

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2007

N°112

THESE  
POUR LE  
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Par

**Fabienne Ballanger**

Née le 27 novembre 1976

Présentée et soutenue publiquement le 11 septembre 2007

**MISE EN EVIDENCE DES EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES  
DU GLUCONATE DE LITHIUM  
DANS LA DERMATITE SEBORRHEIQUE**

Président : Mme le Professeur B. Dréno, Professeur en Dermatologie

Directeur de thèse : Mme le Professeur B. Dréno, Professeur en  
Dermatologie

## PLAN

Introduction

### I- La dermatite séborrhéique

A/ Epidémiologie	p12
1/ Prévalence de la dermatite séborrhéique	
2/ Maladies associées à la dermatite séborrhéique	
3/ Facteurs inducteurs de poussée de dermatite séborrhéique	
B/ Pathogénie	p15
1/ Implication de <i>Malassezia</i>	
Controverses concernant le rôle de <i>Malassezia</i>	
Rôle immunogène de <i>Malassezia</i>	
Activité enzymatique de <i>Malassezia</i>	
2/ Rôle du sébum	
3/ Rôle de la susceptibilité individuelle	
C/ Clinique de l'enfant et de l'adulte	p23
1/ La lésion élémentaire	
2/ Le profil évolutif	
3/ Anatomopathologie	
4/ Les localisations	
5/ Formes cliniques	
6/ Diagnostic différentiel	
D/ Traitement de la dermatite séborrhéique	p29
1/ Traitements locaux	
Antifongiques	
Dermocorticoïdes	
Autres	
2/ Cosmétiques	
3/ Traitements systémiques	
Antifongiques	
Rétinoïdes oraux	
Photothérapie	

#### 4/ Stratégies thérapeutiques

### **II- Les sels de Lithium**

A/ Mécanismes d'action du lithium utilisé par voie systémique	p41
1/ Effets moléculaires du lithium	
- Modulation de nombreux systèmes de seconds messagers	
- Inhibition de la GSK3 $\beta$	
- Action sur la PAP phosphatase	
- Action sur le métabolisme de l'acide arachidonique	
2/ Action sur la croissance et la différenciation cellulaire	
3/ Action immunologique	
4/ Effets secondaires	
B/ Mécanismes d'action potentiels du lithium utilisé par voie topique	p50
1/ Action anti-inflammatoire	
2/ Action antifongique	
C/ Essais thérapeutiques concernant le lithium topique	p52

### **III- Etude des effets modulateurs du gluconate de lithium sur les kératinocytes**

<b>Objectifs</b>	p58
<b>Matériel et méthode</b>	p59
A/ Matériel	p59
1/ Culture de kératinocytes humains normaux en monocouche	
2/ Explants cutanés	
3/ Le modulateur : le gluconate de lithium	
4/ Anticorps utilisés	
B/ Méthode	p63
1/ Test de viabilité : Test MTT	
2/ Stimulation des kératinocytes en monocouche et des explants	
a- Modèles de stimulation	
b- Détermination des doses de LPS et de zymosan utilisées	
c- Préparation des solutions de LPS et de zymosan	
d- Utilisation des préparations de LPS et de zymosan	
3/ Technique d'immunohistochimie	

4/ Dosage immunoenzymatique ELISA

5/ Analyse statistique

**Résultats**

p69

A/ Test de viabilité

B/ Effet modulateur du gluconate de lithium sur la prolifération kératinocytaire

C/ Effet modulateur du gluconate de lithium sur la différenciation  
kératinocytaire

D/ Effet modulateur du gluconate de lithium sur l'expression et la sécrétion de  
cytokines pro et anti-inflammatoires

E/ Effet modulateur du gluconate de lithium sur l'expression de TLR2 et TLR4

**Discussion**

p82

**Conclusion**

p92

**Bibliographie**

p94

**Annexe**

p107

## INTRODUCTION

La dermatite séborrhéique est une pathologie fréquente, touchant 2% de la population générale. Il s'agit d'une dermatose inflammatoire chronique, évoluant par poussées et touchant principalement le sujet jeune. Les lésions sont érythémato-squameuses en plaques localisées au niveau des zones séborrhéiques de la tête et du tronc. Elles sont le plus souvent associées à une colonisation par des levures saprophytes du genre *Malassezia*. Le caractère fréquemment inesthétique des lésions et les localisations au visage entraînent un retentissement sur la vie sociale et personnelle du patient. Elle est souvent mal vécue. Ceci explique donc la demande thérapeutique très forte de la part des patients.

Cependant, alors que c'est une dermatose de connaissance ancienne (19<sup>ème</sup> siècle), la physiopathologie de la maladie reste mal connue et est toujours controversée. Ceci freine considérablement les avancées thérapeutiques faute de pouvoir trouver les cibles thérapeutiques. En effet, le rôle des levures dans la dermatite séborrhéique reste contesté car leur mécanisme d'action est mal compris et les seuls traitements antifongiques ne permettent pas d'obtenir une rémission complète prolongée des lésions.

Un nouveau médicament : le Gluconate de lithium suscite beaucoup d'intérêt et d'espoir dans le traitement de cette maladie chronique. En effet, à raison de deux applications par jour sur le visage pendant deux mois, il a permis d'obtenir de très bons résultats et des rémissions prolongées. Il a donc obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 2002. Mais, les mécanismes d'action sont imparfaitement connus.

Nous nous sommes donc attachés, au travers de ce travail, à déterminer si, à côté des mécanismes d'action connus du gluconate de lithium, le kératinocyte ne pouvait

pas être également une cible d'action du gluconate de lithium, expliquant son efficacité dans la dermatite séborrhéique.

Dans une première partie, nous rappellerons les caractéristiques épidémiologiques, physiopathologiques, cliniques de la dermatite séborrhéique ainsi que les différentes thérapeutiques utilisées. Puis, dans une deuxième partie, nous ferons le point sur les données actuellement disponibles sur les mécanismes d'action du lithium. Enfin, nous exposerons l'étude réalisée et discuterons les résultats obtenus.

# **I- LA DERMATITE SEBORRHEIQUE (DS)**

## **A/ EPIDEMIOLOGIE**

L'épidémiologie de la DS est relativement mal connue. S'il est évident qu'il s'agit d'une maladie « fréquente », il n'existe que peu d'études concernant ce point et il est difficile d'établir la prévalence de manière fiable. En effet, des différences de définition peuvent exister selon les auteurs, notamment entre une forme mineure de DS et un état séborrhéique normal. De plus, l'évolution de la dermatose par poussées rend difficile l'analyse des facteurs de risque car il est difficile de distinguer les facteurs de risque de la maladie et les facteurs de risque de poussée. De même, cette évolution par poussées complique l'étude des facteurs pronostiques.

### **1/ Prévalence de la dermatite séborrhéique**

Peu de travaux ont étudié la prévalence de la DS dans la population générale. Aux Etats-Unis, dans les années 70, un sondage, effectué à partir de données d'examen clinique sur un échantillon représentatif de 20000 personnes, a permis d'estimer la prévalence de la DS, chez les sujets entre 1 et 74 ans, à 2% [1]. Des prévalences nettement plus élevées ont été retrouvées dans d'autres études, mais ces résultats étaient probablement faussés par des biais de sélections, telle que la participation volontaire à une étude comportant un examen dermatologique [2]. En 2003, un sondage, réalisé par questionnaire sur un panel de la Sofres, a annoncé une prévalence cumulée sur 24 mois de 2% dans la population générale [3].

Comme le montre un travail australien, la prévalence de la DS est très élevée dans les premiers mois de vie (71% avant l'âge de 3 mois), puis diminue de façon régulière pour être négligeable après 3 ans (1% après 3 ans) [4].

## **2/ Maladies associées à la dermatite séborrhéique**

La prévalence de la DS est particulièrement élevée au cours de certaines pathologies. Ainsi, au cours de l'infection par le VIH, la DS peut atteindre 50% des sujets [5]. La prévalence et l'intensité des lésions sont fonction de l'importance du déficit immunitaire [6].

L'association DS et cancers des voies aéro-digestives supérieures a été formellement démontrée par une étude cas-témoins [7]. Elle démontre une prévalence significativement supérieure chez les cas : patients atteints de cancers ORL par rapport aux témoins correspondant soit à des patients alcoolo-tabagiques, soit à des patients présentant un cancer d'autre localisation. Ceci semblerait donc écarter le rôle de l'intoxication alcoolique et/ou tabagique dans la survenue d'une DS. Cependant, il a également été mis en évidence une association entre DS et pancréatite chronique [8]. L'influence de facteurs nutritionnels dont l'alcoolisme, pourrait expliquer cette association.

Enfin, classiquement, il est rapporté une association entre DS et maladie de parkinson ou syndromes parkinsoniens induits (neuroleptiques) [9] et entre DS et syndrome dépressif [10]. Ceci pourrait s'expliquer par l'hyperséborrhée secondaire aux traitements.



### **3/ Facteurs inducteurs de poussée de dermatite séborrhéique**

La DS est une maladie chronique. Les facteurs induisant la survenue ou les poussées de DS ont été peu étudiés et sont donc mal connus. Deux sont suspectés : les facteurs climatiques (amélioration pendant la période estivale) et le stress, sans que cela soit formellement démontré [11, 12].

## **B/ PATHOGENIE**

Les facteurs aboutissant à l'apparition d'une dermatite séborrhéique sont encore imparfaitement connus. *Malassezia*, levure saprophyte, lipophile et kératinophile de la peau humaine, joue vraisemblablement un rôle. Le sébum favorise probablement la prolifération de cette levure et explique la localisation caractéristique de l'affection. D'autres facteurs pourraient également être impliqués : un facteur intrinsèque, comme la réactivité du système immunitaire cutané aux stimuli et des facteurs extrinsèques : nutritionnels, climatiques, environnementaux.

### **1/ Implication de *Malassezia***

*Malassezia* est la dénomination définitivement adoptée et remplace les anciennes dénominations (*Saccharomyces*, *Pityrosporum*). Les levures du genre *Malassezia* sont au nombre de sept : *M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. sloffiea*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis* et *M. restricta*. Ces levures sont difficiles à cultiver. Elles nécessitent une température comprise entre 28 et 38°C, un pH compris entre

5,5 et 6,5 et un milieu de culture lacté ou riche en huile d'olive. La facilité de culture de *M. furfur* par rapport aux autres espèces a probablement conduit à surestimer son rôle dans la pathogénie de la dermatite séborrhéique. Les techniques récentes d'analyse génétique identifient plutôt *M. restricta* et *M. globosa* comme étant prédominant sur les cuirs chevelus pityriasiques [13] et *M.furfur* et *M. globosa* sur des échantillons de peau lésionnelle de visages atteints de dermatite séborrhéique [14].

### **- Controverses concernant le rôle de *Malassezia***

Le rôle pathogène de cette levure est encore débattu et les études publiées à ce jour montrent des résultats contradictoires, notamment en ce qui concerne la relation entre la densité de levures et l'importance de l'expression clinique.

Les arguments en faveur de l'implication de *Malassezia* sont :

1°/ *Malassezia* constituent une plus grande proportion de la flore cutanée et sa densité est plus grande chez les patients atteints de dermatite séborrhéique par rapport aux sujets témoins [15, 16].

De plus, les aires cutanées les plus fréquemment atteintes par les lésions de dermatite séborrhéique sont celles où les levures de *Malassezia* atteignent naturellement leur plus forte densité.

2°/ La dermatite séborrhéique est significativement associée à d'autres lésions imputables aux levures du genre *Malassezia* : les folliculites pityrosporiques et le pityriasis versicolor sont plus fréquents chez ces patients.

3°/ Les traitements antifongiques sont efficaces sur les lésions de dermatite séborrhéique et réduisent en parallèle l'intensité des signes cliniques et la quantité

de *Malassezia* présentes à la surface des kératinocytes. Les récurrences post-thérapeutiques sont précédées de la réapparition de levures [17].

Les arguments contre le rôle de *Malassezia* sont :

1°/ *Malassezia* est une levure saprophyte, présente normalement à la surface cutanée des régions séborrhéiques chez tous les individus [18]. Or seulement 2% des patients développent des lésions.

2°/ Les travaux expérimentaux visant à rechercher une corrélation entre le taux de *Malassezia* et l'intensité des symptômes montrent des résultats discordants autant chez le sujet immunocompétent que chez le sujet VIH [19-22].

3°/ Des moyens thérapeutiques dépourvus d'activité antifongique peuvent améliorer l'état clinique des patients, notamment les dermocorticoïdes. De plus, les médicaments antifongiques pourraient agir autrement que par leur seule action antifongique. En effet, ils exercent une action anti-inflammatoire et diminuent l'excrétion sébacée par interférence avec les récepteurs androgéniques.

### **- Rôle immunogène de *Malassezia***

L'absence de relation constante entre la densité en levure et l'expression clinique de la maladie, ainsi que son incidence accrue chez les sujets immunodéprimés, suggèrent que l'immunité jouerait un rôle central dans la genèse de la dermatite séborrhéique.

Concernant l'immunité innée, il a été démontré que la réponse des kératinocytes à *Malassezia* faisait intervenir les Toll-like récepteurs (TLRs) (récepteurs de l'immunité innée jouant un rôle dans la réponse à des microorganismes) et en particulier TLR2

[23]. Concernant l'immunité à médiation humorale, les résultats des études des taux d'anticorps dirigés contre *Malassezia* sont très variables et contradictoires [24-26]. Concernant l'immunité à médiation cellulaire, il a été retrouvé, chez certains patients, une déficience des fonctions lymphocytaires T et des monocytes posant l'hypothèse d'une altération de la réponse immunitaire cellulaire aux levures *Malassezia* [27]. Mais ceci n'a pu être confirmé, d'autres études retrouvent au contraire une hyperprolifération lymphocytaire [26].

Cependant, l'étude immunohistochimique des lésions de dermatite séborrhéique est plutôt en faveur d'une stimulation irritative, non immunogénique du système immunitaire, avec augmentation du nombre de cellules NK, une surexpression de cytokines proinflammatoires et des molécules d'adhésion ICAM1, une densité élevée en cellules HLA DR+ et une activation du complément [28, 29]. La nature de cette stimulation irritative n'est pas élucidée : elle pourrait être liée aux substances libérées par *Malassezia* ou aux stimuli environnementaux. De plus, l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires ( $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ,  $IL1\alpha$ ) est également retrouvée en peau saine chez les sujets atteints de dermatite séborrhéique [29] : Il semble donc exister une inflammation cutanée à la fois en peau lésionnelle et non-lésionnelle chez les patients atteints de DS. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence de lésions précliniques ou par l'existence d'un terrain prédisposant à la survenue de DS.

Par ailleurs, Watanabe et al ont démontré que les espèces de *Malassezia* pouvaient avoir un effet différent sur la sécrétion de cytokines par les kératinocytes [30].

Enfin, Baroni et al ont étudié les capacités immunomodulatrice et invasive de *Malassezia* sur des cultures de kératinocytes humains. Leurs résultats supportent

l'hypothèse que *Malassezia*, in vivo, entraîne une rupture de la fonction barrière de l'épiderme en inhibant l'activité de la transglutaminase I [31].

### **- Activité enzymatique de *Malassezia***

*Malassezia* possède une activité lipasique capable d'hydrolyser les triglycérides en acides gras libres et d'entraîner la libération d'acide arachidonique, à partir duquel sont formés les prostaglandines et les leucotriènes impliqués dans l'inflammation cutanée [32]. De plus, il a été démontré que *Malassezia*, en proliférant au niveau du follicule pilosébacé, induit une réaction inflammatoire in situ liée à la destruction de l'épithélium du canal infundibulaire.

## **2/ Rôle du sébum**

La dermatite séborrhéique survient dans les régions les plus riches en glandes sébacées : région médiofaciales, cuir chevelu, région présternale et aux âges où les glandes sébacées sont les plus actives (nouveau-né et adultes jeunes).

Le sébum humain est un mélange complexe de triglycérides, d'acides gras, d'esters, de stérols, de cholestérol et de squalène. Lorsqu'il est sécrété, il est composé essentiellement de triglycérides et d'esters, qui sont découpés par la flore commensale en diglycérides, monoglycérides et acides gras libres. Ainsi, *Malassezia* dégrade le sébum, libérant de multiples acides gras à partir des triglycérides. Elles consomment les acides gras saturés nécessaires à leur prolifération, laissant les acides gras insaturés à la surface de la peau. L'hyperséborrhée naturelle ou induite par des médicaments ou par certaines affections (syndromes parkinsoniens) pourrait

donc favoriser l'émergence de lésions de dermatite séborrhéique en stimulant la colonisation et la prolifération de *Malassezia*. Toutefois, l'hyperséborrhée est inconstamment retrouvée [33]. L'hypothèse du rôle de l'accumulation de sébum a donc été émise pouvant expliquer la localisation des lésions au fond des plis [34].

