P.acnes* (FM et SA) ou de LPS et l'expression de CRH et de CRH-R1 a été évaluée dans l'épiderme. Cette étude a été réalisée en présence ou en absence de pré-incubations avec le gluconate de zinc afin de déterminer l'éventuel effet préventif des sels de zinc dans l'induction de l'axe CRH/CRH-R1 par *P.acnes*. Cette seconde partie du travail a été complétée par une analyse en qPCR sur des monocouches de kératinocytes stimulés par la fraction membranaire de *P.acnes* en présence ou en absence de pré-incubations avec le gluconate de zinc. D'autre part, les taux de CRH, dans les surnageants des monocouches de kératinocytes, ont été analysés par dosage EIA (enzyme immunoassay).

### (3) Résultats

Tout d'abord, l'étude *in vivo* nous a permis de montrer par immunohistochimie, sur 4 donneurs, que CRH et CRH-R1 sont surexprimés, dans les lésions d'acné en comparaison à leur niveau basal d'expression en peau non lésée de patients acnéiques ou en peaux saines de patients non acnéiques. Cette observation a été notée pour l'ensemble des 4 donneurs étudiés. Le taux basal d'expression, en peau non lésée, était toujours faible pour CRH et CRH-R1 et celui-ci était toujours augmenté dans l'épiderme des lésions d'acné.

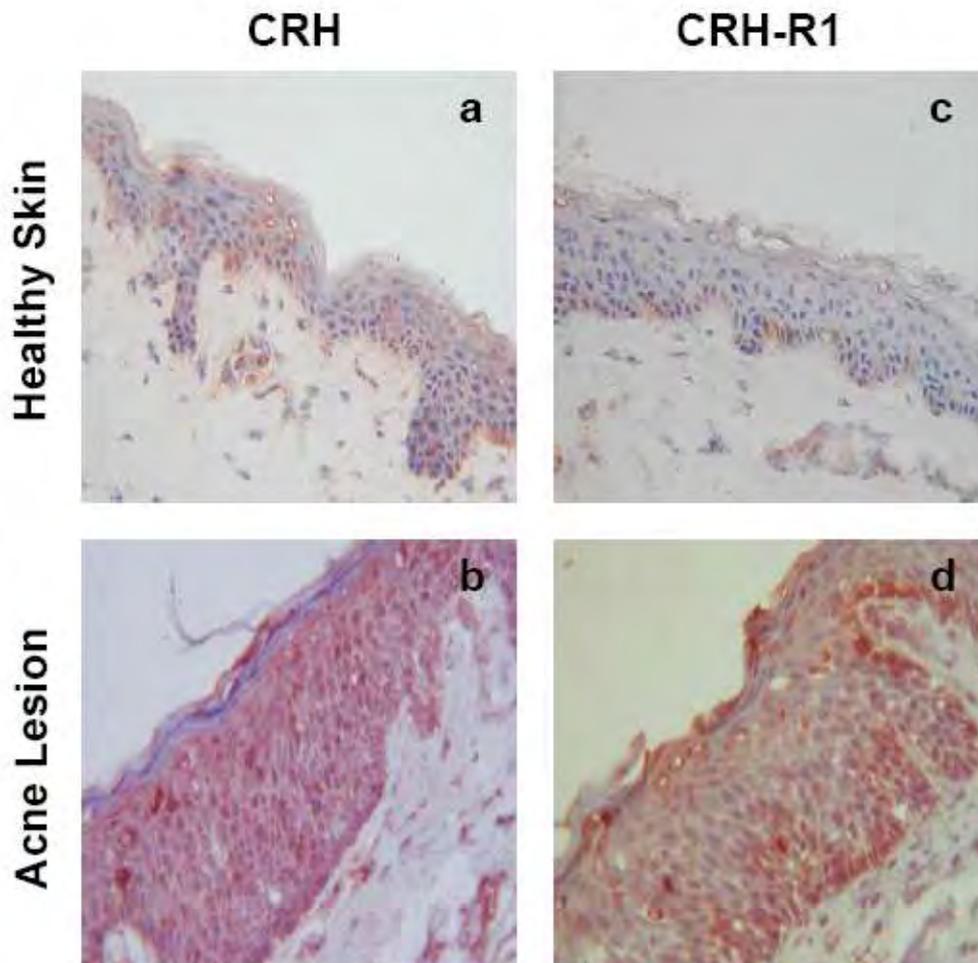


Figure 15. Expression de CRH (a,b) et de CRH-R1 (c,d) en zone non lésée de patient acnéique (a,c) et au niveau d'une papule d'acné (b,d). Grossissement x25

D'autre part, l'incubation d'explants cutanés de six donneurs sains avec les différents extraits de *P.acnes* nous a permis de confirmer que les deux extraits de *P.acnes*, et plus particulièrement l'extrait FM, est capable de stimuler l'expression de CRH de manière significative ( $p < 0,05$ ) et ce, dès 3h d'incubation. Parallèlement, le LPS induit une légère augmentation de l'expression de CRH mais celle-ci n'était significative qu'après 6h d'incubation. De plus, nous avons montré que la fraction FM induit aussi une augmentation de l'expression de CRH-R1 *in vitro* dans l'épiderme.

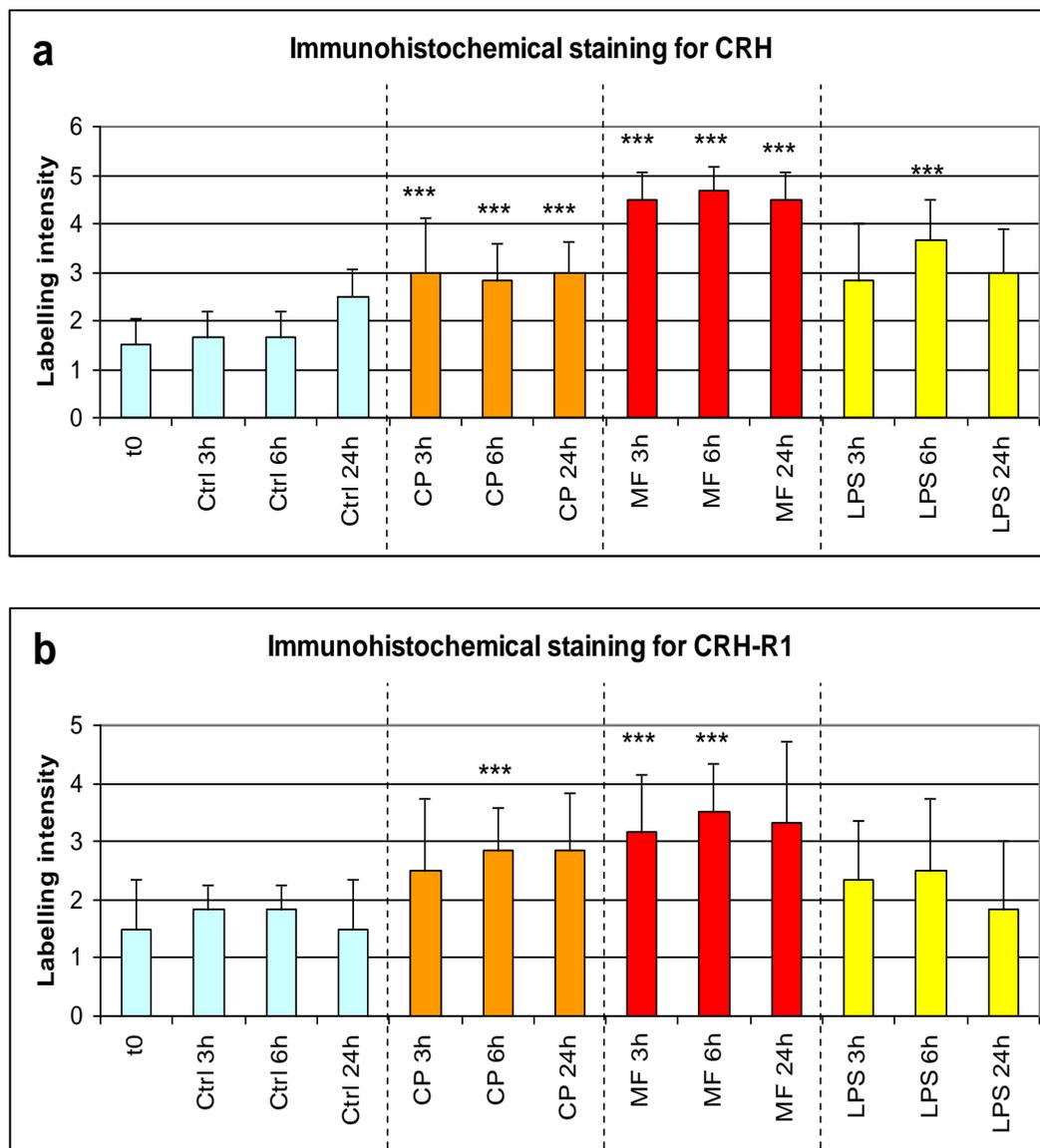


Figure 16. Niveaux d'expression de CRH (a) et de CRH-R1 (b) dans les explants de peaux saines de 6 donneurs incubés pendant 3h, 6h et 24h en présence de milieu seul (Ctrl), des extraits SA (CP) et FM (MF) de *P.acnes* et de LPS (modulations significatives  $***p < 0,05$ )

Nous avons observé que des pré-incubations avec le gluconate de zinc permettent de réduire ces surexpressions induites par FM. Les pré-incubations de 24h permettent de restaurer le niveau basal d'expression de CRH et de CRH-R1. Cependant, le gluconate de zinc présente déjà un effet régulateur significatif sur l'expression de CRH et de CRH-R1 dès 1h de pré-incubation.

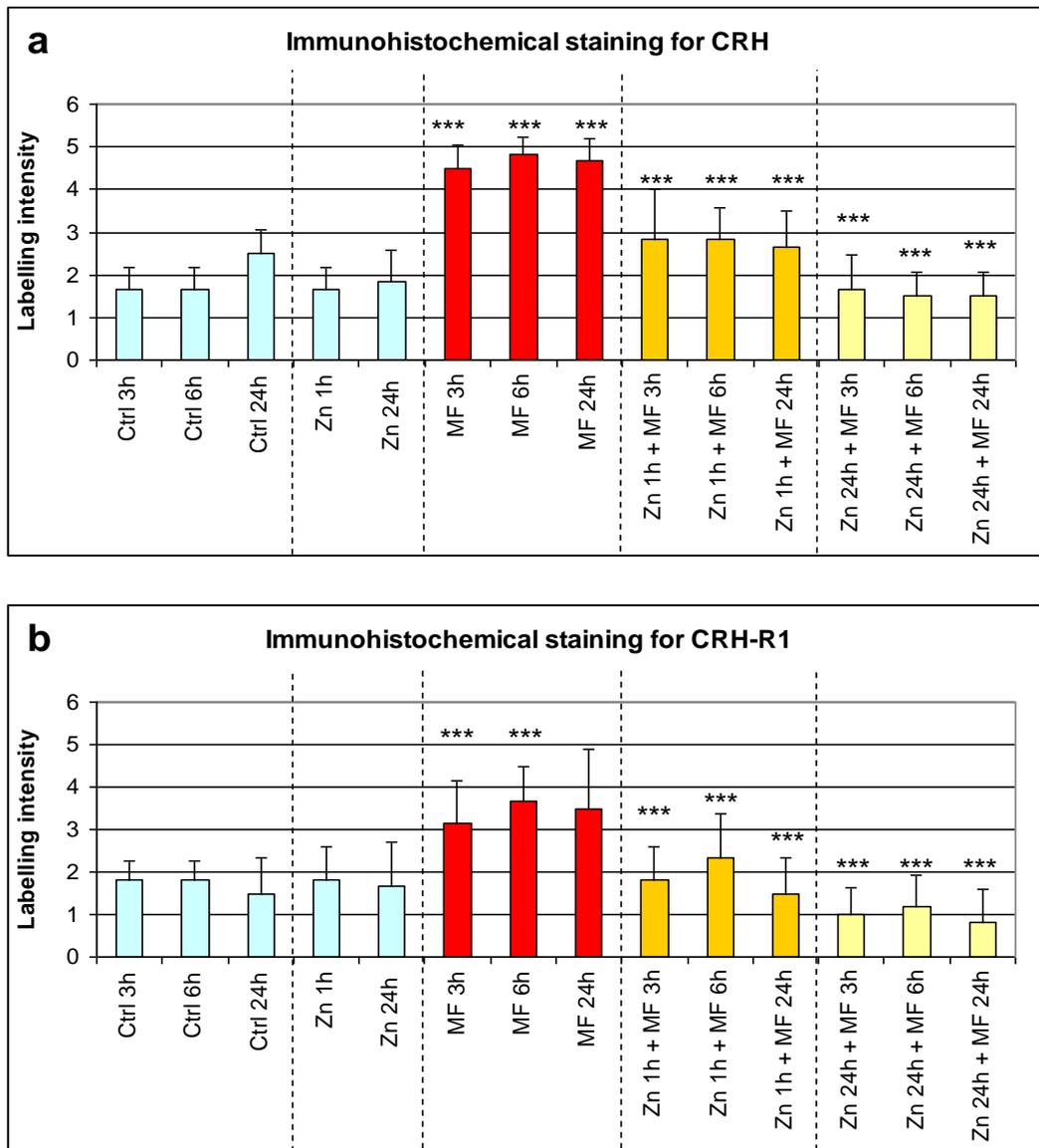


Figure 17. Niveaux d'expression de CRH (a) et de CRH-R1 (b) dans des explants de peaux saines de 6 donneurs incubés pendant 1h, 3h, 6h et 24h en présence du milieu seul (Ctrl), de l'extrait FM de *P.acnes* seul (MF), de gluconate de zinc seul (Zn) ou d'une pré-incubation d'1h ou de 24h en présence de gluconate de zinc, suivie d'une incubation en présence de MF (Modulations significatives : \*\*\* $p < 0,05$ )

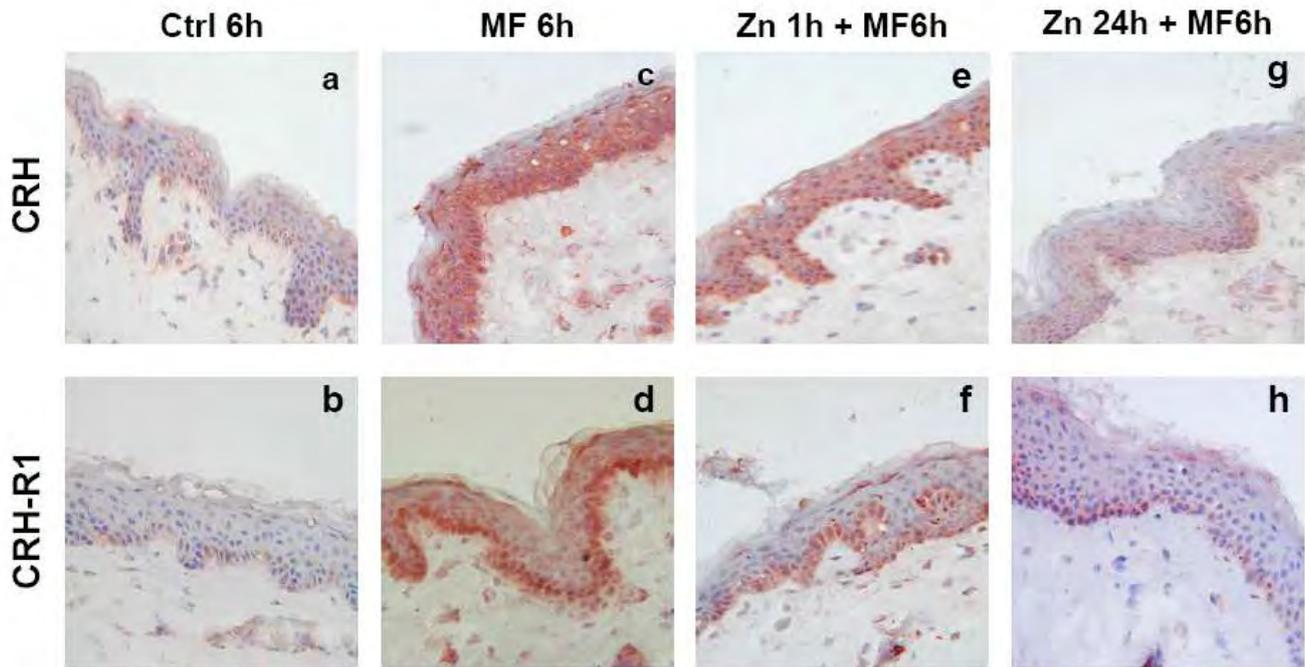


Figure 18. Expression de CRH (a, c, e, g) et de CRH-R1 (b, d, f, h) dans les explants de peaux saines après 6h d'incubation en présence de milieu seul (Ctrl) (a, b) ou de l'extrait FM de *P.acnes* seul (MF) (c,d), et après 1h (e, f) ou 24h (g, h) de préincubation avant l'ajout de FM pendant 6h

Enfin, concernant les expériences menées *in vitro* sur les monocouches de kératinocytes, nous n'avons pas détecté d'ARNm pour CRH quelle que soit la condition testée (avec ou sans stimulation par *P.acnes*, avec ou sans pré-incubation avec le gluconate de zinc). Pour CRH-R1, les taux d'ARNm détectés étaient très faibles et les faibles variations observées n'étaient donc pas interprétables. Ce résultat nous permet de conclure que CRH n'est pas exprimé et que CRH-R1 est peu exprimé par les kératinocytes peu différenciés, de la couche basale de l'épiderme. De plus, le dosage CRH en EIA dans les surnageants de culture (pourtant concentrés 10 fois), de ces mêmes kératinocytes était lui aussi négatif, ce qui nous permet de confirmer cette observation.

D'après notre étude, *P.acnes* stimulerait donc principalement l'expression de CRH et de CRH-R1 des kératinocytes des couches épineuse et granuleuse de l'épiderme et/ou des autres types cellulaires de l'épiderme tels que les mélanocytes ou encore les cellules de Langerhans.

Ces résultats confirment ceux d'une précédente étude dans laquelle le CRH n'était pas détecté dans les kératinocytes normaux humains en monocouches mais qu'il était exprimé par les mélanocytes (Slominski *et al.*, 1995). Dans une autre étude, le CRH était détecté dans les kératinocytes de la couche épineuse de l'épiderme et les mélanocytes à des taux relativement faibles en peaux saines (Kono *et al.*, 2001).

## **2. Rôle de *P.acnes* dans la modulation de l'axe IGF-1/IGF-1R et effets modulateurs du zinc**

### **a) Etude des effets de *P.acnes* sur l'axe IGF-1/IGF-1R et effets modulateurs du zinc**

#### ***(1) Objectifs***

Le premier objectif de ce travail était de comparer le niveau d'expression de l'IGF-1 et de l'IGF-1R entre la peau saine (peau de patient non acnéique et peau non lésée de patient acnéique) et la peau de lésée au niveau d'une papule d'acné. Nous avons aussi évalué l'état de prolifération et de différenciation des kératinocytes entre la peau saine et la peau pathologique. Le second objectif était d'étudier le rôle de *P.acnes* sur l'expression des molécules IGF-1 et IGF-1R, particulièrement au niveau de l'épiderme. Enfin, les modulations induites par le gluconate de zinc sur cet axe IGF-1/IGF-1R ont été évaluées.

#### ***(2) Méthodologie***

Afin de comparer le niveau d'expression de nos différents marqueurs d'intérêt entre la peau saine et la peau pathologique, nous avons étudié, par immunohistochimie, l'expression de l'IGF-1 et de son récepteur IGF-1R ainsi que du Ki-67 et de la filaggrine entre des biopsies de peaux saines, de peau non lésée de dos de patients acnéiques et de papules d'acné de dos.

La seconde partie du travail a consisté à incuber des explants de peaux saines avec les deux extraits de *P.acnes* (FM et SA) ou le LPS, en présence ou en absence de gluconate de zinc. Les niveaux d'expression cutanée de l'IGF-1 et de l'IGF-1R ont été évalués par immunohistochimie et le niveau de sécrétion de l'IGF-1 a été mesuré par dosage ELISA dans le surnageant de culture des explants cutanés. Enfin, une analyse en qPCR a été réalisée sur des monocouches de kératinocytes stimulés par la fraction FM de *P.acnes* en présence ou en absence de gluconate de zinc.

#### ***(3) Résultats***

Nous avons montré que, *in vivo*, comparativement aux peaux saines dans lesquelles les niveaux basaux d'expression sont plutôt faibles, l'IGF-1 et l'IGF-1R sont surexprimés dans

l'épiderme des peaux acnéiques. De plus, au niveau des lésions d'acné, cela s'accompagne d'une surexpression du marqueur de prolifération Ki-67 et d'une expression anormale de la filaggrine qui est étendue aux couches moins différenciées de l'épiderme.

D'autre part, nous avons montré que, *in vitro*, *P.acnes* est capable de stimuler l'expression de l'IGF-1 ainsi que de l'IGF-1R dans l'épiderme des peaux saines et que cet effet est particulièrement important après des incubations de 6h en présence de la fraction membranaire de *P.acnes*. Comme nous l'avons montré en ELISA, cela s'accompagne d'une sécrétion plus importante de l'IGF-1 dans le surnageant de culture des explants. De plus, des pré-incubations d'1h ou de 24h en présence de gluconate de zinc permettent de limiter ces surexpressions induites par *P.acnes* de manière significative. De manière remarquable, l'expression du Ki-67 et de la filaggrine sont toutes deux modulées de la même manière que l'IGF-1 et l'IGF-1R en présence des extraits de *P.acnes* et du gluconate de zinc. Enfin, si la qPCR sur monocouches de kératinocytes ne nous a pas permis de détecter la présence d'ARNm pour l'IGF-1, indiquant que cette protéine n'est pas exprimée par les kératinocytes peu différenciés, en revanche, l'ARNm de l'IGF-1R a été détecté et nous avons confirmé nos résultats précédemment décrits. En effet, après 6h d'incubation, la fraction membranaire de *P.acnes* stimule de manière significative la synthèse d'ARNm de l'IGF-1R par les kératinocytes et une pré-incubation de 24h permet de diminuer l'induction de cette surexpression. Par qPCR, nous avons observé que le LPS inhibe l'expression de l'IGF-1R par les kératinocytes peu différenciés mais cet effet n'était pas observé en immunohistochimie indiquant un rôle spécifique du LPS sur les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. Ces résultats ont fait l'objet d'un second article.

**b) Article 2: Propionibacterium acnes activates the IGF-1/IGF-1R system in the epidermis and improves keratinocytes proliferation**

**Manuscrit accepté pour publication dans le Journal of Investigative Dermatology**

**AUTHOR(S):** Isard O<sup>1</sup>, Knol AC<sup>1</sup>, Ariès MF<sup>4</sup>, Nguyen JM<sup>3</sup>, Khammari A<sup>1,2</sup>, Castex-Rizzi N<sup>4</sup>, Dréno B<sup>1,2</sup>

**INSTITUTION(S):**

<sup>1</sup> INSERM U892, 9 quai Moncousu 44093 Nantes cedex 01, France

<sup>2</sup> Unit of Dermato Oncology University Hospital, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, Cedex 1 France

<sup>3</sup> PIMESP Hôpital Saint Jacques CHU de Nantes, 85 rue Saint Jacques 44093 Nantes, Cedex 1 France

<sup>4</sup> Institut de Recherche Pierre Fabre, Laboratoire de Biologie Cellulaire Cutanée, Toulouse, France.

(✉) **Corresponding author:** Brigitte Dréno, Department of Dermato Oncology, CHU HOTEL DIEU, Place Alexis Ricordeau, 44035 NANTES Cedex 01, FRANCE

Phone: 0033240083118

Fax: 00 33 240083117

e-mail : brigitte.dreno@wanadoo.fr

**SHORT TITLE:** IGF-1/IGF-1R system activation by *P. acnes*

# *Propionibacterium acnes* Activates the IGF-1/IGF-1R System in the Epidermis and Induces Keratinocyte Proliferation

O Isard<sup>1</sup>, AC Knol<sup>1</sup>, MF Ariès<sup>2</sup>, JM Nguyen<sup>3</sup>, A Khammari<sup>1,4</sup>, N Castex-Rizzi<sup>2</sup> and B Dréno<sup>1,4</sup>

*Propionibacterium acnes* has a major role in the development of acne lesions. IGF-1 stimulates the proliferation of keratinocytes via an activation of IGF-1 receptor (IGF-1R). Zinc has been proven to work efficiently against inflammatory acne and to modulate the IGF-1 system. Our objectives were to study the modulation of IGF-1 and IGF-1R expression by *P. acnes* extracts and to determine their modulation by zinc gluconate. *In vivo*, we analyzed biopsies of acne lesions and healthy skin, and *in vitro* we used skin explants incubated with two *P. acnes* extracts—membrane fraction (MF) and cytosolic proteins—with or without zinc. IGF-1 and IGF-1R expression was evaluated using immunohistochemistry, and the IGF-1 production in supernatants was measured by ELISA. Then, IGF-1 and IGF-1R mRNA levels were analyzed using quantitative PCR on normal human epidermal keratinocytes (NHEKs). IGF-1 and IGF-1R were overexpressed in acne lesions. MF increased IGF-1 and IGF-1R expression in the epidermis of explants and was associated with an overexpression of both Ki-67 and filaggrin. Zinc had the effect of downregulating IGF-1 and IGF-1R levels. These observations were confirmed at the mRNA level for IGF-1R in NHEKs. These results demonstrate that *P. acnes* can induce the formation of comedo by stimulating the IGF/IGF-1R system. Moreover, zinc downregulates this pathway.

*Journal of Investigative Dermatology* (2010) 0, 000–000. doi:10.1038/jid.2010.281

## INTRODUCTION

Acne vulgaris is a common chronic inflammatory skin disease that affects the pilosebaceous follicle. Three main factors have been identified in the pathogenesis of acne. First, there is hyperproliferation and abnormal differentiation of follicular epithelium keratinocytes. Second, an excessive amount of sebum is produced by the sebaceous glands. Finally, there is inflammation induced by *Propionibacterium acnes* (Eichenfield and Leyden, 1991; Thiboutot, 1997; Zouboulis *et al.*, 2005).

*P. acnes* is a bacterium that not only induces an inflammatory reaction but also maintains it. By releasing lipases, *P. acnes* induces production of free fatty acids. It also secretes chemotactic factors (Vowels *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2005) and increases the secretion of proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,

and IL-8) from mononuclear cells and keratinocytes (Vowels *et al.*, 1995; Sugisaki *et al.*, 2009). *P. acnes* also induces the activation of Toll-like receptors-2 and -4 in keratinocytes (Jugeau *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2006). Furthermore, the *P. acnes* genome encodes many factors that may have inflammatory potential (Bruggemann *et al.*, 2004). It was recently reported that this bacterium also modulates keratinocyte proliferation and differentiation through an induction of filaggrin and integrin expression (Jarrousse *et al.*, 2007a), but the mechanism remains unknown.

There is increasing evidence suggesting the involvement of IGF-1 in acne. Recent studies describe a correlation between IGF-1 serum levels and the severity of acne in women (Aizawa and Niimura, 1995; Cappel *et al.*, 2005). IGF-1 serum levels also correlate directly with the amount of facial sebum in both men and women (Vora *et al.*, 2008). In the skin, IGF-1 induces keratinocyte proliferation *in vitro* (Ristow and Messmer, 1988; Krane *et al.*, 1991; Barreca *et al.*, 1992) and *in vivo* (Gilhar *et al.*, 1994; Valentinis and Baserga, 2001; Sadagurski *et al.*, 2006), and it induces lipid production in human sebocytes (Smith *et al.*, 2006). In addition, inhibition of IGF-1 receptor (IGF-1R) results in a thin abnormal epidermis (Liu *et al.*, 1993).

Several studies have reported beneficial effects of zinc salts on inflammatory lesions in mild to moderate acne (Dreno *et al.*, 1989; Michaelsson and Ljunghall, 1990; Schachner *et al.*, 1990; Meynadier, 2000). A link between zinc and the IGF-1 system has recently been reported in the

<sup>1</sup>INSERM U892, 9 Quai Moncoussu, Nantes, France; <sup>2</sup>Institut de Recherche Pierre Fabre, Laboratoire de Biologie Cellulaire Cutanée, Toulouse, France; <sup>3</sup>PIMESP Hôpital Saint Jacques CHU de Nantes, Nantes, France and <sup>4</sup>Unit of Dermato-Oncology, University Hospital, Nantes, France

Correspondence: B Dréno, Department of Dermato-Oncology, CHU Hôtel Dieu, Place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes Cedex 01, France.  
E-mail: brigitte.dreno@wanadoo.fr

Abbreviations: Ctrl, control; CP, cytosolic protein; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IGF-1R, IGF receptor 1R; IGFBP-3, IGF-binding protein-3; LPS, lipopolysaccharide; MF, membrane fraction; NHEK, normal human epidermal keratinocyte; *P. acnes*, *Propionibacterium acnes*

Received 8 April 2010; revised 23 July 2010; accepted 24 July 2010

downregulation of IGF-1R expression in prostate cancer cells (Banudevi *et al.*, 2010).

In this context, the aim of our work was first to study the *in vivo* IGF-1 and IGF-1R expression levels in the epidermis of inflammatory acne lesions as compared with healthy skin. Second, we investigated whether *P. acnes* was able to induce IGF-1R expression and IGF-1 secretion by keratinocytes. Finally, we evaluated the modulation of IGF-1 or IGF-1R by zinc gluconate.

## RESULTS

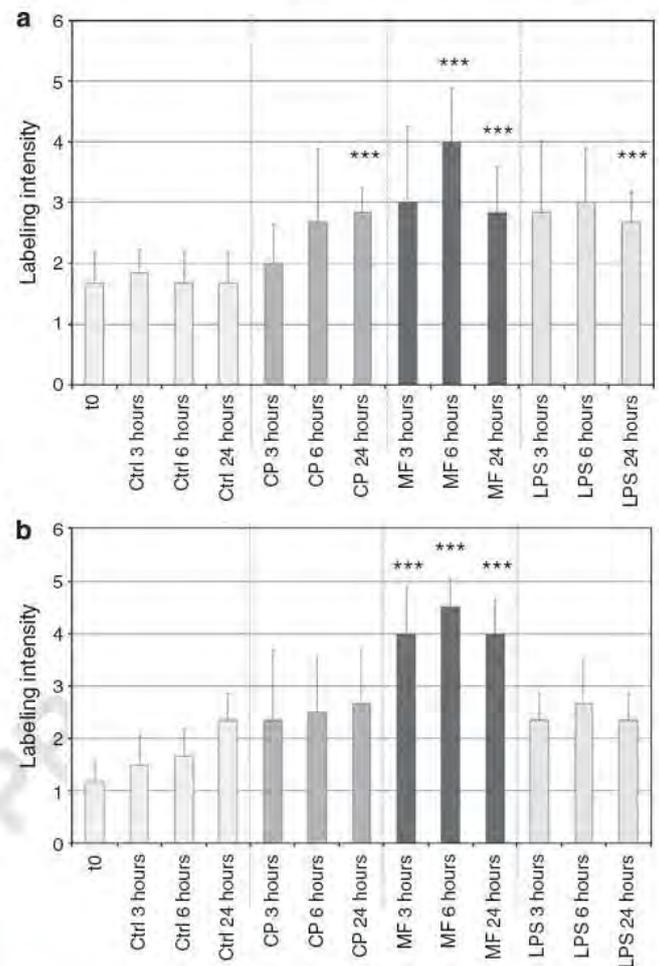
### *In vivo* expression of IGF-1, IGF-1R, Ki-67, and filaggrin in acne lesions and healthy skin

We analyzed three acne biopsies from the upper back (inflammatory papules) and three healthy skin biopsies from the same region. In all the acne biopsies, we observed a strong expression of IGF-1 (Figure 1b) and IGF-1R (Figure 1d) in the epidermis as compared with healthy skin (Figure 1a and c). In addition, Ki-67 expression was strongly increased in the basal layer of the epidermis of acne lesions (Figure 1f) as compared with healthy skin (Figure 1e). Moreover, filaggrin expression was extended from the stratum corneum to the suprabasal layers in the epidermis of inflammatory acne lesions (Figure 1h) as compared with healthy skin (Figure 1g).

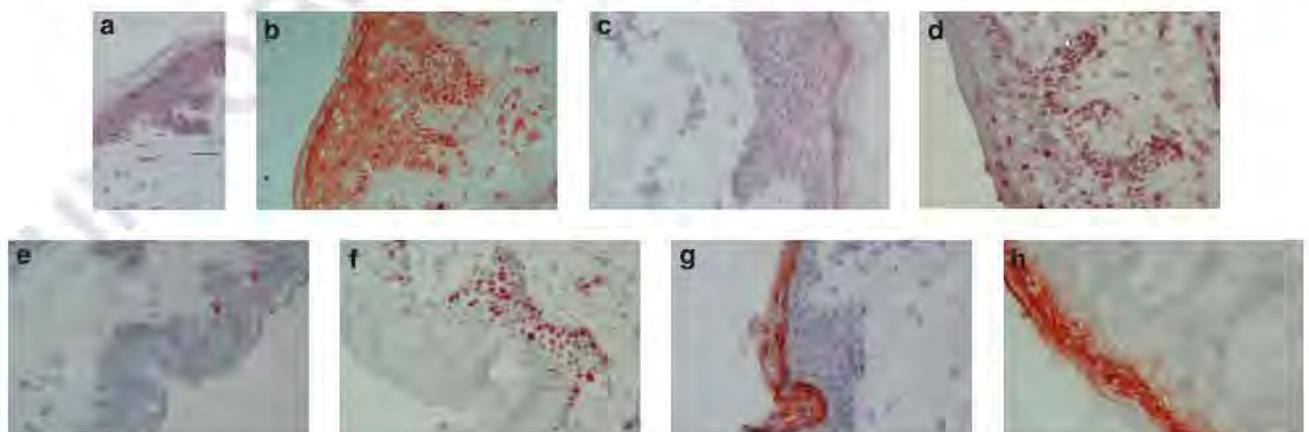
### *In vitro* modulation of IGF-1, IGF-1R, Ki-67, and filaggrin expression by *P. acnes* extracts

**IGF-1 and IGF-1R modulation by *P. acnes* extracts in cutaneous explants.** After we confirmed that expression of IGF-1 and IGF-1R was similar both in healthy abdominal and in healthy upper-back skin (data not shown), we used abdominal skin explants to evaluate the effects induced by *P. acnes* (Figures 2–4). After 3 hours, induction of IGF-1 expression in the epidermis was noted with both *P. acnes* membrane fraction (MF) and lipopolysaccharide (LPS), but it was not statistically significant as compared with the control (Ctrl) medium ( $P > 0.05$ ; Figure 2a and b). IGF-1R was significantly increased, up to  $4.00 \pm 0.89$  with *P. acnes* MF, as compared with the Ctrl medium  $1.50 \pm 0.55$  ( $P < 0.05$ ).

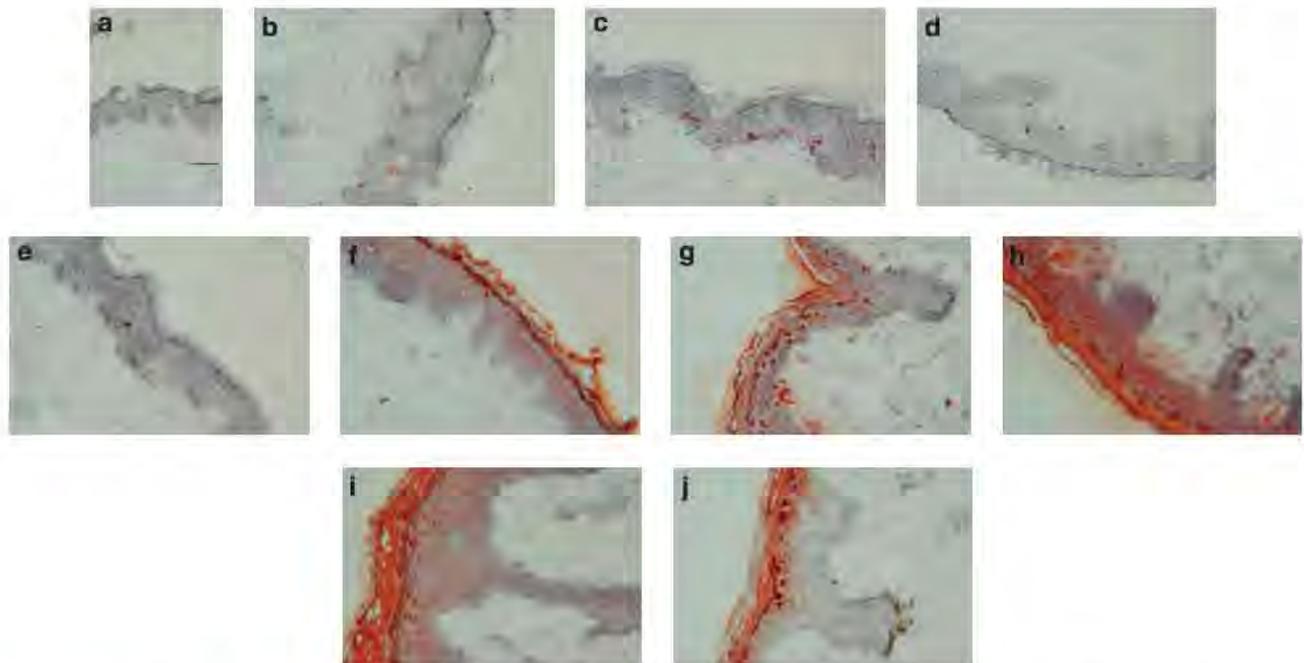
After 6 hours, IGF-1 expression was significantly increased, from  $1.67 \pm 0.52$  in the Ctrl medium to  $4.00 \pm 0.89$  with *P. acnes* MF only ( $P < 0.05$ ). IGF-1R expression



**Figure 2. *P. acnes* modulates IGF-1 and IGF-1R expression.** Expression of IGF-1 (a) and IGF-1R (b) in the epidermis of explants without or after 3, 6, or 24 hours of incubation with *P. acnes* membrane fraction (MF), cytosolic protein (CP), and lipopolysaccharide (LPS). Scale: null labeling (0), very weak labeling (1), weak labeling (2), moderate labeling (3), strong labeling (4), and very strong labeling (5). \*\*\*Significant modulation. Ctrl, control.



**Figure 1. Cutaneous expression of IGF-1, IGF-1R, Ki-67, and filaggrin.** Expression of IGF-1 (a and b), IGF-1R (c and d), Ki-67 (e and f), and filaggrin (g and h) in the epidermis of healthy donors (a, c, e, and g) and acne lesions (b, d, f, and h). Bar = 30  $\mu$ m.



**Figure 3.** Ki-67 and filaggrin expressions are modulated by *P. acnes* and zinc gluconate. Detection of Ki-67 (upper slides) and filaggrin (lower slides) expression in healthy abdominal skin (a and f), after 6 hours of incubation with lipopolysaccharide (b and g), *P. acnes* membrane fraction (c and h) and with a preincubation of 1 h (d and i) or 24 hours (e and j) with zinc gluconate alone before membrane fraction addition for 6 hours. Bar = 50  $\mu$ m.

significantly increased, from  $1.67 \pm 0.52$  to  $4.50 \pm 0.55$  with *P. acnes* MF ( $P < 0.05$ ).

After 24 hours, IGF-1 expression was significantly increased, from  $1.67 \pm 0.52$  in the Ctrl medium to  $2.83 \pm 0.75$  with *P. acnes* MF ( $P < 0.05$ ),  $2.83 \pm 0.41$  with *P. acnes* cytosolic protein (CP) ( $P < 0.05$ ), and  $2.67 \pm 0.52$  with LPS ( $P < 0.05$ ). IGF-1R expression was also increased, from  $2.33 \pm 0.52$  to  $4.00 \pm 0.63$  with *P. acnes* MF only ( $P < 0.05$ ).

**Ki-67 and filaggrin modulation by *P. acnes* extracts in cutaneous explants.** Ki-67 expression was strongly increased in the basal layer of the epidermis after 6 hours incubation with *P. acnes* MF (Figure 3c), less with LPS (Figure 3b) as compared with the Ctrl medium (Figure 3a). *P. acnes* MF (Figure 3h), and, less intensively, LPS (Figure 3g) extended the expression of filaggrin from the stratum corneum to the lower part of the epidermis as compared with the Ctrl medium (Figure 3f).

**IGF-1 ELISA after 6 hours of stimulation with *P. acnes* in cutaneous explant supernatants.** After 6 hours, IGF-1 secretion was increased to  $0.34 \pm 0.13 \text{ ng l}^{-1}$  with *P. acnes* MF,  $0.28 \pm 0.08 \text{ ng l}^{-1}$  with *P. acnes* CP, and  $0.251 \pm 0.05 \text{ ng l}^{-1}$  with LPS as compared with the Ctrl medium,  $0.23 \pm 0.10 \text{ ng l}^{-1}$  (Figure 4a). Although the modulation noted was not significant, it was nonetheless observed for all six donors studied.

**IGF-1 and IGF-1R quantitative reverse transcription-PCR analysis after 6 hours of stimulation with *P. acnes* on normal human epidermal keratinocytes.** After 6 hours stimulation

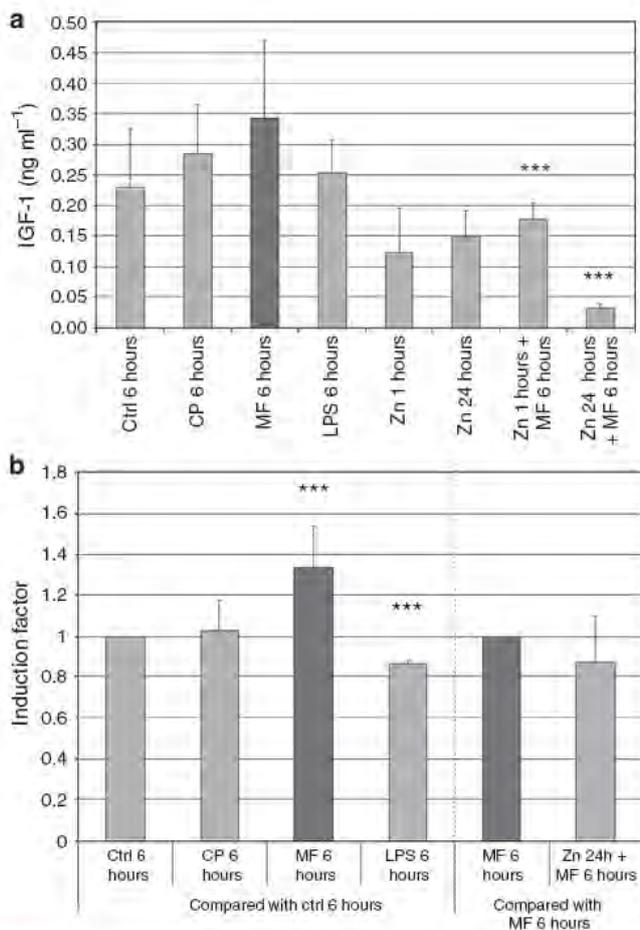
with *P. acnes* MF, IGF-1R mRNA level was significantly increased as compared with the Ctrl medium, with an induction factor of  $1.03 \pm 0.14$  ( $P = 0.02$ ; Figure 4b). A significant reduction of IGF-1R mRNA level was noted after 6 hours stimulation with LPS (inhibition factor =  $0.86 \pm 0.02$ ;  $P = 0.0001$ ). IGF-1 mRNA was not detected in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs).

**In vitro modulation of keratinocyte IGF-1, IGF-1R, Ki-67, and filaggrin expression by zinc salts**

**IGF-1 and IGF-1R modulation in cutaneous explants.** Before addition of MF for 6 hours, a 1-hour preincubation with zinc gluconate partially inhibited IGF-1 overexpression induced by MF, but the effect was significant only after 6 hours ( $4.00 \pm 0.89$  to  $2.33 \pm 0.52$ ;  $P < 0.05$ ; Figures 3–5). In a similar manner, the expression of IGF-1R induced by MF (1, 3, and 6 hours) was significantly inhibited by a 1-hour preincubation with zinc ( $P < 0.05$ ; Figure 5a and b).

A 24-hour preincubation with zinc gluconate resulted in a strong downregulation of IGF-1 expression induced by MF ( $1.00 \pm 0.00$  after 3 hours,  $1.33 \pm 0.52$  after 6 hours, and  $1.17 \pm 0.41$  after 24 hours), leading to a recovery of IGF-1 initial levels ( $P < 0.05$ ). The same results were obtained with IGF-1R, leading to a recovery of initial IGF-1R levels ( $P < 0.05$ ).

**Ki-67 and filaggrin modulation with zinc preincubation in cutaneous explants.** A 1-hour preincubation with zinc gluconate, followed by 6 hours of incubation with MF, inhibited the induction of both Ki-67 (Figure 3d) and filaggrin (Figure 3i) expression by MF alone (Figure 3c and h). This



**Figure 4.** (a) IGF-1 levels in explants culture supernatants. Secretion of IGF-1 in explant culture supernatants after 6 hours of incubation with or without *P. acnes* membrane fraction (MF), cytosolic protein (CP) and lipopolysaccharide (LPS) alone, or with a preincubation of 1 or 24 hours with zinc gluconate before MF addition. Zinc alone for 1 h or 24 hours was used as a control (Ctrl). \*\*\*Significant modulation (b) IGF-1R mRNA levels in normal human epidermal keratinocytes. *Left:* IGF-1R mRNA relative expression after 6 hours incubation with or without *P. acnes* MF, CP, and LPS alone as compared with the basal level (Ctrl), which was regarded as 1. *Right:* IGF-1R mRNA relative expression after 24 hours with zinc gluconate before MF addition for 6 hours as compared with the MF-induced level (MF 6 hours), which was regarded as 1. \*\*\*Significant modulation.

inhibition was more pronounced with 24 hours of preincubation, leading to a recovery of the initial levels of Ki-67 (Figure 3e) and filaggrin expression (Figure 3j).

**ELISA of zinc salt modulation of keratinocyte IGF-1 expression.** A 1-h preincubation with zinc gluconate significantly reduced the IGF-1 overexpression induced by MF, from  $0.34 \pm 0.13$  to  $0.18 \pm 0.03$  ng ml<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ; Figure 4a).

This reduction was more pronounced after 24-hours preincubation with zinc gluconate ( $0.34 \pm 0.13$  to  $0.03 \pm 0.01$  ng ml<sup>-1</sup>;  $P < 0.05$ ).

**Quantitative real-time RT-PCR analysis of zinc salt modulation of IGF-1R in NHEKs.** Preincubation with zinc for 24 hours reduced the IGF-1R mRNA expression induced

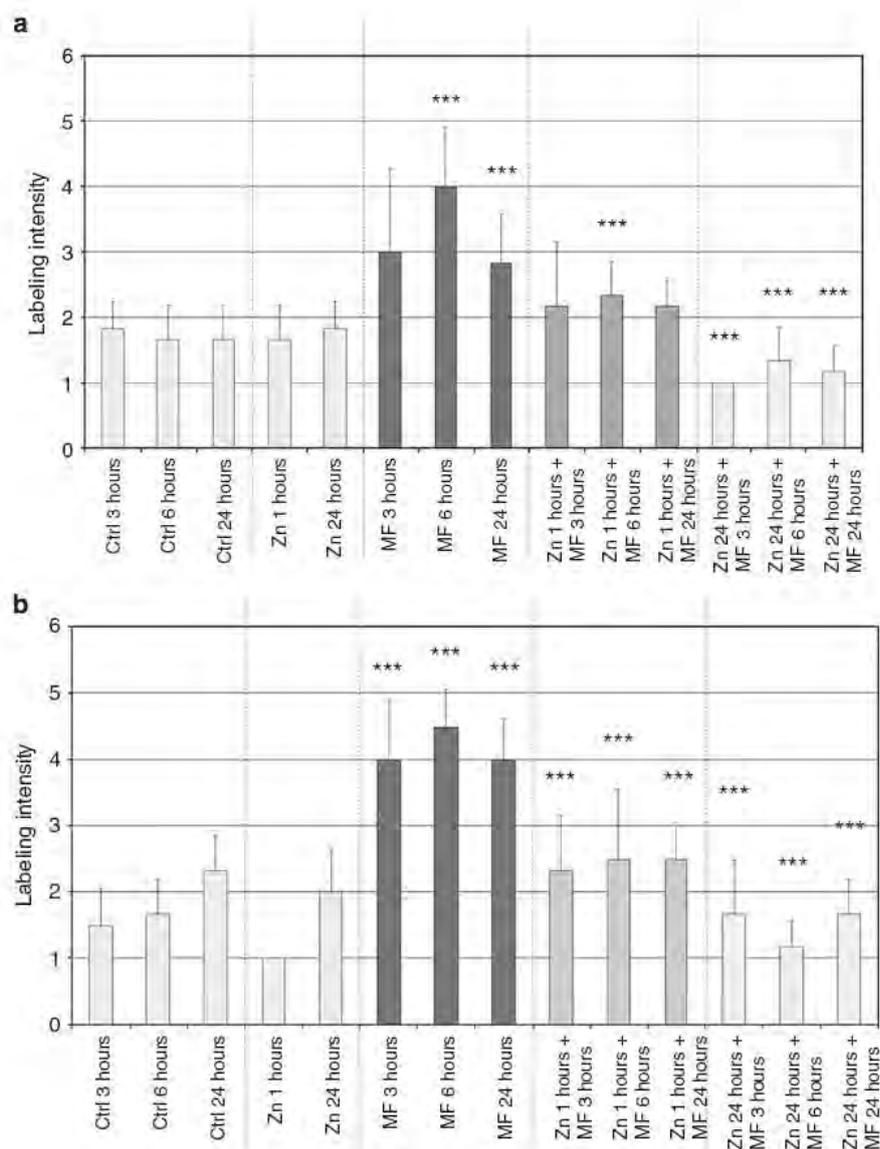
by MF (6 hours stimulation), with an inhibition factor of  $0.86 \pm 0.23$  ( $P = 0.66$ ; Figure 4b). Although the modulation observed was not significant, it was noted for four of the five donors studied.

## DISCUSSION

In this study, we found that IGF-1 and IGF-1R are over-expressed in acne lesions as compared with healthy skin. To our knowledge it has not previously been reported that *P. acnes* stimulates IGF-1 and IGF-1R expression in keratinocytes and increases IGF-1 secretion. In addition, we observed that zinc gluconate prevents the induction of both IGF-1 and IGF-1R expression by *P. acnes* in keratinocytes. Furthermore, IGF-1 and IGF-1R overexpression is associated with an increase in the proliferation index of Ki67 and filaggrin expression. These two markers were also downregulated by zinc gluconate. Of the two extracts of *P. acnes*, MF has the strongest stimulating effect on IGF-1 and IGF-1R expression. Although MF contains membrane and cell-wall components, particularly peptidoglycan and lipoteichoic acid, CP contains only cytosolic proteins. Thus, these results suggest that *P. acnes* acts on the IGF-1/IGF-1R system through a direct contact with the keratinocyte membrane, which could be lipoteichoic acid, a major cell-wall component of Gram-positive bacteria, previously found to increase cell proliferation among human ureteral epithelial cells (Wille *et al.*, 1992; Elgavish *et al.*, 1996). In addition, the induction of IGF-1 and IGF-1R expression was always more pronounced than with LPS, which is considered a reference among proinflammatory substances. However, LPS shows an inhibitory effect on IGF-1R mRNA expression in NHEKs but not in explants, suggesting its specific role in keratinocytes of the basal layer.

Interestingly, we observed that the IGF-1 and IGF-1R overexpression both in acne lesions and in skin explants was associated with an increase in Ki-67 and filaggrin expression in the epidermis, confirming that the IGF-1/IGF-1R system is associated with the modulation of both proliferation and differentiation of keratinocytes. It was previously noted that Ki-67 expression level is higher in acne patients' epidermis than in normal healthy skin (Knaggs *et al.*, 1994). Moreover, we have reported that the differentiation of keratinocytes is modulated by *P. acnes* in the epidermis through an induction of filaggrin and integrin expression (Jarrousse *et al.*, 2007a). Taken together, these results argue for the hypothesis that *P. acnes* has a significant role in the formation of comedo and that one of the mechanisms implicates the IGF-1/IGF-1R pathway (Figure 6).

Recently, acne has been suggested to be an IGF-1-mediated disease, modified by diets that increase IGF-1 signaling (Melnik and Schmitz, 2009). A direct relationship between consumption of milk and other dairy products and elevated IGF-1 serum levels has been established (Crowe *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2009). Although to date no clear association has been established between acne prevalence and diet (Davidovici and Wolf, 2010; Melnik, 2010), recent studies describe a correlation between milk consumption and acne prevalence (Spencer *et al.*, 2009). Thus, IGF-1 signaling may have a major role in the formation of acne lesions. Given



**Figure 5. Zinc gluconate downregulates IGF-1 and IGF-1R expression.** Expression of IGF-1 (a) and IGF-1R (b) in the epidermis of healthy skin, after 3, 6, 24 hours of incubation with *P. acnes* membrane fraction (MF) alone or after a preincubation of 1 or 24 hours with zinc gluconate before MF addition. Zinc alone for 1 or 24 hours was used as a control (Ctrl). Scale: null labeling (0), very weak, labeling (1), weak labeling (2), moderate labeling (3), strong labeling (4) and very strong labeling (5). \*\*\*Significant modulation.

that IGF-1 has a higher affinity for IGF-1R than does IGF-2 or insulin (Hodak *et al.*, 1996), we can hypothesize that the IGF-1/IGF-1R pathway has a central role in comedogenesis and is activated by two mechanisms. First, a high glycemic diet has been shown to increase IGF-1 and insulin serum levels. Second, our results show that *P. acnes* alone is able to activate the keratinocyte IGF-1/IGF-1R system. These two mechanisms may act synergistically. The absence of IGF-1 mRNA in NHEKs confirms that IGF-1 is produced mainly by keratinocytes of the suprabasal layers (Rudman *et al.*, 1997; Tavakkol *et al.*, 1999). This IGF-1 production can activate IGF-1R, mostly located in the basal layer of epidermis, and thus induce proliferation of keratinocytes and an increase in filaggrin expression through a paracrine pathway. Moreover,

acne lesion formation is increased by the induction of lipogenesis (Smith *et al.*, 2008) and the production of androgens (Melnik, 2009) by IGF-1 (Figure 6). Thus, these results establish a link among hyperglycemic diets, *P. acnes*, and acne lesions.

With respect to zinc, it has been shown that this essential trace element has mainly anti-inflammatory properties; it induces inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis (Dreno *et al.*, 1992), decreases nitric oxide production (Yamaoka *et al.*, 2000), induces inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  and IL-6, and decreases Toll-like receptor-2 expression (Jarrousse *et al.*, 2007b). In addition, zinc is known to have an antimicrobial activity against *P. acnes* (Fluhr *et al.*, 1999; Dreno *et al.*, 2005).

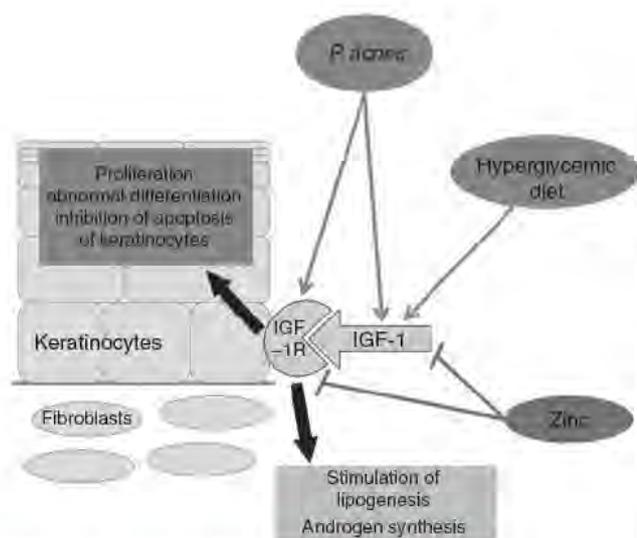


Figure 6. IGF-1/IGF-1R system in acne lesions development.

In this study, we demonstrated that zinc prevents the activation of IGF-1 and IGF-1R expression induced by *P. acnes*. Because zinc is known for being able to modify protein conformation (Stray *et al.*, 2004), it could act by modulating some proteins implicated in the transcription or translation of the *IGF-1* or *IGF-1R* genes. This effect was obtained with as little as 1 hour of preincubation with zinc and was complete after 24 hours of preincubation. Interestingly, this IGF-1/IGF-1R system inhibition is associated with a preventive effect on both hyperproliferation and abnormal differentiation of the epidermis.

Very recently, in a similar manner, it has been shown that isotretinoin was able to modulate the IGF system. Indeed, isotretinoin—the most efficient treatment against acne—has been observed to decrease both serum IGF-1 and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) levels (Karadag *et al.*, 2010). IGFBP-3 is the most abundant IGFBP in plasma, has the highest affinity for IGF-1, and modulates keratinocyte differentiation (Grimberg and Cohen, 2000; Edmondson *et al.*, 2005). Thus, IGFBP-3 is strongly implicated in the IGF system, and it would be of interest to examine its modulation by zinc (Singh *et al.*, 2004). Finally, a recent study found that external stressors such as the bacteria *Mycobacterium leprae* are implicated in the induction of the keratinocyte IGF-1/IGF-1R signaling with induction of cell proliferation (Rodrigues *et al.*, 2010). Taken together, these results support a major role for the IGF-1/IGF-1R system in acne pathology, as early as during the formation of the microcomedo.

In conclusion, IGF-1 and IGF-1R have been identified as targets for *P. acnes* in the development of acne lesions. We have confirmed that *P. acnes* acts not only in the inflammatory step of acne pathogenesis but also in the retentional stage. This probably explains why both antibiotics and benzoyl peroxide have a moderate antiretentional effect by killing the bacteria. Finally, zinc, like isotretinoin, modulates the IGF/IGF-1R system.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

**Bacterial extracts.** *P. acnes* extracts: Two *P. acnes* IP53113T (Pierre Fabre, Toulouse, France) extracts were made available to us. The strain was first described in 1968. The MF of the bacteria contains peptidoglycan and teichoic acid. The second fraction was the CP fraction of the bacteria. The MF of the bacteria was resuspended in culture medium.

**LPS used as proinflammatory substance.** The LPS extracted from *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma, St Quentin Fallavier, France) was reconstituted in phosphate-buffered saline and used as a positive control for inflammation. The LPS was diluted in Dulbecco's modified Eagle medium (Sigma-Aldrich) with a final concentration of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  and incubated with cutaneous explants.

**Trace element: zinc salts.** Zinc gluconate (Labcata, Montrouge, France; 15 mg zinc gluconate = 2 mg zinc element) was diluted in Dulbecco's modified Eagle medium with a final zinc concentration of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  and incubated with cutaneous explants.

### In vitro study: healthy skin explants and NHEKS

Normal human cutaneous explants—an *in vitro* condition modeling the *in vivo* situation—were obtained from surgical samples of healthy abdominal skin from the Plastic Surgery Service of the Nantes University Hospital (France).

NHEKS were obtained from foreskins of healthy donors at Nantes University Hospital (France). Five donors were used for the quantitative reverse transcription-PCR analysis.

**In vivo study: skin biopsies.** Three cutaneous biopsies of inflammatory acne lesions (papules) of the upper back and three biopsies of healthy skin from the same area were obtained from a skin tissue bank (Department of Dermato-Oncology, Nantes University Hospital, France). All patients had signed an agreement. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki, and the Medical Ethical Committee of the Nantes University Hospital approved all described studies.

### Methods

**Skin explant technique.** Punches (4 mm in diameter) from the abdominal skin of six healthy donors, considered a healthy skin model, were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in a moist atmosphere in the presence of 5%  $\text{CO}_2$  for 3, 6, or 24 hours in Dulbecco's modified Eagle medium as described in a previous study (Jarrousse *et al.*, 2007a). The medium contained *P. acnes* extracts at the following concentrations: MF 1/2 or CP 1/5, LPS at  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  or zinc at  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The medium alone was used as a control. After incubations of 3, 6, or 24 hours, the explants were removed from the culture medium and frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . In order to evaluate any zinc effects, the explants were preincubated with zinc at  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  for 1 hour or 24 hours and then incubated for 6 hours with MF with a final zinc concentration of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  and MF 1/2.

**NHEK culture.** NHEKS obtained from healthy foreskins were grown at  $37^\circ\text{C}$  in a humid environment under 5%  $\text{CO}_2$  in keratinocyte serum-free medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with  $5 \text{ ng ml}^{-1}$  EGF,  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  bovine pituitary extract,  $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  Fungizone (Bristol-Myers Squibb), and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich).

Cells were used after a limited number ( $n=2$ ) of subcultures and were incubated with MF, CP, LPS, or zinc. The medium alone was used as a control. Cells were preincubated with zinc for 24 hours and then incubated for 6 hours with MF at a final concentration of zinc at  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  and MF 1/2.

**Immunoperoxidase.** Immunohistochemistry was performed using the streptavidin/peroxidase technique as previously described (Jarrousse *et al.*, 2007a). We used frozen sections ( $5 \mu\text{m}$  thick) of cutaneous biopsies of acne lesions, normal skin, or explants. Primary antibodies were deposited on the slides for 1 hour for IGF-1 (R&D Systems, Lille, France) and IGF-1R (R&D Systems) or 30 minutes for Ki67 (Dako, Trappes, France) and filaggrin (Biomedical Technologies, Cliniscience, Montrouge, France) in a humid environment at room temperature. Two examiners read the slides. Labeling intensity was scored on a five-point scale: null labeling (0), very weak labeling (1), weak labeling (2), moderate labeling (3), strong labeling (4), and very strong labeling (5).

**Microscopy and scoring.** Slides were read using a Leica microscope (Leica Microsystems), and photographs were taken with a digital SLR Camera D70S (Nikon). All exposures were for the same length of time, at the same luminosity, and at the same magnification ( $\times 25$ ). The immunostaining intensity was scored by two independent observers, who were unaware of the tissue source or incubation conditions.

**ELISA.** IGF-1 concentrations in cutaneous explant culture supernatants were measured by ELISA using the commercial Human IGF-1 Quantikine Kit (R&D Systems), according to the manufacturer's protocol. All culture supernatants were collected and concentrated using the Amicon Ultra-4 Membrane Ultracell-3 (Millipore).

**Quantitative real-time reverse-transcription-PCR.** NHEKs were lysed in RLT buffer (Qiagen) supplemented with 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma). mRNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). mRNA concentrations were evaluated using Nanodrop (Thermo Scientific, Illkirch, France) and RNA integrity using Agilent technology (Villecresnes, France). Reverse transcription was performed using  $2 \mu\text{g}$  of total RNA and relative quantification of *IGF-1*, *IGF-1R*, and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) expression was performed using real-time PCR as previously described (Pfaffl, 2001), with the corresponding TaqMan probes (TaqMan gene expression assays; Applied Biosystems) and 20 ng of complementary DNA samples, in an Mx3005P machine (Stratagene). Thermal cycling was at  $50^\circ\text{C}$  for 2 minutes and  $95^\circ\text{C}$  for 10 minutes, followed by 45 cycles at  $95^\circ\text{C}$  for 30 seconds and  $60^\circ\text{C}$  for 1 minute. PCR efficiency was determined using Total Liver RNA (Biochain, Montrouge, France), performed in parallel to plot the standard curves for *IGF-1*, *IGF-1R*, and *HPRT*. Mean threshold cycle (CT) values from duplicate PCRs were normalized to mean CT values for the housekeeping gene (*HPRT*) from the same complementary DNA preparations. The relative expression ratio of a target gene was calculated on the basis of the PCR efficiency (E) and the CT deviation between a given NHEK sample (x) and nonstimulated NHEK samples (calibrator), expressed in comparison with *HPRT*:  $\text{ratio} = (E^{IGF-1R})^{\Delta CT_{IGF-1R}} / ((E^{HPRT})^{\Delta CT_{HPRT}})^{\text{calibrator}_x}$ .

**Statistical analysis.** IGF-1 and IGF-1R protein levels were expressed as the mean  $\pm$  SD. To determine the differences between all experimental groups (Ctrl, CP, MF, LPS, zinc), a Kruskal-Wallis test was performed. If the test was significant, a Dunnett test was used to isolate the group(s) that differed from the Ctrl group. This closed test procedure allows the alpha risk to remain at 5%. For purposes of the IGF-1R mRNA analysis, mRNA relative expressions were expressed as the mean  $\pm$  SD compared with the basal level (Ctrl) or the MF-induced level (MF 6 hours).

Confidence intervals (95%) were calculated for each ratio (observed/theoretical) and for each condition. The ratio was considered significant if the 95% confidence interval excluded 1. The significance of the stimulating effects of CP, MF, LPS, or zinc as compared with controls and the inhibiting effect of zinc preincubation, as compared with MF alone, were all assessed at the  $P < 0.05$  value (\*\*\*).

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Financial support and *P. acnes* extracts were provided by Pierre Fabre Dermatology Laboratories (Toulouse, France), and zinc gluconate was kindly provided by Labcatal Laboratories (Montrouge, France). We thank the Unit of Dermato-Oncology and the Plastic and Pediatric Surgery Departments of Nantes University Hospital (Nantes, France) for skin biopsies and abdominal skin samples.

#### REFERENCES

- Aizawa H, Niimura M (1995) Elevated serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) levels in women with postadolescent acne. *J Dermatol* 22:249-52
- Banudevi S, Senthilkumar K, Sharmila G *et al.* (2010) Effect of zinc on regulation of insulin-like growth factor signaling in human androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Chim Acta* 411:172-8
- Barreca A, De Luca M, Del Monte P *et al.* (1992) *In vitro* paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors. *J Cell Physiol* 151:262-8
- Bruggemann H, Henne A, Hoster F *et al.* (2004) The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science* 305:671-3
- Cappel M, Mauger D, Thiboutot D (2005) Correlation between serum levels of insulin-like growth factor 1, dehydroepiandrosterone sulfate, and dihydrotestosterone and acne lesion counts in adult women. *Arch Dermatol* 141:333-8
- Crowe FL, Key TJ, Allen NE *et al.* (2009) The association between diet and serum concentrations of IGF-1, IGFBP-1, IGFBP-2, and IGFBP-3 in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:1333-40
- Davidovici BB, Wolf R (2010) The role of diet in acne: facts and controversies. *Clin Dermatol* 28:12-6
- Dreno B, Amblard P, Agache P *et al.* (1989) Low doses of zinc gluconate for inflammatory acne. *Acta Derm Venereol* 69:541-3
- Dreno B, Foulc P, Reynaud A *et al.* (2005) Effect of zinc gluconate on *Propionibacterium acnes* resistance to erythromycin in patients with inflammatory acne: *in vitro* and *in vivo* study. *Eur J Dermatol* 15:152-5
- Dreno B, Trossaert M, Boiteau HL *et al.* (1992) Zinc salts effects on granulocyte zinc concentration and chemotaxis in acne patients. *Acta Derm Venereol* 72:250-2
- Edmondson SR, Thumiger SP, Kaur P *et al.* (2005) Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) localizes to and modulates proliferative epidermal keratinocytes *in vivo*. *Br J Dermatol* 152:225-30

- Eichenfield LF, Leyden JJ (1991) Acne: current concepts of pathogenesis and approach to rational treatment. *Pediatrician* 18:218-23
- Elgavish A, Lloyd K, Reed R (1996) A subpopulation of human urothelial cells is stimulated to proliferate by treatment *in vitro* with lipoteichoic acid, a cell wall component of *Streptococcus faecalis*. *J Cell Physiol* 169:42-51
- Fluhr JW, Bosch B, Gloor M et al. (1999) *In-vitro* and *in-vivo* efficacy of zinc acetate against propionibacteria alone and in combination with erythromycin. *Zentralbl Bakteriell* 289:445-56
- Gilhar A, Ish-Shalom S, Pillar T et al. (1994) Effect of antiinsulin-like growth factor 1 on epidermal proliferation of human skin transplanted onto nude mice treated with growth hormone. *Endocrinology* 134:229-32
- Grimberg A, Cohen P (2000) Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 183:1-9
- Hodak E, Gottlieb AB, Anzilotti M et al. (1996) The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential in human epidermis and skin appendages: correlation of increased expression with epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* 106:564-70
- Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A et al. (2007a) Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium acnes* extracts on keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 299:441-7
- Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A et al. (2007b) Zinc salts inhibit *in vitro* Toll-like receptor 2 surface expression by keratinocytes. *Eur J Dermatol* 17:492-6
- Jugeau S, Tenaud I, Knol AC et al. (2005) Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol* 153:1105-13
- Karadag AS, Ertugrul DT, Tatal E et al. (2010) Short-term isotretinoin treatment decreases insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 levels: does isotretinoin affect growth hormone physiology? *Br J Dermatol* 162:798-802
- Knaggs HE, Holland DB, Morris C et al. (1994) Quantification of cellular proliferation in acne using the monoclonal antibody Ki-67. *J Invest Dermatol* 102:89-92
- Krane JF, Murphy DP, Carter DM et al. (1991) Synergistic effects of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I/somatostatin C (IGF-I) on keratinocyte proliferation may be mediated by IGF-I transmodulation of the EGF receptor. *J Invest Dermatol* 96:419-24
- Liu JP, Baker J, Perkins AS et al. (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72
- Melnik B (2009) Milk consumption: aggravating factor of acne and promoter of chronic diseases of Western societies. *J Dtsch Dermatol Ges* 7:364-70
- Melnik B (2010) [Acne vulgaris. Role of diet]. *Hautarzt* 61:115-25
- Melnik BC, Schmitz G (2009) Role of insulin, insulin-like growth factor-1, hyperglycaemic food and milk consumption in the pathogenesis of acne vulgaris. *Exp Dermatol* 18:833-41
- Meynadier J (2000) Efficacy and safety study of two zinc gluconate regimens in the treatment of inflammatory acne. *Eur J Dermatol* 10:269-73
- Michaelsson G, Ljunghall K (1990) Patients with dermatitis herpetiformis, acne, psoriasis and Darier's disease have low epidermal zinc concentrations. *Acta Derm Venereol* 70:304-8
- Nagy I, Pivarcsi A, Kis K et al. (2006) *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect* 8:2195-205
- Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A et al. (2005) Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol* 124:931-8
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
- Qin LQ, He K, Xu JY (2009) Milk consumption and circulating insulin-like growth factor-1 level: a systematic literature review. *Int J Food Sci Nutr* 60(Suppl 7):330-40
- Ristow HJ, Messmer TO (1988) Basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I are strong mitogens for cultured mouse keratinocytes. *J Cell Physiol* 137:277-84
- Rodrigues LS, da Silva Maeda E, Moreira ME et al. (2010) *Mycobacterium leprae* induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. *Cell Microbiol* 12:42-54
- Rudman SM, Philpott MP, Thomas GA et al. (1997) The role of IGF-1 in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen? *J Invest Dermatol* 109:770-7
- Sadagurski M, Yakar S, Weingarten G et al. (2006) Insulin-like growth factor 1 receptor signaling regulates skin development and inhibits skin keratinocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 26:2675-87
- Schachner L, Eaglstein W, Kittles C et al. (1990) Topical erythromycin and zinc therapy for acne. *J Am Acad Dermatol* 22:253-60
- Schaller M, Loewenstein M, Borelli C et al. (2005) Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with *Propionibacterium acnes* and coproporphyrin III. *Br J Dermatol* 153:66-71
- Singh B, Charkowicz D, Mascarenhas D (2004) Insulin-like growth factor-independent effects mediated by a C-terminal metal-binding domain of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Biol Chem* 279:477-87
- Smith TM, Cong Z, Gilliland KL et al. (2006) Insulin-like growth factor-1 induces lipid production in human SEB-1 sebocytes via sterol response element-binding protein-1. *J Invest Dermatol* 126:1226-32
- Smith TM, Gilliland K, Clawson GA et al. (2008) IGF-1 induces SREBP-1 expression and lipogenesis in SEB-1 sebocytes via activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Invest Dermatol* 128:1286-93
- Spencer EH, Ferdowsian HR, Barnard ND (2009) Diet and acne: a review of the evidence. *Int J Dermatol* 48:339-47
- Stray SJ, Ceres P, Zlotnick A (2004) Zinc ions trigger conformational change and oligomerization of hepatitis B virus capsid protein. *Biochemistry* 43:9989-98
- Sugisaki H, Yamanaka K, Kakeda M et al. (2009) Increased interferon-gamma, interleukin-12p40 and IL-8 production in *Propionibacterium acnes*-treated peripheral blood mononuclear cells from patient with acne vulgaris: host response but not bacterial species is the determinant factor of the disease. *J Dermatol Sci* 55:47-52
- Tavakkol A, Varani J, Elder JT et al. (1999) Maintenance of human skin in organ culture: role for insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor. *Arch Dermatol Res* 291:643-51
- Thiboutot DM (1997) Acne. An overview of clinical research findings. *Dermatol Clin* 15:97-109
- Valentinis B, Baserga R (2001) IGF-1 receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol* 54:133-7
- Vora S, Ovhal A, Jerajani H et al. (2008) Correlation of facial sebum to serum insulin-like growth factor-1 in patients with acne. *Br J Dermatol* 159:990-1
- Vowels BR, Yang S, Leyden JJ (1995) Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. *Infect Immun* 63:3158-65
- Wille JJ, Park J, Elgavish A (1992) Effects of growth factors, hormones, bacterial lipopolysaccharides, and lipoteichoic acids on the clonal growth of normal ureteral epithelial cells in serum-free culture. *J Cell Physiol* 150:52-8
- Yamaoka J, Kume T, Akaike A et al. (2000) Suppressive effect of zinc ion on iNOS expression induced by interferon-gamma or tumor necrosis factor-alpha in murine keratinocytes. *J Dermatol Sci* 23:27-35
- Zouboulis CC, Eady A, Philpott M et al. (2005) What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol* 14:143-52

## **c) Travaux complémentaires**

### ***(1) Objectif***

Nous avons souhaité compléter les résultats obtenus dans cet article par une étude plus approfondie de l'expression du récepteur IGF-1R par les kératinocytes.