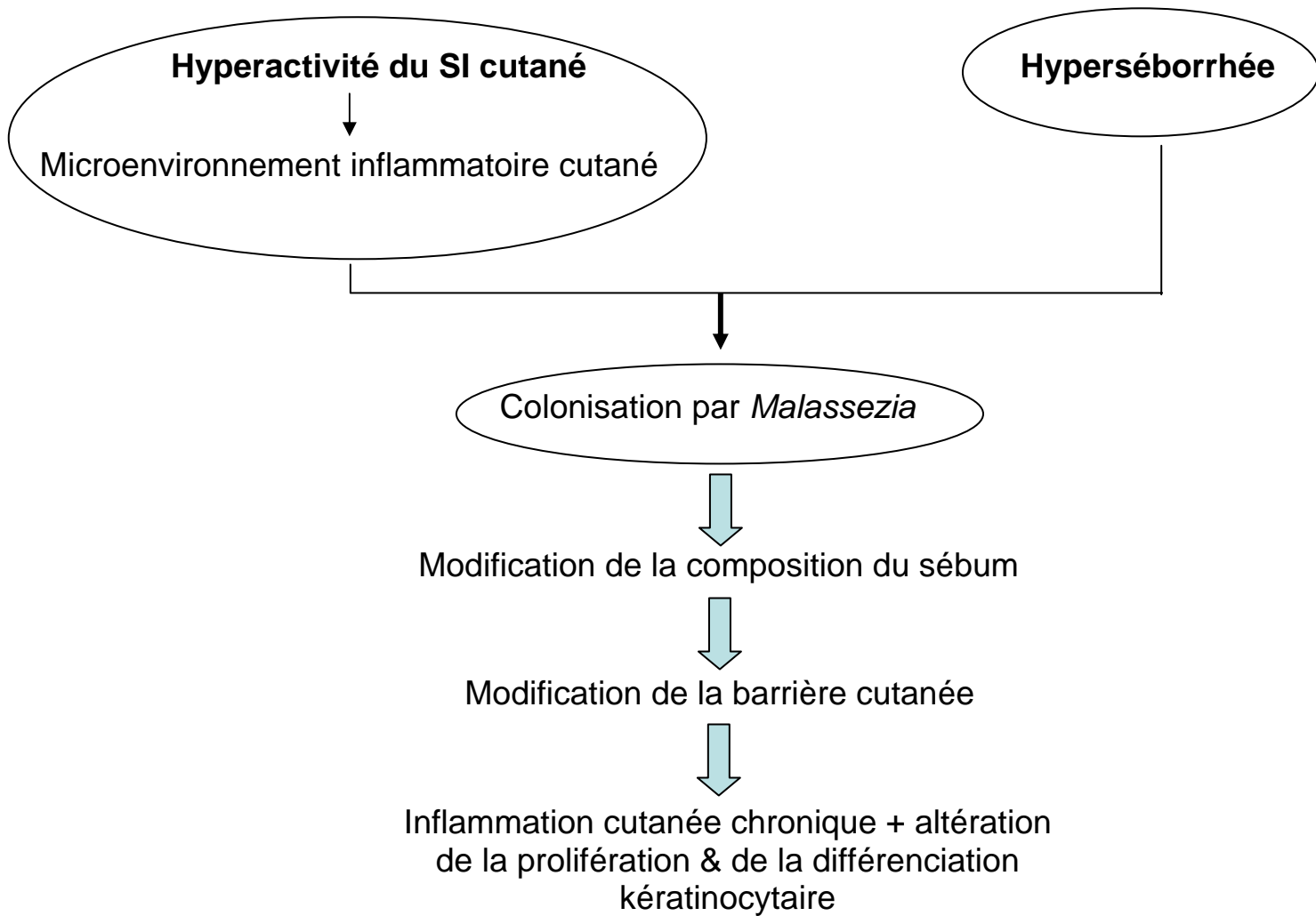
### **3/ Rôle de la susceptibilité individuelle**

Les acides gras insaturés libérés après dégradation du sébum par *Malassezia* (acides oléique et palmitoléique) s'accumulent à la surface de la peau. Chez certains sujets, ces acides gras pénètrent dans le stratum cornéum, interrompant la fonction barrière de la peau et entraînent une inflammation cutanée [35]. Il existerait une susceptibilité individuelle concernant la toxicité de ces acides gras libres. Elle serait liée à la fois à un défaut de la fonction barrière de la peau favorisant leur pénétration, mais aussi à l'intensité de la réponse inflammatoire cutanée à l'effet de différents stimuli et notamment à ces acides gras libres, qui ont une action irritante et induisent une réponse kératinocytaire hyperproliférative. En effet, cette réponse inflammatoire semble différente entre les sujets atteints de DS et les sujets ne présentant pas de DS [36].

En conséquence de ces observations, nous avons tenté de proposer une nouvelle approche des mécanismes étiopathogéniques de la DS.

Il semblerait que, les sujets susceptibles de développer des lésions de dermatite séborrhéique présenteraient primitivement une hyperréactivité du système immunitaire (SI) cutané aux stimuli environnementaux. En réponse à ces stimuli, les kératinocytes et autres cellules du SI cutané sécrèteraient des cytokines

inflammatoires. Ceci entraînerait l'existence d'un microenvironnement inflammatoire cutané. L'association à une hyperséborrhée favoriserait la colonisation par *Malassezia* et la prolifération de ces levures. Secondairement, la modification de la composition du sébum due *Malassezia* pourrait entraîner une rupture de la barrière cutanée et favoriser la pénétration de *Malassezia*. Ce dernier, par ses activités biochimiques, pourrait pérenniser l'inflammation [35-37]. Ceci réalise donc un véritable cercle vicieux. *Malassezia* jouerait donc un rôle important mais non exclusif dans la genèse des lésions de dermatite séborrhéique. La séborrhée en elle-même ne serait pas un véritable facteur causal mais seulement permissif puisqu'elle favoriserait la persistance et la multiplication de *Malassezia* [28, 33, 38]. Le paramètre essentiel au développement de lésions de DS serait donc l'existence d'une susceptibilité du SI cutané à déclencher une réaction inflammatoire intense. Ainsi, chez ces sujets, la présence de *Malassezia*, même en faible quantité, entraînerait une réponse inflammatoire cutanée et une altération de la fonction barrière de la peau, induisant secondairement une réponse hyperproliférative et des anomalies de la différenciation cellulaire [37].





## **C/ CLINIQUE DE L'ENFANT ET DE L'ADULTE**

La dermatite séborrhéique est une dermatose inflammatoire et squameuse chronique, affectant l'extrémité céphalique et le tronc, touchant les zones particulièrement riches en glandes sébacées.

### **1/ La lésion élémentaire**

La lésion élémentaire associe un érythème, parfois à renforcement folliculaire en périphérie, à des squames jaunâtres plus ou moins épaisses. Les plaques érythémato-squameuses ne sont pas infiltrées. Elles confluent pour former des lésions à contours polycycliques, assez bien limitées. L'évolution des plaques se fait globalement de manière centrifuge, l'érythème apparaissant plus accentué en périphérie, plus pâle au centre. La topographie est caractéristique, impliquant les zones séborrhéiques (cuir chevelu, zones médiofaciales, médiotoraciques). L'aspect peut varier en fonction de l'ancienneté des lésions, de la topographie, des traitements appliqués. Les lésions sont souvent prurigineuses et s'accompagnent souvent d'une sensation de brûlure superficielle. L'étendue des lésions est variable selon les individus et dans le temps chez un même patient.

### **2/ Le profil évolutif**

Le début se manifeste en général chez l'adulte jeune. Les lésions s'installent très progressivement, sauf dans certaines formes cliniques (infection par le VIH). L'influence saisonnière est classique : amélioration l'été, aggravation l'hiver.

L'évolution se fait par poussées, déclenchées par le stress, l'effort, certains facteurs nutritionnels. Entre deux poussées, la peau est d'aspect normal, souvent légèrement érythémateuse. Elle est, dans l'ensemble, sensible aux topiques irritants, aux frottements, à l'humidité.

### **3/ Anatomopathologie**

Elle n'est pas nécessaire au diagnostic. L'aspect n'est pas spécifique. Il existe des altérations de l'épiderme avec une hyperprolifération et un excès de lipides intra et intercellulaire. Il s'y associe une spongiose et une inflammation dermique superficielle, périvasculaire et périfolliculaire, principalement lymphocytaire. On peut parfois noter une légère spongiose de l'épithélium des infundibula pilaires et de l'épiderme autour des ostia pilaires, hébergeant des levures de *Malassezia*. Dans les lésions plus anciennes, on peut noter une acanthose irrégulière et une parakératose, proche de l'histologie du psoriasis. Pour certains auteurs, les lésions de DS et de psoriasis sont proches cliniquement et histologiquement [39]. Cependant, à la différence du psoriasis, il n'y a pas en règle générale d'exocytose à polynucléaires neutrophiles.

### **4/ Les localisations**

Elles sont, par ordre de fréquence : le cuir chevelu, la face, le tronc.

- Le cuir chevelu

La dermatite séborrhéique du cuir chevelu est souvent précoce, longtemps isolée, parfois toujours isolée. Elle se manifeste par un prurit et un état pelliculaire. Le cuir

chevelu est érythémateux de manière plus ou moins diffuse, recouvert de squames fines, qui peuvent évoluer vers des squames-croûtes plus ou moins adhérentes, posant alors un problème diagnostique avec un psoriasis. Les zones préférentiellement touchées sont le vertex et les zones pariétales. Des plaques érythémato-squameuses, rosées, non infiltrées, peuvent s'observer au delà de la zone d'insertion capillaire (front, régions rétro-auriculaires : *corona seborrhoeica*).

#### ▪ Le visage

La topographie des lésions est caractéristique, médiofaciale : front, région intersourcillière, sillons nasogéniens, sillons verticaux de la glabella, pli sous labial (Fig. a). L'étendue des lésions est variable. L'atteinte de la barbe et de la moustache est possible dans les formes sévères (Fig. b). A l'inverse, le *dorsum nasal* et la pointe de nez ne sont pas touchés. L'atteinte des joues est rare mais possible, posant alors des problèmes diagnostiques.

L'aspect des lésions est érythémato-squameux. Les squames sont grasses, parfois croûteuses, mais restent facilement détachables. Des modifications peuvent être consécutives à l'application de topiques, notamment de dermocorticoïdes (atrophie et pustules en périphérie). L'intensité du prurit est moins nette qu'au niveau du cuir chevelu [40].

#### ▪ Le tronc

Les lésions siègent au niveau présternal et médiosternal et débutent initialement par des macules péripilaires, puis évoluent vers des médaillons érythémato-squameux bien limités, de quelques centimètres de diamètre. Plus ou moins confluentes, elles forment parfois des nappes à contours polycycliques. Les squames sont fines et non

adhérentes. L'atteinte des plis est possible et pose le problème du diagnostic différentiel avec un psoriasis inversé.

- Localisations plus rares

L'atteinte des cils entraîne une blépharite, voire une conjonctivite. Cette étiologie est donc à évoquer devant une blépharite chronique d'origine non allergique.

L'atteinte de la muqueuse génitale (gland, sillon balano-préputial) est fréquemment responsable de balanites récidivantes.

## **5/ Formes cliniques**

- DS et infection par le VIH

Il existe des caractéristiques qui la différencient de la forme classique :

- développement rapide
- atteinte préférentielle et parfois exclusive du visage
- extension des lésions : l'atteinte est sévère d'emblée, dépassant plus largement les zones médiofaciales, débordant sur les joues avec parfois des aspects pseudolupiques en ailes de papillons.
- aspect plus infiltré, psoriasiformes des lésions
- résistance aux traitements classiques de la DS
- aspect anatomopathologique atypique : présence de nécroses kératinocytaires et d'un infiltrat inflammatoire plus dense que dans la forme classique, au sein duquel s'observent des plasmocytes et des polynucléaires neutrophiles [41].

La corrélation entre lymphopénie CD4 et intensité de la dermatite séborrhéique a été mise en avant, de même que l'amélioration sous traitement anti-rétroviral [42, 43].

Certains auteurs en font un marqueur de mauvais pronostic, notamment quant à la corrélation avec la survenue de maladies opportunistes [44].

- La DS du nouveau-né et du nourrisson

Il s'agit d'une dermatose érythémateuse, recouverte de squames grasses et touchant de façon élective le cuir chevelu, le visage et le siège. Elle apparaît vers la fin du premier mois de vie (Fig. c).

Chez le nouveau-né, il existe une sécrétion sébacée naturelle, due aux hormones maternelles, responsable d'une hyperséborrhée physiologique du visage et du cuir chevelu. Le siège est habituellement indemne avant l'âge de 3 à 4 semaines. L'atteinte peut rester limitée à l'extrémité céphalique ou être plus diffuse réalisant une atteinte du siège (posant le problème du diagnostic différentiel avec un napkin-psoriasis) parfois associée à une atteinte des plis axillaires, voire une érythrodermie de Leiner-Moussous. L'éruption peut devenir pustuleuse. L'état général n'est pas modifié. Il n'y a pas de prurit. Si un prélèvement mycologique est effectué, des levures du genre *Malassezia* sont retrouvées en grande quantité. Leur prolifération serait favorisée par l'hyperséborrhée [45]. Les lésions disparaissent généralement en quelques semaines. Dans certains cas, cependant, l'affection évolue sans interruption vers une dermatite atopique : les lésions persistent au delà de la 6<sup>ème</sup> semaine, deviennent prurigineuses et s'étendent aux autres zones cutanées habituellement touchées par la dermatite atopique. Dans de rares cas apparaissent des signes de psoriasis infantile.

## 6/ Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel se pose différemment en fonction de localisations mais le plus souvent avec le psoriasis.

- Au niveau du cuir chevelu :

Le psoriasis pose le problème le plus difficile, notamment en cas d'atteinte isolée du cuir chevelu. On retiendra en faveur du psoriasis, une limitation plus nette des lésions sur la lisière du cuir chevelu, le caractère plus sec, plus épais, plus brillant des squames, qui blanchissent lors du grattage méthodique. Cependant, l'association DS-psoriasis est possible.

- Au niveau du visage :

Le diagnostic entre le sébo-psoriasis et une dermatite séborrhéique peut-être très difficile si la dermatose faciale ne s'accompagne d'aucune autre localisation caractéristique de psoriasis (situation rare en pratique). L'anatomopathologie est sans intérêt. Il existe une continuité entre ces deux affections. Cependant, dans la dermatite séborrhéique, il existe une spongiose infundibulaire et épidermique.

Le lupus érythémateux subaigu peut, selon la topographie, prêter à confusion avec une DS atypique. L'analyse anatomopathologique et la présence de localisations plus typiques redressent le diagnostic.

La rosacée ne touche pas le cuir chevelu mais s'exprime par un érythème médiofacial. Les lésions sont non squameuses et associent papules et pustules. L'association dermatite séborrhéique et rosacée est possible : on parle de dermatose mixte du visage.

Des aspects à type de DS ont été rapportés au cours de dermatomyosite [46], de carences en zinc, ainsi qu'au cours de certaines toxidermies (methyldopa,

cimétidine). Une dermatophytie devra être évoquée dans certains cas, particulièrement chez le sujet immunodéprimé [47].

▪ Au niveau du tronc :

Des lésions de pityriasis versicolor sont en général pigmentées ou achromiques et posent peu de problème de diagnostic différentiel. Des lésions de pityriasis rosé de Gibert dans le cas d'évolution atypique peuvent être parfois difficiles à distinguer cliniquement de lésions de DS dans une forme tronculaire diffuse. La syphilis secondaire est toujours à écarter face à des lésions atypiques.

▪ Au niveau des plis :

Le diagnostic avec le psoriasis inversé est parfois difficile en l'absence de contexte évocateur. On retiendra le caractère volontiers mieux limité et plus sec de l'intertrigo psoriasique. Le diagnostic différentiel avec une candidose des plis, un érythrasma ou une maladie de Hailey-Hailey est généralement plus facile.

## **D/ TRAITEMENT DE LA DERMATITE SEBORRHEIQUE**

Des considérations étiopathogéniques détaillées ci-dessus se dégagent les cibles thérapeutiques suivantes :

- la réduction de la colonisation de la peau par les levures du genre *Malassezia*
- le nettoyage du sébum résiduel dans les sites préférentiels de la maladie
- le contrôle de la réaction inflammatoire de l'hôte.

Les choix thérapeutiques varient en fonction de la localisation et de l'importance de l'atteinte des lésions de DS.

## 1/ Traitements locaux

### a/ Antifongiques

#### ▪ Kétoconazole KETODERM® :

Il s'agit de l'imidazolé le plus fréquemment utilisé dans la DS. Il a l'AMM dans cette indication. Au plan pharmacologique, il agit à la fois par son action antifongique mais également grâce à des propriétés anti-inflammatoires. En effet, il diminue la synthèse des leucotriènes par inhibition de la 5-lipoxygénase [48]. A la concentration de 2% et au rythme de 2 applications par jour pendant 4 semaines, son efficacité est clairement démontrée aussi bien sur les lésions de DS du cuir chevelu [49] que sur les lésions de la face [50] avec une amélioration des lésions chez 88 à 95% des patients en fonction des études [51-54]. Il s'agissait d'études réalisées en double aveugle contre placebo. Le critère principal d'évaluation était l'amélioration des lésions. Il a également été mis en évidence une disparition des levures du genre *Malassezia* au niveau du cuir chevelu sous traitement par kétoconazole shampooing [54]. Plus récemment, un étude de phase III a évalué l'efficacité et la sécurité du traitement de la dermatite séborrhéique par du kétoconazole gel moussant une fois par jour pendant 2 semaines comparé au véhicule. Le traitement par kétoconazole était significativement plus efficace ( $p=0,0014$ ) et améliorait l'érythème, la desquamation et le prurit [55]. La poursuite du traitement au long cours permettrait de limiter la survenue de récurrences [53]. La tolérance du traitement est bonne mais une irritation est décrite chez un tiers des patients dans l'étude de Danby [52].



▪ Ciclopiroxolamine MYCOSTER®

Elle a l'AMM dans le traitement de la dermatite séborrhéique. En effet, plusieurs études ont montré que, à la concentration de 1% et au rythme de 2 applications par jour pendant 1 mois, suivi d'une application par jour le 2<sup>ème</sup> mois, elle permettait une guérison complète avec disparition des signes cliniques et non une simple amélioration [56, 57]. En effet, dans une première étude [56], après un mois de traitement, 44% des patients (n=57) ne présentaient plus aucune lésion de DS contre 15% avec l'excipient (n=72) ( $p < 0,001$ ). Après la phase de maintenance, le taux de rémission complète avec la ciclopiroxolamine était de 63% contre 34% avec l'excipient ( $p < 0,007$ ). Dans une 2<sup>ème</sup> étude [57], le taux de succès (défini par la diminution de l'érythème, du prurit, de la sensation de brûlure et de la desquamation) était de 73,9% avec la ciclopiroxolamine (n=92) contre 53,6% avec l'excipient (n=97). 26,1% des patients traités par ciclopiroxolamine ne présentaient plus de lésion de DS contre 8,2% avec l'excipient. Concernant la tolérance, 33% des patients traités par ciclopiroxolamine décrivaient des effets secondaires locaux à type d'érythème, de prurit ou de sécheresse cutanée [56]. Cependant, dans une autre étude, la tolérance globale était jugée excellente par les investigateurs dans 64,1% des cas et bonne dans 18,5% des cas, contre respectivement 40,2% et 37,1% avec l'excipient ( $p = 0,009$ ).

Une étude randomisée en double aveugle sur 303 patients atteints de DS a cherché à comparer l'efficacité d'une crème contenant 1% de ciclopiroxolamine au kétoconazole gel moussant à 2% (étude de non-infériorité) [58]. Le premier mois, l'application de la crème à la ciclopiroxolamine était biquotidienne et celle du gel au kétoconazole était bihebdomadaire. Puis le 2<sup>ème</sup> mois, l'application de ciclopiroxolamine était quotidienne et celle de kétoconazole était hebdomadaire. Les

deux thérapeutiques ont été considérées comme non-inférieures. Cependant, le traitement par kétoconazole occasionnait statistiquement plus d'effets secondaires (37%) que la ciclopiroxolamine (20%) ( $p=0,002$ ). Il s'agissait essentiellement d'exacerbation de la dermatose, d'érythème ou de sécheresse cutanée.

Plus récemment, une étude a comparé l'efficacité antifongique contre *Malassezia globosa* et *Malassezia restricta* (comparaison des concentrations minimales inhibitrices) de la ciclopiroxolamine, seule ou associée à du pyrithione de zinc, à celle du kétoconazole. Elle a révélé un effet synergique inhibiteur de l'association ciclopiroxolamine – pyrithione de zinc, étant plus efficace et fongicide que le kétoconazole [59].

Enfin, un shampooing contenant 1,5% de ciclopiroxolamine SEBIPROX® a l'AMM dans le traitement de la DS du cuir chevelu à raison de 2 à 3 fois par semaine pendant 4 semaines.

- Bifonazole AMYCOR® 1%

Il n'a pas l'AMM dans le traitement de la DS. Cependant, 2 études en double aveugle contre placebo ont montré son efficacité par rapport au placebo sans générer d'effet secondaire. La 1<sup>ère</sup> étude concernait 44 patients présentant une DS du cuir chevelu [60]. La moitié des patients était traitée par bifonazole shampooing 3 fois par semaine pendant 6 semaines, l'autre moitié par le véhicule. Le bifonazole était significativement supérieur sur la desquamation ( $p=0,01$ ), le prurit ( $p=0,008$ ) et l'amélioration globale de la DS ( $p=0,03$ ).

La 2<sup>ème</sup> étude concernait 100 patients, le schéma thérapeutique était identique et le bifonazole était significativement supérieur au placebo ( $p<0,05$ ) [61].

- Autres antifongiques topiques

Ils n'ont pas l'AMM dans le traitement de la dermatite séborrhéique.

Un essai clinique contrôlé concernait la terbinafine LAMISIL® [62]. A raison d'une application quotidienne de terbinafine 1% en solution pendant 4 semaines, 11 patients sur 18 étaient considérés comme guéris sans réapparition de nouvelles lésions 2 semaines après l'arrêt du traitement.

Des études ouvertes avec le fluconazole TRIFLUCAN® [63] et le fenticonazole LOMEXIN® [64] crème montraient un effet bénéfique de ces antifongiques dans la DS.

#### b/ Dermocorticoïdes

Seule l'hydrocortisone crème a l'AMM dans le traitement de la DS. Une étude randomisée en double aveugle a comparé le traitement par miconazole 2%, hydrocortisone 1% et l'association des deux. Cette dernière se révélait plus efficace avec obtention d'une disparition complète des lésions après 4 semaines de traitement dans 90% des cas (19/21) contre 68% avec le miconazole (15/22) et 70% avec l'hydrocortisone (17/24) [65]. Deux autres études ne trouvaient pas de différence significative en comparant l'efficacité du kétoconazole crème 2% à celle de l'hydrocortisone 1% respectivement sur 72 [66] et 50 patients [67]. Une étude en simple aveugle réalisée par Ortonne et al. comparaient le kétoconazole gel moussant 2% utilisé pendant 4 mois à une lotion de dipropionate de bêtaméthasone 0,05% [68]. L'efficacité et la tolérance du kétoconazole étaient significativement meilleures que le dermocorticoïde ( $p < 0,05$ ). La comparaison, dans une étude en double aveugle, du kétoconazole crème 2% au 17-butyrate clobétasol montrait une efficacité similaire des 2 thérapeutiques. Les taux de récurrences étaient de 30% avec

le kétoconazole (n=17) contre 50% avec le dermocorticoïde (n=19) mais cette différence n'était pas significative [69]. Enfin, dans une étude en double aveugle, l'association kétoconazole 2% - dénosidegel 0,05% se révélait significativement plus efficace que l'excipient ( $p < 0,01$ ) [70].

c/ Autres traitement topiques.

De nombreux traitements ont été essayés dans la DS. Cependant, il s'agit le plus souvent d'études ouvertes réalisées sur un faible nombre de patients. Compte tenu de l'évolution chronique de la DS et de son amélioration spontanée possible, il convient de rester prudent quant aux résultats obtenus dans ces études. Ces traitements n'ont pas l'AMM dans le traitement de la DS.

▪ Peroxyde de benzoyle

Deux études ont testé l'efficacité du peroxyde de benzoyle dans la DS. La première est une étude ouverte [71]. La seconde est une étude en double aveugle contre placebo [72]. Cinquante-neuf patients étaient traités pendant 4 semaines par une application quotidienne de peroxyde de benzoyle 5% ou d'excipient. Le peroxyde de benzoyle était significativement plus efficace que l'excipient ( $p < 0,05$ ).

▪ Métronidazole

Trois essais ont été réalisés avec gel de métronidazole. Le premier était réalisé en double aveugle contre placebo avec du gel de métronidazole à 1% (n=44).

L'amélioration obtenue après 8 semaines de traitement était significativement supérieure au placebo ( $p < 0,0001$ ) [73].

Plus récemment, deux études ont été réalisées en double aveugle. L'une comparait l'efficacité du gel de métronidazole à 0,75% et le kétoconazole 2% en crème utilisée pendant 4 semaines (n=60). Le critère principal d'évaluation était l'amélioration clinique déterminée selon des critères de sévérité clinique. Il n'a été retrouvé aucune différence significative entre les deux topiques [74]. L'autre comparait l'efficacité du métronidazole 0,75%, utilisé 2 fois par jour pendant 8 semaines chez des patients présentant une dermatite séborrhéique faible à modérée (n=84), au placebo. Il n'a pas été mis en évidence de différence significative [75].

- Propylène glycol

Une seule étude en double aveugle contre placebo a étudié l'efficacité du propylène glycol. Elle concernait 39 patients et concluait à une efficacité significativement supérieure du propylène glycol par rapport au placebo [76].

- Calcipotriol DAIVONEX® :

Une étude ouverte a rapporté l'efficacité du calcipotriol dans la DS [77]. Cependant, la seule étude en double aveugle contre placebo ne montrait une efficacité que chez 5% des patients traités par calcipotriol (n=19) contre 40% avec le placebo (n=20) [78].

- Les inhibiteurs des calcineurines topiques : Tacrolimus PROTOPIC® et

Pimécrolimus ELIDEL®

Ils ont des propriétés antifongiques et anti-inflammatoires sans risque d'atrophie cutanée.

Deux études ouvertes concernant respectivement 16 et 18 patients atteints de dermatite séborrhéique ont montré une amélioration de la dermatose sous traitement par tacrolimus 0,1% [79, 80].

Après la publication d'un cas de dermatite séborrhéique amélioré par le pimécrolimus [81], une étude réalisée en double aveugle contre placebo (véhicule seul) a recherché l'efficacité d'un traitement par pimécrolimus crème 1% appliquée deux fois par jour pendant 4 semaines. Quarante-seize patients étaient randomisés (n=47 pimécrolimus et n=49 véhicule), 88,5% d'hommes jeunes. Le critère principal d'efficacité était l'amélioration de l'érythème, de la desquamation, ainsi que l'amélioration globale jugée à S0, S2, S4. La supériorité du pimécrolimus était observée dès la 2<sup>ème</sup> semaine (p=0,0062). Cependant, la généralisation des conclusions de cette étude est gênée par la population étudiée constituée principalement d'hommes jeunes [82].

- Les sels de lithium

Sous forme topique, ils constituent une option thérapeutique intéressante dans la DS. Le gluconate de lithium a l'AMM dans cette indication, à raison de 2 applications par jour pendant deux mois. Cependant, les mécanismes d'action ne sont pas clairement établis. Ceci faisant l'objet de notre étude, nous détaillerons, dans la 2<sup>ème</sup> partie de ce travail, les effets cellulaires et moléculaires connus du lithium ainsi que les résultats des différents essais thérapeutiques.

## 2/ Traitements systémiques

Aucun de ces traitements n'a l'AMM dans le traitement de la dermatite séborrhéique.

### ▪ Antifongiques :

Une étude en double aveugle a montré l'efficacité du kétoconazole per os NIZORAL® (200 mg/j) dans le traitement de la dermatite séborrhéique comparé au placebo ( $p < 0,01$ ) ( $n=19$ ) [83]. De même, une seule étude a montré l'efficacité de la terbinafine per os à la dose de 250mg/j par rapport au placebo ( $p < 0,0001$ ) ( $n=60$ ) [84]. Enfin, une étude a montré l'efficacité du pramiconazole (200mg/j) chez des patients présentant des lésions de DS. En effet, en comparaison par rapport au groupe contrôle non traité ( $n=17$ ), il était constaté, chez les patients traités, une diminution de la densité de *Malassezia* en peau lésionnelle suivie d'une amélioration cliniquement significative dès J7 et à 1 mois sans modification de l'excrétion de sébum [85]. Aucun effet secondaire grave n'était noté dans ces trois essais.

L'itraconazole SPORANOX® et le fluconazole TRIFLUCAN® parfois utilisés dans la dermatite séborrhéique, en particulier chez le sujet immunodéprimé, n'ont pas fait l'objet d'études contrôlées dans cette indication.

### ▪ Rétinoïdes oraux

En raison des effets inhibiteurs des rétinoïdes sur la glande sébacée, certains auteurs ont proposé d'utiliser l'isotrétinoïne à faible dose dans la DS. Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude contrôlée n'a démontré l'efficacité d'un rétinoïde et en particulier de l'isotrétinoïne dans le traitement de la DS.

- Photothérapie

Il est habituel de constater une amélioration des lésions de dermatite séborrhéique pendant l'été, souvent suivie d'une rechute après l'été [12]. La photothérapie UVA ou les UVB TL01 peuvent être utilisés. Cependant, il n'existe aucun essai clinique contrôlé évaluant l'efficacité de la photothérapie dans le traitement de la DS. Une étude ouverte sur 18 patients présentant une DS sévère a montré une amélioration significative ( $p=0,005$ ) avec le traitement par UVB TL01. Cependant, la rechute survenait dans tous les cas avec une moyenne de 21 jours [86].

### **3/ Cosmétiques**

Il est classiquement recommandé d'utiliser des produits cosmétiques adaptés aux peaux sensibles et irritées tels que des crèmes neutres, apaisantes, non parfumées. Parallèlement, il convient de conseiller au patient un produit de toilette adapté, tel qu'un pain surgras, un syndet, un savon ou shampooing au pyrithione de zinc non irritant. En effet, le savonnage soigneux et le lavage fréquent des cheveux avec des produits adaptés permet une réduction du sébum résiduel propice au développement des lésions. Enfin, des crèmes séborégulatrices permettent de normaliser la sécrétion sébacée.

### **4/ Stratégies thérapeutiques**

- DS légère à moyenne de la face :

Les traitements locaux sont généralement suffisants. On peut actuellement proposer :



-le kétoconazole 2% en gel moussant ou en crème , 2 applications par semaine pendant 4 semaines.

- le ciclopiroxolamine en crème, 2 fois par jour pendant 4 semaines

- le gluconate de lithium, 2 fois par jour pendant 2 mois

Les imidazolés pouvant entraîner une majoration transitoire de l'inflammation en début de traitement, l'association à un dermocorticoïde est possible. Cependant, cette prescription ne doit pas être renouvelée ou prolongée compte tenu des risques de corticodépendance et d'atrophie cutanée à long terme.

Il est conseillé un traitement d'entretien à base d'antifongiques, de pyrithione de zinc ou de piroctone olamine en espaçant les applications pour éviter la survenue de récurrence à l'arrêt du traitement [87].

#### ▪ DS profuse :

Dans les DS sévères du visage ou profuses avec lésions thoraciques, survenant le plus souvent chez des patients immunodéprimés et dans les DS résistantes aux traitements locaux, on peut proposer un traitement oral : kétoconazole à la dose de 200mg/j pendant 1 à 2 mois.

Certains auteurs conseillent également l'isotrétinoïne à faible dose (5 à 10mg/j) hors AMM ou la photothérapie (UVA ou UVB TL01) mais leur efficacité n'a pas été prouvée par des études contrôlées.

#### ▪ Pityriasis capitis :

Dans les formes mineures, l'utilisation de shampooing antipelliculaire en vente libre est souvent suffisante. Ils contiennent de la pyrithione de zinc, de la piroctone olamine ou du sulfure de sélénium ayant une activité antifongique ou anti-

inflammatoire, parfois associés à des kératolytiques (acide salicylique ou ichtyol). Le shampooing contenant de la ciclopiroxolamine 1,5% est également efficace.

Dans les formes plus sévères, il est préconisé le kétoconazole 2% en gel moussant, 2 fois par semaine pendant 4 semaines puis 1 fois par mois.

▪ DS du nourrisson :

Il s'agit le plus souvent d'une dermatose bénigne et transitoire ne nécessitant pas de traitement spécifique. L'essentiel est d'éviter l'irritation générée par les applications répétées d'antiseptiques ou de détergents et de conseiller l'utilisation de pain surgras pour la toilette avec un rinçage soigneux. Dans les formes plus sévères, les essais de traitement par kétoconazole n'ont pas fait la preuve de son efficacité [88]. Par ailleurs, il a été rapporté la survenue d'une hyperéosinophilie sanguine majeure lors de l'utilisation de ce topique pour une candidose du siège chez un prématuré [89]. Ainsi, pour certains auteurs, il semble donc que l'utilisation d'émollient et de dermocorticoïdes de classe III soient les seules recommandations acceptables [90]. Cependant, une étude plus récente a comparé l'efficacité du kétoconazole crème à 2% et de l'hydrocortisone en crème à 1%, l'un étant appliqué à gauche et l'autre à droite (n=48). Il n'a pas été retrouvé de différence significative [91]. Nous n'avons retrouvé aucune étude concernant l'efficacité et la sécurité d'utilisation de la ciclopiroxolamine chez l'enfant présentant une dermatite séborrhéique.

## II- LES SELS DE LITHIUM

Le lithium est un cation monovalent dont l'action physiologique est peu connue. Il est prescrit en thérapeutique sous forme de sels (carbonate, succinate, chlorure ou gluconate de lithium). Par voie générale, il est largement utilisé en psychiatrie, pour le traitement des psychoses maniacodépressives. La concentration thérapeutique recommandée est autour de 1mM. En dermatologie, les indications du lithium sont uniquement sous forme topique. En effet, un effet bénéfique des sels de lithium par voie locale dans le traitement de la dermatite séborrhéique a été suggéré par l'observation de cas d'amélioration de cette dermatose chez des patients traités par lithium oral dans le cadre d'une affection psychiatrique [92]. Cette amélioration sous lithium oral n'a pas été confirmée par une étude en double aveugle contre placebo [93] mais, plusieurs études ont montré son bénéfice sous forme topique dans le traitement de la DS [94, 95]. Il a actuellement l'AMM dans cette indication. Cependant, les mécanismes d'action du lithium ont essentiellement été étudiés lors de son administration systémique et les mécanismes d'action du lithium topique ne sont qu'imparfaitement connus.

### **A/ Mécanismes d'action du lithium administré par voie orale**

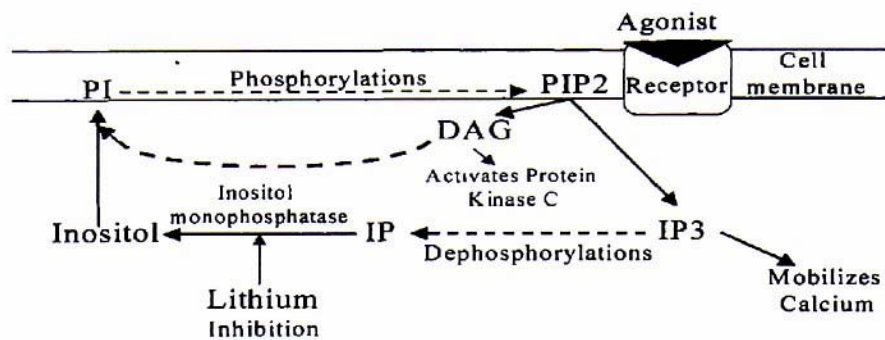
Malgré sa structure simple, les cibles d'action du lithium sont multiples.

#### 1/ Effets moléculaires du lithium

- Modulation de nombreux systèmes de seconds messagers : inositol monophosphate (IMP), adénosine cyclique monophosphate (AMPc), protéine kinase C (PKC).

L'inositol monophosphatase (IMPase) et l'inositol polyphosphate 1-phosphatase sont des enzymes impliquées dans le recyclage et la synthèse de novo de l'inositol, qui est un composant de la voie de signalisation du phosphoinositide (PI). De nombreux récepteurs couplés à une protéine G activent la voie de transmission des phosphoinositides par l'intermédiaire de l'activation de la phospholipase C (PLC). Cette dernière entraîne l'hydrolyse de phospholipides membranaires, phosphorylés en phosphoinositide 4, 5-biphosphonate (PIP<sub>2</sub>), en seconds messagers : le diacylglycérol (DAG) et le inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). DAG et IP<sub>3</sub> jouent des rôles essentiels dans la transmission de signaux dans la cellule. En effet, IP<sub>3</sub> libère le calcium séquestré dans le réticulum endoplasmique puis est déphosphorilé en inositol monophosphate, qui est lui-même déphosphorilé par l'inositol monophosphatase en inositol libre. Le lithium inhibe la dernière étape de ce processus par effet direct inhibiteur sur l'IMPase, puis secondairement sur l'IPPase, conduisant à une déplétion en inositol [96]. Cette hypothèse de déplétion d'inositol pourrait expliquer l'effet thérapeutique et prophylactique du lithium dans le traitement des troubles bipolaires [97].