### ***(2) Méthodologie***

Une étude en cytométrie de flux a été réalisée afin d'analyser l'expression de l'IGF-1R par les kératinocytes en monocouche stimulés par la fraction FM de *P.acnes*, avec ou sans les pré-incubations au gluconate de zinc. La lignée HeLa (lignée cellulaire isolée à partir d'une métastase de cancer du col de l'utérus humain) a été utilisée comme témoin positif pour l'expression de l'IGF-1R et la lignée HaCaT (lignée cellulaire de kératinocytes humains) a été analysée en parallèle des kératinocytes. Des cultures de NHEK de six donneurs sains ont été analysées en cytométrie de flux.

### ***(3) Résultats***

L'analyse par cytométrie de flux a montré que la quasi-totalité des kératinocytes en monocouche, non différenciés (NHEK), ainsi que les cellules de la lignée HaCaT exprimaient l'IGF-1R à leur surface et ce, quelle que soit la condition. Un léger biais a cependant été noté : le cytomètre en flux a probablement classé comme « cellules non marquées » des agrégats de débris de *P.acnes* dont la taille et la granulosité devaient être proches de la taille des cellules. En effet, l'extrait FM de *P.acnes* est composé de débris de la paroi cellulaire et de la membrane plasmique de la bactérie. Après lavage du tapis cellulaire, il est assez difficile d'éliminer l'ensemble des débris et certains de ces débris, sous forme agrégée, pourraient avoir des tailles proches de celles des cellules analysées. D'autre part, des débris pourraient adhérer aux cellules malgré les lavages ce qui pourrait modifier la taille et la granulosité de ces dernières et nuire à l'analyse. Nous avons en effet constaté que tous les échantillons incubés avec les extraits de *P.acnes* présentaient des pourcentages de cellules marquées un peu plus faible que les cellules incubées sans extrait FM de *P.acnes*, ce qui peut s'expliquer par ce biais. Néanmoins, l'ensemble des échantillons testés présentait des pourcentages très élevés de cellules marquées (entre 84 et 94%) indiquant que la grande majorité des cellules

exprime l'IGF-1R à leur surface. *P.acnes* et le gluconate de zinc n'induisent donc pas de modulation du nombre de cellules exprimant l'IGF-1R à leur surface.

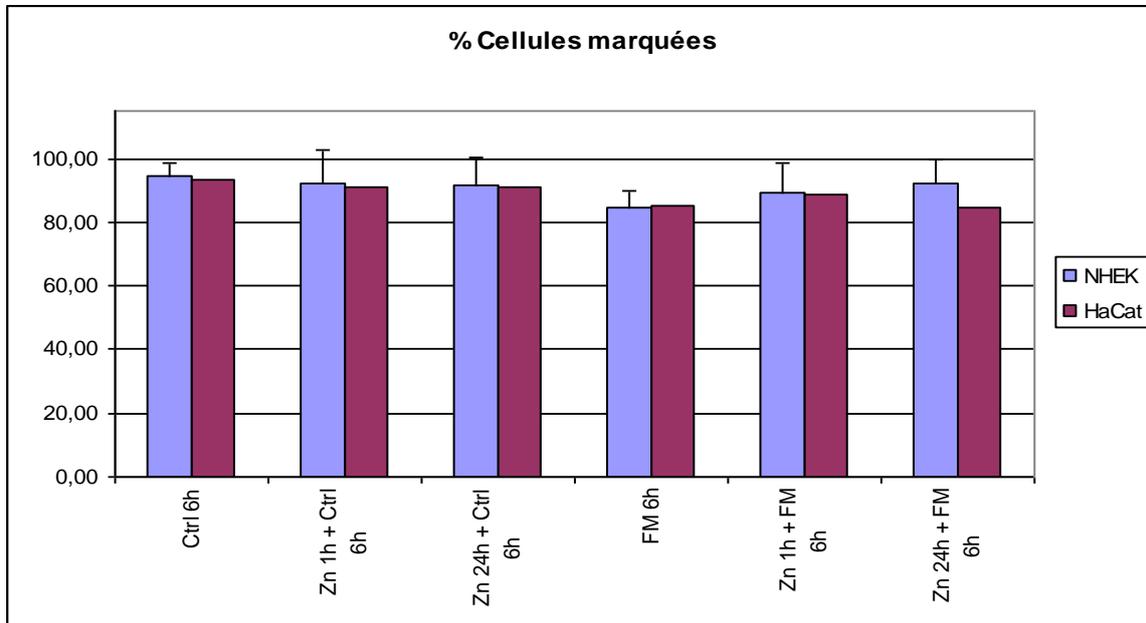


Figure 19. Pourcentages de cellules marquées par l'anticorps anti-IGF-1R (moyenne de 6 donneurs NHEK ou 1 lignée HaCaT)

En ce qui concerne les six donneurs de kératinocytes normaux en monocouches analysés par cytométrie de flux, l'intensité de fluorescence moyenne était identique pour les kératinocytes cultivés en milieu de culture seul et ceux cultivés en présence de gluconate de zinc pendant 1h ou 24h. Le gluconate de zinc seul n'a donc pas d'influence sur l'expression de l'IGF-1R par les kératinocytes. Cette étude complémentaire nous a permis de confirmer que, d'après les intensités de fluorescence relevées, l'expression kératinocytaire de l'IGF-1R est significativement plus élevée après une incubation de 6h en présence de l'extrait FM de *P.acnes* et que des pré-incubations au gluconate de zinc permettent de diminuer cette surexpression. Cependant les modulations par le gluconate de zinc que nous avons observées n'étaient pas significatives, ni après 1h, ni après 24h de pré-incubation. La tendance reste cependant à une diminution de l'expression de l'IGF-1R après des pré-incubations au gluconate de zinc et celle-ci devra être confirmée sur un plus grand nombre de donneurs.

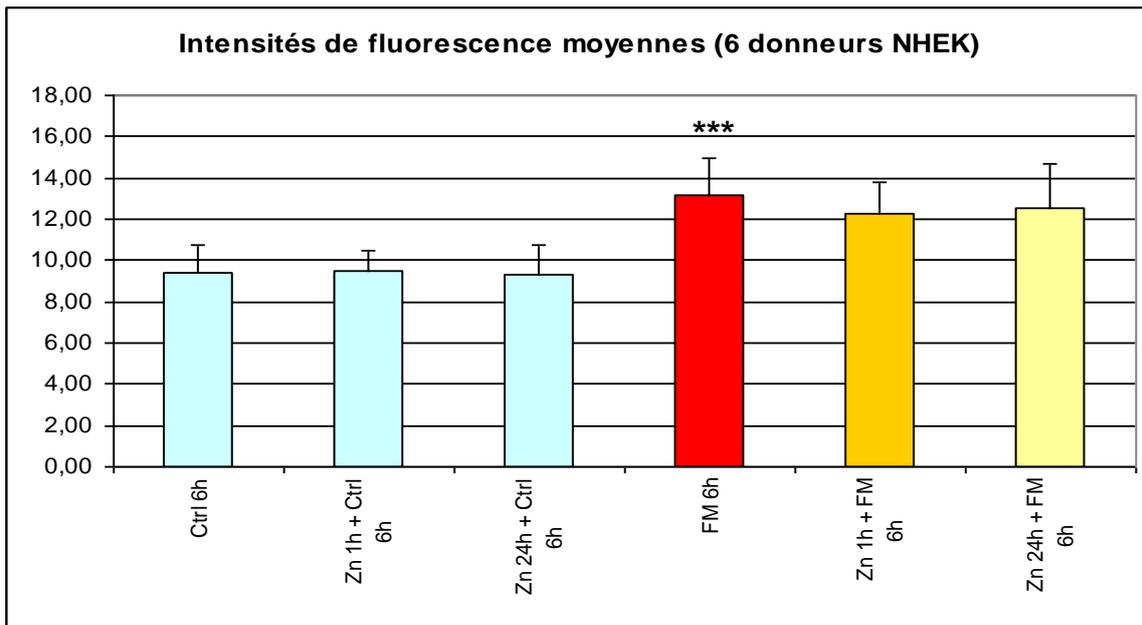


Figure 20. Intensités de fluorescence moyennes des kératinocytes en monocouches de 6 donneurs, marquées avec l'anticorps anti-IGF-1R (différence significative : \*\*\*  $p < 0,05$ )

La même tendance a été notée avec la lignée HaCaT en ce qui concerne la stimulation de l'expression de l'IGF-1R par l'extrait FM de *P.acnes*. Cependant, nous n'avons pas noté d'effet inhibiteur du zinc sur cette surexpression.

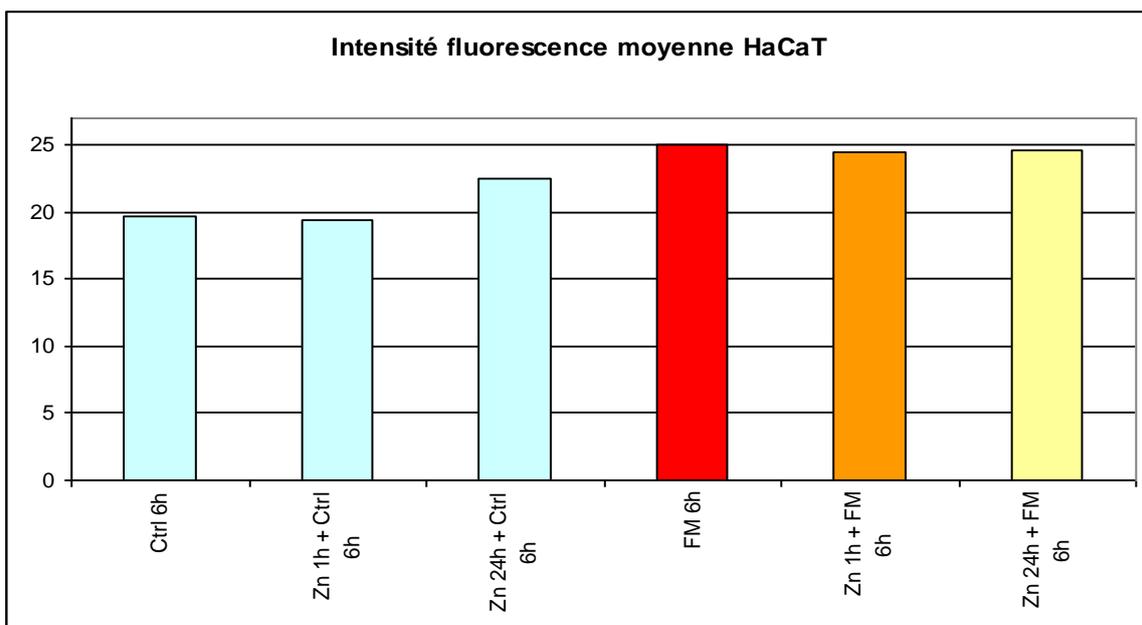


Figure 21. Intensités de fluorescence moyennes de la lignée HaCaT, marquées avec l'anticorps anti-IGF-1R

En conclusion, l'étude en cytométrie de flux nous a permis de mettre en évidence que l'expression de l'IGF-1R dans les kératinocytes de la couche peu différenciée tels que ceux de la couche basale de l'épiderme ainsi que les cellules HaCaT est stimulée par la fraction FM de *P.acnes*. Plus précisément, que ce ne soit pas le nombre de cellules exprimant l'IGF-1R qui est augmenté mais la quantité de récepteur exprimé à la surface de chacune d'entre elles. Enfin, nous avons observé que des incubations en présence de gluconate de zinc permettraient de réduire cette surexpression et ce de manière plus importante pour les kératinocytes normaux.

## **B. Deuxième partie : Evaluation de l'efficacité d'une molécule à visée anti-acnéique**

### **1. Evaluation de l'efficacité d'une molécule à visée anti-acnéique : APRC11**

#### **a) Objectif**

L'objectif de la seconde partie de ce travail était d'évaluer l'efficacité anti-inflammatoire d'un nouvel actif à visée anti-acnéique développé par les laboratoires Pierre Fabre en comparaison à celle de deux actifs déjà utilisés dans le traitement de l'acné : le gluconate de zinc (Zn) et le rétinaldéhyde (RAL). Cet actif est une molécule dérivée des rhamnosides, un nouvel undecyl-rhamnoside : l'APRC11.

#### **b) Méthodologie**

Nous avons tout d'abord modélisé un état inflammatoire représentatif de celui retrouvé dans l'acné en utilisant notre modèle de kératinocytes en monocouche stimulés par la fraction membranaire de *P.acnes*. En effet, comme nous l'avons observé au cours des différentes études menées précédemment au laboratoire, c'est la fraction membranaire qui induit de manière la plus importante les modulations des différents marqueurs que nous avons pu étudier. De ce fait, des kératinocytes issus de peaux saines ont été cultivés en monocouche puis, ils ont été stimulés par la fraction membranaire de *P.acnes* pendant 6h, afin d'induire cet état inflammatoire.

Afin d'étudier le potentiel anti-inflammatoire préventif de l'APRC11 et des deux molécules contrôle RAL et Zn, nous avons pré incubé les kératinocytes avec les différentes molécules durant 1h ou 24h, puis, nous avons induit l'état inflammatoire en incubant les cellules avec FM pendant 6h. Cette induction a été réalisée en présence de la même concentration en molécule anti-inflammatoire. Trois concentrations en APRC11 (0,3 $\mu$ M, 1 $\mu$ M et 3  $\mu$ M), 1 concentration en RAL (100mM) et 1 concentration en Zn (15 $\mu$ M) ont été testées.

Les concentrations protéiques de 18 molécules ont ensuite été mesurées dans les surnageants de culture, soit par dosage ELISA pour les dosages de l'IL-6, l'IL-12, l'IL-15, MMP9 et

LTB4, soit par la méthodologie Luminex via l'utilisation du système Multiplex Bio-plex assay (15-plex) pour les dosages des molécules IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, INF- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  et IL-1RA.

### **c) Résultats**

Sur les 3 premiers donneurs testés, parmi les 18 protéines d'intérêt analysées, les expressions de 5 d'entre elles étaient significativement stimulées par l'incubation de 6h en présence de l'extrait FM de *P.acnes* : IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-6, IL-8, MMP-9. Concernant les marqueurs IL-12, IL-15, LTB-4 étudiés en ELISA et les marqueurs IL1-b, IL-12, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IFN- $\gamma$  étudiés avec le système Luminex Bio-plex, avec les techniques que nous avons utilisées, ils n'étaient pas détectés dans les surnageants de culture des kératinocytes. Enfin, les marqueurs TNF- $\alpha$  et GMCSF analysés avec le système Luminex Bio-plex, ont été détectés à un taux très faible et les variations observées après la stimulation par *P.acnes* n'étaient pas significatives.

De ce fait, dans la suite de l'étude, nous avons focalisé notre attention sur ces 5 marqueurs et les dosages ELISA se sont limités à IL-6 et MMP-9 tandis que le 15-plex a été remplacé par un 3-plex Bio-plex Pro Assays qui permettait le dosage de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1RA et de l'IL-8. L'étude a été renouvelée sur 5 donneurs et a été complétée par une étude de la synthèse des ARNm de ces 5 molécules d'intérêt. Pour cela le système Multiplex Quantigene a été utilisé.

Nous avons constaté que, comme sur nos trois premiers donneurs testés, le taux basal d'expression des 5 molécules d'intérêt était faible et que celui-ci augmentait de manière très importante après la stimulation de 6h en présence de la fraction membranaire de *P.acnes*. Il est à noter que les molécules APRC11, RAL et Zn avaient un effet modulateur sur 4 d'entre elles, mais pas sur l'IL-6 (pour laquelle l'expression semblait même légèrement stimulée, quoique de manière non significative), que les effets modulateurs observés avec l'APRC11 ne dépendaient pas de la concentration testée et qu'après 1h de préincubation, les effets des modulateurs étaient faibles voire inexistantes dans certains cas. De ce fait, 1 seule concentration en APRC11 (1 $\mu$ M), un seul temps de pré-incubation (24h) et seules les 4 protéines d'intérêt (IL-1 $\alpha$ , l'IL-1RA IL-8 et MMP-9) dont les expressions étaient modulées en présence de l'APRC11, du RAL ou du Zn ont été présentées dans l'article.

Nous avons montré, aussi bien au niveau des transcrits qu'au niveau protéique, qu'après une pré-incubation de 24h, le gluconate de zinc est capable de limiter les surexpressions en IL-1 $\alpha$ , IL-8 et MMP-9 induites par l'extrait FM de *P.acnes* et que le RAL permet de réduire l'expression de MMP-9 et d'augmenter celle de l'IL-1-RA, une molécule permettant de contrer les effets de l'IL-1 $\alpha$ . D'autre part, nous avons montré que l'APRC11 a un rôle modulateur sur les 4 molécules testées : il permet de limiter l'induction de l'expression d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-8 et de MMP-9 et de stimuler l'expression de l'IL-1RA de manière plus importante que le RAL ou le gluconate de zinc. D'autre part, il est à noter que bien qu'elles aient été observées pour tous les donneurs étudiés, les réponses à la stimulation par *P.acnes* ainsi qu'aux différents traitements étaient très dépendantes du donneur ce qui explique l'importance des écart-types. Les résultats, exceptés ceux obtenus avec le RAL, ont été présentés dans un troisième article.

## **2. Article 3: Anti-inflammatory properties of a new undecyl-rhamnoside against P.acnes (APRC11)**

**Manuscrit soumis au European Journal of Dermatology**

**AUTHOR(S):** Isard O<sup>1,2</sup>§, Lévêque M<sup>3</sup>§, Knol AC<sup>1,2</sup>, Aries MF<sup>3</sup>, Khammari A<sup>1,2</sup>, Nguyen JM<sup>4</sup>, Castex-Rizzi N<sup>3</sup>, Dréno B<sup>1,2</sup>

§ Both authors contributed equally to the work

### **INSTITUTION(S):**

<sup>1</sup> INSERM U892, 9 quai Moncoussu 44093 Nantes cedex 01, France

<sup>2</sup> Unit of Dermato Cancerology – CIC Biothérapies U0503, Nantes University Hospital, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, Cedex 01 France

<sup>3</sup> Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, Cell Pharmacology, 2 rue Viguerie 31025 Toulouse, France

<sup>4</sup> SEB-PIMESP Saint Jacques Hospital CHU de Nantes, 85 rue Saint Jacques 44093 Nantes, Cedex 01 France

(✉) **Corresponding author:** Brigitte Dréno, Department of Dermato Cancerology CHU HOTEL DIEU, Place Alexis Ricordeau, 44035 NANTES Cedex 01, FRANCE

Phone:0033240083118

Fax: 00 33 240083117

e-mail : brigitte.dreno@wanadoo.fr

**SHORT TITLE:** APRC11 modulates the NHEK expression of different acne markers.

[Arch Dermatol Res.](#) 2011 Apr 3. [Epub ahead of print]

**Anti-inflammatory properties of a new undecyl-rhamnoside  
(APRC11) against *P. acnes*.**

[Isard O](#), [Lévêque M](#), [Knol AC](#), [Ariès MF](#), [Khammari A](#), [Nguyen JM](#), [Castex-Rizzi N](#), [Dréno B](#).

Source : INSERM U892, 9 quai Moncousu, 44093, Nantes Cedex 01, France.

**Abstract**

Acne vulgaris is a skin disease affecting pilosebaceous glands in which *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) induced inflammation plays a central role. In order to develop new therapies against the inflammatory events, we evaluated the modulating effect of a new undecyl-rhamnoside, APRC11, on different markers of the inflammation. For this purpose, normal human keratinocytes taken from five healthy donors were pre-incubated for 24 h with APRC11 or Zinc Gluconate (Zn) which was used as reference molecule for its anti-inflammatory properties. Then, keratinocytes were stimulated with *P. acnes* Membrane Fraction for 6 h, in the presence of either APRC11 or Zn. Different markers were evaluated at mRNA level using a Luminex-based Quantigene array system and at protein level using an ELISA test and a Luminex array system. Results showed that *P. acnes* significantly increased the expression of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9. A 24-h treatment with APRC11 prior to the *P. acnes* stimulation down-regulated the *P. acnes*-induced cytokines over expression (IL-1 $\alpha$ , IL-8 and MMP-9) and up-regulated IL-1RA level in a similar manner than Zn. These regulations were noted at both protein and mRNA levels. In conclusion, the new undecyl-rhamnoside APRC11 is able to down-regulate the expression of molecules implicated in cutaneous inflammation and whose expression is induced by *P. acnes*, confirming its potential interest in inflammatory acne.

PMID: 21461892

**ABBREVIATIONS:**

Ctrl : Control ; ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay ; EDTA; EtOH : Ethanol ; HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; IL-1 $\alpha$ : Interleukin-1 alpha ; IL-1RA : Interleukin-1 receptor antagonist ; IL-8: Interleukin-8; KBM : Keratinocyte Basal Medium ; MF: Membrane Fraction; MMP-9 : Matrix Metalloproteinase-9 ; mRNA: messenger Ribonucleic acid; NHEK : Normal Human Epidermal Keratinocytes ; *P.acnes*: *Propionibacterium acnes*; POLR2A: polymerase RNA II DNA directed polypeptide A; qPCR : Quantitative polymerase chain reaction; r.p.m. : rotations per minute ; RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium; TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor- alpha ; Zn: Zinc

**CONFLICT OF INTEREST:**

This work has been supported by Pierre FABRE

**ACKNOWLEDGEMENTS:**

Financial support, *P.acnes* extracts and APRC11 were provided by Pierre Fabre Dermo-Cosmétique laboratories (Toulouse, France). We thank the Pediatric Surgery Service of Nantes University Hospital (Nantes, France) for foreskins samples.

**ABSTRACT:**

Acne vulgaris is a chronic skin disease of pilosebaceous glands in which inflammation plays a central role. In order to develop new therapies against the inflammatory events, we evaluated the modulating effect of a new undecyl-rhamnoside, namely the undecyl-rhamnoside APRC11, on different markers of the cutaneous inflammation.

For this purpose, normal human keratinocytes taken from five healthy donors were first pre-incubated for 24 hours with APRC11 or Zinc Gluconate (Zn). Zn was used as reference molecule for its anti-inflammatory properties. Then, keratinocytes were stimulated with *P.acnes* MF (Membrane Fraction) for 6 hours, in the presence of either APRC11 or Zn. Different markers of inflammation were evaluated at mRNA level using a Luminex-based Quantigene array system and at protein level using ELISA test and a Luminex array system. Results showed a significant increase in the expression of the following markers: IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 after *P.acnes* stimulation. A 24 hours treatment with APRC11 down regulated the *P.acnes*-induced cytokines expression (IL-1 $\alpha$ , IL-8 and MMP-9) and up-regulated IL-1RA level in a similar manner than Zn. These regulations were noted at both protein and mRNA levels. In conclusion, the new undecyl-rhamnoside APRC11 is able to down-regulate the expression of molecules implicated in cutaneous inflammation and whose expression is induced by *P.acnes*, confirming its potential interest in inflammatory acne.

**KEY WORDS:** Acne, *Propionibacterium acnes*, Keratinocyte, APRC11, Zinc

## INTRODUCTION:

Affecting millions of people, acne vulgaris is the most common skin disease worldwide. As over 90% of schoolchildren are affected and over 20% are moderately or severely affected by acne [1], medical treatments are needed to prevent physical and psychological scarring [2].

The pathogenesis of acne begins with an increased keratinocytes proliferation and an abnormal differentiation leading to obstructed pilosebaceous glands (PSG) and the formation of microcomedos. In addition, a sebum hypersecretion conducts to create a favourable environment for the proliferation of the skin commensal bacteria *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*). Acne inflammatory events are closely associated with the development of *P.acnes* in this anaerobic, sebum-rich environment [3-4]. It is well established that, with proliferation, *P.acnes* is able to induce proinflammatory cytokines secretion from many cell types including keratinocytes [5], but recent studies described also its potential in the stimulation of other proteins expression implicated in the differentiation and proliferation of keratinocytes, inducing microcomedo formation such as IL-1 $\alpha$ . Indeed, in addition to its proinflammatory properties, IL-1 has been shown to induce hyperproliferation of follicular keratinocytes in isolated sebaceous follicle infundibula maintained ex-vivo [6], or integrins and filaggrin expression which are implicated in the abnormal keratinocytes differentiation [7-8]. Finally, *P.acnes* acts thus in all the steps of the development of acne lesions.

Pharmacotherapy of acne vulgaris includes various compounds but the exact mechanisms involved in their efficiencies are often not clearly described or understood. In order to evaluate the potential interest of new molecules in the treatment of inflammatory acne, markers of the inflammation such as chemokines, metalloproteases or pro inflammatory cytokines [9] are commonly studied as “acne targets”.

In this context, the aim of this study was to evaluate the potential action of APRC11, a new rhamnoside derivative namely the undecyl-rhamnoside, on the modulation of different markers of the inflammation. We modelled an “acne prone condition” by incubating keratinocytes with *P.acnes* Membrane Fraction (MF) for 6 hours *in vitro*. First, we pre-incubated the keratinocytes for 24 hours with the APRC11 molecule before the *P.acnes* stimulation. *P.acnes* MF stimulating effects and APRC11 efficiency were evaluated at mRNA and protein levels. APRC11 activity on targeted molecules was compared with another molecule, Zinc Gluconate, which is commonly used in the treatment of acne vulgaris,

especially against inflammatory lesions [10-11]. In this context Zn was chosen as a “reference molecule” for its anti-inflammatory properties.

## **MATERIALS & METHODS:**

### **Materials**

#### *P. acnes extract*

*P. acnes* IP53113T (Pierre Fabre, Toulouse, France) extract was made available to us. The strain was first described in 1968. The Membrane Fraction (MF) contained peptidoglycan and teichoic acid and was resuspended in KBM (Keratinocyte Basal Medium) (Promocell, Heidelberg, Germany).

#### *Therapeutic molecules*

- APRC11 (C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>) (Pierre Fabre Dermo-Cosmétique laboratories, Toulouse, France) was reconstituted in absolute EtOH (Ethanol) (VWR, Briare, France) with an APRC11 concentration of 314mM (=100mg/mL). This stock solution was diluted in KBM in order to obtain a final concentration of 1μM.

- Zinc gluconate (Zn) (Labcatal, Montrouge, France) (15mg zinc gluconate = 2mg zinc element), was diluted in KBM with a final zinc concentration of 15μM (=1μg/mL).

#### *In vitro study: Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK)*

NHEK were obtained from foreskins of five healthy donors from the Pediatric Surgery Service of Nantes University Hospital (France).

### **Methods**

#### *Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) culture*

The hypodermis and deep dermis of the foreskin biopsies were removed. Then samples were cut into pieces of 9mm<sup>2</sup> and incubated for 2 hours at 37°C in Dispase 1X (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The epidermis and dermis were separated with thin forceps. The epidermis pieces were incubated with Trypsin-EDTA 1X (Sigma, St Quentin Fallavier, France) for 2 minutes at 37°C. Then, trypsin action on the pieces of epidermis was inhibited by the addition of RPMI (Sigma, St Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% foetal calf serum (Biowest). The detached keratinocytes were centrifuged at 1500r.p.m. for 7 minutes. The cell

pellet was then taken up in Keratinocyte Serum Free Medium (Invitrogen) supplemented with 5ng/mL Epidermal growth factor (EGF), 25µg/mL Bovine pituitary extract (BPE), 2.5µg/mL Fungizone (Bristol Myers Squibb) and 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma). Then, cells were seeded into 25cm<sup>2</sup> flasks, at a density of 4.10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>. They were cultured at 37°C in a humid environment under 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was removed every 2 or 3 days. At confluence, keratinocytes were detached by incubation with Trypsin-EDTA 1X for 5 minutes. During successive passages, keratinocytes were seeded at a density of 1.5.10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> in 75cm<sup>2</sup> flasks. Cells were used after a limited number (n=2) of subcultures.

In order to model an “acne prone condition”, NHEK were incubated in the presence of *P.acnes* MF for 6 hours.

To evaluate the modulators (APRC11 or Zn) efficiencies, NHEK were first pre incubated with the modulator alone for 1 or 24 hours and then stimulated by *P.acnes* MF for 6 hours with the same modulator (APRC11 or Zn) concentration.

#### *Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)*

MMP9 concentration in NHEK culture supernatants was measured by ELISA using commercial kits, according to the instructions supplied by manufacturers. ELISA was performed using the following kit: MMP-9: Kit Fluorokine E, (R&D Systems, Lille, France)

#### *Multiplex analysis*

After incubation, NHEK supernatants were collected. Three human cytokine concentrations in NHEK culture supernatants were measured by a 3-plex Bio-plex Pro Assays (Bio-Rad) (IL-1α, IL-1RA, IL-8). Each multiplex assay was performed in duplicate according to the manufacturers' specifications. Mean fluorescent intensities were measured with the Bio-Plex 200 (Bio-Rad) and raw data were analyzed by the Bio-Plex Manager 4.1 Software to obtain concentration values.

#### *Quantigene Multiplex analysis*

After incubation, NHEK were washed with RNase free PBS. Total RNA was isolated in RLT buffer (Qiagen) supplemented with 0.1% β-Mercaptoethanol (Sigma). mRNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and mRNA concentrations were evaluated using the Nanodrop (Thermo Scientific). HPRT and POLR2A were used as housekeeping genes. IL-1α, IL-1RA, IL-8 and MMP-9 levels were measured using a Quantigene Multiplex

Assay. Mean fluorescent intensities were measured with the Bio-plex 200 (Bio-Rad) and raw data were analyzed by the Bio-plex Manager 4.1 Software.

*Results analysis and statistical methods*

The MF induced over expressions both at protein and at mRNA levels were considered as significant for induction factor levels of +40% or more. The modulators induced up or down regulations were considered as notable when they were more important than 20% modulation. Concerning the protein level analysis, mixed models were developed to take into account repeated measures for each patient. A logarithmic transformation was applied on data collected. For each factor, one model was used. The reference for comparison was set to FM status. All analyses were performed with R statistical software.

Concerning the mRNA level analysis, sample t tests compare means with a hypothetical value equal to 1. Differences are considered to be significant, if 95% confidence intervals excluded the value 1.

## RESULTS:

### **1- Modulation of NHEK response by *P.acnes* MF**

#### a) IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 mRNA levels (Fig.1)

IL-1 $\alpha$ , and IL-1RA mRNA levels were significantly increased after 6 hours incubation with *P. acnes* MF (p=0.04 for IL-1  $\alpha$  and p=0.03 for IL-1RA) with a mean induction factor of 7.0 ( $\pm$ 3.9) for IL-1  $\alpha$  and 2.7 ( $\pm$ 1.1) for IL-1RA. IL-8 and MMP-9 were also increased but in a nonsignificant manner (respectively p=0.07 and p=0.29). However, for these two markers, the up regulations were noted for all the five donors studied. The data are summarized in Figure 1.

#### b) IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 protein levels (Fig.2)

After 6 hours incubation, *P.acnes* MF induced a significant increase in IL-1 $\alpha$  (p=0.03), IL-1RA (p<0.01), IL-8 (p=0.01) and MMP-9 (p<0.01) protein levels in the NHEK culture supernatants of all the 5 donors studied. The data are summarized in figure 2.

### **2- Modulation of *P.acnes*-stimulated NHEK response with APRC11 or Zn (after 24 hours of prior incubation)**

#### a) IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 mRNA levels (Fig. 3)

- *Modulations of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8, MMP-9 mRNA levels induced by 24 hours of prior incubation with APRC11:*

After a 24 hours prior incubation, APRC11 showed an inhibitory effect on IL-1 $\alpha$  (-12%), IL-8 (-26%) and MMP-9 (-71%) mRNA levels. Moreover, APRC11 up regulated IL-1RA mRNA (+48%). These effects were observed for all the donors studied. The data are summarized in the figure 3.

- *Modulations of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8, MMP-9 mRNA levels induced by 24 hours prior incubation with Zinc gluconate:*

Zinc gluconate had an inhibitory effect only on MMP-9 mRNA (-55%) and a stimulating effect on the production of IL-1RA mRNA (+72%). These effects were noted for all the 5 donors studied (Fig. 3).

b) IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8, MMP-9 protein levels analysis (Fig.4)

- *Modulations of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8, MMP-9 protein levels induced by 24 hours prior incubation with APRC11:*

APRC11 had an inhibitory effect on IL-1 $\alpha$  secretion (-20%), IL-8 (-26%) and MMP-9 (-40%; p<0.001). In addition, APRC11 up regulated IL-1RA level (+ 34%; p=0.04) (Fig. 4).