De plus, le traitement chronique par lithium diminue la concentration de PKC  $\alpha$  et  $\epsilon$  [98].



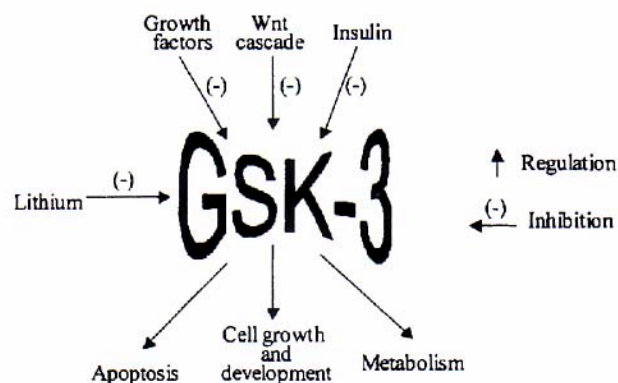
Effet du lithium sur le cycle du phosphoinositide (PI), d'après Shaldubina.

Il a également été rapporté un effet modulateur significatif du lithium sur la voie de signalisation de l'AMPc. Les récepteurs couplés aux protéines G modulent la concentration intracellulaire d'AMPc par l'intermédiaire de l'action de médiateurs sur l'adénylate cyclase (AC). L'AC catalyse la conversion de l'adénosine triphosphate en AMPc. Mais une même molécule informative peut soit augmenter, soit diminuer la concentration intracellulaire d'AMPc, selon le type de récepteur sur lequel elle se lie. L'AMPc exerce ses effets principalement en activant une enzyme, la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), qui phosphoryle et régule de nombreuses protéines impliquées dans la régulation des transferts ioniques, des éléments du cytosquelette et des facteurs de transcription. Le lithium diminue l'activité de l'adénylate cyclase et donc la concentration d'AMPc [99]. Ceci a également été mis en évidence au niveau de l'épiderme [100].

- Inhibition de la GSK3 $\beta$

La GSK3 $\beta$  est une sérine-thréonine kinase normalement très active dans les cellules mais pouvant être inhibée par des signaux provenant de multiples voies de signalisation (tels que la voie Wnt, la voie Pi3 kinase, PKA, PKC...). Il existe 2

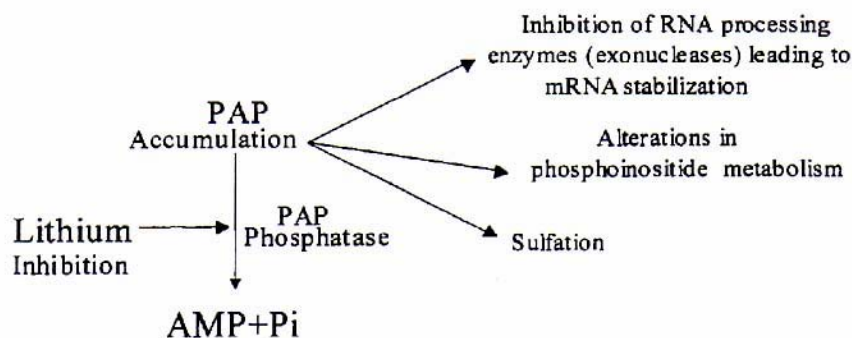
isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui ont des fonctions biologiques différentes. Les cibles de la GSK3 $\beta$  sont nombreuses : facteurs de transcription ( $\beta$ -catenin, cyclic AMP response element binding protein : CREB, c-jun), protéines liées aux microtubules, protéines du cycle cellulaire (cycline D) et régulateurs du métabolisme (glycogène synthase, pyruvate deshydrogénase). GSK3 $\beta$  est donc capable de réguler divers processus cellulaires, tels que la synthèse du glycogène, la transcription, la différenciation, la prolifération, l'apoptose. En effet, l'augmentation de l'activité de GSK3 $\beta$  a un effet pro-apoptotique, alors que l'inhibition de GSK3 prévient l'apoptose [101]. GSK3 $\beta$  est très abondante au niveau cérébral et serait la cible des traitements antidépresseurs. Plusieurs études ont montré clairement que le lithium, aux concentrations thérapeutiques utilisées, entraînait une inhibition biologique significative de GSK3 $\beta$  dans le cerveau des mammifères. Elle pourrait donc constituer la cible thérapeutique du lithium. Cependant, cette inhibition de GSK3 $\beta$  par le lithium survient aux concentrations limites supérieures de la fourchette thérapeutique. Ceci pourrait donc expliquer les effets secondaires toxiques du lithium plus que les effets thérapeutiques [97].



Processus cellulaires dans lesquels est impliquée GSK3 $\beta$ , d'après Shaldubina.

- Action sur la PAP phosphatase

La 3'-phosphoadénosine 5'-phosphate (PAP) phosphatase est une enzyme ubiquitaire. Elle catalyse spécifiquement l'hydrolyse du 3' phosphate de PAP, convertissant ainsi PAP en 5' phosphate (AMP) et phosphate inorganique. Le lithium inhibe la PAP phosphatase aux concentrations thérapeutiques, mais essentiellement aux limites inférieures (0,3mM). De cette manière, il renforce la déplétion en inositol par inhibition de la déphosphorilation de l'inositol phosphate. De plus, dans les levures, il a été montré que l'accumulation de PAP, due à l'inhibition de la PAP phosphatase, pouvait interférer sur la réplication de l'ADN et la synthèse d'ARNm [102].



Possibles effets physiologiques secondaires à l'accumulation de PAP, d'après Shaldubina.

- Action sur le métabolisme de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est libéré à partir des phospholipides membranaires via l'activation de la phospholipase A2 (PLA2). Grâce à cette libération et à l'action de cyclooxygénase, il y a production de métabolites eicosanoïdes proinflammatoires tels que prostaglandines et thromboxanes.

Le lithium a une action sur la production des prostaglandines. Ceci a été démontré grâce à un système de perfusion mésentérique chez le rat. Ainsi, le lithium, à concentration élevée, pourrait entraîner une réduction de la formation de prostaglandines probablement en rapport avec une inhibition de relargage de précurseurs (acide di-homo-gamma-linolénique et acide arachidonique). A plus faible concentration de lithium, la réponse était plus sélective avec une inhibition de la production de PGE1 et PGE2 (précurseurs des acides gras) et TXB2 [38, 103]. Des études récentes chez le rat ont montré aussi que le lithium diminuait l'expression génique et l'expression protéique de la phospholipase A2 cytosolique et de la cyclo-oxygénase de type 2 [104].

## 2/ Action sur la croissance et la différenciation cellulaire

Concernant la prolifération cellulaire, le lithium a un effet mitogène sur les lymphocytes T (LT), les cellules mononuclées et les polynucléaires neutrophiles [105, 106]. Cet effet inducteur sur la prolifération a également été démontré sur des cellules épithéliales mammaires [107]. Cependant, il a été démontré que le carbonate de lithium, à une concentration comprise entre 2,5 et 5mM inhibait la croissance de précurseurs de lignée cellulaire murines [108].

Concernant la différenciation cellulaire, les observations sont variables selon les études : effet bloquant de la différenciation cellulaire [109] ou effet inducteur de la différenciation cellulaire de cellules rénales normales [107, 110].

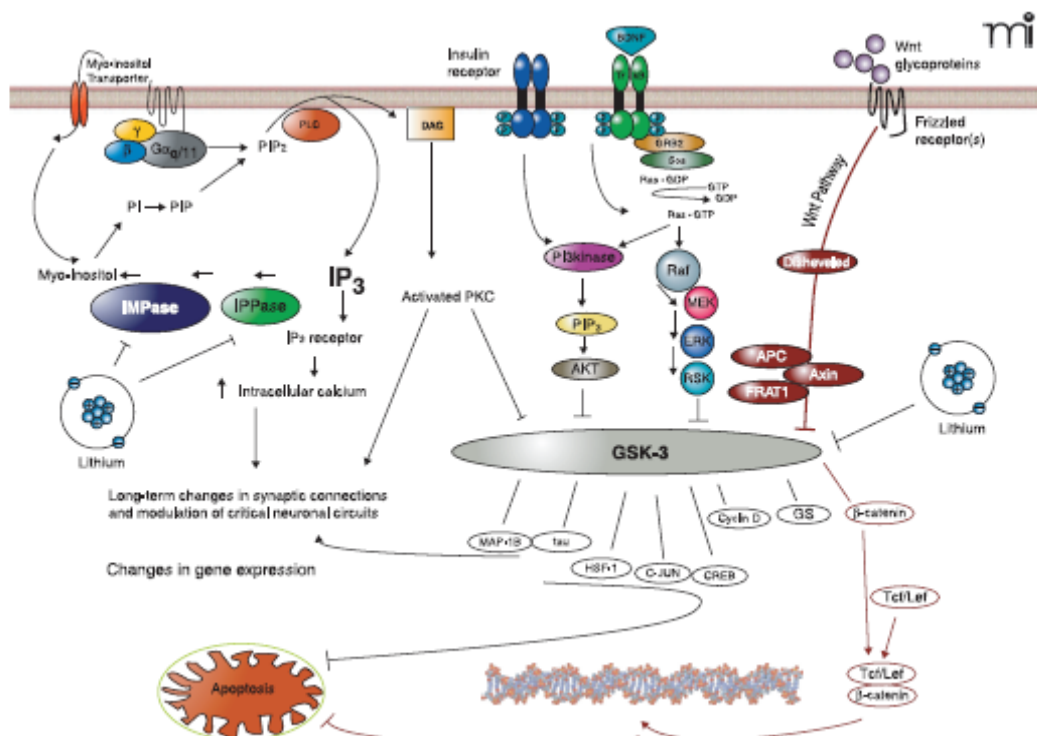
## 3/ Action immunologique

Le lithium peut affecter les fonctions de cellules impliquées dans la réponse inflammatoire. Il induit une leucocytose portant en particulier sur les neutrophiles, à la



fois chez des volontaires sains et des malades leucémiques [111]. Il est capable de favoriser la libération de certains médiateurs et la granulopoïèse [112]. Il augmente aussi la chimiotaxie des polynucléaires neutrophiles, en particulier au niveau épidermique, dans les lésions induites expérimentalement [113]. Il augmente la production d'IL2 après stimulation par la phytohématoglutinine et la réponse proliférative des LT helpers [114]. Il inhibe les LT suppresseurs [115] mais stimule la production des immunoglobulines IgG et M par les lymphocytes B [116, 117].

Le lithium aurait également un effet immunomodulateur médié par des cytokines. Les différentes études sur l'effet du lithium sur la production de cytokines, par différents types cellulaires, mettent en évidence une augmentation des cytokines pro et anti-inflammatoires. Ainsi, *in vitro*, le lithium (1mM) incubé avec du sang total de volontaires sains stimule la sécrétion de cytokines proinflammatoires ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ) mais aussi anti-inflammatoires (IL4, IL10) [118]. Par contre, à 5mM, le lithium incubé avec du sang total de volontaires sains, augmente essentiellement les cytokines anti-inflammatoires : IL10 [119]. Cependant, nous n'avons retrouvé qu'une seule étude concernant l'influence du lithium (1,5 mM) sur la sécrétion de cytokines par des kératinocytes normaux ou psoriasiques associés ou non à des lymphocytes (40). Elle retrouve l'augmentation de cytokines proinflammatoires ( $IFN\gamma$ , IL2) mais n'étudiait pas l'effet du lithium sur les cytokines anti-inflammatoires [120].



GSK : glycogene synthase kinase 3 ; IMP3 : inositol monophosphatase ; PI3K : phosphatidyl inositol 3 Kinase ; PIP2 : phosphoinositide-4,5-biphosphate; DAG: diacyglycérol ; IP3 : inositol-1,4,5-triphosphate ; PKC : protéine kinase C ; IPPase : inositol polyphoshatase phoshatase

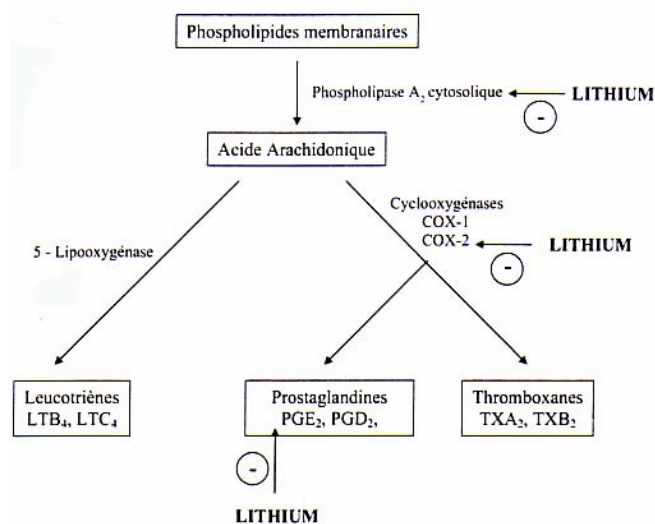
#### 4/ Effets secondaires

Le traitement par lithium par voie générale peut s'accompagner d'effets secondaires cutanés. Il a notamment été rapporté la survenue d'éruptions maculopapuleuses, d'acné, de kératoses folliculaires et d'induction ou aggravation de dermatoses érythémato-squameuses, qui sont très polymorphes [121, 122]. Il peut s'agir de poussées de psoriasis, de parakératoses psoriasiformes ou de dermatites séborrhéiques. Elles peuvent présenter la forme inaugurale de la maladie ou constituer une nouvelle poussée de la maladie [123]. Parmi les hypothèses pathogéniques, celle faisant intervenir le rôle prédisposant des facteurs psychologiques propres à ces dermatoses (notamment le stress) sont actuellement abandonnés. Actuellement, il semblerait que ces manifestations dermatologiques soient liées au fait que le lithium agirait comme inhibiteur général de toutes les hormones dont l'AMPc est le messenger. Dans la peau, il inhiberait l'adénylate cyclase, réduisant ainsi l'accumulation d'AMPc et entraînant une accumulation de polynucléaires neutrophiles [121]. Bloomfield a également prouvé que, dans ces conditions, les neutrophiles de patients psoriasiques traités par lithium avaient une plus grande propension à dégranuler que ceux des sujets sains [124]. Le lithium pourrait également affecter la voie de la PKC-inositol-biphosphate en inhibant l'inositol-1-phosphatase, entraînant une altération des signaux de transduction cellulaire [109]. Au niveau cellulaire, le lithium pourrait avoir un effet mitogène et agir en bloquant la différenciation cellulaire [125, 126]. Enfin, il est connu que l'IL6 et son inducteur le  $TNF\alpha$  jouent un rôle dans la physiopathologie du psoriasis. La combinaison lithium et  $TNF\alpha$  pourrait augmenter la concentration d'IL6 conduisant à une hyperplasie épidermique et participant à la création d'un infiltrat inflammatoire cellulaire local [109].

## B/ Mécanismes d'action potentiels du lithium utilisé par voie topique

### 1/ Action anti-inflammatoire

Il a été démontré in vitro que des concentrations élevées de lithium (100 à 200 mmol/L) diminuaient de manière importante la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires [38]. Or, le métabolisme de l'acide arachidonique permet la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation (leucotriènes, prostaglandines, thromboxanes). Le lithium topique diminuerait donc la production de prostaglandines inflammatoires. Des études plus récentes ont confirmé ces observations et ont permis de démontrer que l'action anti-inflammatoire du lithium topique pourrait s'expliquer par l'inhibition de deux enzymes intervenant au niveau de la voie métabolique de l'acide arachidonique : la phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique (cPLA<sub>2</sub>) et la cyclooxygénase de type 2 (COX<sub>2</sub>), comme observé au niveau cérébral chez le rat traité de façon chronique par du lithium [127].



## 2/ Action antifongique

Afin d'évaluer son action antifongique, des fongigrammes avec différentes dilutions de gluconate de lithium 8% (1/2 au 1/16) ont été testées sur plusieurs souches de *Malassezia*. Il apparaît que le gluconate de lithium 8%, dilué au demi, a une action fongistatique sur *Malassezia furfur* et *Malassezia restricta*, disparaissant à une dilution au quart. Ceci n'a pas été retrouvé dans l'étude ancienne de Boyle qui concluait que le lithium sous la forme de succinate de lithium à la concentration de 1-150 mg/l (1mM) n'inhibait pas la croissance des levures du genre *Malassezia* [128]. Ceci était également constaté quelques années plus tard par Cuelenaere [129]. Cependant, deux autres études ont montré que le lithium pouvait inhiber la croissance de souches de *Malassezia* in vitro mais lors d'utilisation à des concentrations plus élevées que celles habituellement testées (100 fois supérieur à celle utilisées par Boyle), mais restant inférieures à celles obtenues lors d'application de succinate de lithium à 8% [130, 131]. Ainsi, la sensibilité de la plupart des espèces de levures au lithium se situerait entre 2 et 30mM [132].

Cette action fongistatique pourrait s'expliquer par deux mécanismes :

- Modulation de la production d'acides gras libres.

Il a été montré qu'à forte concentration, le lithium inhibait la production de tous les acides gras libres et notamment les acides gras libres à 12 atomes de carbones, indispensables à la croissance de levures du genre *Malassezia* [38]. Cependant, lorsque le lithium est inclus dans des préparations topiques permettant d'obtenir une concentration de lithium de 1mM à la surface de la peau, il n'existe aucun effet thérapeutique apparent. Ainsi, des concentrations plus élevées, pouvant

correspondre à celles de l'usage topique, sont nécessaires, pour obtenir cette diminution des acides gras libres [38].

- Blocage du cycle cellulaire des levures et inhibition de la réplication de l'ADN

Smith et al ont démontré in vitro que le lithium inhibait la prolifération de levures du genre *Saccharomyces cerevisiea*. Cette diminution résulterait du blocage du cycle cellulaire des levures par le lithium [133]. De plus, la PAP (adénosine 3', 5' biphosphatase) est très sensible au lithium, puisque son activité est inhibée de 50% par une concentration de lithium de 0,1mM et 0,3mM [102, 134]. Or, l'inhibition de la PAP bloque la réplication de l'ADN, empêchant ainsi la prolifération des levures [135]. On pourrait supposer que le lithium agirait de la manière sur d'autres genres de levures proches, telle que *Malassezia*.

### **C/ Essais thérapeutiques sur les sels de lithium**

Les premières études concernaient le succinate de lithium.

▪ Comparaison succinate de lithium versus placebo

Une étude randomisée, contrôlée, en double aveugle avec « cross over » du succinate de lithium à 8% appliqué 2 fois par jour pendant 4 semaines contre placebo a été réalisée chez 19 patients atteints de dermatite séborrhéique faciale évoluant depuis 4 semaines [128]. L'évaluation était faite par une échelle visuelle analogique et l'investigateur. L'étude concluait que le succinate de lithium était significativement plus efficace que le placebo. Cependant, la crème contenait des molécules pouvant être efficaces sur la composante inflammatoire de la dermatite

séborrhéique comme la lanoline, le sulfate de zinc à 0,05% ou le tocophérol d'autant que le placebo ne contenait que de la lanoline.

Après avoir constaté une efficacité dans une étude ouverte comparant le succinate de lithium et le placebo, Cuelenaere et al confirmaient ces résultats préliminaires par une étude en cross-over, en double aveugle, contre placebo chez 30 patients. Ils évaluaient le taux de rémission ou d'amélioration grâce à une échelle visuelle analogique complétée par l'investigateur. Ils concluaient qu'il existait une différence significative mais le succinate de lithium et le placebo étaient aussi associés à du sulfate de zinc 0,05% [129].

Avec le même produit EFALITH, une large étude multicentrique, randomisée, en double aveugle, contre placebo, en cross over chez 200 patients et en parallèle chez 27 patients était réalisée. L'échantillon était constitué de 162 hommes et 65 femmes d'âge moyen 37,6 ans. Dans l'essai en cross-over, les patients faisaient l'application d'EFALITH ou de placebo 2 fois par jour pendant 4 semaines et après 2 semaines d'interruption de traitement, appliquaient l'autre traitement pendant 4 semaines. Les patients inclus en parallèle appliquaient le placebo pendant 2 semaines puis EFALITH 2 fois par jour pendant 6 semaines. L'efficacité était évaluée par une échelle visuelle analogique complétée par les patients et concluait à l'efficacité du succinate de lithium à 8% de manière significative par rapport au placebo. Cependant, ces études en cross over restent critiquables devant l'absence de preuve de l'existence d'effets rémanents du lithium topique [136].

- Comparaison succinate de lithium versus placebo chez des patients VIH+

Un seul essai en double aveugle a étudié l'effet du succinate de lithium topique à 8% (ne contenant pas de zinc) à deux applications par jour versus placebo pendant 8

semaines chez des patients VIH+. L'application se faisait sur une moitié du visage, chaque malade étant son propre témoin. Douze patients VIH+ ayant une dermatite séborrhéique du visage ont été inclus, 10 ont été retenus pour l'analyse. Sur la partie du visage traitée par succinate de lithium, les auteurs notaient une réponse clinique rapide en 2,5 jours en moyenne avec une réduction significative du score (échelle visuelle analogique). L'efficacité était maintenue jusqu'au 47ème jour mais les différences n'étaient plus significatives après 2,5 jours. Il s'agissait d'une petite série avec une faible puissance statistique [137].

Des études plus récentes se sont intéressées au gluconate de lithium et ont introduit des critères plus précis pour évaluer l'efficacité du traitement.

- Comparaison gluconate de lithium 8% versus placebo [94]

Il s'agit d'une étude comparative, multicentrique, randomisée, en double aveugle menée chez 129 patients présentant une dermatite séborrhéique d'intensité modérée ou sévère évoluant depuis au moins 2 mois. Chaque groupe de traitement recevait soit le gel de lithium à 8%, soit le véhicule (placebo) à la posologie de 2 applications par jour pendant 2 mois. Le critère principal d'évaluation choisi pour cette étude était le pourcentage de patients présentant une rémission complète de l'érythème et de la desquamation à J28 et J56. La rémission complète était définie comme la disparition totale de l'érythème et de la desquamation, seul critère d'efficacité réelle reconnu par le malade dans le dermatite séborrhéique. Les signes fonctionnels habituels de la dermatite séborrhéique, tels que le prurit, la sensation d'étirement ou de brûlure, étaient aussi évalués comme critères secondaires.

L'analyse de l'efficacité a été réalisée sur 123 patients : 62 patients dans le groupe gluconate de lithium 8% et 61 dans le groupe placebo. Les résultats ont montré une



supériorité statistiquement significative du gluconate de lithium 8% avec un taux de rémission complète de 29,1% versus 3,8% avec le placebo après 8 semaines de traitement ( $p < 0,001$ ) ; et un taux de rémission globale (= rémission partielle + rémission complète) de 90,9% versus 54,7%. L'analyse des critères secondaires a confirmé les résultats. En effet, il existait également une amélioration statistiquement significative par rapport au groupe placebo sur les 3 critères secondaires : prurit, étirements et sensations de brûlure. Enfin, la tolérance générale du gluconate de lithium 8% s'est montrée équivalente à celle du placebo.

▪ Comparaison gluconate de lithium 8% versus kétoconazole 2% [95]

Cette étude randomisée, contrôlée, multicentrique, menée chez 289 patients a comparé le gluconate de lithium 8% au produit de référence : le kétoconazole 2% gel moussant (sachet-dose). Le kétoconazole a été utilisé car c'est le traitement le plus couramment utilisé et considéré comme le traitement de référence dans la dermatite séborrhéique (il a l'AMM dans cette indication). En raison des différences de galéniques entre les deux traitements, une étude en double aveugle n'était pas réalisable. Cependant, pour garantir un certain degré d'insu, les traitements étaient randomisés et dispensés à l'aveugle par les investigateurs. Le groupe gluconate de lithium 8% appliquait le gel deux fois par jour sur l'ensemble du visage pendant 2 mois. La posologie du groupe kétoconazole 2% était celle préconisée dans l'AMM, c'est-à-dire 2 applications par semaine pendant 1 mois puis une application par semaine pendant le mois suivant. Le critère principal d'évaluation était le taux de rémission complète lors de la dernière évaluation c'est-à-dire la disparition totale des signes objectifs de dermatite séborrhéique : érythème et desquamation.

Il s'agissait d'une étude de non-infériorité : la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la différence entre les pourcentages de rémission complète entre le gel de gluconate de lithium 8% et le gel moussant de kétoconazole 2% ne devait pas être inférieure à -15%. Au total, 288 patients ont été retenus pour l'analyse de l'efficacité : 152 dans le groupe gluconate de lithium et 136 dans le groupe kétoconazole 2%. Les résultats ont montré une rémission complète lors de la dernière évaluation de 52% pour le gluconate de lithium 8% et 30,1% pour le kétoconazole 2%. Ceci correspondait à une différence entre les deux traitements de 21,9%, correspondant à un intervalle de confiance compris entre +10% et 33,7%. En application des recommandations de l'EMA (CPMP/ EWP/482/99-27 juillet 2000), l'ensemble de l'intervalle de confiance à 95% de la différence entre les deux traitements étant supérieur à zéro, il est possible de conclure à la supériorité du gluconate de lithium 8% par rapport au kétoconazole 2% dans la dermatite séborrhéique du visage. De plus, l'analyse des critères secondaires (prurit, étirements, sensations de brûlure) a confirmé la supériorité du gluconate de lithium 8% avec disparition de la sensation d'étirement chez 87% des patients versus 75% avec le kétoconazole 2% ( $p=0,01$ ) et disparition de la sensation de brûlure chez 94% des patients versus 87% avec le kétoconazole 2% ( $p=0,04$ ). Seule, l'évaluation du prurit ne mettait pas en évidence de différence significative entre les deux traitements. La tolérance globale était bonne et similaire dans les deux groupes.

#### ▪ Effets secondaires

Le gluconate de lithium 8% topique a une bonne tolérance. Elle est évaluable grâce à deux essais cliniques, cumulant au total 417 patients dont 218 ont été traités par gluconate de lithium 8% [94, 95]. Vingt-quatre patients ont présenté 29 effets

indésirables imputables au traitement. Il s'agissait le plus souvent de sensation de brûlure ou d'érythème. Ils étaient le plus souvent spontanément résolutifs. Aucun effet indésirable grave n'était imputable au traitement par gluconate de lithium. De plus, aucun effet secondaire cutané tel que ceux observés avec le traitement par lithium par voie générale (lésions psoriasiformes ou acnéiformes) n'a été rapporté durant les études cliniques.

Le lithium est un élément trace dans l'organisme. Il a des actions multiples, à la fois au niveau cellulaire où il peut moduler la prolifération et la différenciation de nombreux types cellulaires, et au niveau moléculaire où il intervient dans de nombreux systèmes de seconds messagers, modulant la transduction du signal transmembranaire. Cependant, alors que lors d'administration par voie orale, le lithium peut entraîner la survenue d'éruptions psoriasiformes, il a un effet bénéfique par voie topique sur une autre dermatose érythémato-squameuse : la dermatite séborrhéique. Les mécanismes d'action du lithium par voie topique sont imparfaitement connus. L'action d'inhibition de la libération des acides gras libres par le lithium, de même que l'action antifongique décrite par certains auteurs ne semblent pas pouvoir expliquer complètement les effets thérapeutiques du lithium topique. En effet, Dréno et al observaient que *Malassezia furfur* était toujours présent après 8 semaines de traitement dans les deux groupes (traitement topique par gluconate de lithium ou placebo) sans différence significative [94]. Ceci avait également été constaté par Cuelanaere avec le succinate de lithium [129]. De plus, il existe probablement des différences de concentrations thérapeutiques entre l'utilisation orale (1mM) et topique (plus élevées) du lithium. Enfin, la plupart des études ont été réalisées sur des cellules sanguines ou cérébrales et non sur des

kératinocytes. La dermatite séborrhéique étant une dermatose inflammatoire, nous avons cherché à savoir si l'efficacité du lithium par voie topique sur les kératinocytes pouvait s'expliquer par un effet anti-inflammatoire.

### **III- ETUDE DES EFFETS MODULATEURS DU GLUCONATE DE LITHIUM SUR LES KERATINOCYTES**

#### **OBJECTIF**

Notre travail avait pour objectif d'étudier, in vitro, l'effet modulateur du lithium, sous la forme de Gluconate de lithium, sur les kératinocytes.

Pour cela, nous avons étudié l'effet modulateur du lithium sur :

- la prolifération kératinocytaire via l'étude de l'expression de la protéine nucléaire Ki67,

- la différenciation kératinocytaire via l'étude de 2 marqueurs : La Kératine 10 (K10) : marqueur de différenciation précoce, spécifique des couches suprabasales de l'épiderme et la filaggrine : un marqueur de différenciation tardif. La filaggrine existe sous forme de profilaggrine dans les grains de kératohyaline de la couche granuleuse et se transforme en filaggrine dans la couche cornée,

- l'expression et la sécrétion de cytokines pro inflammatoires ( $TNF\alpha$ , IL6) et anti-inflammatoires (IL10,  $TGF\beta1$ ),

- l'expression de TLRs (TLR2 et TLR4),

par les kératinocytes stimulés ou non par le LPS ou le zymosan.

La stimulation des kératinocytes permettait de créer une inflammation permettant de se rapprocher des conditions in vivo de dermatite séborrhéique.

## **MATERIEL ET METHODE**

### **A/ MATERIEL**

#### **1/ Culture de kératinocytes humains normaux en monocouche**

Les kératinocytes humains normaux étaient obtenus à partir de prépuces de donneurs sains provenant du service de chirurgie infantile. L'hypoderme et le derme profond étaient retirés avant de découper le prélèvement en morceaux de 1mm<sup>2</sup> et de les mettre à incuber dans une solution de trypsine 2X (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) pendant une nuit à 4°C.

Le jour suivant, l'épiderme et le derme étaient séparés à l'aide de pinces fines et l'action de la trypsine était inhibée par une solution de RPMI 1640 (Sigma) associée à 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Biowest, Nuaille, France). Les kératinocytes qui s'étaient détachés des morceaux d'épiderme, étaient centrifugés pendant 7 minutes à 1500 tours/minute. Puis le culot était resuspendu dans un milieu de culture : KSFM (keratinocyte serum free medium) (Invitrogen, Cergy pontoise, France) supplémenté avec 25 µg/ml de BPE (Bovine pituitary extract), 0,1-0,2 ng/ml d'rEGF (Recombinant epidermal growth factor), 2,5 µg/ml de Fungizone (Bristol-Myers Squibb, Paris, France) et Pénicilline (100UI/ml)/Streptomycine 100 µg/ml. Les cellules étaient ensuiteensemencées dans des flasques de culture 25cm<sup>2</sup> à la

densité de 40000 cellules /cm<sup>2</sup>. Les kératinocytes étaient cultivés en atmosphère humide à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture était renouvelé tous les 2 ou 3 jours.

Lorsque les cellules atteignaient un stade proche de la confluence, approximativement une dizaine de jours plus tard, elles étaient détachées pour être passées en flasques 75 cm<sup>2</sup>. Pour cela, les kératinocytes étaient, dans un premier temps, incubés pendant 7 minutes à 37°C avec du PBS-Ethylenediaminetétraacetic acide (PBS-EDTA). Dans un deuxième temps, les cellules étaient incubées pendant 5 minutes à 37°C avec de la trypsine 1X afin de les détacher du support de culture.

Après 2 passages en culture, les cellules étaientensemencées dans des labteks Sonic Seal 4 puits (Dutscher, Ruthmath, France), à la densité de 25000 cellules par puits. Le milieu de culture utilisé était du KBM (Keratinocyte Basal Medium) (Promocell, Heidelberg, Allemagne) sans hydrocortisone (KBM-HC), supplémenté avec 0,4% de BPE, 0,125 ng/ml d'EGF, 5 µg/ml d'insuline, 10 µg/ml de transferrine, 0,39 µg/ml d'épinéphrine et 0,09 mM de chlorure de calcium.

## **2/ Explants cutanés**

Les explants étaient réalisés à partir de plasties abdominales provenant du service de chirurgie plastique, à l'aide de punchs de 4 mm de diamètre. Les explants étaient placés dans des plaques 24 puits et incubés avec du milieu de culture KBM-HC.

Pour chaque technique utilisée, culture en monocouche ou explant, six donneurs différents étaient utilisés. Ces 2 techniques sont complémentaires. La culture en monocouche permet d'étudier l'action directe du modulateur sur des kératinocytes en

prolifération. La technique d'explant est plus proche des conditions in vivo. Elle permet d'étudier l'action du modulateur sur des cellules en différenciation, l'influence des interactions épiderme/derme et de préciser la localisation de l'expression des différents marqueurs dans l'épiderme.

### **3/ Le modulateur : Gluconate de lithium**

Le lithium sous forme gluconate de lithium était aimablement fourni par LABCATAL (Montrouge, France). Il était utilisé, à différentes concentrations (1,6 ; 3 ; 5mM), pendant 48 heures (temps déterminé comme nécessaire pour la pénétration du lithium dans les cellules et le déclenchement d'un effet [138] ), sur des cultures de kératinocytes en monocouche ou des explants stimulés ou non. Des kératinocytes ou explants cultivés dans du KBM-HC et sans gluconate de lithium ( Li 0mM) étaient utilisés comme contrôles.

Après incubation avec le gluconate de lithium, les labteks et les explants étaient lavés au PBS, puis congelés (à -20°C après fixation dans l'acétone pour les labteks et en azote liquide pour les explants) en vue de l'étude immunohistochimique. Les surnageants de culture étaient congelés afin d'évaluer la sécrétion protéique par une technique de dosage Elisa.

#### 4/ Anticorps utilisés

Spécificité	Isotype Clonalité	Origine	Fournisseur	Références	Concentration
Ki67	IgG1 monoclonal	souris	Dako, Glostrup, France	M7187	1µg/ml
K10	IgG1 Monoclonal	souris	Dako	M7002	0,5µg/ml
Filaggrine	IgG1 monoclonal	souris	Medical Technologies Inc, Shoughton USA.	BT-576	1/1000 <sup>eme</sup>
IL10	IgG1 monoclonal	souris	Diaclone, Besançon, France	855-100-05	2µg/ml
TGF-β1	IgG1 monoclonal	souris	Serotec, Cergy Saint Christophe, France	MCA-797	2µg/ml
TNF-α	IgG1 monoclonal	souris	R&Dsystems, Lille, France	MAB610	25µg/ml
IL6	IgG1 monoclonal	souris	Serotec	MCA746	10µg/ml
TLR2	polyclonal	lapin	Santa-cruz, Le Perray en Yvelines, France	Sc-10741	10µg/ml
TLR4	polyclonal	lapin	Santa-cruz	Sc-10739	5µg/ml



## **B/ METHODE**

### **1/ Test de viabilité : test MTT**

Le lithium étant une substance toxique, nous avons étudié l'effet de différentes concentrations de lithium sur les kératinocytes. Pour cela, les kératinocytes de 4 donneurs différents étaientensemencés à la densité de 15000 cellules/puits en plaques 24 puits dans du KBM-HC. Parallèlement une gamme étalon était réalisée avec 0, 10000, 15000, 20000, 30000, 40000 cellules par puits.