- *Modulations of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8, MMP-9 protein levels induced by 24 hours prior incubation with Zinc gluconate:*

Zinc gluconate inhibited IL-1 $\alpha$  secretion (-25%), IL-8 secretion (- 27%) and MMP-9 level (- 35%; p<0.001) but did not modulate IL-1RA level (Fig. 4).

## DISCUSSION:

Activation of the innate immune system by *P.acnes* triggers host defences and contributes to the development of the inflammatory reaction in acne around and in the sebaceous follicle. Thus, as expected, after 6 hours of incubation, *P.acnes* induced significant up regulations of IL-1 $\alpha$ , IL-8 and MMP-9 by keratinocytes both at transcriptional and protein level. In addition, IL-1RA expression was also significantly increased by *P.acnes*. As IL-1-RA is physiologically produced in order to counteract the IL-1 $\alpha$  effects, IL-1RA over expression by *P.acnes* stimulated NHEK is probably a marker of the regulation of induced IL-1  $\alpha$ . Moreover, these results are in accordance with studies describing over expressions of these four molecules in acne lesions or up regulations induced by *P.acnes* [12-15]. Thus, our results validate our model of acne prone conditions.

Concerning the molecule used as control, Zinc Gluconate acts on different mechanisms involved in acne by modulating integrins expression [16] and seborrhoea [17-18], by having an antimicrobial activity against *P.acnes* and also by reducing the resistance of *P.acnes* strains to erythromycin both *in vitro* and *in vivo* [10, 19]. Moreover, Zn has been used until now mainly for its anti-inflammatory properties [11]. In our study, we observed a modulating effect of Zn on IL-1 $\alpha$ , IL-8 and MMP-9 expression rates. This confirms previous studies indicating that Zn is able to modulate the innate immunity by inhibiting the nitric oxide production [20], TNF- $\alpha$  or TLR-2 expression [21] and thus improves acne.

Thus the activities of this control molecule are confirmed in our *in vitro* model.

In comparison with Zinc gluconate which has an effect on three of the four markers studied (IL-1 $\alpha$ , IL-8 and MMP-9), APRC11 modulates all the four markers. Indeed, APRC11 is able to down-regulate IL-1 $\alpha$ , IL-8 and MMP-9 and also up regulate IL-1RA expression at both mRNA and protein levels. Interestingly, similarly to Zinc Gluconate, APRC11 down regulates IL-1 $\alpha$  and IL-8 cytokines levels. Moreover, APRC11 was also able to down regulate MMP-9 expression and to up regulate IL-1RA expression in more significant manner than Zinc Gluconate. A rhamnoside is a glycoside of rhamnose, sugars found in plant glycosides. Among the rhamnosides, the pentyl- and cetyl-rhamnoside have previously been used as cosurfactant and surfactant. Concerning the anti inflammatory activities of rhamnoside, nothing has ever been shown previously. In the literature, we can just find mentioned that flavonol glycosides act on rat paw oedema and phenolic glycosides on nitric oxid release [22-

23]. Our results demonstrate that cutaneous inflammation represents a crucial target of this new undecyl-rhamnoside APRC11.

Concerning the two molecules studied, although the modulations observed were not always significant, they were noted for all the donors analyzed. Interestingly, this work points the strong donor-dependant variability of keratinocytes in their response to *P.acnes* stimulation but also in their response to the different anti inflammatory treatments. This observation could explain the important variations noted in acne severity between different patients exposed to the same *P.acnes* strains or quantities and could also explain the failure of treatments in some cases.

Treatments efficiency is significantly enhanced by the combination of various molecules [24-25] to target simultaneously the major factors implicated in acne physiopathology namely sebaceous hyperplasia, follicular hyperkeratosis and inflammation. In this context, APRC11 is a new substance which could be useful to treat the inflammatory stage of acne in combination with other agents.

In summary, in this study, we demonstrate that the undecyl-rhamnoside APRC11, has anti inflammatory activities on skin via the modulation of targets implicated in innate immunity. Interestingly, these targets are up regulated by *P acnes*, supporting the interest of this molecule in the treatment of inflammatory acne and potentially in the reduction of scar formation.

## FIGURE LEGENDS:

### **Fig.1: *P.acnes* up regulates the NHEK secretion of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 at mRNA level**

Evaluation of NHEK IL-1 $\alpha$  (a), IL-1RA (b), IL-8 (c) and MMP-9 (d) relative mRNA synthesis after *P.acnes* MF 6 hours stimulation (MF) compared with the basal levels (Ctrl), which were regarded as 1. Each bar represents the mean  $\pm$ SD from 5 donors.

Statistical significance: \*\*\* $p < 0.05$  as compared with the basal levels (Ctrl).

### **Fig.2: *P.acnes* up regulates the NHEK secretion of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 at protein level**

Evaluation of IL-1 $\alpha$  (a), IL-1RA (b), IL-8 (c) and MMP-9 (d) protein expression (pg/mL) at basal level (Ctrl) and after *P.acnes* MF 6 hours stimulation (MF) in NHEK culture supernatants. Each bar represents the mean  $\pm$ SD from 5 donors. Statistical significance: \*\*\* $p < 0.05$  as compared with the basal levels (Ctrl).

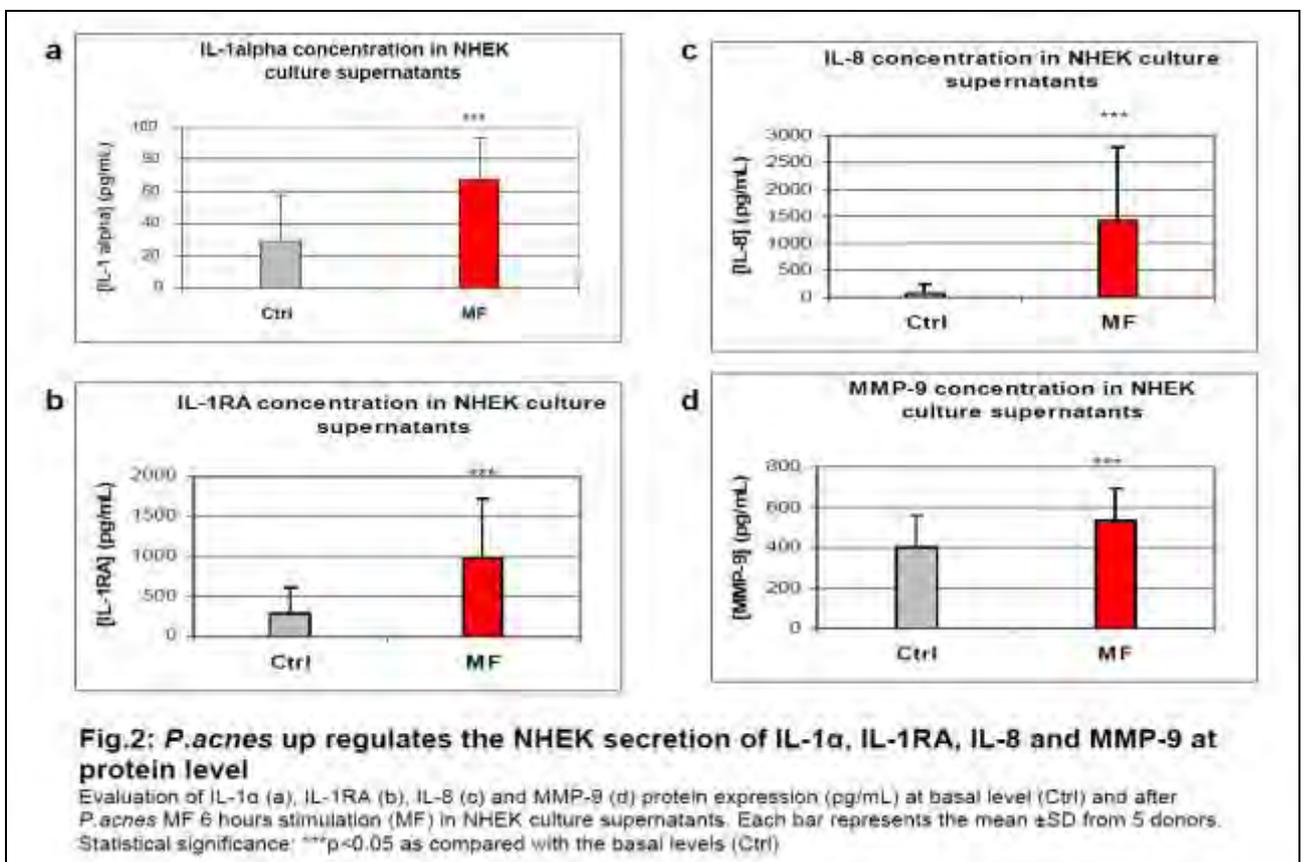
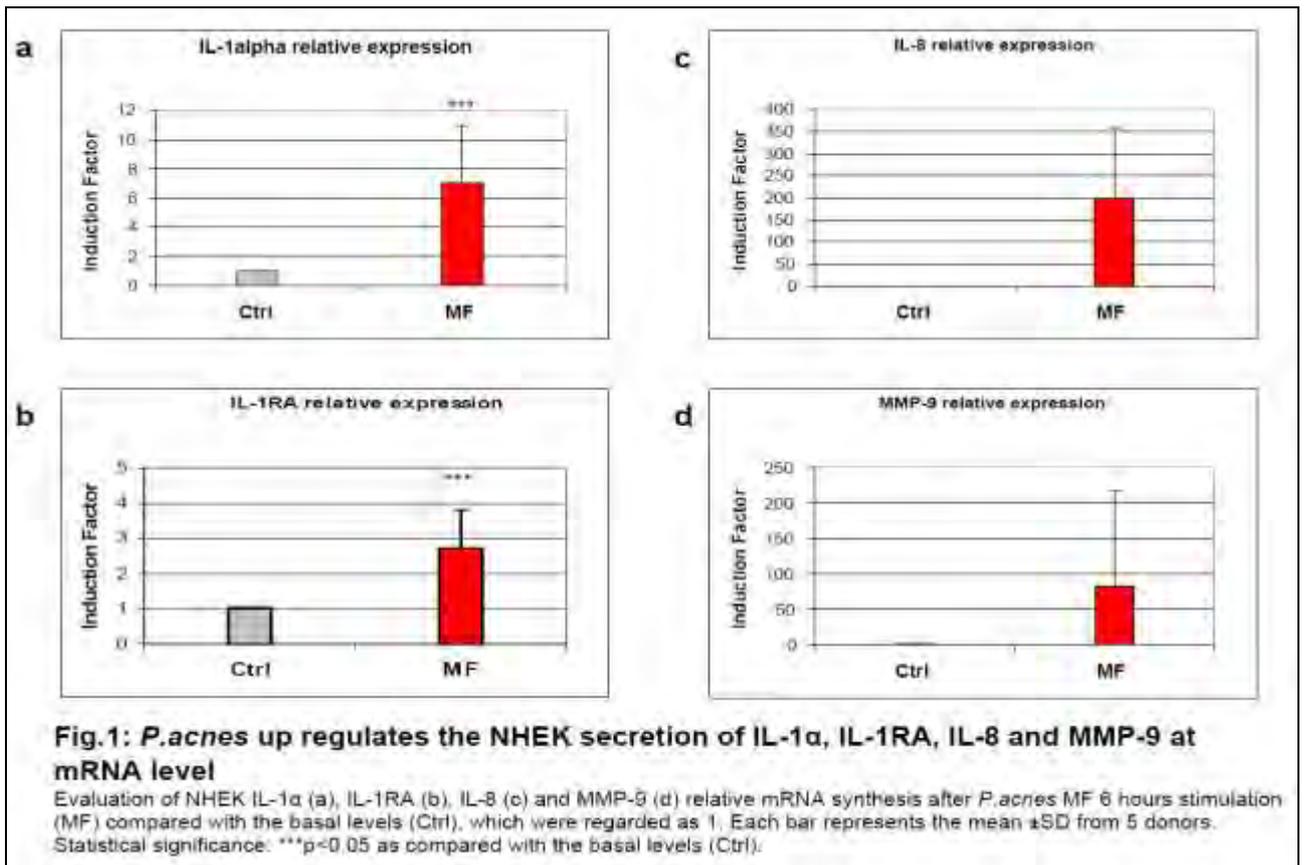
### **Fig.3: APRC11 and Zn modulate the *P.acnes*-induced up regulations at mRNA level**

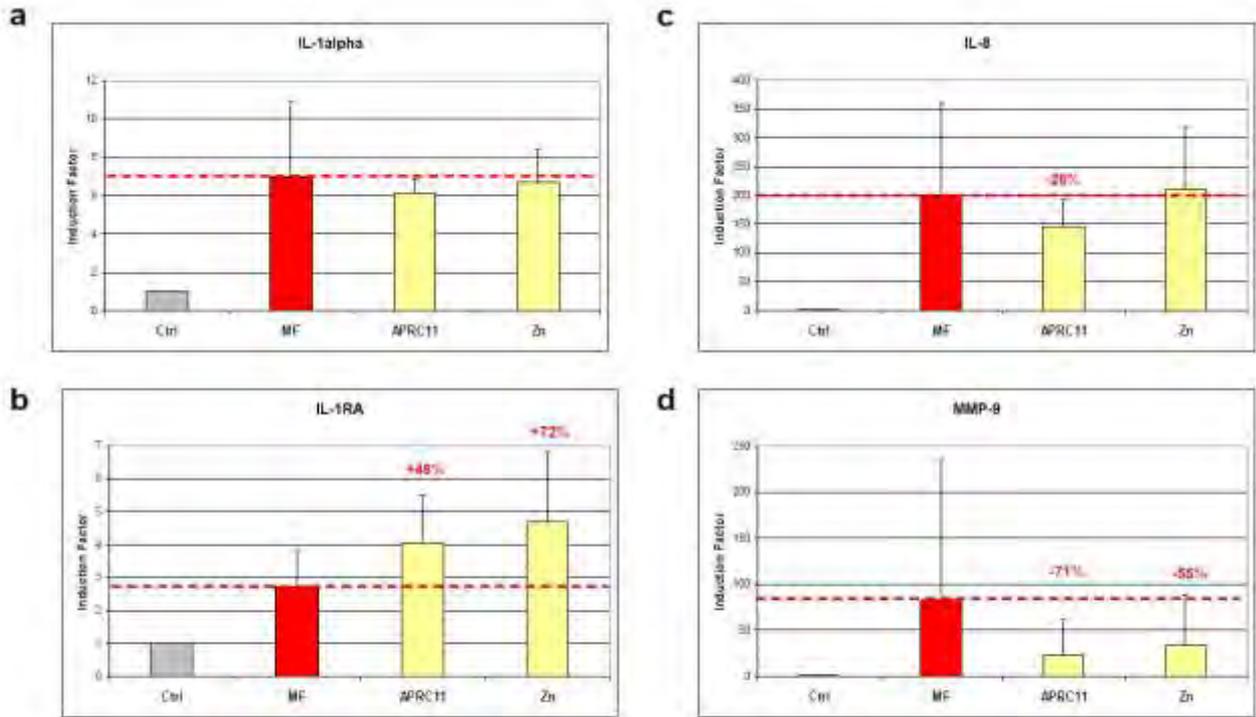
Evaluation of NHEK IL-1 $\alpha$  (a), IL-1RA (b), IL-8 (c) and MMP-9 (d) mRNA synthesis at basal level (Ctrl) which were regarded as 1, at *P.acnes* stimulated level (MF), and after 24 hours preincubation with APRC11 or Zn before MF stimulation. Each bar represents the mean  $\pm$ SD from 5 donors.

### **Fig.4: APRC11 and Zn modulate the *P.acnes*-induced up regulations at protein level**

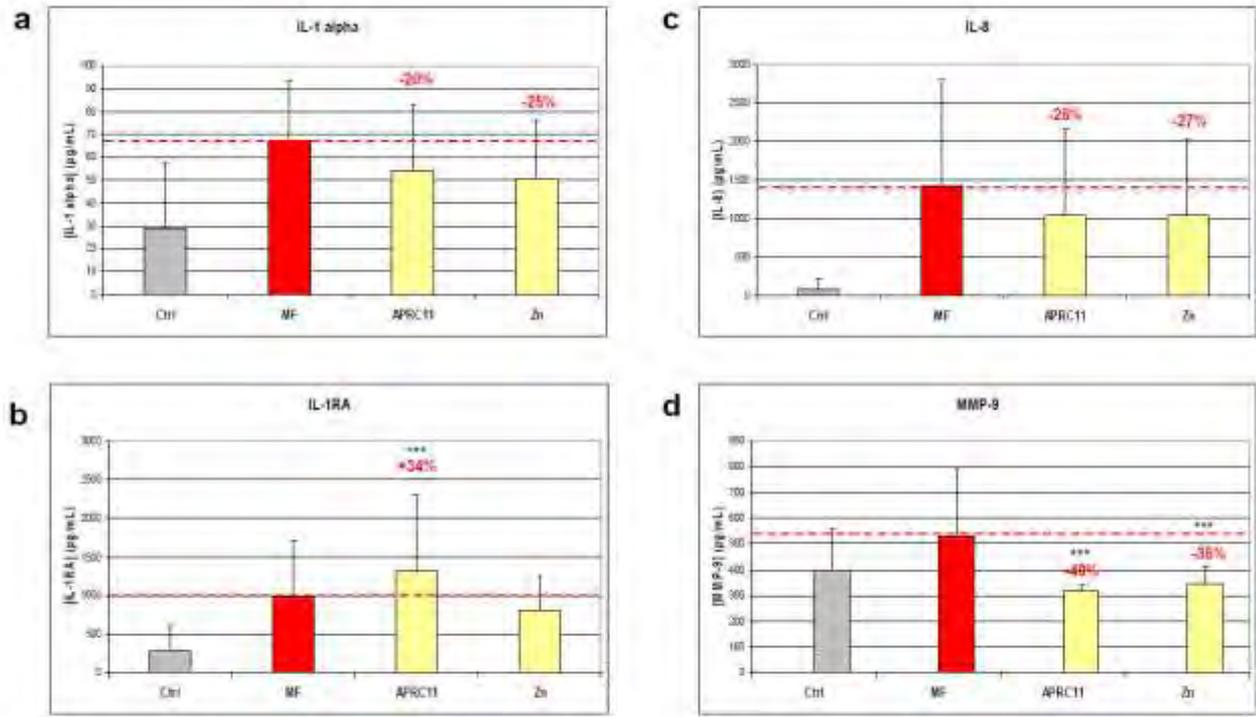
Evaluation of IL-1 $\alpha$  (a), IL-1RA (b), IL-8 (c) and MMP-9 (d) protein expression (pg/mL) at *P.acnes*-stimulated level (MF) and after 24 hours preincubation with APRC11 and Zn. Each bar represents the mean  $\pm$ SD from 5 donors. \*\*\* $p < 0.05$  as compared with the MF stimulated levels (MF).

**FIGURES:**





**Fig.3: APRC11 and Zn modulate the *P.acnes*-induced up regulations at mRNA level**  
 Evaluation of NHEK IL-1 $\alpha$  (a), IL-1RA (b), IL-8 (c) and MMP-9 (d) mRNA synthesis at basal level (Ctrl) which were regarded as 1, at *P.acnes* stimulated level (MF), and after 24 hours preincubation with APRC11 or Zn before MF stimulation. Each bar represents the mean  $\pm$ SD from 5 donors.



**Fig.4: APRC11 and Zn modulate the *P.acnes*-induced up regulations at protein level**  
 Evaluation of IL-1 $\alpha$  (a), IL-1RA (b), IL-8 (c) and MMP-9 (d) protein expression (pg/mL) at *P.acnes*-stimulated level (MF) and after 24 hours preincubation with APRC11 or Zn. Each bar represents the mean  $\pm$ SD from 5 donors. \*\*\* $p$ <0.05 as compared with the MF stimulated levels (MF).

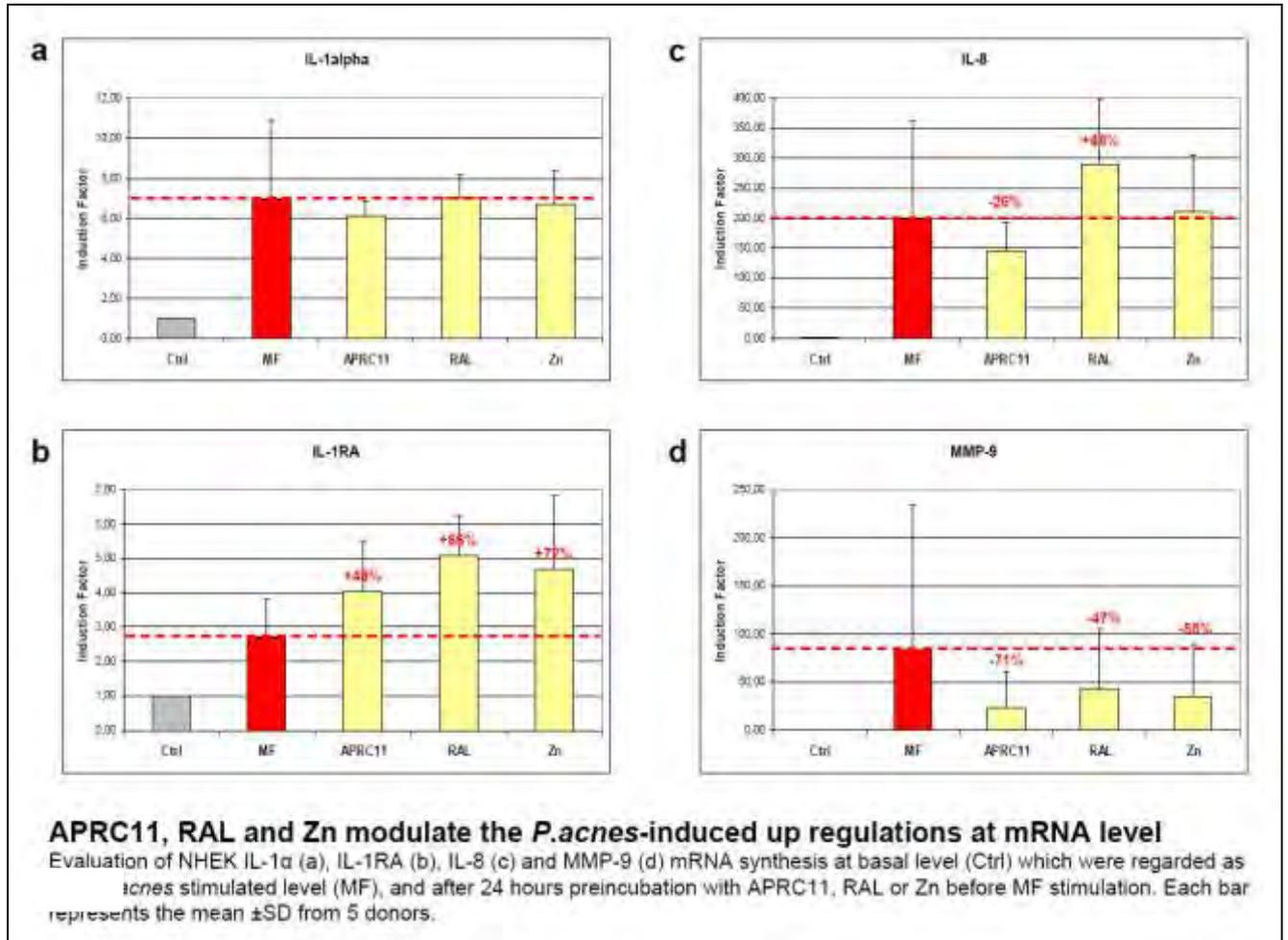
## REFERENCES:

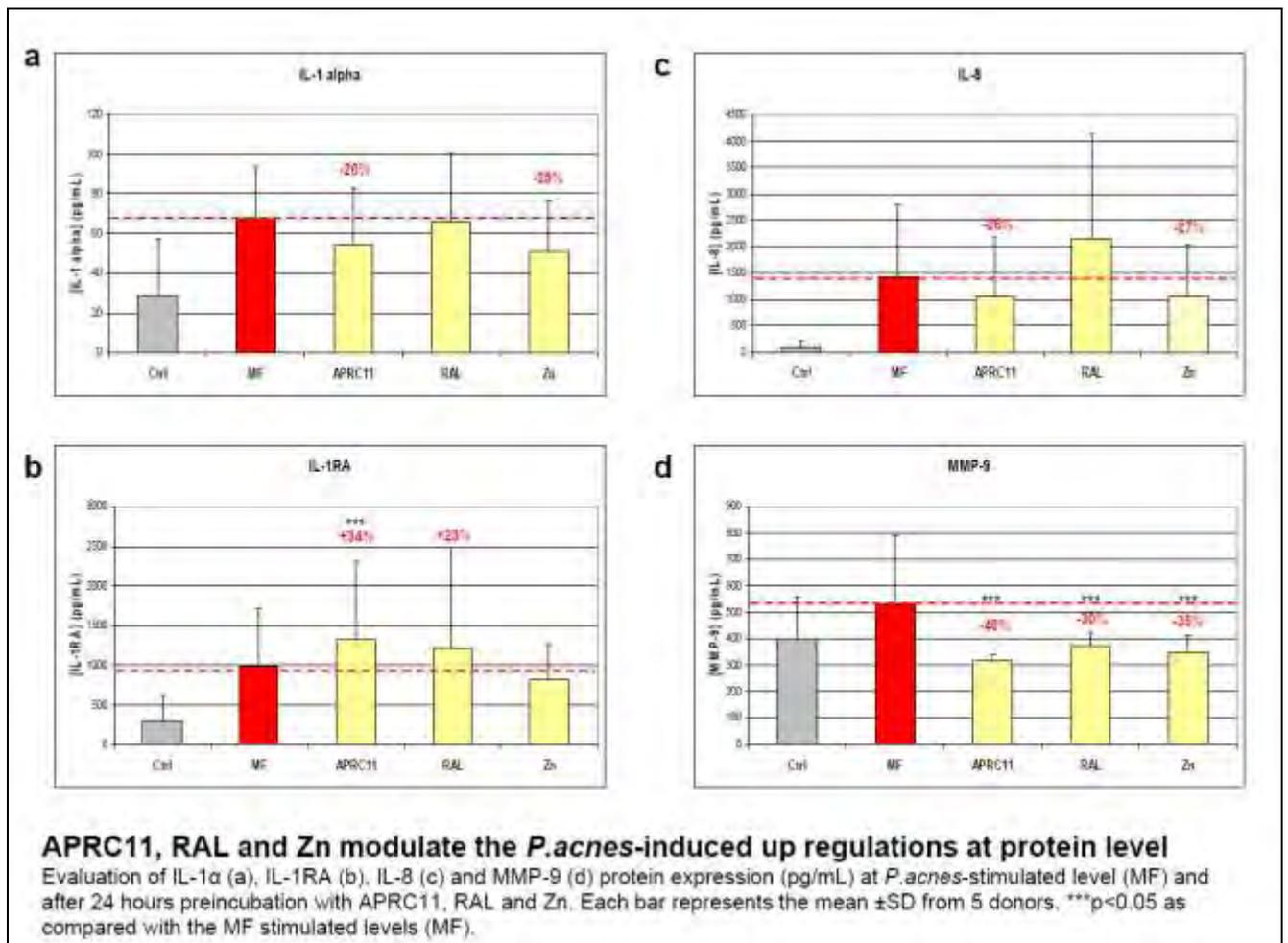
- [1] Kilkenny M, Merlin K, Plunkett A, Marks R. The prevalence of common skin conditions in Australian school students: 3. acne vulgaris. *Br J Dermatol.* 1998;139:840-5.
- [2] Rehn LM, Meririnne E, Hook-Nikanne J, Isometsa E, Henriksson M. Depressive symptoms, suicidal ideation and acne: a study of male Finnish conscripts. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008;22:561-7.
- [3] Kurokawa I, Danby FW, Ju Q, Wang X, Xiang LF, Xia L, et al. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol.* 2009;18:821-32.
- [4] Zouboulis CC. Is acne vulgaris a genuine inflammatory disease? *Dermatology.* 2001;203:277-9.
- [5] Vowels BR, Yang S, Leyden JJ. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. *Infect Immun.* 1995;63:3158-65.
- [6] Guy R, Green MR, Kealey T. Modeling acne in vitro. *J Invest Dermatol.* 1996;106:176-82.
- [7] Akaza N, Akamatsu H, Kishi M, Mizutani H, Ishii I, Nakata S, et al. Effects of *Propionibacterium acnes* on various mRNA expression levels in normal human epidermal keratinocytes in vitro. *J Dermatol.* 2009;36:213-23.
- [8] Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dreno B. Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium acnes* extracts on keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2007;299:441-7.
- [9] Zouboulis CC, Nestoris S, Adler YD, Orth M, Orfanos CE, Picardo M, et al. A new concept for acne therapy: a pilot study with zileuton, an oral 5-lipoxygenase inhibitor. *Arch Dermatol.* 2003;139:668-70.
- [10] Dreno B, Foulc P, Reynaud A, Moysse D, Habert H, Richet H. Effect of zinc gluconate on *propionibacterium acnes* resistance to erythromycin in patients with inflammatory acne: in vitro and in vivo study. *Eur J Dermatol.* 2005;15:152-5.
- [11] Meynadier J. Efficacy and safety study of two zinc gluconate regimens in the treatment of inflammatory acne. *Eur J Dermatol.* 2000;10:269-73.
- [12] Jeremy AH, Holland DB, Roberts SG, Thomson KF, Cunliffe WJ. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J Invest Dermatol.* 2003;121:20-7.
- [13] Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, Jarrousse V, Quereux G, Khammari A, et al. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol.* 2005;153:1105-13.
- [14] Kim J. Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Dermatology.* 2005;211:193-8.
- [15] Lyte P, Sur R, Nigam A, Southall MD. Heat-killed *Propionibacterium acnes* is capable of inducing inflammatory responses in skin. *Exp Dermatol.* 2009;18:1070-2.
- [16] Tenaud I, Sainte-Marie I, Jumbou O, Litoux P, Dreno B. In vitro modulation of keratinocyte wound healing integrins by zinc, copper and manganese. *Br J Dermatol.* 1999;140:26-34.
- [17] Pierard GE, Pierard-Franchimont C. Effect of a topical erythromycin-zinc formulation on sebum delivery. Evaluation by combined photometric-multi-step samplings with Sebutape. *Clin Exp Dermatol.* 1993;18:410-3.
- [18] Stamatiadis D, Bulteau-Portois MC, Mowszowicz I. Inhibition of 5 alpha-reductase activity in human skin by zinc and azelaic acid. *Br J Dermatol.* 1988;119:627-32.
- [19] Fluhr JW, Bosch B, Gloor M, Hoffer U. In-vitro and in-vivo efficacy of zinc acetate against *propionibacteria* alone and in combination with erythromycin. *Zentralbl Bakteriol.* 1999;289:445-56.

- [20] Yamaoka J, Kume T, Akaike A, Miyachi Y. Suppressive effect of zinc ion on iNOS expression induced by interferon-gamma or tumor necrosis factor-alpha in murine keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2000;23:27-35.
- [21] Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dreno B. Zinc salts inhibit in vitro Toll-like receptor 2 surface expression by keratinocytes. *Eur J Dermatol.* 2007;17:492-6.
- [22] Cheenpracha S, Park EJ, Yoshida WY, Barit C, Wall M, Pezzuto JM, et al. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. *Bioorg Med Chem.* 2010.
- [23] Okoye FB, Osadebe PO. A new anti-inflammatory flavonol glycoside from *Alchornea floribunda* leaves. *Nat Prod Res.* 2010;24:266-73.
- [24] Dreno B, Castell A, Tsankov N, Lipozencic J, Serdaroglu S, Gutierrez V, et al. Interest of the association retinaldehyde/glycolic acid in adult acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23:529-32.
- [25] Leyden JJ. A review of the use of combination therapies for the treatment of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49:S200-10.

# 1. Résultats complémentaires à l'article

Les résultats obtenus après des pré-incubations de 24h en présence de RAL qui n'ont pas été présentés dans l'article sont présentés ci-dessous.





En ce qui concerne le RAL, aussi bien au niveau des transcrits que des protéines, nous avons identifié un effet inhibiteur de cette molécule sur la sécrétion de MMP-9 ainsi que sur l'induction de l'expression de l'IL-1RA. Ces résultats confirment des études indiquant que les acides rétinoïques (RA) ont la capacité de réduire la synthèse des ARNm de MMP-2 et MMP-9 (Lee *et al.*, 2009; Thielitz and Gollnick, 2008; Tsang and Crowe, 2001). D'autre part, nos résultats sont en accord d'autres travaux qui indiquent que les rétinoïdes, en inhibant l'expression de MMP-9, ont la capacité de moduler la formation des cicatrices (Axel *et al.*, 2001; Tsang and Crowe, 2001).

# Discussion

- **Problématique générale**

L'acné est une pathologie inflammatoire chronique du follicule pilo-sébacé affectant 80% à 90% des adolescents. Il existe toutefois des formes d'acné persistant à l'âge adulte, principalement chez les jeunes femmes, mais aussi des formes d'acné du nourrisson. En outre, certaines formes sévères peuvent conduire à la formation de cicatrices. Souvent affichante, cette pathologie peut donc avoir un fort retentissement sur la qualité de vie et est parfois associée à des syndromes dépressifs. L'acné est une pathologie multifactorielle et c'est donc un ensemble de facteurs qui conduisent à l'apparition des lésions et qui déterminent leur degré de sévérité. Actuellement la recherche sur l'acné est axée sur l'étude de ces différents facteurs afin de mieux comprendre les mécanismes responsables du développement de la pathologie et d'élaborer de nouveaux traitements. En effet, une meilleure connaissance de la formation du microcomédon pourrait permettre le développement de thérapies préventives ciblant les lésions débutantes afin d'éviter leur évolution vers des lésions inflammatoires. Cependant, la nécessité de développer des traitements curatifs permettant de réduire l'inflammation est toujours d'actualité et des études permettant une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la phase inflammatoire de l'acné restent nécessaires.

Classiquement, trois étapes sont définies dans la formation des lésions d'acné : une hyper séborrhée, des anomalies de la prolifération et de la différenciation kératinocytaire induisant la formation du microcomédon, puis une phase inflammatoire dans laquelle l'implication de *P.acnes* est de plus en plus clairement définie. Pourtant, de récentes études suggèrent un rôle plus précoce de *P.acnes* et ce, dès la formation du microcomédon. En effet, il a été montré que *P.acnes* pourrait être impliqué non seulement dans la phase inflammatoire de l'acné, mais aussi dans les deux premières étapes que sont l'hyper séborrhée (Iinuma *et al.*, 2009; Zouboulis, 2009) ainsi que les anomalies de la prolifération (Jugeau *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2005) et de la différenciation (Akaza *et al.*, 2009; Jarrousse *et al.*, 2007a; Nagy *et al.*, 2005) des kératinocytes. Dans ce contexte, nous avons souhaité approfondir les études précédemment menées sur *P.acnes* afin de mieux comprendre le rôle joué par cette bactérie dans la physiopathologie de l'acné.

- **Objectifs de la première partie**

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier l'implication potentielle de la bactérie *P.acnes* dans la modulation de l'expression cutanée de deux voies hormonales retrouvées au niveau de la peau et potentiellement impliquées dans le développement de l'acné: d'une part l'axe CRH/CRH-R1, d'autre part l'axe IGF-1/IGF-1R. Cette étude s'accompagnait, en parallèle, de l'analyse de l'éventuel effet préventif du gluconate de zinc dans la modulation de l'expression des molécules impliquées dans ces deux voies.