Quarante-huit heures plus tard, le gluconate de lithium était déposé à différentes concentrations sur les kératinocytes : 1,6mM ; 3mM ; 5mM ; 10mM ; 15mM ; 25mM ; 50mM. Les dilutions étaient réalisées dans du KBM-HC. Le milieu de culture seul servait de milieu contrôle.

Quarante-huit heures après addition du gluconate de lithium, le MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthyl thiazol-2-yl)- 2,5 diphényltétrazolium) (Sigma) à la concentration de 5mg/ml était déposé dans chaque puits pendant 4 heures. Le MTT était dégradé par la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en MTT formazan. Ce dernier était dissout par un mélange isopropanol/HCl 0,04. La lecture des densités optiques (DO) pour chaque puits était effectuée sur un lecteur de plaques Elisa à 570nm. La DO était corrélée au nombre de cellules vivantes grâce à une courbe de calibration établie à partir des différentes densités cellulaires de la gamme étalon.

Pour chacune des 4 séries de cellules testées, le test était réalisé en duplicate.

Les résultats du test MTT étaient exprimés en pourcentage de modulation :

$$\frac{\text{Nombre de cellules vivantes avec Li} - \text{Nombre de cellules vivantes dans contrôle}}{\text{Nombre de cellules vivantes dans le contrôle}} \times 100$$

## **2/ Stimulation des kératinocytes en monocouche et des explants**

### a- Modèles de stimulation

Nous avons utilisé deux modèles différents de stimulation des kératinocytes dans le but d'induire une inflammation :

- le LPS : lipopolysaccharide bactérien. Il s'agit d'une macromolécule contenue dans la paroi des bactéries gram négatif, ici *Escherischia coli* (Souche 0111 :B4, Sigma) utilisée classiquement pour induire une inflammation (expression et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, principalement le  $TNF\alpha$ ) dans des modèles de cultures cellulaires [139].

- le zymosan (Sigma). Il s'agit d'un polysaccharide insoluble de la paroi d'une levure : *Saccharomyces cerevisiae*, levure proche des levures du genre *Malassezia*.

### b- Détermination des doses de LPS et de zymosan utilisées pour nos manipulations

Nous avons étudié l'effet du LPS à différentes concentrations (1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml et 50 $\mu$ g/ml) et pendant différents temps d'incubation (8h, 24h, 48h) sur l'expression de plusieurs cytokines :  $TNF\alpha$ , IL6,  $TGF\beta$ 1, IL10 par des kératinocytes en monocouche (technique immunohistochimique).

De même nous avons étudié l'effet du zymosan à différentes concentrations (1,2mg/ml, 2mg/ml, 5mg/ml) et pendant différents temps d'incubation (8h, 24h, 48h).

Le KBM-HC seul servait de milieu contrôle.

Ces expériences ont été réalisées en duplicate. Nous avons utilisé une biopsie de dermite séborrhéique (sur laquelle *Malassezia furfur* était mise en évidence à

l'examen anatomopathologique) afin de comparer les intensités d'expression des marqueurs in vivo ( cf Annexe) et in vitro après induction de l'inflammation. Ces manipulations nous ont permis de déterminer la dose minimale capable d'induire une inflammation (augmentation de l'expression des cytokines proinflammatoires) sans entraîner une mortalité cellulaire. Nous avons retenu la dose de 1 µg/ml pour le LPS et 2mg/ml pour le zymosan.

### c- Préparation des solutions de LPS et de zymosan

- le LPS :

Il a été mis en évidence que le LPS préparé avec 10% de SVF entraînait une augmentation de la stimulation des TLR2 et 4 [140]. Le LPS était donc préparé à la concentration de 1 µg/ml dans du KBM-HC avec 10% de SVF.

- le zymosan :

Il se présente sous forme d'une poudre insoluble. Il était mis en solution dans 100 volumes de PBS stérile, porté à ébullition pendant 30 minutes, puis le mélange était centrifugé à 2 reprises (centrifugation 4000 tours/min, à 20°C pendant 30 minutes) [141, 142]. Enfin, le culot était repris dans du KBM-HC afin d'obtenir une préparation à 2mg/ml.

### d- Utilisation des préparations de LPS et Zymosan

Au début de l'expérience, les cultures de kératinocytes en monocouche et les explants étaient incubés 6 heures à 37°C avec une préparation de LPS 1 µg/ml ou

de zymosan 2mg/ml ou du KGM-HC pour le contrôle. Puis, après 2 lavages avec du PBS, le gluconate de lithium était ajouté à différentes concentrations pendant 48 heures.

### **3/ Technique d'immunohistochimie**

Il s'agit d'une technique d'immunomarquage indirect à l'aide de la peroxydase. Elle est employée pour localiser l'expression protéique des marqueurs étudiés sur des cultures de kératinocytes en monocouche (labteks) et sur coupes d'explants (5 $\mu$ m d'épaisseur) après fixation dans l'acétone (10 min).

Les sites non-spécifiques étaient saturés pendant 30 minutes dans un bain de TBS (Tris-buffered saline, Dako), Tween 20 0,05% p/v, BSA 0,1% p/v (Bovine Serum Albumine, Sigma).

Pour l'anticorps anti-TNF $\alpha$ , une perméabilisation avec une solution de PBS+Triton 0,3% (Sigma) à 4°C pendant 5 minutes, suivie de 2 lavages de 10 minutes au TBS+BSA étaient réalisés avant le dépôt de l'anticorps primaire. Les anticorps anti-TNF $\alpha$ , anti-IL6 étaient déposés pendant toute une nuit, à 4°C, en milieu humide et à l'obscurité. Les autres anticorps étaient déposés pendant 30 minutes, à température ambiante, en milieu humide et à l'obscurité. Un anticorps IgG1 irrelevant anti-souris servait de témoin négatif.

Des rinçages de 15 minutes étaient effectués entre chaque étape avec la solution de TBS+BSA 0,1%. Les labteks et les lames d'explants étaient incubés successivement avec le 2<sup>ème</sup> anticorps biotinylé (DAKO Chem Tek detection kit peroxydase/AEC rabbit/mouse) pendant 30 minutes, la streptavidine couplée à la peroxydase pendant 30 minutes, puis l'AEC (3-amino-9 éthylcarbazole : substrat de la peroxydase) était

déposé pendant 1 à 5 minutes en fonction des marqueurs. La réaction était stoppée avec de l'eau distillée (10 minutes). Les lames étaient alors contre-colorées à l'hémalum de Mayer (VWR International) pendant 60 secondes, rincées à l'eau distillée et montées entre lame et lamelle en milieu aqueux.

La lecture des lames était réalisée par 2 observateurs différents au microscope Leitz, objectif 25. Une échelle semi-quantitative était utilisée pour définir l'intensité du marquage (0 : nul ; + : faible ; ++ : moyen ; +++ : fort). Dans le cas du Ki67, les résultats étaient exprimés en pourcentage de cellules marquées. La lecture était faite sur 3 champs pour chaque lame et une moyenne était établie. Puis, pour chaque marqueur, une moyenne des résultats des 6 donneurs était réalisée.

#### **4/ Dosage immunoenzymatique ELISA**

Cette technique permettait de détecter et de doser différentes cytokines sécrétées dans les surnageants des cultures de kératinocytes en monocouche et des cultures d'explants. Nous avons utilisé les kits de détection de  $TNF\alpha$ , IL10,  $TGF\beta 1$  (Biosource, International Inc, Ca, USA) et IL6 (Immunotech, Marseille, France). La lecture de la densité optique était faite sur un lecteur de plaque ELISA (Molecular Devices, Ca, USA) à 450 nm pour le  $TNF\alpha$ , l'IL10 et le  $TGF\beta 1$  et à 405 nm pour l'IL6. Les sensibilités de détection étaient variables en fonction des kits : 1,7pg/ml pour le  $TNF\alpha$ , <1pg/ml pour l'IL10, <15pg/ml pour le  $TGF\beta 1$ , 3pg/ml pour l'IL6.

Pour chaque cytokine étudiée, une moyenne des concentrations sur les 6 donneurs était établie pour chaque groupe : absence de stimulation, stimulation par LPS, stimulation par zymosan, et pour chaque concentration de lithium.

L'immunohistochimie et dosage ELISA sont deux techniques complémentaires. L'immunohistochimie permet de localiser l'expression du marqueur et d'étudier les modulations de l'intensité d'expression. L'ELISA permet de quantifier le niveau de sécrétion des cytokines.

### **5/ Analyse statistique**

Les résultats étaient exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. L'analyse statistique était réalisée grâce à un test non paramétrique : test de Wilcoxon apparié. Une valeur de p inférieure à 0,05 était considérée comme significative.

## RESULTATS

### A/ Test de viabilité

Nous avons testé différentes concentrations de gluconate de lithium afin de déterminer celles qui n'étaient pas toxiques pour les kératinocytes (Fig. 1).

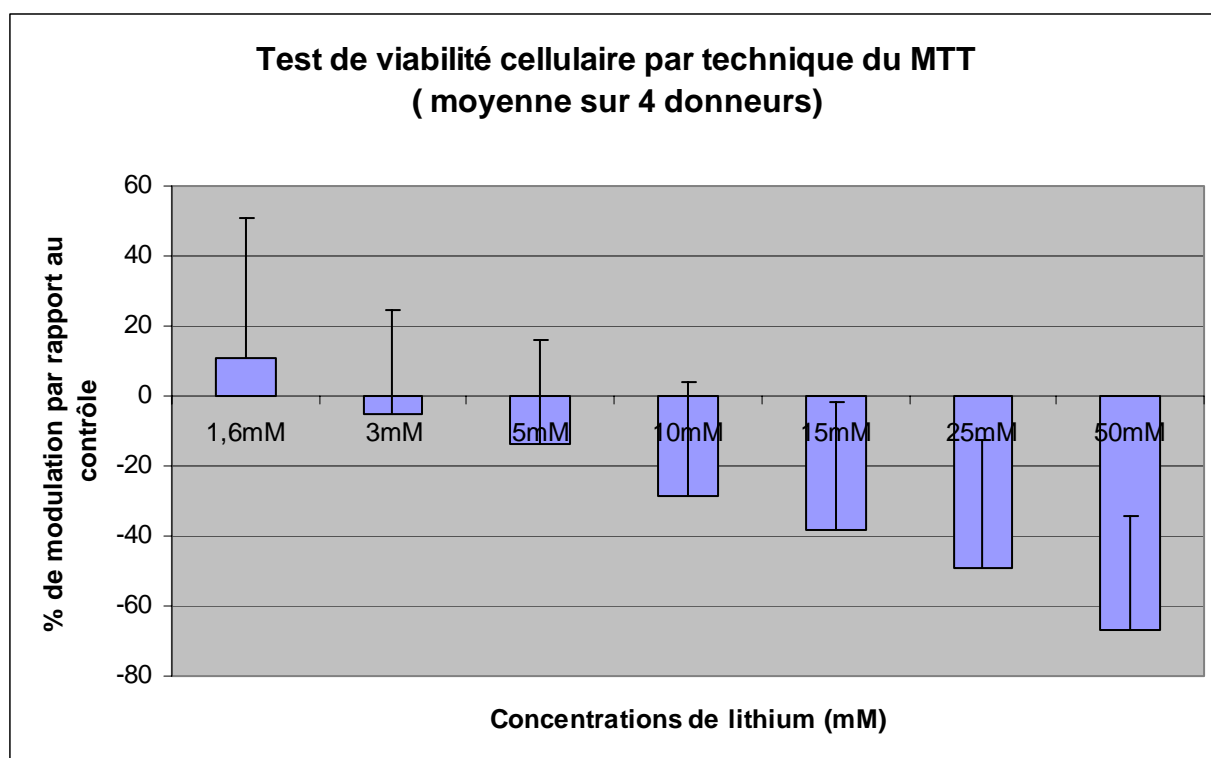


Figure 1

En moyenne, on constatait une augmentation de 10,7% du nombre de kératinocytes vivants lorsqu'ils étaient incubés avec 1,6mM de gluconate de lithium. Les autres concentrations diminuaient la viabilité des kératinocytes de manière dose-dépendante. Il existait donc un effet cytotoxique dose-dépendant du gluconate de lithium sur les kératinocytes à partir de 3mM. Cet effet était net à partir de 10mM de lithium (réduction du nombre de cellules vivantes de 28,59%).

Pour nos expériences, nous avons donc choisi d'utiliser le gluconate de lithium aux concentrations de 1,6mM, 3mM, 5mM où la viabilité des kératinocytes était supérieure à 80% du contrôle.

### **B/ Effet modulateur du gluconate de lithium sur la prolifération kératinocytaire**

Ceci était réalisé par l'étude du marquage de la protéine nucléaire Ki67 au niveau des kératinocytes en monocouche et des explants (résultats exprimés en pourcentage de cellules marquées).

Dans les cultures en monocouche non stimulées par le LPS ou le zymosan, le lithium diminuait de manière dose dépendante le nombre de kératinocytes en prolifération. Le pourcentage de cellules en prolifération, passait, en effet, de 80% ( $\pm 15,5$ ) en l'absence de lithium à 53,5% ( $\pm 24,2$ ) en présence de 5mM de gluconate de lithium, en l'absence de stimulation et de 80% ( $\pm 24,7$ ) à 46,7% ( $\pm 15$ ) en cas de stimulation par le zymosan. Cette diminution était particulièrement significative dans le cas des kératinocytes stimulés par le LPS. En effet, le pourcentage de cellules en prolifération, passait de 79,2% ( $\pm 10$ ) en l'absence de lithium à 33,3% ( $\pm 5$ ) en présence de 5mM de gluconate de lithium ( $p=0,03$ ) (Fig. 2 et 3).



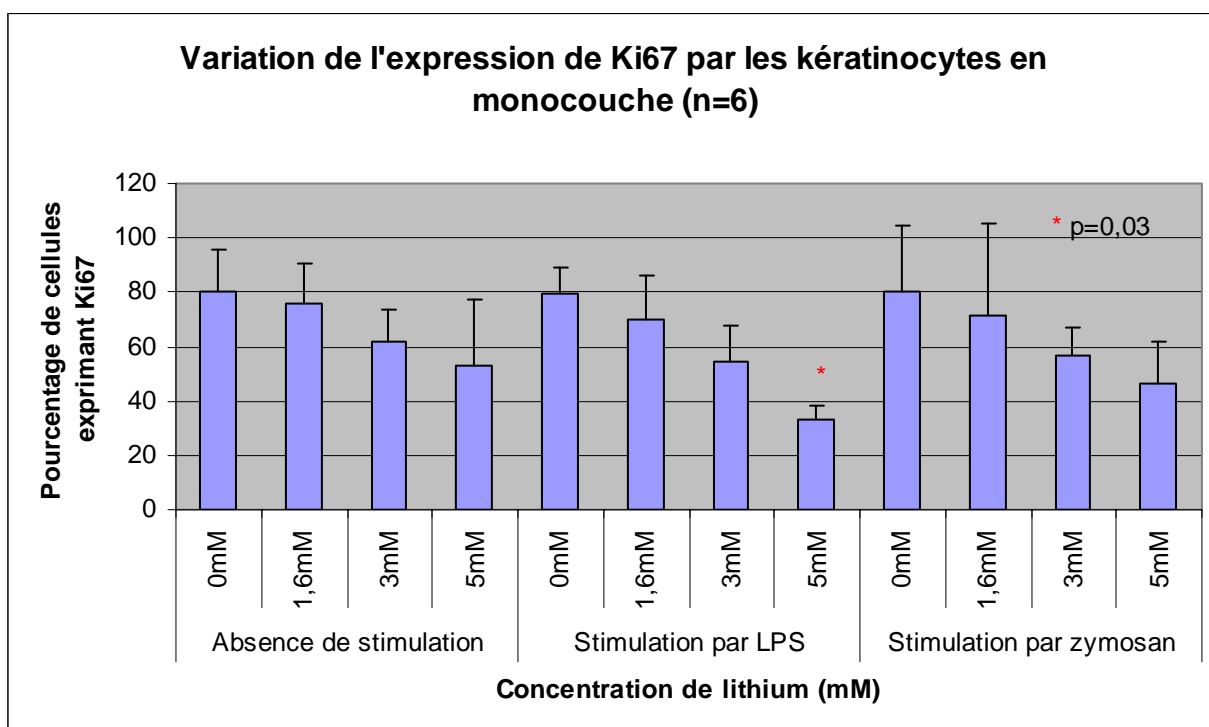


Figure 3

Au niveau des explants cutanés, aucune modulation significative de l'expression de Ki67 n'était observée, quelque soit la concentration de gluconate de lithium utilisée et que les explants soient ou non stimulés.

### **C/ Effet modulateur du gluconate de lithium sur la différenciation kératinocytaire.**

Sur les kératinocytes en monocouche, la K10 était exprimée par des cellules de grande taille. Il s'agissait d'un faible pourcentage de cellules (<1%) dans les cultures de kératinocytes non stimulés. Mais le nombre de cellules marquées augmentait de manière dose dépendante dans les cultures de kératinocytes stimulés par le LPS ou le zymosan. Ainsi, lors d'incubation avec 5mM de gluconate de lithium, le nombre de

cellules exprimant la K10 passait de 0,75% ( $\pm 0,27$ ) à 8,2% ( $\pm 5,1$ ) pour les kératinocytes stimulés par le LPS et de 0,62% ( $\pm 0,25$ ) à 3,9% ( $\pm 3,5$ ) pour les kératinocytes stimulés par le zymosan. Ces modulations n'étaient pas significative mais cet effet était particulièrement marqué chez 2 donneurs sur 6 (Fig. 4).

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet inducteur du gluconate de lithium sur l'expression de la filaggrine sur les kératinocytes en monocouche.

Sur les coupes d'explants, l'intensité d'expression de la K10 au niveau des couches suprabasales était comparable quelque soit la concentration de gluconate de lithium. Dans les explants non stimulés, l'expression de la filaggrine était forte ( $3 \pm 0$ ) et localisée à la couche cornée et granuleuse. En présence de 5mM de gluconate de lithium, l'expression de la filaggrine s'étendait aux couches spineuses dans tous les explants stimulés par le zymosan (6 cas sur 6) (Fig. 5). Dans les cas de stimulation avec le LPS ou dans les cas d'absence de stimulation, cette extension de l'expression de la filaggrine était observée dans, respectivement, 3 et 2 cas sur 6.