- **Les modèles d'études utilisés : intérêt et limites**

Nos expérimentations ont été réalisées sur explants cutanés (modèle *ex vivo*) ainsi que sur kératinocytes cultivés en monocouches (modèle *in vitro*). L'utilisation des explants cutanés nous a permis d'étudier les effets de *P.acnes* et du gluconate de zinc dans les conditions les plus proches possibles de celles rencontrées *in vivo*, puisque ce modèle contient tous les types cellulaires de l'épiderme et les kératinocytes sont présents à tous les stades de différenciation. Les observations faites sur explants cutanés ont ensuite été confrontées à celles notées sur les kératinocytes en monocouches. En effet, l'utilisation de ce second outil nous a permis de modéliser les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme qui ont un fort pouvoir prolifératif et qui sont peu différenciés. Effectivement, ces cultures cellulaires sont uniquement constituées de kératinocytes non différenciés et permettent l'étude très précise de ce seul type cellulaire. Néanmoins, il convient de rester vigilant sur les résultats obtenus avec ce modèle car certains effets des modulateurs pourraient être ignorés s'ils nécessitent une différenciation plus avancée des kératinocytes ou la présence d'autres types cellulaires pour s'exprimer (fibroblastes, mélanocytes...).

- **L'axe CRH/CRH-R1 dans l'acné et les modulations induites par *P.acnes***

L'utilisation de ces deux modèles nous a permis de mettre en évidence, par immunohistochimie, que les extraits de *P.acnes*, et plus particulièrement l'extrait FM, étaient capables d'induire une augmentation de l'expression de la protéine CRH dans l'épiderme des explants, en peau totale. Nous n'avons toutefois pas retrouvé d'expression du CRH dans les kératinocytes en monocouches, c'est-à-dire les kératinocytes peu différenciés qui modélisent ceux de la couche basale de l'épiderme. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude indiquant que le CRH n'était pas détecté dans les kératinocytes normaux humains en

monocouches par RT-PCR mais qu'il était exprimé par les mélanocytes cultivés de la même manière, en monocouches (Slominski *et al.*, 1995). Dans une autre étude, le CRH et le CRH-R1 étaient détectés dans les kératinocytes de la couche épineuse de l'épiderme (c'est à dire des kératinocytes à un stade de différenciation plus avancé que ceux de la couche basale) ainsi que dans les mélanocytes, et ce à des taux relativement faibles en peaux saines, confirmant ainsi notre observation sur explants cutanés. D'autre part, ces taux étaient plus élevés en périphérie des follicules pilo-sébacés (Kono *et al.*, 2001). Cette même étude montrait une détection du CRH et du CRH-R1 dans l'épiderme et dans les glandes sébacées par RT-PCR *in situ* confirmant la capacité de la peau à produire elle-même les ARNm correspondant à ces deux molécules. Au cours de notre étude, nous avons également observé par immunohistochimie que la protéine CRH-R1 était exprimée faiblement dans l'épiderme des explants cutanés et nous avons détecté, à un taux très faible, la présence de l'ARNm de CRH-R1 dans les monocouches de kératinocytes, ce qui confirme ces observations. D'autre part, nous avons montré que l'expression du CRH-R1 était stimulée par des incubations en présence de l'extrait FM de *P.acnes*. Ceci pourrait laisser penser que *P.acnes* représente un stress local pour la peau et que l'activation de l'axe CRH/CRH-R1 se déclenche en réponse à ce stress.

Par ailleurs, nous avons aussi observé qu'au niveau des lésions d'acné, les taux de CRH et de CRH-R1 étaient plus élevés que dans les peaux saines de patients acnéiques ainsi que dans les peaux d'individus sains. Ces résultats sont en accord avec la très récente étude de Ganceviciene *et al.* centrée sur les follicules pilo-sébacés, dans laquelle il a été montré que les molécules de l'axe CRH/CRH-R1 étaient surexprimées dans les lésions d'acné. Plus précisément, il a été montré dans cette étude qu'au niveau des lésions, les sébocytes, à tous les stades de différenciation, exprimaient le CRH de manière très intense alors qu'elle dépendait du stade de différenciation (immunomarquage plus intense dans les sébocytes moins différenciés) dans les zones non atteintes par l'acné chez des patients acnéiques ainsi que dans les peaux saines (Ganceviciene *et al.*, 2009). De manière indépendante, de multiples études ont montré la capacité de la peau à produire du CRH et du CRH-R1 localement et il est décrit que ces expressions sont plus intenses dans diverses pathologies cutanées telles que l'acné, le psoriasis, l'alopécie, la kératose séborrhéique ou encore certains cancers, au niveau de la zone inflammatoire ou en périphérie (Kim *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006b; Tagen *et al.*, 2007). Dans notre étude, nous avons approfondi ces observations en établissant un lien

direct entre la bactérie *P.acnes* et l'induction de l'axe CRH/CRH-R1 en peau saine. Des comparaisons entre des peaux normales et des peaux inflammatoires suggèrent que l'axe CRH/CRH-R1 pourrait être modulé par le système immunitaire de manière autocrine ou paracrine. Au sein du système nerveux central, il est décrit que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6) sont capables de stimuler l'expression du CRH (Audhya *et al.*, 1991; Singh and Fudenberg, 1988). De ce fait, de la même manière, des surexpressions de ces cytokines induites par *P.acnes*, qui sont retrouvées dans l'épiderme de patients acnéiques, pourraient engendrer une surexpression du CRH local. De par ses différentes actions, le CRH pourrait jouer un rôle au niveau de chacune des trois étapes nécessaires au développement des lésions d'acné. En effet, il est décrit que l'activation de l'axe CRH/CRH-R1 stimule la production de sébum en augmentant la synthèse de lipides par les sébocytes (Zouboulis *et al.*, 2002), qu'il est capable de moduler l'état de différenciation des kératinocytes (Zbytek *et al.*, 2005; Zbytek and Slominski, 2005) et qu'il joue un rôle fondamental dans l'inflammation : le CRH est capable de stimuler la dégranulation des mastocytes (Theoharides *et al.*, 1998), de stimuler la sécrétion de l'IL-1 par les monocytes (Kavelaars *et al.*, 1989) et de l'IL-6 par les mononucléaires (Angioni *et al.*, 1993), de stimuler la prolifération des lymphocytes (McGillis *et al.*, 1989; Singh, 1989) et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par des kératinocytes (Zbytek *et al.*, 2004). Bien que les mécanismes d'action de la voie CRH/CRH-R1 au niveau cutané méritent d'être plus approfondis, l'activation de cet axe pourrait, en partie, expliquer l'exacerbation de certaines pathologies cutanées, et plus particulièrement l'acné, sous l'influence d'un stress systémique ou local. Si le stress psychologique est déjà largement associé à l'acné, une hyper prolifération de *P.acnes* pourrait constituer un stress local déclenchant l'activation de la voie CRH/CRH-R1 cutanée, probablement à travers une augmentation de la sécrétion de certaines cytokines par les cellules de l'épiderme, aboutissant ainsi à une hyper sécrétion sébacée, des anomalies de la prolifération kératinocytaire et une stimulation de l'inflammation et donc, à la formation des lésions d'acné. Dans ces conditions, des molécules permettant de bloquer l'activation de cette voie pourraient être bénéfiques pour le traitement de l'acné. Zoumakis et al. ont déjà proposé l'utilisation d'antagonistes au CRH ou au CRH-R dans le traitement d'un grand nombre de pathologies stress-dépendantes liées à l'axe CRH/CRH-R1 (Zoumakis and Chrousos, 2010; Zoumakis *et al.*, 2006).

- **L'axe IGF-1/IGF-1R dans l'acné et les modulations induites par *P.acnes***

En ce qui concerne l'axe IGF-1/IGF-1R, nous avons montré que l'IGF-1 et son récepteur sont surexprimés dans l'épiderme des lésions d'acné, en comparaison aux peaux saines. Ceci s'accompagne d'une surexpression du marqueur de prolifération Ki-67 ainsi que d'une expression anormale de la filaggrine. Ce résultat confirme de précédents travaux indiquant des taux sériques en IGF-1 plus élevés chez des patients acnéiques que chez des sujets sains, ainsi qu'une corrélation entre le taux d'IGF-1 et la sévérité de l'acné (Aizawa and Niimura, 1995; Cappel *et al.*, 2005; Vora *et al.*, 2008).

Si le rôle d'une surexpression de l'axe IGF-1/IGF-1R a déjà été suggéré dans l'acné et que l'influence de l'alimentation, notamment des produits laitiers qui favoriseraient l'augmentation du taux d'IGF-1, est discuté depuis de nombreuses années (Crowe *et al.*, 2009; Melnik and Schmitz, 2009; Qin *et al.*, 2009), nous avons montré, pour la première fois, que l'extrait FM de *P.acnes* est capable à lui seul, d'induire une surexpression de l'IGF-1 et de son récepteur ainsi qu'une surexpression du Ki-67 et de la filaggrine au niveau épidermique. Ainsi, la surexpression de l'IGF-1 observée chez les patients acnéiques pourrait être liée à la prise alimentaire et/ou à une augmentation de la prolifération de la bactérie *P.acnes*. En outre, ces deux mécanismes pourraient avoir une action synergique et influencer la formation du microcomédon ainsi que l'hyper séborrhée. En effet, il est décrit que l'IGF-1 stimule la prolifération kératinocytaire (Grimberg and Cohen, 2000; Stachelscheid *et al.*, 2008), la production d'androgènes (Melnik and Schmitz, 2009) et la lipogenèse (Smith *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2008). Cette relation entre l'axe IGF-1/IGF-1R et l'acné a aussi été très récemment mise en évidence, indirectement, à travers une étude dans laquelle Karadag *et al.* décrivent que l'isotrétinoïne, molécule dont l'efficacité n'est plus à démontrer dans le traitement de l'acné sévère, est capable d'inhiber à la fois le taux sérique d'IGF-1 et celui de l'IGFBP-3 (Karadag *et al.*, 2010). Ainsi, la voie IGF-1/IGF-1R pourrait être directement impliquée dans la physiopathologie de l'acné et son inhibition par un traitement pourrait permettre d'améliorer considérablement la maladie.

Il est à noter que nous n'avons pas détecté d'expression de l'IGF-1 dans les kératinocytes non différenciés. Ceci confirme de précédentes études indiquant que l'IGF-1 n'est pas produit par les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, mais plutôt par les kératinocytes

différenciés des couches supra basales (Rudman *et al.*, 1997; Tavakkol *et al.*, 1999). Cependant, nous avons mis en évidence que le récepteur IGF-1R est exprimé par les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme et que leur expression est stimulée par l'extrait FM de *P.acnes*. Ces observations suggèrent que l'IGF-1, produit par les kératinocytes des couches supra basales, agit de manière paracrine sur les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme et stimule leur prolifération.

Enfin, nous avons observé que, contrairement à l'extrait FM de *P.acnes*, le LPS a un effet inhibiteur sur l'expression de l'IGF-1R dans les kératinocytes non différenciés de la couche basale de l'épiderme. Cet effet était retrouvé sur les monocouches de kératinocytes mais pas sur les explants, suggérant une action spécifique du LPS sur les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. Très récemment, de la même manière que pour *P.acnes*, une étude a montré que la bactérie *Mycobacterium leprae* est, elle aussi, capable d'induire l'expression de l'axe IGF-1/IGF-1R, entraînant une prolifération des cellules de Schwann (Rodrigues *et al.*, 2010). Il est à noter que ces deux bactéries sont toutes deux des bactéries Gram positives riches en GC (bactéries Gram positives dont l'ADN a une teneur en GC supérieure à 50% par mole) tandis que le LPS est l'un des composants de la paroi des bactéries Gram négatives. Ce constat nous amène à émettre l'hypothèse que la composition de la paroi de la bactérie pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'induction ou l'inhibition de l'expression de l'IGF-1R à la surface des kératinocytes. De manière tout à fait intéressante, cette hypothèse est appuyée par d'autres études indiquant que l'acide lipotéichoïque (LTA), un autre composant de la paroi des bactéries Gram positives, de *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* stimule la prolifération des cellules épithéliales de l'urètre *in vitro* et que le LPS de différentes bactéries Gram négatives l'inhibe (Elgavish *et al.*, 1996; Wille *et al.*, 1992). Ces mécanismes pourraient être directement liés à une modulation de l'expression de l'axe IGF-1/IGF-1R de ces cellules.

- **Le rôle de *P.acnes* dans la modulation des deux axes hormonaux cutanés : conclusions et perspectives**

Ainsi, nos résultats montrent que c'est principalement la fraction membranaire FM de *P.acnes* qui active les axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R cutanés. Ces observations suggèrent qu'au moins l'un des composants de FM induit directement ces effets. Dans les précédentes études

menées au laboratoire, cette même fraction avait déjà été décrite comme capable d'induire une hyper prolifération kératinocytaire et une induction des TLRs à la surface des kératinocytes (Jugeau *et al.*, 2005) ainsi qu'une modulation de l'expression de différentes intégrines (Jarrousse *et al.*, 2007a). Ce résultat implique que *P.acnes* agit très certainement par un contact direct avec les kératinocytes, via un ou plusieurs des composants de sa paroi. La paroi cellulaire des bactéries Gram positives est constituée d'une seule couche de peptidoglycane (PTG) de 20 à 80nm d'épaisseur qui se trouve à l'extérieur de la membrane plasmique et qui contient des protéines telles que les acides téichoïques (TA) et lipotéichoïques (LTA). La paroi des bactéries Gram négatives est constituée d'une fine couche de PTG (2 à 7nm d'épaisseur), d'un espace péri-plasmique et d'une membrane externe (7 à 8nm d'épaisseur). L'épaisseur plus importante de la paroi des bactéries Gram positives leur confère une résistance accrue. La fraction FM de *P.acnes*, bactérie Gram positive, est donc principalement constituée de PTG, mais aussi de protéines telles que les TA et LTA qui ne sont pas retrouvées chez les bactéries Gram négatives. Ces protéines sont des facteurs d'adhérence bactériens (adhésines) jouant un rôle dans les maladies infectieuses notamment au moment de la fixation du microorganisme à la cellule. De plus, la membrane plasmique ainsi que la paroi de *P.acnes* se distinguent de la plupart des autres bactéries Gram positives notamment parce qu'ils contiennent du phosphatidyl inositol et que la structure du PTG y est légèrement différente (Kim, 2005). Il est aussi intéressant de noter que le LTA des bactéries Gram positives ainsi que le PTG sont reconnus par le TLR-2 dont l'expression est stimulée par des incubations en présence de *P.acnes* (Jugeau *et al.*, 2005). L'ensemble des molécules qui compose la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est donc un bon candidat et il serait intéressant d'étudier le rôle spécifique de ces protéines ou du PTG seul sur l'activation kératinocytaire des axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R afin d'approfondir les mécanismes entrant en jeu.

- **Le rôle du gluconate de zinc dans la modulation des deux axes hormonaux cutanés**

Dans la première partie de ce travail, le second objectif était d'étudier les éventuels effets modulateurs du gluconate de zinc sur l'induction des voies CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R. En effet, la pluralité du mode d'action des sels de zinc dans l'acné inflammatoire n'est que partiellement connue. Cependant, de nombreuses études ont décrit les diverses actions possibles du zinc pouvant expliquer son efficacité dans le cadre du traitement de l'acné

inflammatoire minime à modérée. Le zinc a, en effet, la capacité d'inhiber le chimiotactisme des polynucléaires (Dreno *et al.*, 1992), l'expression de TLR-2 par les kératinocytes (Jarrousse *et al.*, 2007b), la production de cytokines kératinocytaires pro-inflammatoires (Sainte-Marie *et al.*, 1998), l'expression de certaines intégrines kératinocytaires exprimées par l'épiderme des lésions inflammatoires cutanées (Gueniche *et al.*, 1995; Tenaud *et al.*, 2000), l'expression de la 5  $\alpha$  réductase de type I (Stamatiadis *et al.*, 1988), l'activité des MMPs (Santos *et al.*, 2001), l'expression de la superoxyde dismutase intrakératinocytaire (Coudray *et al.*, 1993) ou encore de stimuler les cellules NK et l'activité de phagocytose des macrophages (Crea *et al.*, 1990). Pourtant, si l'efficacité anti-inflammatoire du zinc peut s'expliquer par ces divers aspects, son rôle dans les phases plus précoces du développement de la pathologie n'est pas encore clairement défini. Il est à noter que le zinc a la capacité de réguler l'expression et l'action de diverses hormones dans l'organisme en agissant à la fois sur la stabilité structurale des protéines mais aussi sur leur fonctionnalité (Berg and Shi, 1996; Chvapil, 1973). Dans notre étude, nous avons apporté des preuves concernant l'implication des axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R dans la physiopathologie de l'acné. Dans ce contexte, nous avons donc souhaité évaluer l'éventuelle action du zinc sur ces deux axes afin d'élucider les modes d'action de ce dernier dans le traitement de l'acné. Pour cela, le même type d'expérimentations que précédemment a été réalisé et l'efficacité préventive du gluconate de zinc sur les surexpressions induites par *P.acnes* de ces deux axes a été évaluée par des pré-incubations de 1h ou de 24h avant la stimulation par l'extrait FM de *P.acnes*. Une précédente étude menée au laboratoire sur le même modèle avait déjà permis de montrer que le gluconate de zinc était capable d'inhiber la surexpression de TLR-2 induite par les extraits de *P.acnes* sur les kératinocytes (Jarrousse *et al.*, 2007b) apportant une nouvelle preuve de son efficacité anti-inflammatoire. Dans notre étude, nous avons mis en évidence la capacité du gluconate de zinc à inhiber les surexpressions induites par la fraction FM de *P.acnes* de CRH et de son récepteur mais aussi de l'IGF-1 et de son récepteur.

Ce résultat indique que le gluconate de zinc, en modulant l'expression de l'axe CRH/CRH-R1 cutané, pourrait jouer un rôle inhibiteur sur l'hypersécrétion sébacée, les modulations de la différenciation kératinocytaire ou en encore l'inflammation, liées à l'action de CRH dans la peau. L'action spécifique du zinc sur la modulation de l'axe CRH/CRH-R1 n'étant pas encore décrite dans la littérature, nous soulevons ici une nouvelle voie d'exploration qui pourrait

s'appliquer non seulement au domaine de l'acné, mais éventuellement à d'autres pathologies dans lesquelles cette voie est altérée.

En ce qui concerne l'axe IGF-1/IGF-1R, nous avons montré dans notre étude que l'action du gluconate de zinc permet de réduire les surexpressions, induites par *P.acnes*, de l'IGF-1 et de son récepteur IGF-1R dans l'épiderme et que ceci s'accompagne d'une régulation de l'expression du Ki-67 et de la filaggrine. Ces résultats sont appuyés par une très récente étude qui indique que les sels de zinc ont la capacité de moduler l'axe IGF-1/IGF-1R. Ceci a effectivement été mis en évidence par Banudevi et al. qui montrent que l'expression de l'IGF-1R dans les cellules cancéreuses de la prostate est réduite par un traitement au sulfate de zinc et que celle de l'IGFBP-3 est augmentée par ce même traitement (Banudevi *et al.*, 2010). De nombreuses études ont montré que le zinc avait la capacité de réduire la prolifération cellulaire, en particulier dans différents types de cancers (Bae *et al.*, 2006; Jaiswal and Narayan, 2004). Ainsi, dans l'acné, le zinc pourrait jouer un rôle dès la phase d'hyper prolifération des kératinocytes, à l'origine de la formation du microcomédon et pourrait inhiber l'hyper séborrhée en modulant à la fois la synthèse des androgènes mais aussi la production de sébum par les sébocytes.

- **Conclusions, limites et perspectives de la première partie**

En conclusion de cette première partie, nos résultats suggèrent qu'une hyper prolifération ou une modification de l'organisation de *P.acnes* (en biofilm par exemple) pourrait constituer un stress externe local pour la peau et déclencher l'activation de l'axe CRH/CRH-R1. De plus, de par la composition de sa paroi, cette bactérie Gram positive induirait l'activation de l'axe IGF-1/IGF-1R. Ces deux axes étant capables d'agir sur les trois étapes de la formation des lésions d'acné, *P.acnes* pourrait être directement responsable de l'hyper séborrhée, des anomalies de prolifération et de différenciation kératinocytaire ainsi que de l'inflammation et participer ainsi, non seulement à la phase inflammatoire de l'acné, mais aussi aux phases les plus précoces du développement de la pathologie.

Il faut toutefois garder à l'esprit que la capacité d'une cellule à répondre à une hormone dépend 1) de la concentration de l'hormone, 2) de l'abondance des récepteurs spécifiques de la cellule et 3) de l'influence exercée par les autres hormones ou autres molécules. Dans notre

étude, nous avons étudié le niveau d'expression des hormones CRH et IGF-1 ainsi que l'abondance de leurs récepteurs respectifs au niveau de la peau. Cependant, il faudra garder à l'esprit que, dans notre travail, les interactions possibles avec d'autres hormones ou protéines n'ont pas été étudiées. Ainsi, pour compléter nos résultats, il serait intéressant de se pencher sur les interactions possibles de ces hormones avec d'autres protéines telles que leurs « binding proteins », ou ligands. En effet, l'expression et l'activité du CRH et des peptides CRH-like (urocortines (Ucns) 1, 2 et 3) peuvent être modulés par l'expression de la CRHBP (CRH binding protein). Cette protéine de 37kDa, majoritairement produite par le foie, est aussi présente dans le cerveau et le placenta. Quelques études décrivent toutefois qu'elle est présente dans la peau, notamment au niveau des sébocytes, et que son expression est augmentée en peaux acnéiques en comparaison aux peaux saines (Ganceviciene *et al.*, 2009; Ganceviciene *et al.*, 2008; Zouboulis *et al.*, 2002). La plupart des études décrivant le rôle de la CRHBP lui attribuent un rôle inhibiteur sur l'axe CRH/CRH-R1 car il est montré qu'en se liant à CRH, elle a la capacité de prévenir ou atténuer les effets liés à l'activation de son récepteur (Potter *et al.*, 1991; Woods *et al.*, 1994). Cependant, d'autres hypothèses sont émises et la CRHBP pourrait aussi jouer un rôle protecteur vis à vis du CRH en augmentant sa demi-vie et en lui permettant d'arriver jusqu'aux organes cibles avant sa dégradation. De plus, les Ucns sont elles aussi retrouvées dans la peau (principalement au niveau des mélanocytes du follicule pilo-sébacé) et, ayant la capacité de se fixer aux récepteurs et à CRHBP, il serait aussi intéressant d'étudier leur expression dans notre modèle (Kausser *et al.*, 2006). Ainsi, l'étude de la stimulation de l'expression de CRHBP et des Ucns pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de l'axe CRH/CRH-R1 dans la pathologie de l'acné. En ce qui concerne le système IGF-1/IGF-1R, il existe aussi une multitude de protéines susceptibles de moduler l'interaction entre l'IGF-1 et l'IGF-1R. C'est le cas des IGFBPs (IGF binding proteins) qui sont capables de moduler la biodisponibilité de l'IGF-1 et modifient sa capacité de fixation à l'IGF-1R, des IGFBP proteases (types I et II) qui peuvent dégrader les IGFBPs, des IGFBP-related proteins (IGFBP-rP) qui ont toutefois une affinité inférieure aux IGF-BPs mais qui peuvent interagir avec les IGFs, ou encore les IGFBP receptors et les IGFBP-rP receptors qui régulent la quantité d'IGFBPs et d'IGFBP-rP libres. Le fait qu'il existe des récepteurs spécifiques pour les IGFBPs et les IGFBP-rP conférerait à ces molécules, en plus de leur action directe sur les IGFs, un rôle IGF-indépendant (Hwa *et al.*, 1999). Si la plupart des IGFBPs sont décrites comme ayant un rôle inhibiteur de l'axe IGF-1/IGF-1R, différentes études ont montré la capacité de l'IGFBP-1 et de l'IGFBP-3 à stimuler les effets des IGFs. Dans l'épiderme, c'est principalement l'IGFBP-3 qui est synthétisé (Edmondson *et al.*, 2005;

Edmondson *et al.*, 2003; Wraight *et al.*, 1994). Les mécanismes de régulation de la synthèse des IGFs sont très nombreux et spécifiques et jouent un rôle certain dans la régulation des effets des IGFs. La grande diversité des protéines impliquées dans le système IGF montre qu'il existe un grand nombre de régulations possibles de cette voie à travers la modulation de leur expression. Dans l'acné, il a été montré que le taux d'IGFBP-3 était augmenté et qu'un traitement par isotrétinoïne permettait de le réduire (Karadag *et al.*, 2010). De ce fait l'étude des autres protéines impliquées dans la voie IGF-1/IGF-1R et particulièrement celle des IGFBPs pourrait s'avérer intéressante afin d'approfondir notre travail. Cela pourrait faire l'objet de futures investigations. Enfin, en ce qui concerne le zinc, il pourrait aussi être intéressant d'étudier le rôle du zinc sur l'expression de ces autres molécules susceptibles d'être impliquées dans les axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R. En effet, si le zinc est décrit comme capable de moduler l'expression d'un grand nombre de protéines et d'hormones, Singh *et al.* ont déjà montré que l'IGFBP-3 possède un metal-binding domain (MBD) qui lui permet de fixer des ions métalliques, ce qui modulerait son activité (Singh *et al.*, 2004). En outre, il a été aussi montré que le zinc avait la capacité de modifier l'affinité du récepteur IGF-1R des cellules musculaires et celle de l'IGFBP-3 des fibroblastes (McCusker *et al.*, 1998; Sackett and McCusker, 1998). De ce fait, il serait intéressant d'étudier l'affinité spécifique du récepteur IGF-1R des kératinocytes pour l'IGF-1, et ce, en présence de taux variables de zinc.

Pour conclure cette première partie, nous avons démontré que le gluconate de zinc est capable de moduler les voies CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R. Cela nous permet de mettre en lumière de nouveaux mécanismes potentiels d'action du zinc dans le traitement de l'acné, qui ne se limitent pas seulement au traitement de la seule phase inflammatoire mais qui pourrait aussi jouer un rôle dans les phases plus précoces du développement des lésions.

- **Objectif de la deuxième partie**

La seconde partie de ce travail de thèse était une étude pharmacologique qui consistait à évaluer l'efficacité anti-inflammatoire d'une nouvelle molécule à visée anti-acnéique : l'APRC11. En effet, si l'intérêt de développer des traitements préventifs ciblant les phases précoces du développement des lésions est primordial afin d'éviter leur évolution vers des lésions inflammatoires, la nécessité de développer de nouvelles thérapies curatives ciblant les

lésions ayant déjà évolué vers un état inflammatoire reste toujours d'actualité. Dans ce contexte, nous avons étudié l'efficacité préventive de l'APRC11 et nous l'avons comparée à celles du rétinaldéhyde (RAL) et du gluconate de zinc (Zn) dans le cadre d'une inflammation induite par l'extrait FM de *P.acnes* sur des cultures de kératinocytes en monocouches.

- **L'induction de l'état inflammatoire par *P.acnes***

Pour cela, nous avons utilisé le modèle de kératinocytes en monocouches que nous avons pré-incubés avec les différentes molécules (APRC11, RAL et Zn) avant de les stimuler avec l'extrait FM de *P.acnes*. Un panel de molécules impliquées dans l'inflammation a ensuite été dosé dans les surnageants de culture de ces cellules et les taux d'ARNm des cibles dont l'expression était modulée ont été évalués. Nous avons confirmé que *P.acnes* stimule l'expression kératinocytaire et la sécrétion de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 et de MMP-9. En ce qui concerne les autres molécules ciblées, soit elles n'ont pas été détectées dans les surnageants de culture des kératinocytes ni avant, ni après stimulation (c'est le cas de l'IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-17, IL-10, IL-13, IL-15, LTB-4, IFN- $\gamma$ ), soit elles ont été détectées en très faibles doses et leur expression n'était pas stimulée par la fraction FM de *P.acnes* (TNF- $\alpha$  et GM-CSF). Bien que des études décrivent que *P.acnes* est capable de stimuler l'expression d'un certain nombre d'entre elles, le fait que nous n'ayons pas retrouvé de surexpression de ces molécules peut s'expliquer de différentes manières : 1) Nous n'avons utilisé qu'une fraction d'une seule souche de la bactérie morte (l'extrait FM). Certaines de ces cibles pourraient être stimulées uniquement par la bactérie vivante, comme cela a été montré pour l'IL-1 $\beta$  notamment (Schaller *et al.*, 2005), par d'autres composants bactériens que ceux de la paroi ou encore par les facteurs produits par la bactérie (Vowels *et al.*, 1995). De plus, il est décrit que, selon les souches de *P.acnes* testées, les réponses cellulaires ne sont pas tout à fait comparables (Nagy *et al.*, 2005). 2) Nous n'avons testé qu'un seul temps de stimulation. Il est tout à fait pensable que certaines de ces cibles nécessitent un temps de contact plus long avec la bactérie avant d'être secrétées par les kératinocytes. 3) Les kératinocytes en monocouches sont un modèle dans lequel les kératinocytes sont seuls et en phase de prolifération. En effet, certaines de ces molécules pourraient éventuellement nécessiter que les kératinocytes soient dans des conditions différentes (interactions avec d'autres types cellulaires, stade de différenciation plus avancé) pour s'exprimer. Ainsi, l'ensemble de ces raisons pourrait expliquer qu'un certain nombre de molécules cibles n'aient pas été détectées.

- **Les effets préventifs des molécules d'intérêt**

Dans la suite de notre étude, nous nous sommes donc focalisés sur les marqueurs qui étaient significativement surexprimés à la suite de l'incubation de 6h avec la fraction FM de *P.acnes*, c'est à dire IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-6, IL-8 et MMP-9. Nous avons ensuite analysé les effets préventifs des différents modulateurs (APRC11, RAL et Zn) après 1h ou 24h de pré-incubation. Nous avons mis en évidence que les effets des modulateurs étaient toujours supérieurs après 24h de pré-incubation alors qu'ils étaient faibles ou nuls après 1h de pré-incubation et que l'APRC11 présentait une efficacité relativement similaire quelle que soit la concentration testée. D'autre part, nous avons observé que les molécules APRC11, RAL et Zn avaient un effet modulateur sur IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 et MMP-9, mais pas sur l'IL-6. En effet, l'expression de l'IL-6 n'était pas diminuée par les modulateurs dans nos conditions (temps d'incubation et concentrations testées). Ceci est en accord avec les données de la littérature puisque des études montrent que le zinc a la capacité de diminuer l'expression de l'IL-6 mais uniquement à des doses très élevées (1mM alors que nous avons utilisé une dose de 15 $\mu$ M) et, qu'à des doses faibles, le taux d'IL-6 était plutôt stimulé par le zinc (Ansteinsson *et al.*, 2009; Schmalz *et al.*, 1998) comme nous l'avons observé. En ce qui concerne les autres cibles (IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 et MMP-9) qui étaient modulées par les molécules d'intérêt, nous avons montré que ces effets étaient notés aussi bien au niveau des transcrits qu'au niveau protéique. En effet, nous avons mis en évidence que, après 24h de pré-incubation, le gluconate de zinc est capable de limiter les surexpressions en IL-1 $\alpha$ , IL-8 et MMP-9 induites par l'extrait FM de *P.acnes*. Cette observation confirme de précédentes études indiquant les propriétés anti-inflammatoires du zinc (Fivenson, 2006; Meynadier, 2000) ainsi que sa capacité à moduler l'expression des marqueurs de l'immunité innée tels que le TNF- $\alpha$  (Gueniche *et al.*, 1995) ou, comme nous l'avons déjà mis en évidence lors d'une précédente étude menée au laboratoire, l'expression du TLR-2 par les kératinocytes (Jarrousse *et al.*, 2007b; Kitamura *et al.*, 2006). D'autre part, nous avons montré que le RAL permet de réduire l'expression de MMP-9 et d'augmenter celle de l'IL-1-RA, une molécule permettant de contrer les effets de l'IL-1 $\alpha$ . Cette observation confirme de récentes études décrivant la capacité du RA (acide rétinoïque), molécule de la même famille que le RAL, à réduire l'expression de certaines métalloprotéases, en particulier MMP-2 et MMP-9, au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau protéique (Lee *et al.*, 2009; Thielitz and Gollnick, 2008; Tsang and Crowe, 2001). Enfin, si les rétinoïdes topiques sont principalement utilisés pour leurs propriétés anti-

réventionnelles ou anti-bactériennes, des études plus récentes ont montré leur potentiel anti-inflammatoire (Pawin *et al.*, 2004). Ces résultats confirment le potentiel anti-inflammatoire du gluconate de zinc et du RAL et nous ont permis de valider notre modèle d'étude. Dans ce contexte, nous avons pu montrer que l'APRC11, d'une manière similaire aux deux molécules contrôle, joue un rôle modulateur sur la surexpression, induite par *P.acnes*, des 4 molécules testées : il permet de limiter l'induction de l'expression d'IL-1  $\alpha$ , d'IL-8 et de MMP-9 et de stimuler l'expression de l'IL-1RA de manière plus importante que le RAL seul ou le gluconate de zinc seul.

De manière intéressante, nous avons pu observer de légères différences entre les modulations mesurées au niveau protéique et celles relevées au niveau de l'ARN. Ceci peut s'expliquer de différentes façons : 1) Tout d'abord, les technologies ELISA et Bio-Plex permettent de doser le taux global de protéines dans chaque puits, sans tenir compte du nombre de cellules par puits. Bien que nous ayons considéré que la croissance des cellules était similaire dans tous les puits puisque les modulateurs testés étaient non toxiques, il se peut toutefois que les modulateurs entraînent une prolifération cellulaire légèrement différente par rapport à celle dans le milieu contrôle, entraînant ainsi un léger biais. Ce problème ne se retrouve pas au niveau du dosage des ARNm par la méthodologie Quantigene car cette technologie permet de rapporter la quantité d'ARNm à des gènes de ménage (HPRT et POLR2A) dont les expressions ne varient pas dans les différentes conditions. Cette technologie tient donc compte de la quantité totale d'ARN par puits, c'est à dire du nombre de cellules. Un biais qui serait lié à une quantité de cellules est donc corrigé par cette approche. 2) Le taux d'ARNm relevé n'est pas directement fiable au taux de protéines mesuré. En effet, il existe de nombreux mécanismes de régulation au niveau cellulaire. Les mécanismes impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle peuvent directement expliquer une différence entre les taux d'ARNm et de protéines mesurés. Parmi les mécanismes de régulation post-transcriptionnels, nous pouvons par exemple citer les modifications des extrémités 5' (coiffe) et 3' (polyadénylation), les modifications de la séquence nucléotidique (épissage, édition), les modifications chimiques (méthylation, isopenténylation...) ou encore la dégradation des ARNm. La régulation de la traduction fait intervenir d'autres facteurs tels que les facteurs d'initiation, les ribosomes, les ARNt (ARN de transfert). Enfin, la régulation post-traductionnelle est aussi dépendante de plusieurs facteurs tels que les modifications structurales ou chimiques post-traductionnelles (ajout de groupements fonctionnels,

peptidiques), le stockage des protéines dans la cellule ou encore leur dégradation (protéolyse). Ainsi, l'ensemble de ces facteurs peut expliquer les différences que nous avons notées au niveau transcriptionnel et au niveau protéique. Pourtant, de manière remarquable, les tendances notées au niveau protéique étaient relativement fidèles aux modulations notées au niveau transcriptionnel.

Par ailleurs, nous avons noté que les réponses à la stimulation par *P.acnes* ainsi qu'aux différents traitements étaient très dépendantes du donneur. En effet, bien qu'elles aient été observées chez l'ensemble des patients testés, l'intensité des réponses aux stimuli était très différente selon les patients. Ceci pourrait expliquer les variabilités en ce qui concerne la sévérité de l'acné ou la réponse aux traitements qui existent entre les patients. Cette observation peut s'expliquer par les différences d'ordre génétique qui existent entre les différents individus.