#### **D/ Etude des effets modulateurs du gluconate de lithium sur l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires**

##### **▪ Cytokine $TNF\alpha$**

Expression et sécrétion par les kératinocytes en monocouche :

- Par immunocytochimie, l'intensité moyenne d'expression de  $TNF\alpha$  était très faible ( $0,5 \pm 0,28$ ). Le gluconate de lithium, quelque soit la concentration utilisée, n'entraînait pas de modulation de l'expression de  $TNF\alpha$  par les kératinocytes, qu'ils soient ou non stimulés par le LPS ou le zymosan.

- Par technique ELISA, la concentration moyenne de  $\text{TNF}\alpha$  dans les surnageants de culture de kératinocytes non stimulés et incubés en l'absence de lithium était de 7,2 ( $\pm 6$ ) pg/ml. La stimulation par le LPS ou le zymosan augmentait la sécrétion de  $\text{TNF}\alpha$  dans le surnageant de culture. Les concentrations retrouvées étaient respectivement de 15 ( $\pm 7,5$ ) pg/ml après stimulation par LPS et 17,1 ( $\pm 11,7$ ) pg/ml après stimulation par le zymosan. Le gluconate de lithium, à la concentration de 1,6mM, augmentait significativement la sécrétion de  $\text{TNF}\alpha$ , à la fois par les kératinocytes non stimulés et par les kératinocytes stimulés. En effet, la sécrétion de  $\text{TNF}\alpha$  par les kératinocytes non stimulés passait de 7,2 ( $\pm 6$ ) à 13,6 ( $\pm 7$ ) pg/ml ( $p=0,03$ ). Dans le cas de stimulation, la sécrétion de  $\text{TNF}\alpha$  par les kératinocytes passait respectivement de 15 ( $\pm 7,5$ ) à 19,8 ( $\pm 7,4$ ) pg/ml ( $p=0,03$ ) dans le cas de stimulation par LPS et de 17,1 ( $\pm 11,7$ ) à 26,5 ( $\pm 10,2$ ) dans le cas de stimulation par le zymosan ( $p=0,03$ ) (Fig. 6).

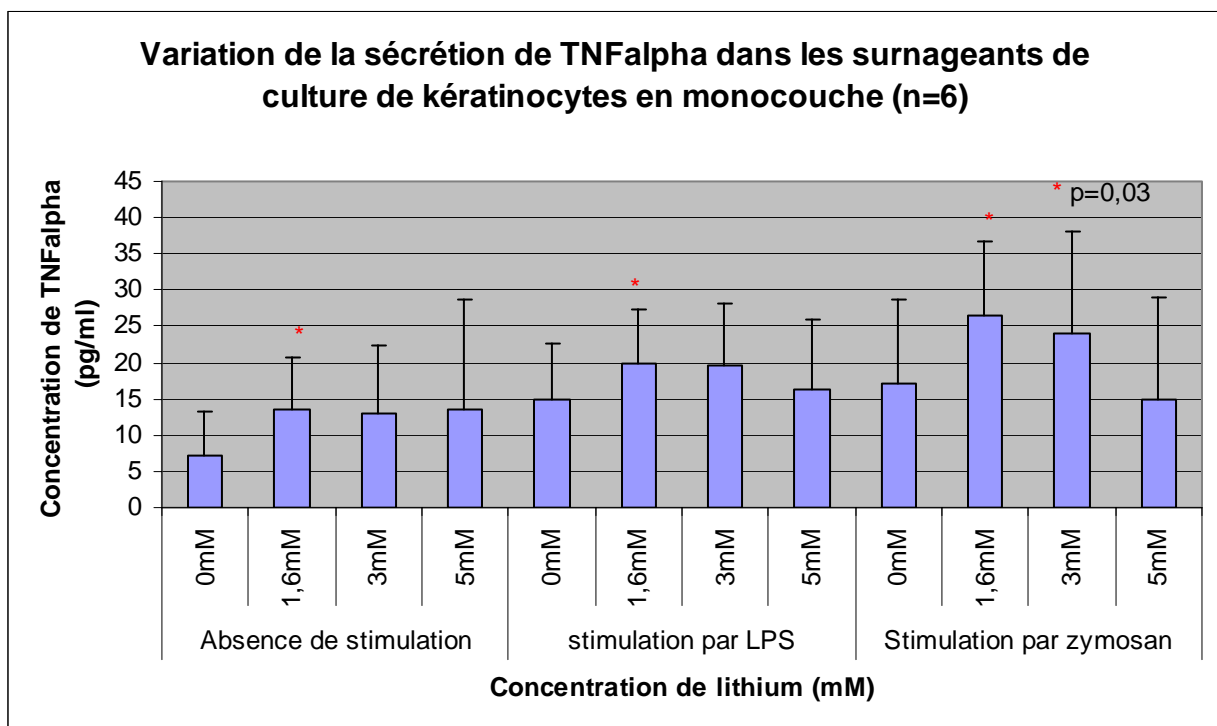
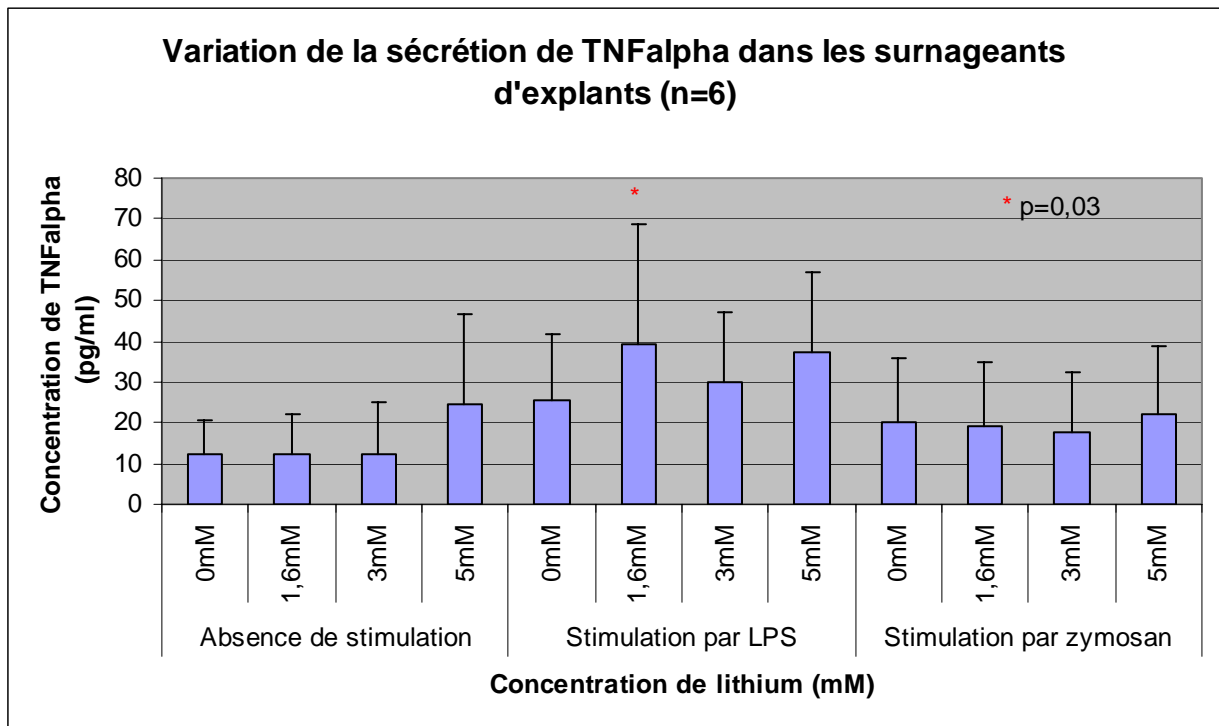


Figure 6

Expression et sécrétion par les explants cutanés :

- Par immunohistochimie, l'intensité moyenne d'expression de  $\text{TNF}\alpha$  par les explants non stimulés, incubés en l'absence de gluconate de lithium était faible ( $1,4 \pm 0,9$ ) et principalement localisée au niveau des couches suprabasales de l'épiderme. La stimulation par le LPS augmentait l'intensité d'expression de  $\text{TNF}\alpha$  ( $2,1 \pm 0,7$ ). L'intensité d'expression de  $\text{TNF}\alpha$  par les explants stimulés par le LPS était augmentée lors d'incubation avec du gluconate de lithium à la concentration de 1,6mM ( $2,6 \pm 0,5$ ) par rapport à l'incubation en l'absence de lithium ( $2,1 \pm 0,7$ ) mais cette différence n'était pas significative (Fig. 7). De même, l'incubation avec du gluconate de lithium, à la concentration de 5mM, diminuait mais de manière non significative, l'intensité d'expression de  $\text{TNF}\alpha$  ( $1,4 \pm 0,7$ ) dans les explants stimulés par le LPS ( $p=0,1$ ).

- Par technique ELISA, la concentration moyenne de  $\text{TNF}\alpha$  dans les surnageants de culture d'explants non stimulés et incubés en l'absence de gluconate de lithium était de 12,45 pg/ml ( $\pm 7,9$ ). En l'absence de lithium, la stimulation par le LPS et le zymosan augmentait la sécrétion de  $\text{TNF}\alpha$ . En effet, la concentration était respectivement de 25 ( $\pm 16$ ) pg/ml dans le cas de stimulation par le LPS et 19,95 ( $\pm 16$ ) avec le zymosan. Le gluconate de lithium, à la concentration de 1,6mM, augmentait significativement la sécrétion de  $\text{TNF}\alpha$  par les explants stimulés par le LPS ( $39,5 \pm 29,3$  pg/ml) ( $p=0,03$ ) (Fig. 8).



**Figure 8**

▪ Cytokine IL6

Concernant les kératinocytes en monocouche et les explants :

- Par immunohistochimie, l'intensité moyenne d'expression d'IL6 par les kératinocytes en monocouche, non stimulés et incubés en l'absence de gluconate de lithium, était faible ( $1,5 \pm 0,8$ ). L'intensité d'expression d'IL6 par les explants cutanés non stimulés et incubés sans gluconate de lithium était également faible ( $1,5 \pm 0,84$ ) et principalement localisée au niveau des couches suprabasales de l'épiderme. Cependant, quelque soit la concentration de gluconate de lithium utilisée, il n'était noté aucune modulation de l'intensité d'expression d'IL6 par les kératinocytes en monocouche ou les explants, qu'ils soient ou non stimulés.

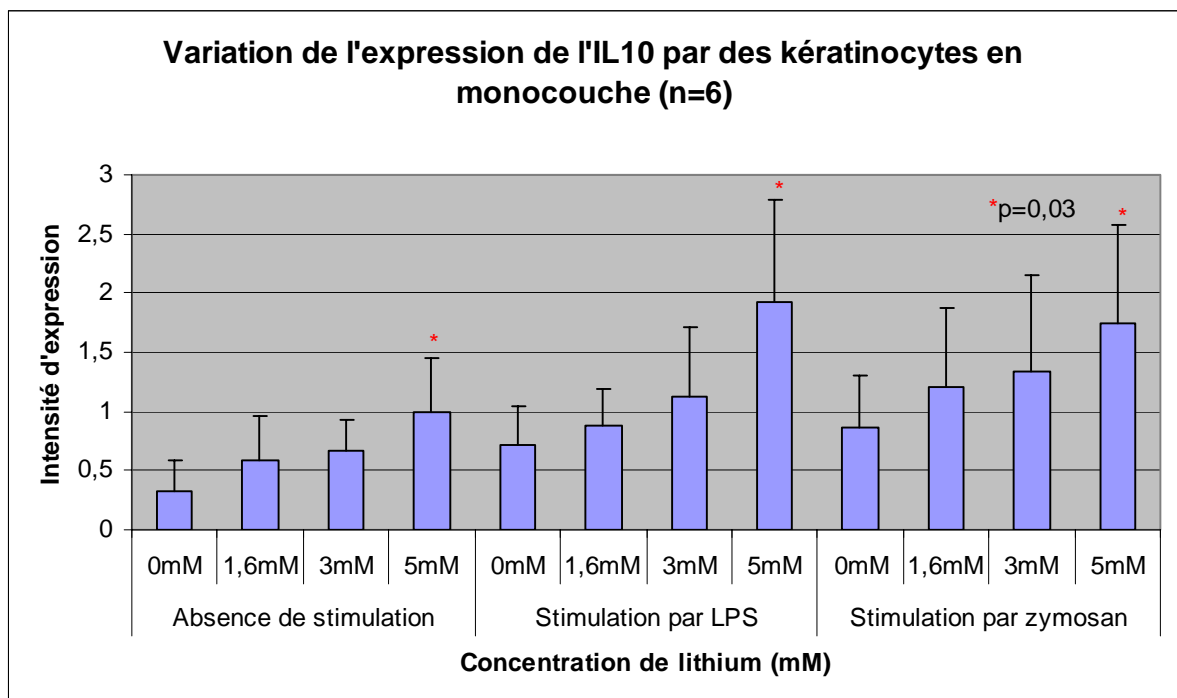
- Par technique ELISA, aucune modulation significative de la sécrétion d'IL6 n'était noté, que ce soit par les kératinocytes en monocouche ou les explants cutanés et quelque soit la concentration de lithium utilisée.

▪ Cytokine IL10

Concernant les kératinocytes en monocouche :

- Par immunocytochimie, l'intensité moyenne d'expression de l'IL10 par les kératinocytes en monocouche non stimulés et incubés sans lithium était très faible ( $0,33 \pm 0,26$ ). L'incubation avec le gluconate de lithium, à la concentration de 5mM, augmentait significativement l'intensité d'expression d'IL10 par les kératinocytes non stimulés (intensité d'expression passant de  $0,33 \pm 0,26$  à  $1 \pm 0,45$  :  $p=0,03$ ) et par les kératinocytes stimulés, que ce soit par le LPS (intensité d'expression passant de  $0,7 \pm 0,3$  à  $1,92 \pm 0,86$  :  $p=0,03$ ) ou avec le zymosan (intensité d'expression passant de  $0,88 \pm 0,44$  à  $1,75 \pm 0,8$  :  $p=0,03$ ) (Fig. 9 et 10).

Figure 10



- Par technique ELISA, la sécrétion d'IL10 par les cultures de kératinocytes en monocouche, stimulés ou non, était très faible ( $< 1\text{pg/ml}$ ) et n'était pas significativement modulée par le gluconate de lithium, quelque soit la concentration utilisée.

Concernant les explants cutanés :

- Par immunohistochimie, l'intensité moyenne d'expression de l'IL10 par les kératinocytes non stimulés et incubés sans lithium était modérée ( $2,08 \pm 0,66$ ). Le gluconate de lithium, quelque soit la concentration utilisée, ne modulait pas l'intensité d'expression de l'IL10 par les explants cutanés stimulés ou non.

- Par technique ELISA, La concentration moyenne d'IL10 dans les surnageants d'explants non stimulés et incubés sans gluconate de lithium était de  $35 \pm 17\text{ pg/ml}$ . Le gluconate de lithium, à la concentration de 5mM, augmentait, mais de manière non significative, la sécrétion d'IL10 par les explants non stimulés ( $62,8 \pm 53,6\text{ pg/ml}$ ) et stimulés par le zymosan ( $94,2 \pm 51,8$  versus  $87 \pm 82,3\text{ pg/ml}$ ). Cependant, la gluconate de lithium, à la concentration de 5mM, augmentait significativement la sécrétion d'IL10 par les explants stimulés par le LPS ( $96,7 \pm 37,7$  versus  $61 \pm 30,7\text{ pg/ml}$  :  $p=0,03$ ) (Fig. 11).

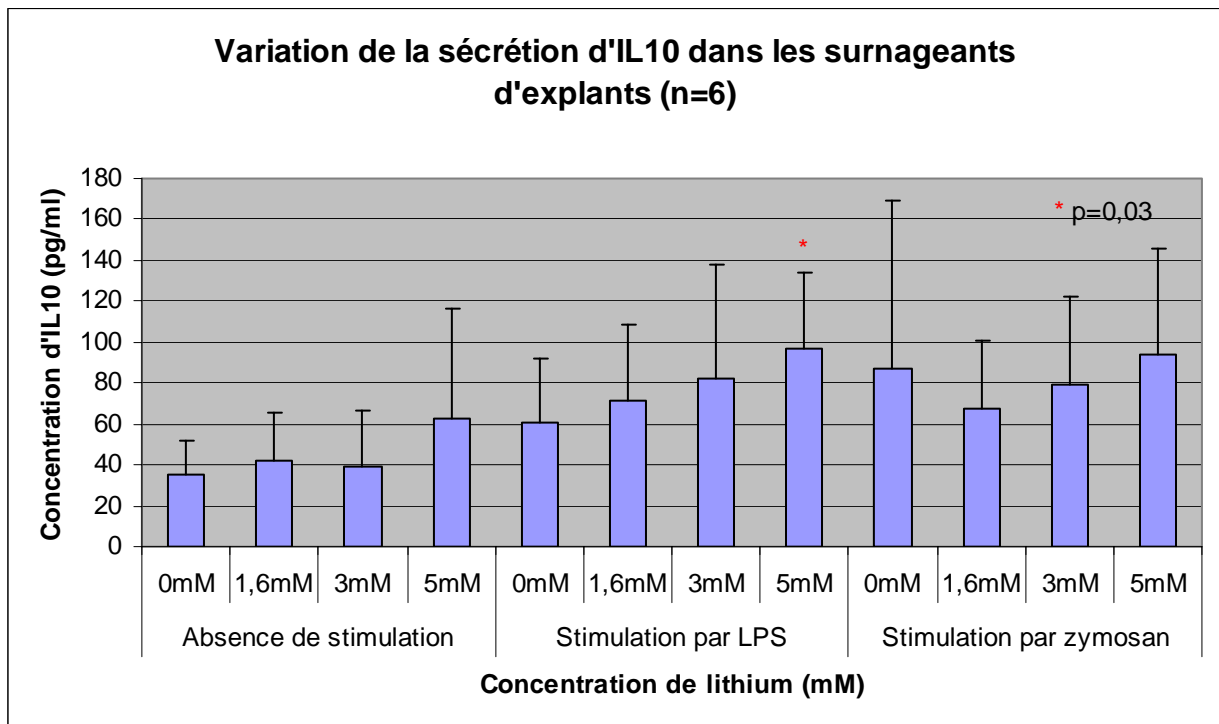


Figure 11

▪ Cytokine TGFβ1

Concernant les cultures de kératinocytes en monocouche :

-Par immunocytochimie, l'expression du TGFβ1 sur les kératinocytes en monocouche non stimulés et incubés en l'absence de gluconate de lithium était négative. Ni la stimulation par LPS ou zymosan, ni l'incubation avec le gluconate de lithium n'induisait d'expression de TGFβ1.