- **Conclusions, limites et perspectives de la deuxième partie**

Pour conclure la seconde partie de ce travail, nous avons démontré, *in vitro*, l'efficacité anti-inflammatoire d'une nouvelle molécule l'APRC11. Sa capacité à réduire l'induction de l'expression des quatre protéines d'intérêt que nous avons étudiées la rend plus efficace que le gluconate de zinc seul ou le RAL seul qui ne sont capables de moduler l'expression que de certaines d'entre elles. Ce nouvel undecyl-rhamnoside pourrait de ce fait représenter une approche thérapeutique innovante pour le traitement de l'acné. Un rhamnoside est un glycoside de rhamnose (sucre que l'on retrouve dans les plantes). Cette famille de molécules est déjà utilisée dans l'industrie cosmétique en tant que co-surfactant ou surfactant. Ici, nous avons mis en évidence une nouvelle application potentielle de ce type de molécules à travers ses propriétés anti-inflammatoires. De plus, dans l'APRC11, le rhamnose est couplé à une chaîne carbonée lipophile qui lui permet d'améliorer sa diffusion au sein du follicule pilo-sébacé. Ainsi, il pourrait agir de manière spécifique, au cœur de l'inflammation. En ce qui concerne les traitements à visée anti-acnéique, il a été démontré que l'association de molécules ciblant différentes causes de la pathologie peut permettre d'augmenter significativement leur efficacité (Dreno *et al.*, 2009; Leyden, 2003; Morel *et al.*, 1999). De ce fait, dans le but de cibler les trois étapes du développement de l'acné, différents types de combinaisons ont déjà été testés tels que : rétinoïdes + antibiotiques, rétinoïdes + peroxyde

benzoyl (BPO), BPO + antibiotiques, sels de zinc + antibiotique, etc. L'APRC11 pourrait donc présenter une efficacité accrue en combinaison avec d'autres molécules thérapeutiques. Il pourrait donc être intéressant de compléter notre étude *in vitro* en testant l'effet synergique de l'APRC11 en combinaison avec d'autres molécules à visée anti-acnéique. Pour cela des co-incubations APRC11 + RAL, APRC11 + gluconate de zinc ou APRC11 + RAL + gluconate de zinc ou encore d'autres actifs peuvent être envisagées avant la stimulation des kératinocytes par *P.acnes*. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que, si des effets synergiques éventuels sont possibles, ce type d'associations pourrait, à l'inverse, présenter des effets antagonistes. Une étude de ce type est donc nécessaire et pourrait permettre de mettre en évidence, non seulement un effet synergique des molécules d'intérêt, mais aussi les effets d'inhibitions éventuels que les molécules pourraient présenter les unes vis à vis des autres. D'autre part, il serait aussi intéressant de tester l'efficacité curative des molécules en les incubant avec les cellules après l'induction de l'inflammation. Cette étude pourrait aussi être envisagée avec des mélanges d'actifs afin de tester les effets synergiques et/ou inhibiteurs des molécules les unes vis à vis des autres.

- **Conclusion générale : le rôle de *P.acnes* dans la pathologie de l'acné**

Pour finir, depuis qu'il a été isolé de lésions d'acnés en 1896, cela fait plus de 100 ans que *P.acnes* est associé à la pathologie de l'acné. De nombreuses études ont démontré que cette bactérie pourrait être associée au développement des lésions, en particulier dans l'induction et le maintien de la phase inflammatoire. Dans notre étude nous avons confirmé que *P.acnes* était capable d'induire une inflammation au niveau des kératinocytes et que des molécules telles que le gluconate de zinc, le rétinaldéhyde, ou encore, l'APRC11 étaient capables de la moduler. De plus, nous avons démontré que *P.acnes* pouvait intervenir dans les phases plus précoces du développement de l'acné, notamment via l'activation des axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R cutanés. Cela confirme l'importance de cette bactérie dans le développement de la pathologie. Cependant, à l'heure actuelle, il n'y a pas de corrélation démontrée entre le nombre de bactéries *P.acnes* et l'importance des lésions inflammatoires acnéiques, ce qui conduit à penser que *P.acnes* agit plus par un mécanisme inflammatoire qu'infectieux. D'autre part, depuis les années 1950 où il a été découvert que *P.acnes* faisait partie de la flore résidente de la peau, il a été successivement décrit que la concentration en *P.acnes* dans les peaux acnéiques n'était pas supérieure à celle retrouvée en peaux saines, que le nombre de *P.acnes* viables dans les follicules pileux ne corrélait pas à la sévérité de l'acné (Evans *et al.*,

1950; Leeming *et al.*, 1988; Leyden *et al.*, 1975) et que, si les follicules pilo-sébacés des patients acnéiques sont colonisés principalement par *P.acnes* et *Staphylococcus epidermidis* (*S.epidermidis*), ceux des patients sains sont colonisés uniquement par *P.acnes* (Bek-Thomsen *et al.*, 2008). De ce fait, les débats concernant le rôle de *P.acnes* dans la pathologie de l'acné se sont multipliés. Il devient alors effectivement nécessaire de comprendre comment une bactérie de la flore commensale peut devenir pathogène pour l'organisme. Les causes sont encore peu connues et c'est très certainement les changements de l'environnement de la bactérie (le follicule pilo-sébacé) principalement au cours de la puberté, l'organisation de la bactérie en biofilm, ou encore son interaction avec d'autres microorganismes comme *S.epidermidis*, qui sont responsables de cette virulence de *P.acnes*. Cependant, d'autres études ont montré que des antibiotiques capables de réduire la teneur en *P.acnes* amélioreraient significativement les symptômes (Holland *et al.*, 1978; Leyden *et al.*, 1975) et que la présence de souches résistantes de *P.acnes* était associée à une efficacité réduite de ce type de traitements (Eady *et al.*, 2003; Eady *et al.*, 1989). Il faudra toutefois garder à l'esprit que ces antibiotiques, en agissant sur l'ensemble de la flore cutanée, ne ciblent pas spécifiquement *P.acnes* et que, de ce fait, d'autres facteurs peuvent entrer en jeu.

Ainsi, il est aujourd'hui admis que *P.acnes* joue un rôle prépondérant dans le développement de l'acné et son rôle n'est certainement pas limité uniquement à l'induction et au maintien de la phase inflammatoire. Les traitements permettant d'éliminer cette bactérie pourraient donc avoir un effet bénéfique sur les trois phases du développement de la pathologie. Ceci pourrait expliquer la faible efficacité anti-rétentionnelle de molécules antibiotiques ou antimicrobiennes telles que le peroxyde de benzoyle utilisées dans le traitement de l'acné. Il faudra néanmoins garder à l'esprit que d'autres propionibactéries cutanées telle que *Propionibacterium granulosum* (Webster *et al.*, 1978), pourraient jouer un rôle dans l'acné et que d'autres espèces microbiennes présentes elles aussi au niveau des follicules pilo-sébacés telles que les *Staphylococcus* spp (Nishijima *et al.*, 2000) ou *Pytosporum* spp (*Malassezia furfur*), pourraient être associées au développement de la pathologie, seuls ou en association avec *P.acnes* (Bek-Thomsen *et al.*, 2008). Afin d'approfondir ce point, il serait donc intéressant de réaliser une étude similaire avec différentes souches de *P.acnes* mais aussi différents types microbiens susceptibles d'être impliqués dans le développement de l'acné.

Si *P.acnes* joue incontestablement un rôle fondamental dans la formation des lésions, il reste donc encore une multitude de pistes à explorer afin de mieux comprendre la réelle implication de cette bactérie dans le développement de l'acné. D'autre part, devant l'apparition massive de résistances microbiennes aux antibiotiques et devant la faible efficacité ou la multitude d'effets secondaires des traitements actuellement disponibles, le développement de thérapies préventives et curatives efficaces pour le traitement de cette pathologie plus que commune reste toujours nécessaire et la découverte de nouvelles molécules aux propriétés anti-acnéiques est donc plus que jamais d'actualité.

# Matériel et Méthodes

## A. Matériel

### 1. Explants cutanés humains

Les explants cutanés ont été obtenus à partir de plasties abdominales de donneurs sains provenant du service de chirurgie plastique du CHU de Nantes. Ces explants ont ensuite été incubés en présence des différents modulateurs.

### 2. Kératinocytes normaux humains en monocouches

Les kératinocytes normaux humains (NHEK) ont été obtenus à partir de prépuces de donneurs sains provenant du service de chirurgie infantile du CHU de Nantes. Ces cellules ont ensuite été incubées en présence des différents modulateurs.

### 3. Biopsies de peau saine

Nous avons utilisé des biopsies cutanées prélevées sur des plasties abdominales obtenues à partir de déchets post-opératoires provenant du service de chirurgie plastique du CHU de Nantes. Ces prélèvements sont considérés comme des modèles de peau saine. Les biopsies prélevées ont été congelées dans l'azote liquide puis conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  afin de réaliser des coupes au cryostat en vue des marquages immunohistochimiques.

### 4. Biopsies de patients acnéiques

Nous avons utilisé des biopsies cutanées prélevées dans le haut du dos de patients acnéiques, au niveau d'une papule d'acné ainsi qu'en zone non lésée. Les biopsies étaient des punches de 4mm de diamètre. Elles ont été congelées dans l'azote liquide puis conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  afin de réaliser des coupes au cryostat en vue de marquages immunohistochimiques.

## 5. Modulateurs

### a) Extraits bactériens

#### (1) Extraits de *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*)

Nous avons utilisé deux extraits bactériens de *P.acnes* (IP53113T) fournis par les laboratoires Pierre Fabre (Toulouse, France). Cette souche bactérienne a été décrite pour la première fois en 1968 et constitue une souche de référence.

La souche de *P.acnes* a d'abord été ensemencée dans le milieu de culture « bouillon de Schaedler » (Diagnostics Pasteur) puis incubée 3 à 4 jours à 37°C, en anaérobiose. Après croissance de la bactérie, la culture a été centrifugée et lavée plusieurs fois dans du sérum physiologique. Puis le culot a été repris dans 150mL de sérum physiologique à la concentration de  $1,1 \cdot 10^8$  bactéries/mL. La suspension bactérienne a ensuite été aliquotée dans des tubes de 15mL à raison de 10mL par tube puis chaque tube a subi 15 cycles de congélation (-80°C) / décongélation (37°C) suivis de 5 cycles de congélation (-80°C) / ultrasons (bain à ultrasons Bransonic 220) afin de lyser les bactéries. L'aspect microscopique de *P.acnes* a été vérifié par microscopie puis la bactérie a été repiquée sur gélose Schaedler +5% sang de mouton (BioMérieux) afin de vérifier la non recroissance du germe. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 4000rpm pendant 15 minutes. Les culots et les surnageants ont été séparés. Les culots FM obtenus contiennent les composants de la paroi et de la membrane plasmique de la bactérie (peptidoglycane, acide téichoïques et lipotéichoïques) tandis que le surnageant SA contient principalement les composants cytosoliques (protéines, enzymes...) de la bactérie. Cependant, à ce jour, la composition exacte de ces deux extraits n'a pas été réalisée. Les deux fractions obtenues ont été conservées à -80°C. La fraction FM a été reconstituée dans 10mL de milieu de culture. La fraction FM a ensuite été utilisée à la dilution 1/2 tandis que la fraction SA a été utilisée à la dilution 1/5 pour les expérimentations. Ces concentrations avaient déjà été validées au laboratoire comme étant non toxiques pour les kératinocytes.

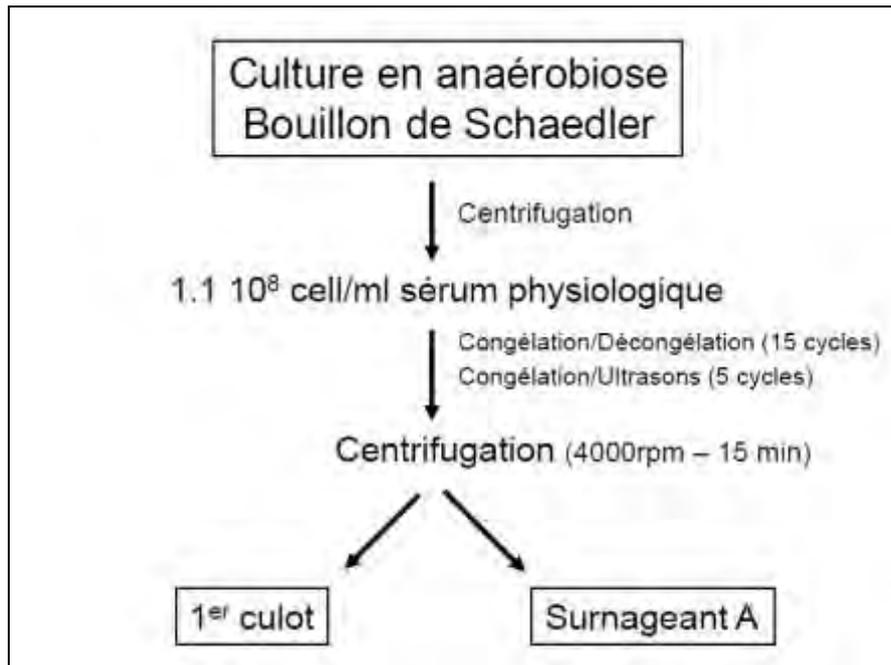


Figure 22. Protocole d'obtention des deux extraits de *P. acnes* (extrait du protocole de « Préparation des extraits bactériens de *Propionibacterium acnes* », Laboratoire de biologie cellulaire, Pierre Fabre Dermo-cosmétique)

## (2) Lipopolysaccharide (LPS)

Nous avons utilisé du LPS de *Escherichia coli* (souche 0111 :B4) commercial (Sigma, St Louis, USA) comme témoin positif de l'inflammation. Le LPS a été reconstitué dans du PBS (phosphate buffer saline) afin d'obtenir une solution mère à la concentration de 1mg/mL.

### b) Molécules thérapeutiques

#### (1) Gluconate de Zinc (Zn)

Le gluconate de zinc nous a été fourni par Labcatal (Montrouge, France). 15mg de gluconate de zinc (2mg d'élément zinc) a été dilué dans le milieu de culture KBM (Keratinocyte Basal Medium) (Promocell, Heidelberg, Germany) pour les monocouches de kératinocytes ou du DMEM (Dubelcco's modified eagle medium) (Sigma, France) pour les explants, à la concentration finale de 1µg/mL (15µM).

#### (2) APRC11 (C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>)

L'APRC11 nous a été fourni par les laboratoires Pierre Fabre. Le RAL a d'abord été repris dans de l'éthanol absolu (VWR, Briare, France) à la concentration de 100mg/mL (314mM),

puis dilué dans le milieu de culture KBM afin d'obtenir 3 concentrations finales de 3 $\mu$ M, 1 $\mu$ M et 0.3  $\mu$ M.

### ***(3) Rétinaldéhyde (RAL)***

Le rétinaldéhyde (RAL) nous a été fourni par les laboratoires Pierre Fabre. Le RAL a d'abord été repris dans de l'éthanol absolu à la concentration de 28,4mg/mL, puis dilué dans le milieu de culture KBM à la concentration finale de 28,4 $\mu$ g/mL (100nM).

## **B. Méthode**

### **1. Culture d'explants cutanés**

Les explants cutanés ont été réalisés à l'aide de « biopsy punches » de 4mm de diamètre sur des plasties abdominales considérées comme un modèle de peau saine. Les explants ainsi prélevés ont été disposés dans le fond de plaques 24 puits. Nous avons laissé les explants adhérer au support en laissant le couvercle ouvert pendant 5 minutes. Les explants ont ensuite été incubés dans du DMEM à 37°C dans une atmosphère humide en présence de 5% de CO<sub>2</sub>, en présence ou non des différents modulateurs et pendant des durées d'incubation variables. Après incubation, les explants ont été retirés du milieu de culture, rincés au PBS puis congelés dans l'azote liquide et conservés -80°C en vue de marquages immunohistochimiques. Les surnageants de culture ont été centrifugés à 1500rpm pendant 7 minutes, à température ambiante afin d'éliminer les débris cellulaires, puis aliquotés et conservés à -80°C en vue des dosages protéiques.

### **2. Culture de kératinocytes normaux humains en monocouche (NHEK)**

L'hypoderme et le derme profond des plasties abdominales ont d'abord été retirés. Le prélèvement a ensuite été découpé en morceaux de 9mm<sup>2</sup> et incubés 2 heures à 37°C dans de la Dispase 1X (Invitrogen). L'épiderme et le derme ont été séparés à l'aide de pinces fines et les morceaux d'épiderme ont été incubés en Trypsine-EDTA 1X (Sigma, St Quentin Fallavier, France) pendant 2 minutes à 37°C. Puis, l'action de la Trypsine sur les morceaux

d'épiderme a été inhibée par du RPMI (Sigma, St Quentin Fallavier, France) supplémenté avec du Sérum de Veau Fœtal (SVF) 10% (Biowest). Les kératinocytes ainsi détachés ont été centrifugés à 1500 r.p.m. pendant 7 minutes, à température ambiante. Le culot cellulaire a ensuite été mis en culture dans du Keratinocyte Serum Free Medium (KSFM) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 5ng/mL d'Epidermal Growth Factor (EGF) (Invitrogen), 25µg/mL de Bovine Pituitary Extract (BPE) (Invitrogen), 2,5µg/mL de Fungizone (Bristol Myers Squibb) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (Sigma). Les cellules ont été ensemencées dans des flacons de culture de 25cm<sup>2</sup>, à raison de 4.10<sup>4</sup>cellules/cm<sup>2</sup>. La culture a été réalisée à 37°C, en atmosphère humide et en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture a été renouvelé tous les 2 à 3 jours. Dans le but de détacher les kératinocytes de leur support de culture primaire, ils ont été incubés avec du PBS/EDTA (Phosphate Buffer Saline / Ethylenediaminetetraacetic acid) pendant 7 minutes puis avec de la trypsine 1X pendant 2 minutes. L'action de la trypsine sur les cellules a été inhibée par addition de DMEM supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) (Invitrogen). Lors des passages successifs, les kératinocytes ont été ensemencés à la densité de 15 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup>. Pour l'ensemble des expériences, les cellules ont été utilisées après un nombre restreint de passages (n=2). Les kératinocytes ont ensuite été ensemencés dans des plaques 6 puits dans du KGM (Keratinocytes Growth Medium) avec ses compléments (BPE, EGF, insuline, transferrine, épinephrine, chlorure de calcium, hydrocortisone). 24 heures avant l'utilisation des cellules, le milieu de culture a été déplété en compléments. Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humide en présence de 5% CO<sub>2</sub>, en présence ou non des différents modulateurs et pendant des durées d'incubation variables. Après incubation, les kératinocytes ont été rincés au PBS puis congelés lysés en Tampon RLT (Qiagen) supplémenté de 0,1% β-Mercaptoéthanol (Sigma) et conservés -80°C en vue d'extraire les ARN totaux, ou incubés en présence des différents anticorps en vue des tests en cytométrie de flux. Les surnageants de culture ont été centrifugés à 1500rpm. pendant 7 minutes, à température ambiante afin d'éliminer les débris cellulaires, puis aliquotés et conservés à -80°C en vue des dosages protéiques.

### 3. Immunohistochimie

#### a) Préparation des lames

Les lames ont été préparées à partir d'explants cutanés, de biopsies de peaux saines et de papules d'acné congelés. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cyostat (Leica) puis elles ont été fixées à l'acétone froid pendant 10min et congelées à -20°C.

#### b) Immunomarquage

Les sites non spécifiques ont été saturés pendant 30min avec du TBS (Tris-Buffered Saline) 0,05% Tween20 w/v (Sigma-Aldrich), 0,1% BSA w/v (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich). L'anticorps primaire a été déposé à la dilution appropriée sur les lames pendant 1 heure en milieu humide à température ambiante. Un anticorps IgG irrelevant de même isotype que l'anticorps primaire a été utilisé comme témoin négatif. Des rinçages de 15min ont été effectués entre chaque étape avec la solution TBS 0,05% Tween20, 0,1% BSA. Les lames ont ensuite été successivement incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé (DAKO ChemTek detection kit peroxydase/AEC, rabbit/mouse, Trappes, France) pendant 30 minutes ou 1h, puis avec la streptavidine couplée à la peroxydase pendant 30 minutes et enfin avec l'AEC (3-amino-9-éthylcarbazole), substrat de la peroxydase, pendant 5 minutes. La réaction a été stoppée à l'eau distillée pendant 10 minutes. La contre coloration a été réalisée avec de l'Hémalun de Mayer (VWR International) pendant 1 à 2 minutes. Les lames ont ensuite été rincées à l'eau distillée puis montées entre lame et lamelle avec un milieu aqueux (GelTol aqueous mounting medium, Immunotech, Marseille, France).

Les anticorps utilisés pour les immunomarquages étaient les suivants :

Antigène	Conalité	Origine	Fournisseur	Concentration Temps d'incubation
CRH	Ployclonal	Lapin	Phoenix Pharmaceuticals	1/50 1h
CRH-R1	IgG2a	Souris	R&D Systems	10µg/mL 1h
IGF-1	IgG1	Souris	R&D Systems	5µg/mL 1h
IGF-1R	IgG1	Souris	R&D Systems	10µg/mL 1h

Ki-67	IgG1	Souris	Dako	1/60 30min
Filaggrine	IgG1	Souris	Biomedicals Technologies	1/800 30min
Non Humain	IgG1	Souris	Dako	celle de l'anticorps
Non Humain	IgG2a	Souris	Dako	celle de l'anticorps

*Figure 23. Liste des anticorps et isotypes irrelevantes (témoins négatifs) utilisés pour les immunomarquages*

### **c) Lecture des lames**

La lecture des lames a été réalisée avec un microscope Leica (Leica Microsystems) par deux personnes différentes et de manière indépendante. Les photographies ont été réalisées avec un appareil photo numérique digital SLR Camera D70S (Nikon) aux grossissements x10 (oculaire) ; x25 / x40 (objectifs), x2,7 (appareil photo). Lors de la lecture, la luminosité était la même pour toutes les lames et les grossissements étaient les mêmes (Oculaires x10, Objectif x25). Le niveau de marquage a été estimé selon une échelle allant de 1 à 5 niveaux d'intensité : marquage nul (0), marquage très faible (1), marquage faible (2), marquage d'intensité moyenne (3), marquage fort (4), marquage très fort (5).

## **4. Dosages de cytokines par la technologie**

### **Luminex Bio-Plex**

#### **a) Principe de la méthodologie Luminex**

La technologie Luminex permet au Bio-Plex de réaliser des dosages multiplexes (dosages multiples au sein d'un même échantillon). Basée sur le principe de la cytométrie en flux, cette technologie associe l'utilisation de billes fluorescentes à une double lecture après excitation par deux lasers. Chaque type de bille étant une association de deux fluorochromes à un ratio défini, il existe un panel de 100 types de billes différentes. Différentes molécules peuvent être couplées à la surface des billes ce qui rend cette technologie applicable à une multitude d'applications :

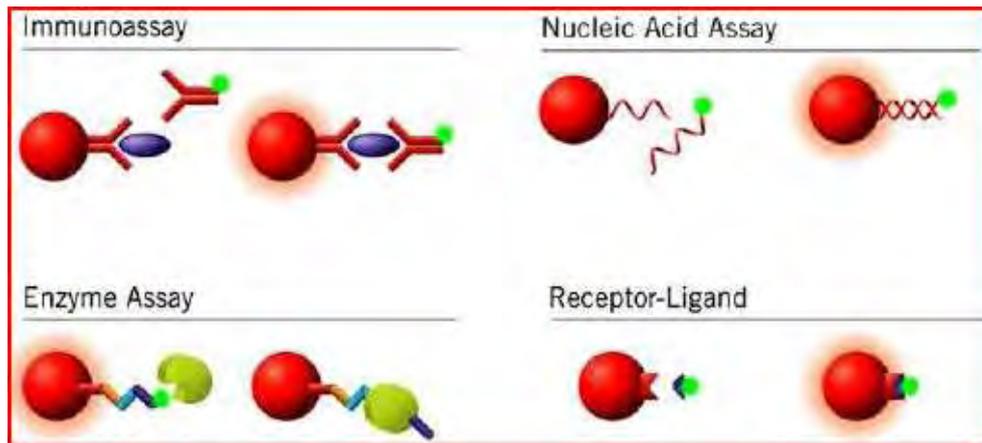


Figure 24. Exemples d'applications compatibles avec l'utilisation du Bio-Plex (extrait de <http://www.luminexcorp.com/technology/index.html>)

Dans le cas du dosage de cytokines, un type de bille a été couplé à un anticorps spécifique dirigé contre la cytokine d'intérêt. Le premier laser, rouge (635nm) permet d'exciter les deux fluorochromes contenus dans la bille et d'identifier chaque type de bille. Le second laser, vert (532nm) excite le fluorochrome reporter et mesure la quantité de cytokines couplée à la surface de la bille. La méthodologie Luminex permet le dosage de cytokines mais aussi d'anticorps, d'ARN, de substrats enzymatiques, de récepteurs en fonction des caractéristiques de la molécule couplée à chaque bille.

### **b) Dosages réalisés**

Nous avons réalisé, sur trois premiers donneurs, un dosage multiplexe de 13 cytokines en utilisant le kit 13-plex LINCO (Ref. HCYTO-60K-PMX kit). Ce kit permettait le dosage simultané de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . Après avoir sélectionné les cibles qui nous intéressaient, nous avons réalisé, sur l'ensemble de nos donneurs, un dosage 3-plex en utilisant le kit 3-plex Bio-Plex Pro<sup>TM</sup> Assays (BIO-RAD) qui permettait le dosage simultané de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1RA et de l'IL-8.

### **c) Lecture**

La plaque a été lue avec le Bio-Plex 200 (Bio-Rad) et les résultats ont été analysés avec le logiciel Bio-plex Manager 4.1 Software.

## 5. Dosages ELISA

### a) Principe de la technologie ELISA

Le dosage ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) permet le dosage de protéines dans des liquides biologiques ou des surnageants de culture. Cette technologie utilise le principe du dosage immuno enzymatique de type « sandwich », caractérisé par l'utilisation de deux anticorps dirigés contre la protéine à doser. Le premier, dit de capture, est fixé au support et permet de capturer la protéine, tandis que le deuxième, dit de révélation, est couplé à une enzyme, la HRP (horseradish peroxidase), qui permet de catalyser le substrat en une substance colorée dont l'intensité est mesurée par une lecture de densité optique (DO) qui sera comparée à une courbe étalon établie en parallèle.

#### ELISA Diagram

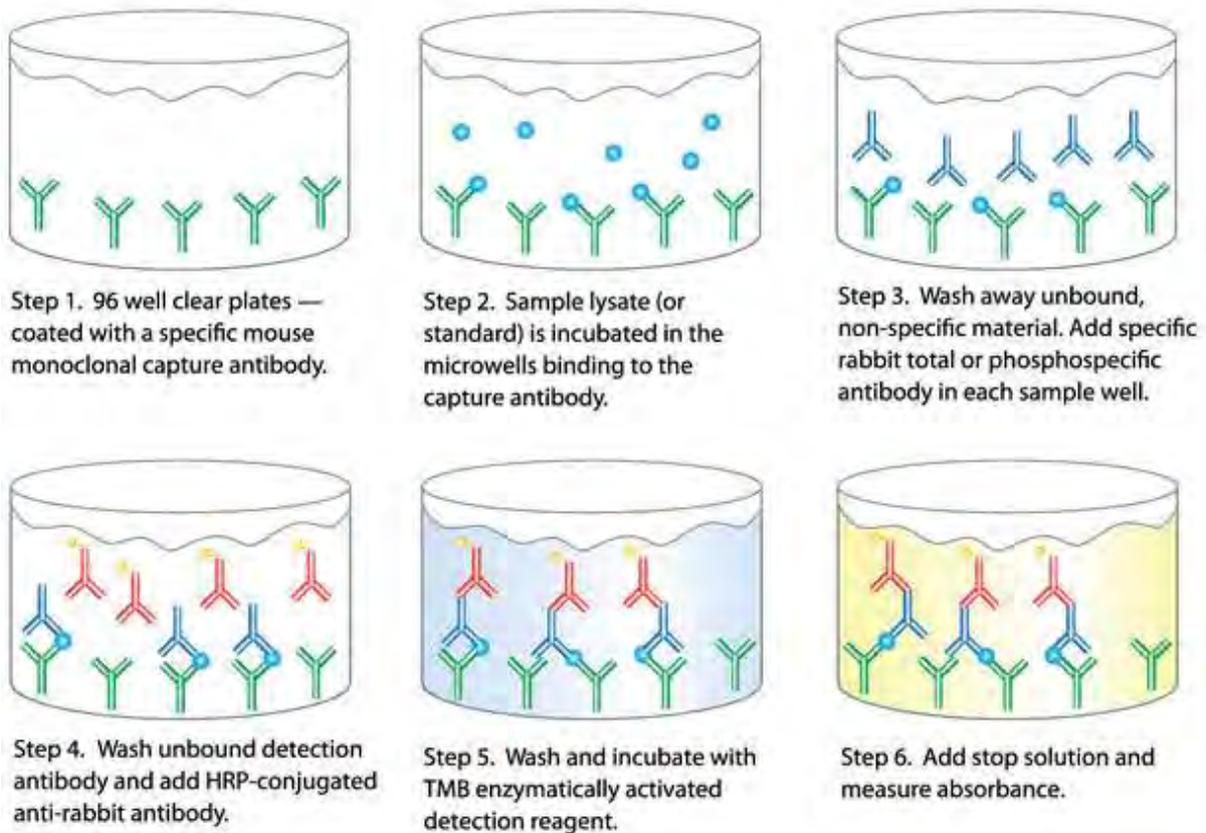


Figure 25. Schéma du principe du dosage ELISA (extrait de <http://www.millipore.com/catalogue/module/c77254>)

## b) Tests ELISA utilisés

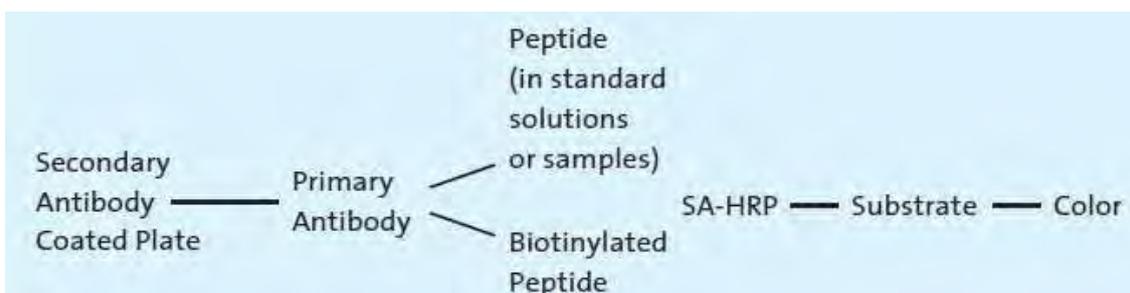
Dans la première partie de cette thèse, nous avons utilisé le kit ELISA commercial Human IGF-1 Quantikine Kit (R&D Systems) selon les instructions du fournisseur. Les surnageants de culture d'explants ont, au préalable, été concentrés 10 fois par centrifugation avec les Amicon ultra-4 membrane ultracell-3 (Millipore). Pour le projet pharmacologique, les kits ELISA commerciaux suivants ont été utilisés selon les instructions du fournisseur :

- IL-6: Ready-Set-Go! Human IL-6 (eBioscience)
- IL-12: Ready-Set-Go! Human IL-12 p70 (eBioscience)
- IL-15: Ready-Set-Go! Human IL-15 (eBioscience)
- MMP-9: Kit Fluorokine E, (R&D Systems, Lille, France)
- LTB4: Kit Parameter LTB4 (R&D Systems)

## 6. Dosage EIA

### a) Principe de la technologie EIA

Le dosage EIA (enzyme immunoassay) est une technologie très proche du dosage ELISA. Ce test est dit « de compétition ». En effet, le premier anticorps, fixé dans les puits de la microplaque est un anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire qui va se fixer à l'antigène d'intérêt mais aussi à un antigène biotinylé ajouté en quantité connue. Il va donc y avoir une fixation compétitive des deux antigènes sur l'anticorps primaire. L'antigène biotinylé fixé interagit ensuite avec la HRP pour donner un produit coloré qui sera détecté. La quantité d'antigène d'intérêt présente dans l'échantillon est donc inversement proportionnelle à la coloration détectée. L'intensité de cette coloration est mesurée par une lecture de densité optique (DO) et est comparée à une courbe étalon établie en parallèle.



*Figure 26. Schéma du principe du dosage EIA (extrait de « General protocol for Enzyme immunoassay kit » Phoenix Pharmaceutical, Inc.)*

### **b) Test EIA utilisé**

Nous avons utilisé le kit EIA commercial Human CRH EIA Kit (Phoenix) selon les instructions du fournisseur. Les surnageants de culture des monocouches de kératinocytes ont, au préalable, été concentrés 10 fois par centrifugation avec les Amicon ultra-4 membrane ultracell-3 (Millipore).

## **7. Cytométrie de flux**

Les cellules (kératinocytes, HaCaT et HeLa) ont été cultivées à raison de 200 000 cellules par puits dans des plaques 6 puits en présence des différents modulateurs. Les cellules HeLa ont été utilisées comme témoin positif. Les cellules ont été décollées par un traitement à la Trypsine EDTA, 2min à 37°C, puis l'action de la trypsine a été inhibée avec du RPMI, 10%SVF. Pour chacune des conditions, les cellules ont été divisées en deux tubes et incubées avec un anticorps primaire anti-IGF-1R couplé à la phycoérythrine IGF-1R-PE (Santa-Cruz) 1/20, ou un isotype irrelevant IgG<sub>1</sub>k-PE 1/20, pendant 30minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS, centrifugées puis lues au FACScan (Becton Dickinson) Le logiciel Cell Quest Pro Software (Becton Dickinson) a été utilisé pour l'analyse des données.

## **8. Dosage Luminex QuantiGene**

### **a) Principe de la technologie Luminex QuantiGene**

Le système Luminex QuantiGene est un système de détection haut débit qui utilise des billes de polystyrène de 5,6µm de diamètre dont la partie interne est colorée par deux fluorochromes distincts dans leur spectre d'émission. Chaque bille peut être greffée d'un réactif différent à sa surface. Elles peuvent être combinées pour la détection de 30 molécules ARN différentes dans une même enceinte de réaction. Un troisième fluorochrome (R-phycoerythrine) couplé à une molécule « rapporteur » permet la quantification de l'interaction spécifique entre le réactif greffé et l'ARN d'intérêt à doser, à la surface de la bille. Un système de cytométrie de flux permet la séparation des billes afin de les détecter individuellement par deux lasers (un laser rouge à 635nm qui excite les deux fluorochromes contenus dans la microsphère et un laser

vert à 532nm qui excite le fluorochrome rapporteur) indépendants au niveau de l'analyseur Luminex Bio-Plex 200. Le signal consiste en la classification des différentes billes et la quantification de la réaction à la surface de chaque bille avec un haut débit. Cette technologie permet donc dans un premier temps de capturer de manière directe et spécifique les ARN d'intérêt puis de les quantifier par amplification du signal et non de la cible via l'« ADN branché ».

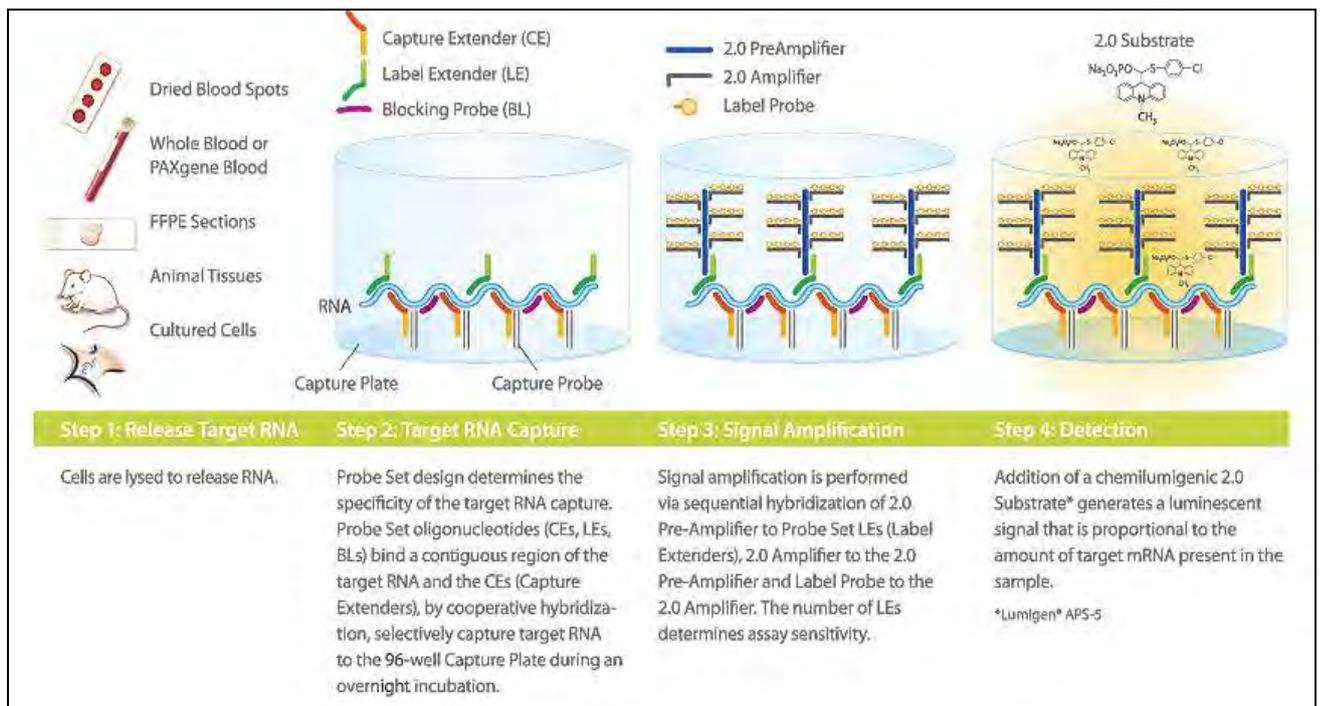


Figure 27. Schéma du principe de la technologie QuantiGene (extrait du « QuantiGene 2.0 Reagent System », [http://www.panomics.com/index.php?id=product\\_1](http://www.panomics.com/index.php?id=product_1))

## b) Extraction d'ARN totaux des monocouches de kératinocytes

Les kératinocytes ont été lysés dans du tampon RLT (Qiagen) supplémenté avec 0,1% de β-Mercaptoethanol (Sigma). L'extraction d'ARN a été réalisée avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Le lysat a été repris dans de l'éthanol froid puis les acides nucléiques ont été récupérés sur les colonnes Qiagen par centrifugation. Ils ont ensuite été lavés. L'ADN génomique a été digéré avec de la DNase et les acides nucléiques ont de nouveau été lavés. Les ARNm totaux ont ensuite été récupérés dans 30µL

d'eau RNase free. Les concentrations en ARNm ont été évaluées avec le Nanodrop (Thermo Scientific) (Illkirch, France).

### **c) Capture des ARNm**

L'ensemble des étapes qui suivent a été réalisé avec le kit Luminex QuantiGene (Panomics). Les échantillons d'ARNm ont été mis dans des plaques 96 puits, en présence du mélange contenant les différents types de sondes « Probe Set » et de billes puis incubés 20h à 54°C, sous agitation 600rpm. Chaque échantillon a été réalisé en duplicate, dans deux puits séparés. Les gènes de référence POLR2A (polymerase RNA II DNA directed polypeptide A) et HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) ont été utilisés.

### **d) Révélation**

Après lavage des puits au wash buffer, les échantillons ont été incubés en présence de solution « Pre-Amplifier » et incubés 1h à 50°C, sous agitation 600rpm. Puis les puits ont de nouveau été lavés puis les échantillons ont été incubés 1h à 50°C, sous agitation 600rpm en présence de solution « Amplifier ». La plaque a de nouveau été lavée et les échantillons ont été incubés 1h à 50°C, sous agitation 600rpm en présence de solution « Label Probe ». Enfin la liaison au « SAPE » a été réalisée par une incubation de 30 minutes à température ambiante, sous agitation 800rpm.

### **e) Lecture**

La plaque a été lue avec le Bio-Plex 200 (Bio-Rad) et les résultats ont été analysés avec le logiciel Bio-Plex Manager 4.1 Software.

### **f) Analyse des résultats**

L'analyse des résultats a été effectuée à partir des données obtenues : FI (intensité de fluorescence) – Bkgd (background, bruit de fond), pour chaque condition et chaque gène. Seuls les résultats obtenus avec une FI supérieure à deux fois le Bkgd ont été pris en compte. Une analyse des gènes de référence a été préalablement effectuée. Pour cela, les valeurs des FI-Bkgd des deux gènes de référence ont été calculées puis la corrélation entre ces deux gènes a été vérifiée. La moyenne géométrique des deux gènes de référence a ensuite été calculée et cette moyenne a servi à normaliser les valeurs des FI-Bkgd des différents échantillons. La

quantification étant relative, la valeur du FI-Bkgd de chaque échantillon a été normalisée par rapport à la valeur de la moyenne géométrique du FI-Bkgd des gènes de référence sur ce même échantillon :

$$FI_{\text{échantillon normalisé}} = (FI\text{-Bkgd})_{\text{échantillon}} / (FI\text{-Bkgd})_{\text{gènes de référence}}$$

La quantité relative de chaque ARN entre les échantillons contrôles et les échantillons traités est obtenue par :

$$QR = FI_{\text{échantillon normalisé traité}} / FI_{\text{échantillon normalisé contrôle}}$$

## 9. RT-qPCR

### a) Extraction d'ARN totaux des monocouches de kératinocytes

Les kératinocytes ont été lysés dans du tampon RLT (Qiagen) supplémenté avec 0,1% de  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma). L'extraction d'ARN a été réalisée avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Les concentrations en ARNm ont été évaluées avec le Nanodrop (Thermo Scientific) (Illkirch, France) et la qualité de l'ARNm extrait a été évaluée avec des puces Agilent technology (Villecresnes, France).

### b) Reverse Transcription

La rétrotranscription a été réalisée à partir de 2  $\mu$ g d'ARNm total extrait. 2 $\mu$ g d'ARN ont été prélevés pour chaque échantillon. Le volume a été ajusté à 25 $\mu$ L avec de l'eau RNase free (Qiagen). Les ARNm ont été dénaturés pendant 2 minutes à 70°C. Puis, ils ont été incubés pendant 1h à 42°C en présence de DTT 10mM, tampon first strand 1X, dNTP mixture 1mM, Oligo(dT)12-18 Primer 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ g d'ARN, M-MLV Reverse Transcriptase 8U/ $\mu$ L et RNase-OUT Recombinant Ribonuclease inhibitor 0,4U/ $\mu$ L (Invitrogen Life Technologies) dans un volume total de 50 $\mu$ L/tube. L'ADNc obtenu a ensuite été utilisé pour la PCR quantitative.

### c) PCR quantitative

Les quantifications relatives des gènes d'intérêt (CRH, CRH-R1, IGF-1, IGF-1R) par rapport à l'HPRT ont été réalisées à partir de 20ng d'ADNc par RT-PCR quantitative (real-time

polymerase chain reaction) (Pfaffl, 2001) dans un thermocycleur Mx3005P (Stratagene). Les sondes Taqman correspondant aux séquences des gènes ciblés (CRH, CRH-R1, IGF-1, IGF-1R) ont été utilisées (Taqman gene expression assays; Applied Biosystem). Le programme utilisé était le suivant : 1 cycle à 50°C pendant 2 minutes, 1 cycle à 95°C pendant 10 minutes, suivis de 45 cycles à 95°C pendant 30 secondes et 60°C pendant 1 minute. L'efficacité de la réaction de PCR a été vérifiée par l'utilisation d'une gamme de dilutions de cDNA issus d'ARN total de cerveau (témoin positif pour le CRH et le CRH-R1) et de foie (témoin positif pour l'IGF-1 et l'IGF-1R) (Biochain, Montrouge, France), réalisée en parallèle des PCR CRH, CRH-R1, IGF-1, IGF-1R et HPRT.

#### **d) Analyse des résultats**

Chaque échantillon a été réalisé en duplicate, dans deux puits séparés. Pour chaque échantillon d'ADNc, la valeur moyenne des CT (threshold cycle) provenant des duplicates de PCR pour les gènes d'intérêt a été normalisée à la valeur du CT pour l'HPRT. L'expression relative de chaque gène d'intérêt a été calculée à partir de l'efficacité de la PCR (E) et de la différence des CT entre un échantillon donné stimulé (x) comparé à un échantillon non stimulé (calibrator), exprimés en comparaison à l'HPRT:  $\text{ratio} = (E_{\text{IGF-1R}})^{\Delta \text{CT}_{\text{IGF-1R}}(\text{calibrator}_x)} / ((E_{\text{HPRT}})^{\Delta \text{CT}_{\text{HPRT}}(\text{calibrator}_x)})$ .

# Table des figures

<i>Figure 1. Structure générale de la peau (extrait de <a href="http://www.genko.fr/wp-content/uploads/2008/12/la_peau.jpg">http://www.genko.fr/wp-content/uploads/2008/12/la_peau.jpg</a>).....</i>	<i>3</i>
<i>Figure 2. Les différents types cellulaires de l'épiderme (extrait de <a href="http://histoblog.viabloga.com/images/merckel_Langherans_t.800.jpg">http://histoblog.viabloga.com/images/merckel_Langherans_t.800.jpg</a>).....</i>	<i>4</i>
<i>Figure 3. Les différentes couches de l'épiderme (extrait de Hole's Human Anatomy &amp; Physiology, 8th edition Shier, Butler &amp; Lewis, 1999).....</i>	<i>6</i>
<i>Figure 4. Schéma et coupe histologique de l'unité pilo-sébacée (1 : glandes sébacée ; 2 : canal excréteur ; 3 : muscle érecteur du poil) (extrait de l'atlas d'histologie humaine et animale <a href="http://webapps.fundp.ac.be">http://webapps.fundp.ac.be</a>) .....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 5. Schéma des terminaisons nerveuses de la peau (extrait de <a href="http://www.lecorpshumain.fr/corpshumain/1-peau.html">http://www.lecorpshumain.fr/corpshumain/1-peau.html</a>) .....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 6. Colonie de staphylococcus aureus (extrait de <a href="http://en.academic.ru/pictures/enwiki/83/Staphylococcus_aureus_01.jpg">http://en.academic.ru/pictures/enwiki/83/Staphylococcus_aureus_01.jpg</a>).....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 7. Classification scientifique de P.acnes .....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 8. Propionibacterium acnes (extrait de <a href="http://www.innovations-report.de/">http://www.innovations-report.de/</a>).....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 9. Tableau représentant la répartition des prévalences de l'acné par tranche d'âge entre 2000 et 2002, en France .....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 10. Les étapes de la formation des lésions d'acné (inspiré de <a href="http://www.indianwomenshealth.com/Acne-121.aspx">http://www.indianwomenshealth.com/Acne-121.aspx</a>) .....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 11. Acné inflammatoire du visage : papules et papulo-pustules (extrait de <a href="http://e-medicaltextbook.blogspot.com/2008/09/acne-vulgaris.html">http://e-medicaltextbook.blogspot.com/2008/09/acne-vulgaris.html</a>) .....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 12. Les TLRs humains et leurs ligands (CpG :Cytosine guanine nucléotides) (extrait de Review of the innate immune response in acne vulgaris, Kim., Dermatology, 2005 ; 211 : 193-198)26</i>	
<i>Figure 13. Etapes de la formation d'un biofilm.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 14. Physiologie des boucles de rétroaction au sein de l'axe HPA.....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 15. Expression de CRH (a,b) et de CRH-R1 (c,d) en zone non lésée de patient acnéique (a,c) et au niveau d'une papule d'acné (b,d). Grossissement x25 .....</i>	<i>56</i>

<i>Figure 16. Niveaux d'expression de CRH (a) et de CRH-R1 (b) dans les explants de peaux saines de 6 donneurs incubés pendant 3h, 6h et 24h en présence de milieu seul (Ctrl), des extraits SA (CP) et FM (MF) de P.acnes et de LPS (modulations significatives ***p&lt;0,05).</i>	57
<i>Figure 17. Niveaux d'expression de CRH (a) et de CRH-R1 (b) dans des explants de peaux saines de 6 donneurs incubés pendant 1h, 3h, 6h et 24h en présence du milieu seul (Ctrl), de l'extrait FM de P.acnes seul (MF), de gluconate de zinc seul (Zn) ou d'une pré-incubation d'1h ou de 24h en présence de gluconate de zinc, suivie d'une incubation en présence de MF (Modulations significatives : ***p&lt;0,05)</i>	58
<i>Figure 18. Expression de CRH (a, c, e, g) et de CRH-R1 (b, d, f, h) dans les explants de peaux saines après 6h d'incubation en présence de milieu seul (Ctrl) (a, b) ou de l'extrait FM de P.acnes seul (MF) (c,d), et après 1h (e, f) ou 24h (g, h) de préincubation avant l'ajout de FM pendant 6h</i>	59
<i>Figure 19. Pourcentages de cellules marquées par l'anticorps anti-IGF-1R (moyenne de 6 donneurs NHEK ou 1 lignée HaCaT)</i>	73
<i>Figure 20. Intensités de fluorescence moyennes des kératinocytes en monocouches de 6 donneurs, marquées avec l'anticorps anti-IGF-1R (différence significative : *** p&lt;0,05)</i>	74
<i>Figure 21. Intensités de fluorescence moyennes de la lignée HaCaT, marquées avec l'anticorps anti-IGF-1R</i>	74
<i>Figure 22. Protocole d'obtention des deux extraits de P.acnes (extrait du protocole de « Préparation des extraits bactériens de Propionibacterium acnes », Laboratoire de biologie cellulaire, Pierre Fabre Dermo-cosmétique)</i>	119
<i>Figure 23. Liste des anticorps et isotypes irrelevantes (témoins négatifs) utilisés pour les immunomarquages</i>	123
<i>Figure 24. Exemples d'applications compatibles avec l'utilisation du Bio-Plex (extrait de <a href="http://www.luminexcorp.com/technology/index.html">http://www.luminexcorp.com/technology/index.html</a>)</i>	124
<i>Figure 25. Schéma du principe du dosage ELISA (extrait de <a href="http://www.millipore.com/catalogue/module/c77254">http://www.millipore.com/catalogue/module/c77254</a>)</i>	125
<i>Figure 26. Schéma du principe du dosage EIA (extrait de « General protocol for Enzyme immunoassay kit » Phoenix Pharmaceutical, Inc.)</i>	127
<i>Figure 27. Schéma du principe de la technologie QuantiGene (extrait du « QuantiGene 2.0 Reagent System », <a href="http://www.panomics.com/index.php?id=product_1">http://www.panomics.com/index.php?id=product_1</a>)</i>	128

# Références

Adebamowo CA, Spiegelman D, Berkey CS, Danby FW, Rockett HH, Colditz GA, *et al.* (2008) Milk consumption and acne in teenaged boys. *J Am Acad Dermatol* 58:787-93.

Aizawa H, Niimura M (1995) Elevated serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) levels in women with postadolescent acne. *J Dermatol* 22:249-52.

Akaza N, Akamatsu H, Kishi M, Mizutani H, Ishii I, Nakata S, *et al.* (2009) Effects of Propionibacterium acnes on various mRNA expression levels in normal human epidermal keratinocytes in vitro. *J Dermatol* 36:213-23.

Amer M, Bahgat MR, Tosson Z, Abdel Mowla MY, Amer K (1982) Serum zinc in acne vulgaris. *Int J Dermatol* 21:481-4.

Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* 5:196-201.

Angioni S, Petraglia F, Gallinelli A, Cossarizza A, Franceschi C, Muscettola M, *et al.* (1993) Corticotropin-releasing hormone modulates cytokines release in cultured human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* 53:1735-42.

Ansteinsson V, Refsnes M, Skomedal T, Osnes JB, Schiander I, Lag M (2009) Zinc- and copper-induced interleukin-6 release in primary cell cultures from rat heart. *Cardiovasc Toxicol* 9:86-94.

Ashbee HR, Muir SR, Cunliffe WJ, Ingham E (1997) IgG subclasses specific to Staphylococcus epidermidis and Propionibacterium acnes in patients with acne vulgaris. *Br J Dermatol* 136:730-3.

Audhya T, Jain R, Hollander CS (1991) Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. *Cell Immunol* 134:77-84.

Axel DI, Frigge A, Dittmann J, Runge H, Spyridopoulos I, Riessen R, *et al.* (2001) All-trans retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation, and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 49:851-62.

Bae SN, Lee YS, Kim MY, Kim JD, Park LO (2006) Antiproliferative and apoptotic effects of zinc-citrate compound (CIZAR(R)) on human epithelial ovarian cancer cell line, OVCAR-3. *Gynecol Oncol* 103:127-36.

Ballanger F, Baudry P, N'Guyen JM, Khammari A, Dreno B (2006) Heredity: a prognostic factor for acne. *Dermatology* 212:145-9.

Banudevi S, Senthilkumar K, Sharmila G, Arunkumar R, Vijayababu MR, Arunakaran J (2010) Effect of zinc on regulation of insulin-like growth factor signaling in human androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Chim Acta* 411:172-8.

- Barreca A, De Luca M, Del Monte P, Bondanza S, Damonte G, Cariola G, *et al.* (1992) In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors. *J Cell Physiol* 151:262-8.
- Bek-Thomsen M, Lomholt HB, Kilian M (2008) Acne is not associated with yet-uncultured bacteria. *J Clin Microbiol* 46:3355-60.
- Berg JM, Shi Y (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271:1081-5.
- Berra B, Rizzo AM (2009) Glycemic index, glycemic load, wellness and beauty: the state of the art. *Clin Dermatol* 27:230-5.
- Bruggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A, *et al.* (2004) The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science* 305:671-3.
- Burggraf D, Trinkl A, Dichgans M, Hamann GF (2007) Doxycycline inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 25:506-13.
- Burkhart CG (2005) "Acne biofilms," temperature, and microenvironments. *J Am Acad Dermatol* 52:182.
- Burkhart CG, Burkhart CN (2007) Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: *Propionibacterium acnes* biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug. *J Am Acad Dermatol* 57:722-4.
- Burkhart CN, Burkhart CG (2003) Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. *Int J Dermatol* 42:925-7.
- Burkhart CN, Burkhart CG (2006) Genome sequence of *Propionibacterium acnes* reveals immunogenic and surface-associated genes confirming existence of the acne biofilm. *Int J Dermatol* 45:872.
- Cappel M, Mauger D, Thiboutot D (2005) Correlation between serum levels of insulin-like growth factor 1, dehydroepiandrosterone sulfate, and dihydrotestosterone and acne lesion counts in adult women. *Arch Dermatol* 141:333-8.
- Cesur Y, Yordaman N, Dogan M (2009) Serum insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 levels in children with zinc deficiency and the effect of zinc supplementation on these parameters. *J Pediatr Endocrinol Metab* 22:1137-43.
- Chiu A, Chon SY, Kimball AB (2003) The response of skin disease to stress: changes in the severity of acne vulgaris as affected by examination stress. *Arch Dermatol* 139:897-900.
- Choi JY, Piao MS, Lee JB, Oh JS, Kim IG, Lee SC (2008) *Propionibacterium acnes* stimulates pro-matrix metalloproteinase-2 expression through tumor necrosis factor-alpha in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 128:846-54.

- Chronnell CM, Ghali LR, Ali RS, Quinn AG, Holland DB, Bull JJ, *et al.* (2001) Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in acne vulgaris lesions. *J Invest Dermatol* 117:1120-5.
- Chvapil M (1973) New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci* 13:1041-9.
- Chvapil M, Stankova L, Weldy P, Bernhard D, Campbell J, Carlson EC, *et al.* (1977) The role of zinc in the function of some inflammatory cells. *Prog Clin Biol Res* 14:103-27.
- Coates P, Vyakrnam S, Eady EA, Jones CE, Cove JH, Cunliffe WJ (2002) Prevalence of antibiotic-resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. *Br J Dermatol* 146:840-8.
- Coenye T, Peeters E, Nelis HJ (2007) Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res Microbiol* 158:386-92.
- Cordain L, Lindeberg S, Hurtado M, Hill K, Eaton SB, Brand-Miller J (2002) Acne vulgaris: a disease of Western civilization. *Arch Dermatol* 138:1584-90.
- Coudray C, Rachidi S, Favier A (1993) Effect of zinc on superoxide-dependent hydroxyl radical production in vitro. *Biol Trace Elem Res* 38:273-87.
- Cove JH, Holland KT, Cunliffe WJ (1983) Effects of oxygen concentration on biomass production, maximum specific growth rate and extracellular enzyme production by three species of cutaneous propionibacteria grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 129:3327-34.
- Crea T, Guerin V, Ortega F, Hartemann P (1990) [Zinc and the immune system]. *Ann Med Interne (Paris)* 141:447-51.
- Crowe FL, Key TJ, Allen NE, Appleby PN, Roddam A, Overvad K, *et al.* (2009) The association between diet and serum concentrations of IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-2, and IGFBP-3 in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:1333-40.
- Csukas Z, Banizs B, Rozgonyi F (2004) Studies on the cytotoxic effects of *Propionibacterium acnes* strains isolated from cornea. *Microb Pathog* 36:171-4.
- Cunliffe WJ, Holland DB, Clark SM, Stables GI (2000) Comedogenesis: some new aetiological, clinical and therapeutic strategies. *Br J Dermatol* 142:1084-91.
- Davidovici BB, Wolf R (2010) The role of diet in acne: facts and controversies. *Clin Dermatol* 28:12-6.
- Deplewski D, Rosenfield RL (2000) Role of hormones in pilosebaceous unit development. *Endocr Rev* 21:363-92.

- Dreno B, Castell A, Tsankov N, Lipozencic J, Serdaroglu S, Gutierrez V, *et al.* (2009) Interest of the association retinaldehyde/glycolic acid in adult acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23:529-32.
- Dreno B, Foule P, Reynaud A, Moyses D, Habert H, Richet H (2005) Effect of zinc gluconate on propionibacterium acnes resistance to erythromycin in patients with inflammatory acne: in vitro and in vivo study. *Eur J Dermatol* 15:152-5.
- Dreno B, Stalder JF, Pecquet C, Boiteau HL, Barriere H (1984) Variations in cutaneous zinc concentrations after oral administration of zinc gluconate. *Acta Derm Venereol* 64:341-4.
- Dreno B, Trossaert M, Boiteau HL, Litoux P (1992) Zinc salts effects on granulocyte zinc concentration and chemotaxis in acne patients. *Acta Derm Venereol* 72:250-2.
- Eady AE, Cove JH, Layton AM (2003) Is antibiotic resistance in cutaneous propionibacteria clinically relevant? : implications of resistance for acne patients and prescribers. *Am J Clin Dermatol* 4:813-31.
- Eady EA, Cove JH, Holland KT, Cunliffe WJ (1989) Erythromycin resistant propionibacteria in antibiotic treated acne patients: association with therapeutic failure. *Br J Dermatol* 121:51-7.
- Edmondson SR, Thumiger SP, Kaur P, Loh B, Koelmeyer R, Li A, *et al.* (2005) Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) localizes to and modulates proliferative epidermal keratinocytes in vivo. *Br J Dermatol* 152:225-30.
- Edmondson SR, Thumiger SP, Werther GA, Wraight CJ (2003) Epidermal homeostasis: the role of the growth hormone and insulin-like growth factor systems. *Endocr Rev* 24:737-64.
- Elgavish A, Lloyd K, Reed R (1996) A subpopulation of human urothelial cells is stimulated to proliferate by treatment in vitro with lipoteichoic acid, a cell wall component of *Streptococcus faecalis*. *J Cell Physiol* 169:42-51.
- Etheredge L, Kane BP, Hassell JR (2009) The effect of growth factor signaling on keratocytes in vitro and its relationship to the phases of stromal wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:3128-36.
- Evans CA, Smith WM, Johnston EA, Giblett ER (1950) Bacterial flora of the normal human skin. *J Invest Dermatol* 15:305-24.
- Farrar MD, Ingham E, Holland KT (2000) Heat shock proteins and inflammatory acne vulgaris: molecular cloning, overexpression and purification of a propionibacterium acnes GroEL and DnaK homologue. *FEMS Microbiol Lett* 191:183-6.
- Fivenson DP (2006) The mechanisms of action of nicotinamide and zinc in inflammatory skin disease. *Cutis* 77:5-10.
- Fluhr JW, Bosch B, Gloor M, Höffler U (1999) In-vitro and in-vivo efficacy of zinc acetate against propionibacteria alone and in combination with erythromycin. *Zentralbl Bakteriologie* 289:445-56.

Ganceviciene R, Bohm M, Fimmel S, Zouboulis CC (2009) The role of neuropeptides in the multifactorial pathogenesis of acne vulgaris. *Dermatoendocrinol* 1:170-6.

Ganceviciene R, Graziene V, Fimmel S, Zouboulis CC (2008) Involvement of the corticotropin-releasing hormone system in the pathogenesis of acne vulgaris. *Br J Dermatol*.

Gilhar A, Ish-Shalom S, Pillar T, Etzioni A, Silbermann M (1994) Effect of antiinsulin-like growth factor 1 on epidermal proliferation of human skin transplanted onto nude mice treated with growth hormone. *Endocrinology* 134:229-32.

Gingras S, Turgeon C, Brochu N, Soucy P, Labrie F, Simard J (2003) Characterization and modulation of sex steroid metabolizing activity in normal human keratinocytes in primary culture and HaCaT cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87:167-79.

Graham GM, Farrar MD, Cruse-Sawyer JE, Holland KT, Ingham E (2004) Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* GroEL. *Br J Dermatol* 150:421-8.

Grimberg A, Cohen P (2000) Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 183:1-9.

Gueniche A, Viac J, Lizard G, Charveron M, Schmitt D (1995) Protective effect of zinc on keratinocyte activation markers induced by interferon or nickel. *Acta Derm Venereol* 75:19-23.

Guy R, Green MR, Kealey T (1996) Modeling acne in vitro. *J Invest Dermatol* 106:176-82.

Haase H, Rink L (2009) Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. *Annu Rev Nutr* 29:133-52.

Harkaway KS, McGinley KJ, Foglia AN, Lee WL, Fried F, Shalita AR, *et al.* (1992) Antibiotic resistance patterns in coagulase-negative staphylococci after treatment with topical erythromycin, benzoyl peroxide, and combination therapy. *Br J Dermatol* 126:586-90.

Hodak E, Gottlieb AB, Anzilotti M, Krueger JG (1996) The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential in human epidermis and skin appendages: correlation of increased expression with epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* 106:564-70.

Holland KT, Cunliffe WJ, Roberts CD (1978) The role of bacteria in acne vulgaris: a new approach. *Clin Exp Dermatol* 3:253-7.

Horrobin DF, Cunnane SC (1980) Interactions between zinc, essential fatty acids and prostaglandins: relevance to acrodermatitis enteropathica, total parenteral nutrition, the glucagonoma syndrome, diabetes, anorexia nervosa and sickle cell anaemia. *Med Hypotheses* 6:277-96.

Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999) The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20:761-87.

Iinuma K, Sato T, Akimoto N, Noguchi N, Sasatsu M, Nishijima S, *et al.* (2009) Involvement of *Propionibacterium acnes* in the augmentation of lipogenesis in hamster sebaceous glands in vivo and in vitro. *J Invest Dermatol* 129:2113-9.

Iversen OJ, Dalen AB, Svindland HB (1985) Isolation of an acidic polysaccharide antigen from *Propionibacterium acnes*. *Arch Dermatol Res* 277:225-9.

Jaiswal AS, Narayan S (2004) Zinc stabilizes adenomatous polyposis coli (APC) protein levels and induces cell cycle arrest in colon cancer cells. *J Cell Biochem* 93:345-57.

Jalali GR, Roozbeh J, Mohammadzadeh A, Sharifian M, Sagheb MM, Hamidian Jahromi A, *et al.* (2010) Impact of oral zinc therapy on the level of sex hormones in male patients on hemodialysis. *Ren Fail* 32:417-9.

James KA, Burkhart CN, Morrell DS (2009) Emerging drugs for acne. *Expert Opin Emerg Drugs* 14:649-59.

Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dreno B (2007a) Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium acnes* extracts on keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 299:441-7.

Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dreno B (2007b) Zinc salts inhibit in vitro Toll-like receptor 2 surface expression by keratinocytes. *Eur J Dermatol* 17:492-6.

Jeremy AH, Holland DB, Roberts SG, Thomson KF, Cunliffe WJ (2003) Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J Invest Dermatol* 121:20-7.

Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, Jarrousse V, Quereux G, Khammari A, *et al.* (2005) Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol* 153:1105-13.

Kalis C, Gumenscheimer M, Freudenberg N, Tchaptchet S, Fejer G, Heit A, *et al.* (2005) Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *J Immunol* 174:4295-300.

Kanai K, Asano K, Hisamitsu T, Suzaki H (2004) Suppression of matrix metalloproteinase production from nasal fibroblasts by macrolide antibiotics in vitro. *Eur Respir J* 23:671-8.

Karadag AS, Ertugrul DT, Tatal E, Akin KO (2010) Short-term isotretinoin treatment decreases insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 levels: does isotretinoin affect growth hormone physiology? *Br J Dermatol*.

Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP (1991) Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254:421-3.

Kauser S, Slominski A, Wei ET, Tobin DJ (2006) Modulation of the human hair follicle pigmentary unit by corticotropin-releasing hormone and urocortin peptides. *Faseb J* 20:882-95.

Kavelaars A, Ballieux RE, Heijnen CJ (1989) The role of IL-1 in the corticotropin-releasing factor and arginine- vasopressin-induced secretion of immunoreactive beta-endorphin by human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 142:2338-42.

Kawai T, Akira S (2005) Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 7:12-9.

Kim HS, Cho DH, Kim HJ, Lee JY, Cho BK, Park HJ (2006a) Immunoreactivity of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotrophic hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone in alopecia areata. *Exp Dermatol* 15:515-22.

Kim HS, Luo L, Pflugfelder SC, Li DQ (2005) Doxycycline inhibits TGF-beta1-induced MMP-9 via Smad and MAPK pathways in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:840-8.

Kim J (2005) Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Dermatology* 211:193-8.

Kim J, Ochoa MT, Krutzik SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, *et al.* (2002) Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol* 169:1535-41.

Kim JE, Cho DH, Kim HS, Kim HJ, Lee JY, Cho BK, *et al.* (2007) Expression of the corticotropin-releasing hormone-proopiomelanocortin axis in the various clinical types of psoriasis. *Exp Dermatol* 16:104-9.

Kim MH, Cho D, Kim HJ, Chong SJ, Lee KH, Yu DS, *et al.* (2006b) Investigation of the corticotropin-releasing hormone-proopiomelanocortin axis in various skin tumours. *Br J Dermatol* 155:910-5.

Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, *et al.* (2006) Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat Immunol* 7:971-7.

Klinger B, Anin S, Silbergeld A, Eshet R, Laron Z (1998) Development of hyperandrogenism during treatment with insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female patients with Laron syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48:81-7.

Knaggs HE, Hughes BR, Morris C, Wood EJ, Holland DB, Cunliffe WJ (1994) Immunohistochemical study of desmosomes in acne vulgaris. *Br J Dermatol* 130:731-7.

Kono M, Nagata H, Umemura S, Kawana S, Osamura RY (2001) In situ expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and proopiomelanocortin (POMC) genes in human skin. *Faseb J* 15:2297-9.

Koyama S, Cobb LJ, Mehta HH, Seeram NP, Heber D, Pantuck AJ, *et al.* (2010) Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. *Growth Horm IGF Res* 20:55-62.

Krane JF, Murphy DP, Carter DM, Krueger JG (1991) Synergistic effects of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I/somatomedin C (IGF-I) on keratinocyte

proliferation may be mediated by IGF-I transmodulation of the EGF receptor. *J Invest Dermatol* 96:419-24.

Kratz G, Lake M, Ljungstrom K, Forsberg G, Haegerstrand A, Gidlund M (1992) Effect of recombinant IGF binding protein-1 on primary cultures of human keratinocytes and fibroblasts: selective enhancement of IGF-1 but not IGF-2-induced cell proliferation. *Exp Cell Res* 202:381-5.

Kuenzli S, Saurat JH (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. *Br J Dermatol* 149:229-36.

Kurokawa I, Danby FW, Ju Q, Wang X, Xiang LF, Xia L, *et al.* (2009) New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol* 18:821-32.

Kurokawa I, Mayer-da-Silva A, Gollnick H, Orfanos CE (1988) Monoclonal antibody labeling for cytokeratins and filaggrin in the human pilosebaceous unit of normal, seborrhoeic and acne skin. *J Invest Dermatol* 91:566-71.

Lansdown AB (1996) Zinc in the healing wound. *Lancet* 347:706-7.

Leccia MT, Richard MJ, Favier A, Beani JC (1999) Zinc protects against ultraviolet A1-induced DNA damage and apoptosis in cultured human fibroblasts. *Biol Trace Elem Res* 69:177-90.

Lee DD, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Vouthounis C, Blumenberg M, Tomic-Canic M (2009) Retinoid-responsive transcriptional changes in epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* 220:427-39.

Lee WJ, Jung HD, Chi SG, Kim BS, Lee SJ, Kim do W, *et al.* (2010) Effect of dihydrotestosterone on the upregulation of inflammatory cytokines in cultured sebocytes. *Arch Dermatol Res* 302:429-33.

Leeming JP, Holland KT, Cuncliffe WJ (1988) The microbial colonization of inflamed acne vulgaris lesions. *Br J Dermatol* 118:203-8.

Lew BL, Sim WY, Kim NI (2009) Expression of Toll-like Receptor 2 in Cultured Human Keratinocytes: The Effect of Bacterial Antigens, Cytokines and Calcium Concentration. *Ann Dermatol* 21:337-44.

Lewis DA, Travers JB, Somani AK, Spandau DF (2010) The IGF-1/IGF-1R signaling axis in the skin: a new role for the dermis in aging-associated skin cancer. *Oncogene* 29:1475-85.

Leyden JJ (2003) A review of the use of combination therapies for the treatment of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 49:S200-10.

Leyden JJ, McGinley KJ, Mills OH, Kligman AM (1975) Propionibacterium levels in patients with and without acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 65:382-4.

- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.
- Mahoney MG, Brennan D, Starcher B, Faryniarz J, Ramirez J, Parr L, *et al.* (2009) Extracellular matrix in cutaneous ageing: the effects of 0.1% copper-zinc malonate-containing cream on elastin biosynthesis. *Exp Dermatol* 18:205-11.
- Mao-Qiang M, Fowler AJ, Schmuth M, Lau P, Chang S, Brown BE, *et al.* (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activation stimulates keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 123:305-12.
- McCusker RH, Kaleko M, Sackett RL (1998) Multivalent cations and ligand affinity of the type 1 insulin-like growth factor receptor on P2A2-LISN muscle cells. *J Cell Physiol* 176:392-401.
- McGillis JP, Park A, Rubin-Fletter P, Turck C, Dallman MF, Payan DG (1989) Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by corticotropin-releasing factor. *J Neurosci Res* 23:346-52.
- Melnik B (2009) Milk consumption: aggravating factor of acne and promoter of chronic diseases of Western societies. *J Dtsch Dermatol Ges* 7:364-70.
- Melnik BC, Schmitz G (2009) Role of insulin, insulin-like growth factor-1, hyperglycaemic food and milk consumption in the pathogenesis of acne vulgaris. *Exp Dermatol* 18:833-41.
- Meynadier J (2000) Efficacy and safety study of two zinc gluconate regimens in the treatment of inflammatory acne. *Eur J Dermatol* 10:269-73.
- Michaelsson G, Ljunghall K (1990) Patients with dermatitis herpetiformis, acne, psoriasis and Darier's disease have low epidermal zinc concentrations. *Acta Derm Venereol* 70:304-8.
- Michaelsson G, Ljunghall K, Danielson BG (1980) Zinc in epidermis and dermis in healthy subjects. *Acta Derm Venereol* 60:295-9.
- Morel P, Vienne MP, Beylot C, Bonerandi JJ, Dreno B, Lehucher-Ceyrac D, *et al.* (1999) Clinical efficacy and safety of a topical combination of retinaldehyde 0.1% with erythromycin 4% in acne vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 24:354-7.
- Nagy I, Pivarsci A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, *et al.* (2006) Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect* 8:2195-205.
- Nagy I, Pivarsci A, Koreck A, Szell M, Urban E, Kemeny L (2005) Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol* 124:931-8.
- Nakatsuji T, Kao MC, Zhang L, Zouboulis CC, Gallo RL, Huang CM (2010) Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating beta-defensin-2 expression. *J Invest Dermatol* 130:985-94.

- Nasiri S, Ghalamkarpour F, Yousefi M, Sadighha A (2009) Serum zinc levels in Iranian patients with acne. *Clin Exp Dermatol* 34:e446.
- Nishijima S, Kurokawa I, Katoh N, Watanabe K (2000) The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. *J Dermatol* 27:318-23.
- O'Kane M, Murphy EP, Kirby B (2006) The role of corticotropin-releasing hormone in immune-mediated cutaneous inflammatory disease. *Exp Dermatol* 15:143-53.
- Papakonstantinou E, Aletras AJ, Glass E, Tsogas P, Dionyssopoulos A, Adjaye J, *et al.* (2005) Matrix metalloproteinases of epithelial origin in facial sebum of patients with acne and their regulation by isotretinoin. *J Invest Dermatol* 125:673-84.
- Pathak R, Dhawan D, Pathak A (2010) Effect of Zinc Supplementation on the Status of Thyroid Hormones and Na, K, and Ca Levels in Blood Following Ethanol Feeding. *Biol Trace Elem Res.*
- Pawin H, Beylot C, Chivot M, Faure M, Poli F, Revuz J, *et al.* (2004) Physiopathology of acne vulgaris: recent data, new understanding of the treatments. *Eur J Dermatol* 14:4-12.
- Pelle E, McCarthy J, Seltmann H, Huang X, Mammone T, Zouboulis CC, *et al.* (2008) Identification of histamine receptors and reduction of squalene levels by an antihistamine in sebocytes. *J Invest Dermatol* 128:1280-5.
- Perry AL, Lambert PA (2006) *Propionibacterium acnes*. *Lett Appl Microbiol* 42:185-8.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Philpott MP (2003) Defensins and acne. *Mol Immunol* 40:457-62.
- Pierard GE, Pierard-Franchimont C (1993) Effect of a topical erythromycin-zinc formulation on sebum delivery. Evaluation by combined photometric-multi-step samplings with Sebutate. *Clin Exp Dermatol* 18:410-3.
- Potter E, Behan DP, Fischer WH, Linton EA, Lowry PJ, Vale WW (1991) Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature* 349:423-6.
- Prasad AS (1979) Clinical, biochemical, and pharmacological role of zinc. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 19:393-426.
- Puhvel SM, Reisner RM (1972) The production of hyaluronidase (hyaluronate lyase) by *Corynebacterium acnes*. *J Invest Dermatol* 58:66-70.
- Puhvel SM, Sakamoto M (1980) Cytotoxin production by comedonal bacteria (*Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum* and *Staphylococcus epidermidis*). *J Invest Dermatol* 74:36-9.

- Qin LQ, He K, Xu JY (2009) Milk consumption and circulating insulin-like growth factor-I level: a systematic literature review. *Int J Food Sci Nutr* 60 Suppl 7:330-40.
- Richard MJ, Guiraud P, Leccia MT, Beani JC, Favier A (1993) Effect of zinc supplementation on resistance of cultured human skin fibroblasts toward oxidant stress. *Biol Trace Elem Res* 37:187-99.
- Ristow HJ, Messmer TO (1988) Basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I are strong mitogens for cultured mouse keratinocytes. *J Cell Physiol* 137:277-84.
- Rodrigues LS, da Silva Maeda E, Moreira ME, Tempone AJ, Lobato LS, Ribeiro-Resende VT, *et al.* (2010) Mycobacterium leprae induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. *Cell Microbiol* 12:42-54.
- Rudman SM, Philpott MP, Thomas GA, Kealey T (1997) The role of IGF-I in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen? *J Invest Dermatol* 109:770-7.
- Sackett RL, McCusker RH (1998) Multivalent cations depress ligand affinity of insulin-like growth factor-binding proteins-3 and -5 on human GM-10 fibroblast cell surfaces. *J Cell Biochem* 69:364-75.
- Sainte-Marie I, Jumbou O, Tenaud I, Dreno B (1998) Comparative study of the in vitro inflammatory activity of three nickel salts on keratinocytes. *Acta Derm Venereol* 78:169-72.
- Santos MC, Souza AP, Gerlach RF, Tabchoury CM, Line SR (2001) Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing. *Br J Dermatol* 145:854-5.
- Schaller M, Loewenstein M, Borelli C, Jacob K, Vogeser M, Burgdorf WH, *et al.* (2005) Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with Propionibacterium acnes and coproporphyrin III. *Br J Dermatol* 153:66-71.
- Schmalz G, Schuster U, Schweikl H (1998) Influence of metals on IL-6 release in vitro. *Biomaterials* 19:1689-94.
- Schmuth M, Haqq CM, Cairns WJ, Holder JC, Dorsam S, Chang S, *et al.* (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122:971-83.
- Scott DG, Cunliffe WJ, Gowland G (1979) Activation of complement-a mechanism for the inflammation in acne. *Br J Dermatol* 101:315-20.
- Singh B, Charkowicz D, Mascarenhas D (2004) Insulin-like growth factor-independent effects mediated by a C-terminal metal-binding domain of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Biol Chem* 279:477-87.
- Singh VK (1989) Stimulatory effect of corticotropin-releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression. *J Neuroimmunol* 23:257-62.

- Singh VK, Fudenberg HH (1988) Binding of [125I]corticotropin releasing factor to blood immunocytes and its reduction in Alzheimer's disease. *Immunol Lett* 18:5-8.
- Slominski A (2005) Neuroendocrine system of the skin. *Dermatology* 211:199-208.
- Slominski A, Ermak G, Hwang J, Chakraborty A, Mazurkiewicz JE, Mihm M (1995) Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. *FEBS Lett* 374:113-6.
- Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, Paus R (2007) Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:143-9.
- Slominski A, Zbytek B, Pisarchik A, Slominski RM, Zmijewski MA, Wortsman J (2006) CRH functions as a growth factor/cytokine in the skin. *J Cell Physiol* 206:780-91.
- Slominski A, Zbytek B, Szczesniowski A, Semak I, Kaminski J, Sweatman T, *et al.* (2005) CRH stimulation of corticosteroids production in melanocytes is mediated by ACTH. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E701-6.
- Smith TM, Cong Z, Gilliland KL, Clawson GA, Thiboutot DM (2006) Insulin-like growth factor-1 induces lipid production in human SEB-1 sebocytes via sterol response element-binding protein-1. *J Invest Dermatol* 126:1226-32.
- Smith TM, Gilliland K, Clawson GA, Thiboutot D (2008) IGF-1 induces SREBP-1 expression and lipogenesis in SEB-1 sebocytes via activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Invest Dermatol* 128:1286-93.
- Stachelscheid H, Ibrahim H, Koch L, Schmitz A, Tschardt M, Wunderlich FT, *et al.* (2008) Epidermal insulin/IGF-1 signalling control interfollicular morphogenesis and proliferative potential through Rac activation. *Embo J* 27:2091-101.
- Stamatiadis D, Bulteau-Portois MC, Mowszowicz I (1988) Inhibition of 5 alpha-reductase activity in human skin by zinc and azelaic acid. *Br J Dermatol* 119:627-32.
- Stephan F, Revuz J (2004) [Zinc salts in dermatology]. *Ann Dermatol Venereol* 131:455-60.
- Sugimoto Y, Lopez-Solache I, Labrie F, Luu-The V (1995) Cations inhibit specifically type I 5 alpha-reductase found in human skin. *J Invest Dermatol* 104:775-8.
- Tagen M, Stiles L, Kalogeromitros D, Gregoriou S, Kempuraj D, Makris M, *et al.* (2007) Skin corticotropin-releasing hormone receptor expression in psoriasis. *J Invest Dermatol* 127:1789-91.
- Takeda K, Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, *et al.* (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-51.

Tavakkol A, Elder JT, Griffiths CE, Cooper KD, Talwar H, Fisher GJ, *et al.* (1992) Expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-1 receptor mRNA and proteins in human skin. *J Invest Dermatol* 99:343-9.

Tavakkol A, Varani J, Elder JT, Zouboulis CC (1999) Maintenance of human skin in organ culture: role for insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor. *Arch Dermatol Res* 291:643-51.

Tenaud I, Leroy S, Chebassier N, Dreno B (2000) Zinc, copper and manganese enhanced keratinocyte migration through a functional modulation of keratinocyte integrins. *Exp Dermatol* 9:407-16.

Theoharides TC, Donelan JM, Papadopoulou N, Cao J, Kempuraj D, Conti P (2004) Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends Pharmacol Sci* 25:563-8.

Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Webster E, *et al.* (1998) Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology* 139:403-13.

Thiboutot D (2004) Regulation of human sebaceous glands. *J Invest Dermatol* 123:1-12.

Thielitz A, Gollnick H (2008) Topical retinoids in acne vulgaris: update on efficacy and safety. *Am J Clin Dermatol* 9:369-81.

Thumiger SP, Adams TE, Werther GA, Wraight CJ, Edmondson SR (2005) UV induced responses of the human epidermal IGF system: impaired anti-apoptotic effects of IGF-I in HaCaT keratinocytes. *Growth Factors* 23:151-9.

Trivedi NR, Gilliland KL, Zhao W, Liu W, Thiboutot DM (2006) Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling. *J Invest Dermatol* 126:1071-9.

Tsang KJ, Crowe DL (2001) Retinoic acid and extracellular matrix inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression is mediated by the mitogen activated protein kinase pathway. *Int J Oncol* 18:369-74.

Turnbull AV, Rivier CL (1999) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79:1-71.

Vora S, Ovhal A, Jerajani H, Nair N, Chakraborty A (2008) Correlation of facial sebum to serum insulin-like growth factor-1 in patients with acne. *Br J Dermatol* 159:990-1.

Vowels BR, Feingold DS, Sloughfy C, Foglia AN, Konnikov N, Ordoukhanian E, *et al.* (1996) Effects of topical erythromycin on ecology of aerobic cutaneous bacterial flora. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2598-604.

- Vowels BR, Yang S, Leyden JJ (1995) Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. *Infect Immun* 63:3158-65.
- Webster EL, Torpy DJ, Elenkov IJ, Chrousos GP (1998) Corticotropin-releasing hormone and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 840:21-32.
- Webster GF, Leyden JJ (1980) Characterization of serum-independent polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors produced by *Propionibacterium acnes*. *Inflammation* 4:261-9.
- Webster GF, Leyden JJ, Norman ME, Nilsson UR (1978) Complement activation in acne vulgaris: in vitro studies with *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum*. *Infect Immun* 22:523-9.
- Weismann K (1978) What is the use of zinc for wound healing? *Int J Dermatol* 17:568-70.
- Wille JJ, Park J, Elgavish A (1992) Effects of growth factors, hormones, bacterial lipopolysaccharides, and lipoteichoic acids on the clonal growth of normal ureteral epithelial cells in serum-free culture. *J Cell Physiol* 150:52-8.
- Wolkenstein P, Grob JJ, Bastuji-Garin S, Ruszczynski S, Roujeau JC, Revuz J (2003) French people and skin diseases: results of a survey using a representative sample. *Arch Dermatol* 139:1614-9; discussion 9.
- Wolkenstein P, Revuz J (2004) [The frequency and impact of skin diseases in France]. *Ann Dermatol Venereol* 131:325-7.
- Woods RJ, Grossman A, Saphier P, Kennedy K, Ur E, Behan D, *et al.* (1994) Association of human corticotropin-releasing hormone to its binding protein in blood may trigger clearance of the complex. *J Clin Endocrinol Metab* 78:73-6.
- Wraight CJ, Murashita MM, Russo VC, Werther GA (1994) A keratinocyte cell line synthesizes a predominant insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-3) that modulates insulin-like growth factor-I action. *J Invest Dermatol* 103:627-31.
- Zbytek B, Pfeffer LM, Slominski AT (2004) Corticotropin-releasing hormone stimulates NF-kappaB in human epidermal keratinocytes. *J Endocrinol* 181:R1-7.
- Zbytek B, Pikula M, Slominski RM, Mysliwski A, Wei E, Wortsman J, *et al.* (2005) Corticotropin-releasing hormone triggers differentiation in HaCaT keratinocytes. *Br J Dermatol* 152:474-80.
- Zbytek B, Slominski AT (2005) Corticotropin-releasing hormone induces keratinocyte differentiation in the adult human epidermis. *J Cell Physiol* 203:118-26.
- Zbytek B, Slominski AT (2007) CRH mediates inflammation induced by lipopolysaccharide in human adult epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127:730-2.
- Ziegler CG, Krug AW, Zouboulis CC, Bornstein SR (2007) Corticotropin releasing hormone and its function in the skin. *Horm Metab Res* 39:106-9.

Zouboulis CC (2009) Propionibacterium acnes and sebaceous lipogenesis: a love-hate relationship? *J Invest Dermatol* 129:2093-6.

Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, *et al.* (2005) What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol* 14:143-52.

Zouboulis CC, Seltmann H, Hiroi N, Chen W, Young M, Oeff M, *et al.* (2002) Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7148-53.

Zoumakis E, Chrousos GP (2010) Corticotropin-Releasing Hormone Receptor Antagonists: An Update. *Endocr Dev* 17:36-43.

Zoumakis E, Rice KC, Gold PW, Chrousos GP (2006) Potential uses of corticotropin-releasing hormone antagonists. *Ann NY Acad Sci* 1083:239-51.

# Annexes

**Annexe 1 : *Propionibacterium acnes* extracts improve Corticotropin Releasing Hormone expression in the skin**

Poster présenté au CARD Toulouse 2008, 2nd International Conference « Sebaceous Gland, Acne, Rosacea and related disorders » Rome 2008, JDP Paris 2008, ESDR Budapest 2009.

**Annexe 2 : *Propionibacterium acnes* activates the IGF-1/IGF-1R system in the epidermis and induces keratinocytes proliferation**

Poster présenté au CARD Marseille 2010, ESDR Helsinki 2010, JDP Paris 2010

**Annexe 3 : The new undecyl-rhamnoside (APRC11) inhibits *P.acnes*-induced inflammation in keratinocytes**

Poster présenté à l'ESDR Helsinki 2010, JDP Paris 2010

## Annexe 1 : *Propionibacterium acnes* extracts improve Corticotropin Releasing Hormone expression in the skin

### *Propionibacterium acnes* extracts improve Corticotropin Releasing Hormone expression in the skin

Isard O<sup>1</sup>, Knol AC<sup>1</sup>, Castex-Rizzi N<sup>3</sup>, Khammari A<sup>2</sup>, Charveron M<sup>3</sup>, Dréno B<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSERM, U892, Nantes, <sup>2</sup> Clinique dermatologique, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, <sup>3</sup> Laboratoire de biologie cellulaire cutanée, Institut de recherche Pierre Fabre, Toulouse

#### INTRODUCTION

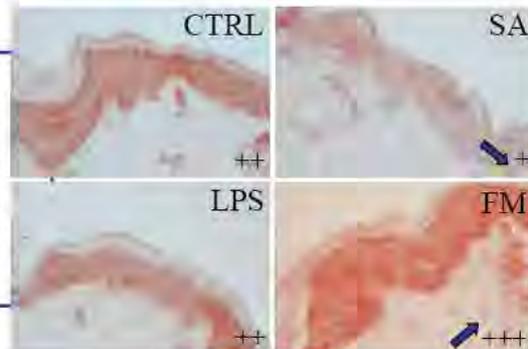
It is widely accepted that *Propionibacterium acnes* plays a major role in the development of acne especially on the inflammatory stage. The Corticotropin Releasing Hormone (CRH) is a neuropeptide also produced by the skin (especially by keratinocytes) through an equivalent of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis, under the influence of a stress. CRH had been reported previously to have a role in the regulation of cell proliferation and differentiation, representing an important step in the development of acne lesions. In this context, our objective was to study the modulation of CRH expression by keratinocytes with different *P.acnes* extracts.

#### METHOD

We used different *P.acnes* extracts in order to study the modulation of CRH expression by the keratinocytes. Cutaneous explants from 3 healthy donors were incubated with two different *P.acnes* extracts : a Membrane Fraction (FM) and a Cytosolic Fraction (SA). After 3 incubations of 3 hours, 6 hours and 24 hours, immunohistochemical analysis was conducted on frozen sections of these cutaneous explants. Immunohistochemistry was performed using the streptavidin/peroxidase technique. The positivity of the staining was quantified according to the intensity of labeling as none (0), weak (+), moderate (++) and strong (+++).

#### RESULTS

Based on the results obtained for the 3 donors, an increase of CRH expression was observed after incubations with the Membrane Fraction (FM) of *P.acnes* (+++). This induction was maximal after 3 hours. The expression of CRH slightly decreased by the incubation in the presence of the Cytosolic Fraction (+). The LPS had no effect on the CRH expression. (++)



#### CONCLUSION

The expression of CRH seems to be improved essentially after an incubation with the proteins of the Membrane Fraction of *P.acnes*. Thus, as it has been shown previously that *P.acnes* extracts could induce filaggrin expression, we have probably identify by this work another mechanism by which *P.acnes* could act on the proliferation and the differentiation of the keratinocytes. Our work confirm that *P.acnes* acts both on the inflammatory stage but also on the early stage of the acne development corresponding to the comedo formation. This could be a possible explanation for the moderate comedolytic activity reported with the use of topical antibiotics and benzoyl peroxyde.

INSERM  
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

Pierre Fabre  
UNIVERSITÉ NANTES  
LABORATOIRE DE BILOGIE CELLULAIRE CUTANÉE

olivia.isard@etu.univ-nantes.fr

- « CRH functions as a growth factor/cytokine in the skin » (Slominski et al., 2006)
- « Corticotropin-releasing hormone induces keratinocyte differentiation in the adult human epidermis » (Zbytek et al., 2005)
- « Corticotropin-releasing hormone triggers differentiation in HaCaT keratinocytes » (Zbytek et al., 2005)

## Annexe 2 : *Propionibacterium acnes* activates the IGF-1/IGF-1R system in the epidermis and induces keratinocytes proliferation

### *Propionibacterium acnes* activates the IGF-1/IGF-1R system in the epidermis and induces keratinocytes proliferation

Isard O<sup>1</sup>, Knol AC<sup>1</sup>, Ariès MF<sup>4</sup>, Nguyen JM<sup>3</sup>, Khammari A<sup>1,2</sup>, Castex-Rizzi N<sup>4</sup>, Dréno B<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM U892 Nantes, <sup>2</sup>Unité de Dermato-Cancérologie CHU Hôtel-Dieu Nantes / CIC Biothérapie INSERM U503, <sup>3</sup>PIMESP Hôpital Saint Jacques CHU Nantes, <sup>4</sup>Pierre Fabre Dermo-cosmétique Recherche Toulouse

#### INTRODUCTION

*Propionibacterium acnes* plays a major role in the development of inflammatory acne. IGF-1 had been reported to stimulate the keratinocytes proliferation via an activation of IGF-1R and could play a central role in the potential link between diet and acne. Our first objective was to study the modulation of epidermal IGF-1 and IGF-1R expression by *P.acnes* extracts, and the second one was to determine their modulation with zinc gluconate which has proven both efficiency against inflammatory acne lesions and modulation of the IGF-1 system.

#### METHOD

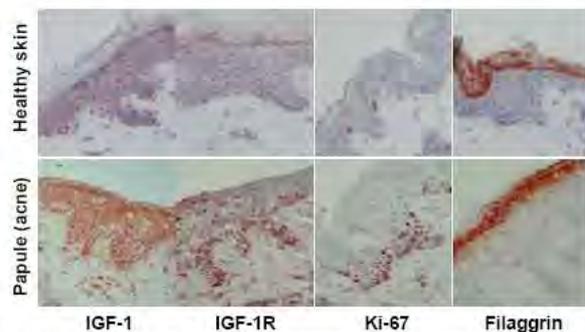
*In vivo*, we analysed biopsies of acne lesions and healthy skin, and *in vitro* we used human skin explants incubated with two *P.acnes* extracts (membrane fraction (MF) and cytosolic proteins (CP)) with or without zinc. The expression of IGF-1 and IGF-1R in keratinocytes was evaluated using immunohistochemistry, and the production of IGF-1 in culture medium was measured by ELISA.

#### RESULTS

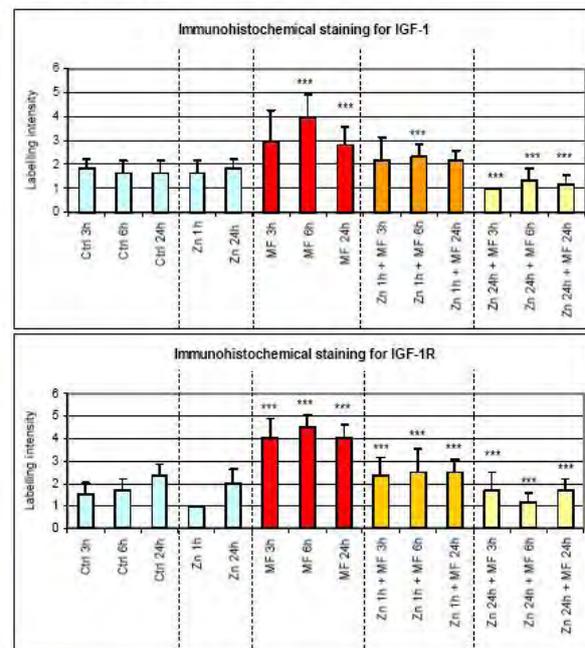
*In vivo*, we observed that both IGF-1 and IGF-1R were overexpressed in acne lesions compared to healthy skin. *In vitro*, MF both increased IGF-1 and IGF-1R expression by skin explants keratinocytes and this modulation was associated with an overexpression of both Ki-67 and filaggrin. Zinc downregulated IGF-1 and IGF-1R levels.

#### CONCLUSION

These results demonstrate for the first time that *P.acnes* can play a role in the formation of comedo via the modulation of the IGF-1/IGF-1R pathway in addition of the diet.



**Fig.1** IGF-1, IGF-1R, Ki-67 and filaggrin expression in the epidermis of the upper back of healthy donors and acne lesions of the upper back (Magn. x25)



**Fig.2** IGF-1 and IGF-1R expression in the epidermis of explants without or after 3, 6 or 24 hours of incubation with *P. acnes* MF (membrane fraction), CP (cytosolic protein) and LPS. Scale: null labelling (0), very weak labelling (1), weak labelling (2), moderate labelling (3), strong labelling (4) and very strong labelling (5) \*\*\*: significant modulation



**Inserm**  
Institut national de la santé et de la recherche médicale



oiva.isard@etu.univ-nantes.fr

Hodak E, Gottlieb AB, Anziotti M, Krueger JG (1996) The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential in human epidermis and skin appendages: correlation of increased expression with epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* 106:564-70.

Banudevi S, Senthilkumar K, Sharmila G, Arunkumar R, Vijayababu MR, Arunakaran J (2010) Effect of zinc on regulation of insulin-like growth factor signaling in human androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Chim Acta* 411:172-8.

## Annexe 3 : The new undecyl-rhamnoside (APRC11) inhibits *P.acnes*-induced inflammation in keratinocytes

### The new undecyl-rhamnoside (APRC11) inhibits *P.acnes*-induced inflammation in keratinocytes

Isard O<sup>1,2</sup>, Lévêque M<sup>4</sup>, Knol AC<sup>1,2</sup>, Aries MF<sup>4</sup>, Nguyen JM<sup>3</sup>, Khammari A<sup>1,2</sup>, Castex-Rizzi N<sup>4</sup>, Dréno B<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM U892 Nantes, <sup>2</sup>Unité de Dermato-Cancérologie CHU Hôtel-Dieu Nantes / CIC Biothérapie INSERM U503, <sup>3</sup>PIMESP Hôpital Saint Jacques CHU Nantes, <sup>4</sup>Pierre Fabre Dermo-cosmétique Recherche Toulouse

**INTRODUCTION** Acne vulgaris is a chronic skin disease of pilosebaceous glands in which inflammation plays a central role. In order to develop new therapies against the development of inflammatory events, we evaluated the effect of a new undecyl-rhamnoside, namely the undecyl-rhamnoside APRC11, on the keratinocytes inflammation and scarring markers.

#### MATERIEL AND METHOD

Normal human keratinocytes taken from 5 healthy donors were first pre-incubated for 24 hours with APRC11 (1  $\mu$ M), Retinaldehyde (RAL, 100nM) or Zinc Gluconate (Zn, 15 $\mu$ M) which were used as reference molecules for their anti-inflammatory activities. Then, keratinocytes were stimulated with *P.acnes* MF (Membrane Fraction) for 6 hours, in the presence of the same APRC11, RAL or Zn concentrations. Different markers of inflammation or scarring were evaluated at protein level using ELISA tests and a Luminex array system, and at mRNA level using a Luminex-based Quantigene array system.



The new undecyl-rhamnoside APRC11 might contribute to reduce inflammatory events.

**RESULTS** Results showed a significant increase in IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 expressions after *P.acnes* stimulation. Treatment with APRC11 down regulated the *P.acnes*-induced cytokines expression (IL-1 $\alpha$ , -20%; IL-8, -26% and MMP-9, -40%) and up-regulated IL-1RA (+34%). These regulations were noted at both protein and mRNA levels.

**CONCLUSION** In conclusion, the new undecyl-rhamnoside APRC11 is able to reduce the *P.acnes*-induced inflammation in normal human keratinocytes, confirming its interest in inflammatory acne and in scar formation.

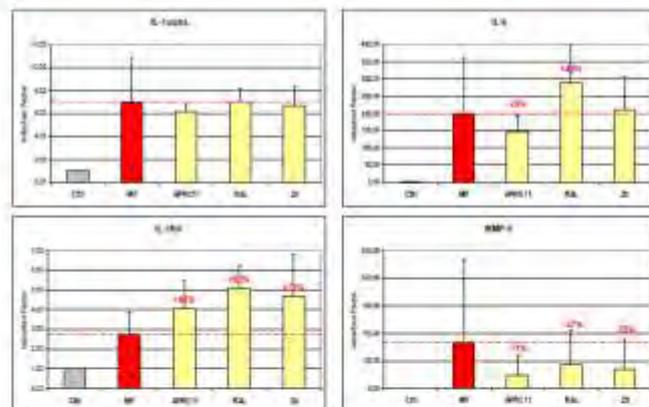


Fig.1. APRC11, RAL and Zn modulate the *P.acnes*-induced up-regulations at mRNA level. Evaluation of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 mRNA synthesis at basal level (CN) which were regarded as 1, of *P.acnes* stimulated level (MF) and after 24 hours preincubation with APRC11, RAL or Zn before MF stimulation. Each bar represents the mean  $\pm$ SD from 5 donors.

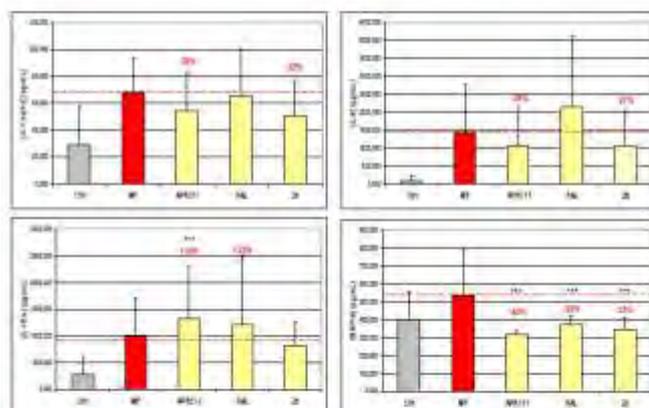


Fig.2. APRC11, RAL and Zn modulate the *P.acnes*-induced up-regulations at protein level. Evaluation of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 protein expression (ng/mL) of *P.acnes* stimulated level (MF) and after 24 hours preincubation with APRC11, RAL and Zn. Each bar represents the mean  $\pm$ SD from 5 donors. \*\*\*\* $p$ <0.05 as compared with the MF stimulated levels (MF).

L'acné est une pathologie inflammatoire du follicule pilo-sébacé multifactorielle dont le développement se déroule suivant trois étapes : une stimulation des glandes sébacées aboutissant à une hyper séborrhée, une hyper prolifération associée à une différenciation et une adhésion kératinocytaire anormale conduisant à la formation de la lésion élémentaire de l'acné : le microcomédon, et enfin une phase inflammatoire dans laquelle la bactérie *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) semble jouer un rôle primordial.

L'axe CRH/CRH-R1 (corticotropin releasing hormone / corticotropin releasing hormone receptor 1) joue un rôle fondamental dans la réponse de l'organisme au stress et il a été décrit qu'il existait un équivalent de cet axe au niveau cutané. L'axe IGF-1/IGF-1R (insulin-like growth factor-1 / insulin-like growth factor-1 receptor) est fondamental pour la prolifération cellulaire et est, lui aussi, présent au niveau de la peau. Ces deux axes ont récemment été suggérés comme potentiellement impliqués dans la pathologie de l'acné car leur activation pourrait être associée à la modulation de la séborrhée, de la prolifération et de la différenciation kératinocytaire ainsi que de l'inflammation. Notre premier objectif était d'étudier le rôle possible de *P.acnes* dans la modulation de ces axes au niveau cutané. Un modèle d'explants de peaux saines et un modèle de monocouches de kératinocytes incubés en présence de deux extraits de *P.acnes* (un extrait FM contenant les protéines de la paroi et de la membrane plasmique de la bactérie, et un extrait SA contenant les protéines cytosoliques) ont été utilisés et les niveaux d'expression du CRH, du CRH-R1, de l'IGF-1 et de l'IGF-1R ont été étudiés. Nous avons mis en évidence que l'expression des hormones CRH et IGF-1 et de leurs récepteurs était stimulée par des incubations avec *P.acnes*. Ainsi, cette bactérie est impliquée non seulement dans la phase inflammatoire de l'acné mais pourrait jouer un rôle fondamental dans les phases précoces du développement des lésions.

Le zinc est utilisé pour le traitement de l'acné inflammatoire minime à modérée. La pluralité du mode d'action du zinc n'est que partiellement connue et si son action sur la phase inflammatoire de l'acné est relativement bien étudiée, son éventuel rôle dans les phases plus précoces du développement de la pathologie n'est que très peu décrit. En parallèle, sur les mêmes modèles, nous avons donc étudié les possibles effets préventifs du gluconate de zinc sur les axes CRH/CRH-R1 et IGF-1/IGF-1R par des pré-incubations de 1h ou 24h. Nous avons mis en évidence que le gluconate de zinc était capable d'inhiber les surexpressions de CRH, IGF-1 et leurs récepteurs induites par *P.acnes*. Ainsi, l'efficacité du zinc dans le traitement de l'acné pourrait s'expliquer par une modulation de ces deux axes.

Enfin, la seconde partie de notre travail a consisté à évaluer l'efficacité anti-inflammatoire d'une molécule à visée anti-acnéique : l'APRC11. Le modèle de kératinocytes en monocouches stimulés par la fraction FM de *P.acnes* a été utilisé. Nous avons confirmé que *P.acnes* stimulait l'expression de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1RA, l'IL-8 et le MMP-9 et nous avons mis en évidence que l'APRC11 était capable de moduler ces surexpressions. L'efficacité de l'APRC11 était supérieure à celle du gluconate de zinc ou du rétinaldéhyde seuls.

**Mots-clés** : Acné, *Propionibacterium acnes*, axe CRH/CRH-R1, axe IGF-1/IGF-1R, Zinc, Kératinocytes

Acne vulgaris is a multifactorial inflammatory skin disease affecting the pilo-sebaceous follicle. The development of acne begins with an increased sebum production, a follicular hyperkeratinization associated with an abnormal differentiation of keratinocytes lining the pilo-sebaceous follicle, and an inflammatory stage where the bacteria *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) plays a fundamental role.

The CRH/CRH-R1 system (corticotropin releasing hormone / corticotropin releasing hormone receptor 1) is the major stress response system in the body and it was proposed that skin has an equivalent of this axis. The IGF-1/IGF-1R system (insulin-like growth factor-1 / insulin-like growth factor-1 receptor) is necessary for a large number of mechanisms particularly the cellular proliferation. This axis is also present in the skin. It was recently proposed that these two systems could be implicated in the pathogenesis of acne due to their ability to modulate seborrhoea, keratinocytes proliferation and differentiation and also the inflammation. Our first aim was to study the eventual *P.acnes* implication in the modulation of these two axes in the skin. We used cutaneous explants and NHEK (Normal Human Epidermal Keratinocytes) incubated with two *P.acnes* extracts (the MF extract contained membrane and cell wall components and the CP extract contained cytosolic proteins). Then, the CRH, CRH-R1, IGF-1 and IGF-1R levels were evaluated. We observed that cutaneous expression of CRH, IGF-1 and their receptors were stimulated by *P.acnes* extracts. *P.acnes* could thus be implicated not only in the inflammatory stage of the pathology, but also as soon as the early steps of the development of acne lesions.

Zinc salts are currently used for the treatment of mild to moderate inflammatory acne. It is widely described that zinc acts on the inflammatory stage of acne via different mechanisms but its role on the earlier steps of the pathology remains unclear. We thus evaluated zinc modulatory effects on the CRH/CRH-R1 axis and the IGF-1/IGF-1R axis. To evaluate the preventive effects of zinc, cutaneous explants and NHEK were first pre incubated with zinc gluconate for 1 hour or 24 hours before MF stimulation. We observed that zinc gluconate was able to inhibit the CRH/CRH-R1 and IGF-1/IGF-1R axes over expressions induced by *P.acnes*. Thus, zinc salts efficiency in the treatment of acne could be explained by the modulation of these two axes.

In the second part of our work, we evaluated the anti inflammatory potential of a new molecule: APRC11. The NHEK model was used. NHEK were stimulated with *P.acnes* MF fraction. We confirmed previous studies indicating that *P.acnes* stimulates the expression of IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-8 and MMP-9 and interestingly, we observed that APRC11 modulated these over expressions. APRC11 efficiency was higher than zinc gluconate or rétinoldehyde efficiencies confirming its potential interest in the treatment of inflammatory acne.

**Key words** : Acne, *Propionibacterium acnes*, CRH/CRH-R1 axis, IGF-1/IGF-1R axis, Zinc, Keratinocytes