- Par technique ELISA, la sécrétion de TGFβ1 dans les surnageants de culture de kératinocytes en monocouche était très faible et non modulée par l'addition de lithium.



Concernant les explants cutanés :

- Par immunohistochimie, l'expression de TGF $\beta$ 1 était dermique et de faible intensité ( $1,33 \pm 0,6$ ). Le gluconate de lithium, quelque soit la concentration utilisée ne modulait pas l'expression de TGF $\beta$ 1 dans les explants cutanés stimulés ou non.

#### **E/ Effet modulateur du gluconate de lithium sur l'expression de TLR2 et TLR4.**

Concernant les cultures de kératinocytes en monocouche :

Les intensités d'expression de TLR2 et TLR4 étaient faibles ( $0,67 \pm 0,26$ ) au niveau des kératinocytes stimulés ou non et incubés en l'absence de lithium. Le gluconate de lithium, quelque soit la concentration utilisée, ne modulait pas de façon significative l'expression de TLR2 et TLR4.

Concernant les explants cutanés :

L'intensité moyenne d'expression de TLR4 par les explants cutanés non stimulés et incubés en l'absence de gluconate de lithium, était faible ( $1,5 \pm 0,5$ ) et principalement exprimés par les kératinocytes des couches suprabasales de l'épiderme. La stimulation par le LPS augmentait l'intensité d'expression de TLR4 ( $1,9 \pm 0,3$ ). Le gluconate de lithium à la concentration de 5mM diminuait significativement l'intensité d'expression de TLR4 par les explants stimulés par le LPS ( $1,25 \pm 0,6$  versus  $1,9 \pm 0,3$  :  $p=0,04$ ) (Fig. 12 et 13).

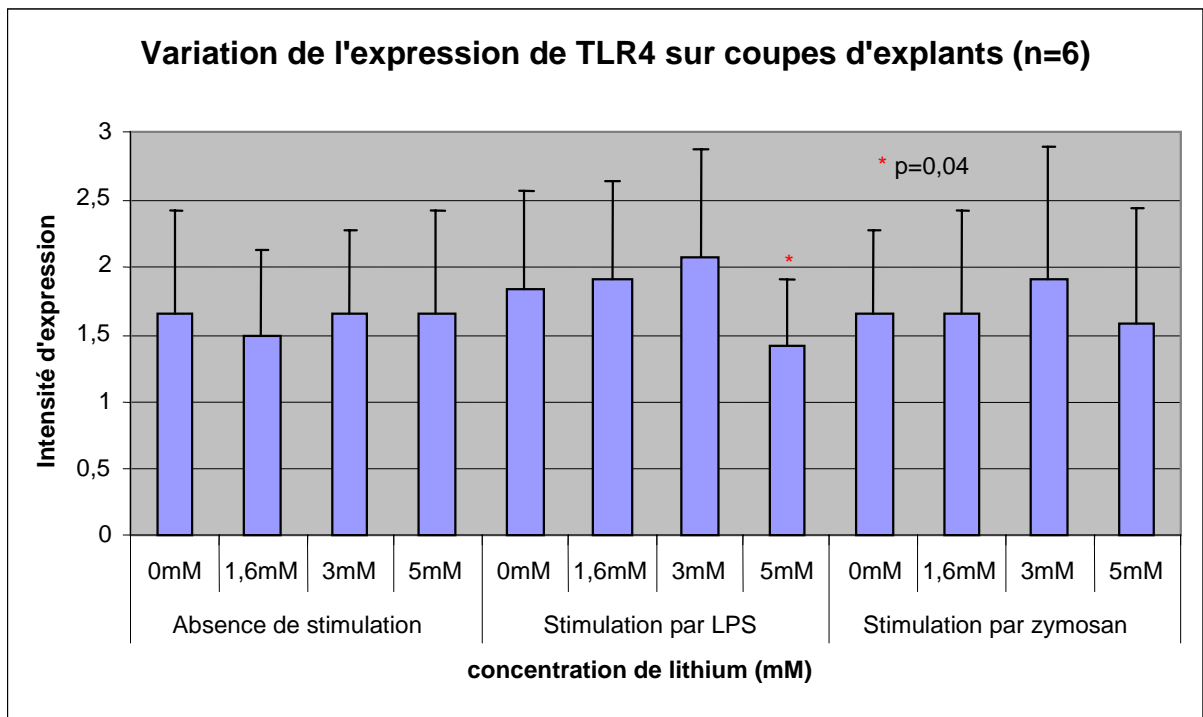


Figure 13

L'intensité moyenne d'expression de TLR2 par les explants cutanés non stimulés et incubés en l'absence de gluconate de lithium était modérée ( $2,25 \pm 0,75$ ) et principalement exprimée par les kératinocytes des couches suprabasales. La stimulation par le zymosan augmentait l'intensité d'expression de TLR2 ( $3 \pm 0$ ). Le gluconate de lithium à la concentration de 5mM diminuait significativement l'intensité d'expression de TLR2 par les explants stimulés par le zymosan ( $1,92 \pm 0,5$  :  $p=0,03$ ) (Fig. 14 et 15).

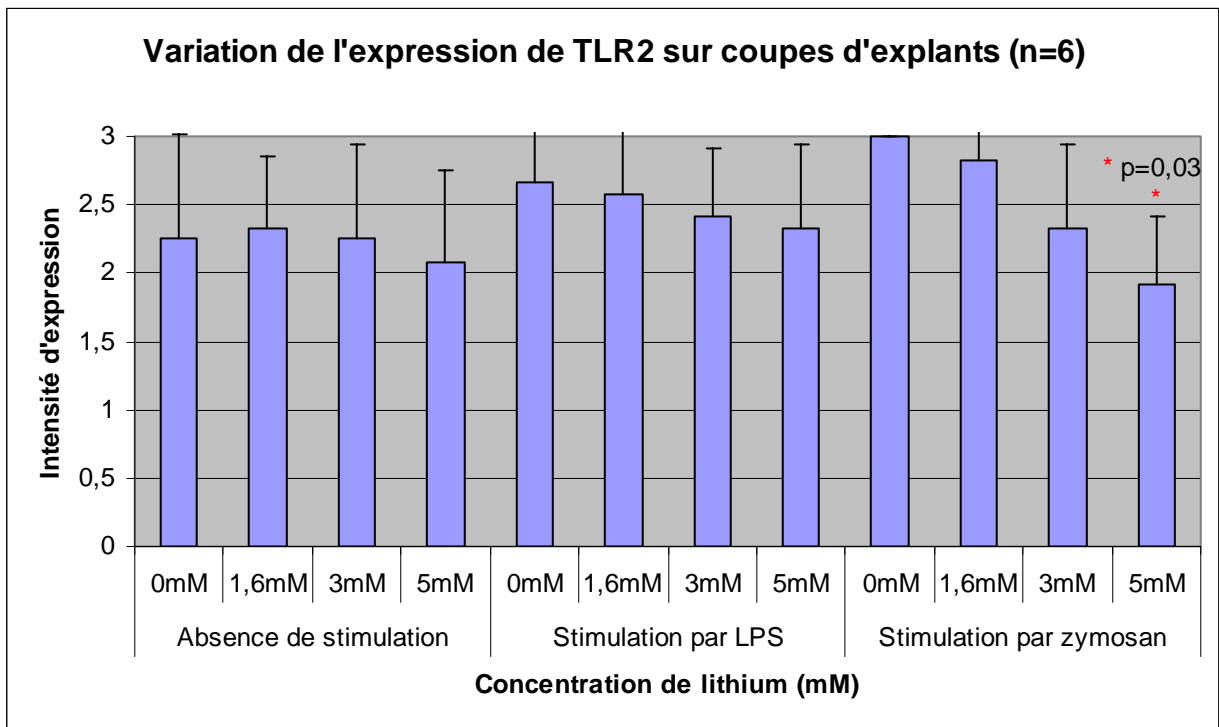


Figure 15

## DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'étudier, *in vitro*, l'effet modulateur du lithium sous la forme de gluconate, à 3 concentrations différentes, sur des kératinocytes stimulés ou non par le LPS ou le zymosan afin de rechercher si le kératinocyte pouvait être une cible d'action du gluconate de lithium. Nos résultats montrent que le kératinocyte est bien une cible du gluconate de lithium et que l'effet du gluconate de lithium sur les kératinocytes est dose-dépendant. A faible concentration (environ 1mM), le gluconate de lithium stimule la sécrétion de  $TNF\alpha$  par les kératinocytes. Au contraire, à plus forte concentration (5mM), il augmente la sécrétion d'IL10 et diminue l'intensité d'expression de TLR2 et TLR4 par les kératinocytes différenciés. De plus, à cette concentration, il n'augmente pas significativement la sécrétion de  $TNF\alpha$ .

Cette étude a été réalisée en utilisant deux modèles de culture cellulaire différents : les explants cutanés et les kératinocytes en monocouche. Les explants cutanés ont l'avantage d'être un modèle plus proche des conditions *in vivo* lors d'application de gluconate de lithium topique. Grâce à ce modèle, il est possible d'étudier tous les stades de différenciation épidermique et de localiser l'expression des marqueurs. Le modèle des kératinocytes en monocouche permet d'affirmer que la cible du gluconate de lithium au sein de l'épiderme est bien le kératinocyte. Nous avons examiné les effets du gluconate de lithium à trois concentrations différentes pour déterminer si, de la même manière que le zinc, les modulations du gluconate de lithium pouvait être dose-dépendantes [143].

Enfin, afin de reproduire expérimentalement une inflammation cutanée similaire à celle observée dans les lésions de dermatite séborrhéique, nous avons utilisé deux inducteurs de l'inflammation : le LPS et le zymosan. L'utilisation du zymosan comme

inducteur de l'inflammation a été décrite, in vivo, chez la souris (injection sous-cutanée) afin d'étudier les effets anti-inflammatoires de différentes substances [144]. In vitro, il a été utilisé dans des surnageants de culture de kératinocytes pour favoriser la libération de fractions de complément [145] ; mais il n'a jamais été utilisé pour stimuler des cultures de kératinocytes afin de déclencher une inflammation. Notre modèle expérimental d'incubation des kératinocytes avec le zymosan, nous semble intéressant in vitro car il permet de se rapprocher du modèle de dermatite séborrhéique. En effet, le zymosan est un polysaccharide provenant de la paroi d'une levure et stimule l'expression de TLR2 de manière comparable à *Malassezia* [23] . Il induit la sécrétion de cytokines pro inflammatoires, et active les voies de signalisation modulées par le gluconate de lithium, ce qui le rend intéressant dans notre étude. Il permet donc d'étudier précisément les effets modulateurs du gluconate de lithium sur l'inflammation induite par la levure sur les kératinocytes. Au contraire, le LPS déclenche une inflammation probablement plus intense que le zymosan mais moins spécifique. Il permet donc d'étudier l'effet modulateur du gluconate de lithium sur le microenvironnement inflammatoire décrit dans les lésions de dermatite séborrhéique.

Dans une première partie, nous avons étudié l'effet modulateur du lithium sur la prolifération kératinocytaire. Le gluconate de lithium, à la concentration de 5mM, diminue significativement la prolifération kératinocytaire dans les cultures de kératinocytes en monocouche après stimulation par le LPS. Cette diminution de la prolifération est également retrouvée dans les cultures de kératinocytes non stimulés ou stimulés par le zymosan mais de manière non significative. Au contraire, il a été décrit un effet mitogène du lithium sur des cellules de la lignée sanguine chez des patients dépressifs traités par lithium (la concentration thérapeutique étant alors de

1mM) [111]. Cet effet inducteur du lithium à faible concentration sur la prolifération des kératinocytes n'est pas retrouvé dans nos expériences sur les cultures en monocouche. Cependant, le test de viabilité réalisé au début de nos expériences montre une augmentation du nombre de cellules vivantes lors de l'incubation avec du gluconate de lithium à la concentration de 1,6mM. Ces différences observées pourraient être liées à une prolifération déjà intense des kératinocytes cultivés en monocouche ou à la nécessité d'interactions derme/épiderme pour potentialiser la réponse au gluconate de lithium.

Dans la deuxième partie, nous avons montré un effet inducteur du gluconate de lithium, à la concentration de 5mM, sur la différenciation des kératinocytes. Le lithium induit, en effet, une augmentation du pourcentage de cellules exprimant la K10 dans les kératinocytes en monocouche et une extension de l'expression de la filaggrine aux couches spineuses supérieures de l'épiderme des explants. Cet effet est plus marqué lorsque les kératinocytes sont stimulés par le LPS et surtout par le zymosan. Ainsi, alors que le lithium utilisé par voie systémique est connu pour induire ou aggraver un psoriasis, nos résultats montrent, qu'à 5mM le lithium pourrait diminuer la prolifération kératinocytaire et induire la différenciation précoce des cellules en prolifération ou accélérer la différenciation finale au niveau des cellules engagées dans le processus de différenciation. Des études concernant l'effet du lithium sur d'autres types cellulaires (cellules tubulaires rénales, cellules leucémiques) mettent aussi en évidence l'induction de la différenciation cellulaire par le lithium [107, 110]. Dans le cas de la dermatite séborrhéique, les lésions se caractérisent essentiellement par un infiltrat inflammatoire dermique superficiel, périvasculaire et périfolliculaire. Dans les lésions plus anciennes, on peut noter une acanthose

irrégulière et une altération de l'épiderme avec hyperprolifération et parakératose [146]. Les altérations de la différenciation épidermique sont principalement liées à l'inflammation. Ces anomalies (hyperprolifération, acanthose, parakératose) sont également retrouvées dans le psoriasis, où elles sont associées à une hyperkératose et à la présence de microabsés à polynucléaires neutrophiles. L'effet du gluconate de lithium topique pourrait donc s'expliquer par une inhibition de la prolifération kératinocytaire et une stimulation de la différenciation kératinocytaire. Cependant, les effets modulateurs du lithium sur la prolifération et la différenciation kératinocytaire ne sont pas tous observés de manière significative dans notre étude. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude sur un échantillon plus large afin de confirmer les modulations observées.

Dans une troisième partie, nous avons étudié les effets modulateurs du gluconate de lithium sur l'expression et la sécrétion de cytokines par les kératinocytes. De nombreuses études se sont intéressées aux effets du lithium sur la sécrétion de cytokines par différents types cellulaires [117, 118, 120, 147]. Cependant, la plupart des études étaient réalisées sur des cellules sanguines et les sels de lithium étaient utilisés à faibles concentrations, comprises entre 1 et 1,5mM. Notre étude est la seconde concernant les effets des sels de lithium sur la sécrétion de cytokines par des kératinocytes. La première, réalisée par Ockenfelds et al, mesurait seulement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par le chlorure de lithium (1,5mM) dans des cultures de kératinocytes et des co-cultures de kératinocytes et lymphocytes [120]. L'étude des effets à trois concentrations différentes, montre que l'effet du gluconate de lithium sur la sécrétion de cytokines est directement dépendante de la concentration de lithium utilisée. En effet, le gluconate de lithium à

faible concentration (1,6mM) a une action pro-inflammatoire, induisant la sécrétion de  $TNF\alpha$  à la fois par les explants stimulés par le LPS et par les kératinocytes cultivés en monocouche, qu'ils soient stimulés ou non. Cet effet pro-inflammatoire du gluconate de lithium in vitro a également été observé dans des études antérieures sur des cultures de cellules sanguines [105, 147]. mais aussi sur des cultures cellulaires stimulées, comme dans notre étude, par le LPS [118]. Parallèlement, il a été démontré que certains sels de lithium comme le chlorure de lithium pouvait potentialiser la cytotoxicité médiée par le  $TNF\alpha$  [147]. De manière intéressante, la concentration de 1,6mM de gluconate de lithium utilisée dans notre étude est proche des concentrations sériques observées chez des patients traités oralement par lithium pour des psychoses maniaco-dépressives. Ainsi, nos résultats, associés à ceux d'autres études, montre que le lithium à faible concentration (environ 1mM) a un effet pro-inflammatoire, au niveau cutané, par stimulation de la sécrétion de  $TNF\alpha$ . Ceci pourrait expliquer la survenue ou l'exacerbation, au cours du traitement, de dermatose inflammatoire telle que la psoriasis.

Concernant la seconde cytokine pro-inflammatoire, nous n'avons observé aucune modulation significative du gluconate de lithium sur la sécrétion ou l'expression d'IL6, quelque soit la concentration de lithium utilisée. Dans la littérature, les résultats des études des effets du lithium sur l'IL6 sont très variables [117, 118, 120, 148]. En effet, selon Rybakowski, le traitement chronique par lithium dans le cadre de maladies psychiatriques, diminuerait la sécrétion d'IL6, diminuant ainsi la phase aiguë de l'inflammation [117]. Au contraire, Beyaert montrait un effet synergique du chlorure de lithium associé au  $TNF\alpha$  sur la sécrétion d'IL6 [148]. Cependant, l'étude de Maes et al sur des surnageants de culture de sang total n'a pas retrouvé de modulation de la sécrétion d'IL6 lors d'incubation avec du lithium (72h) [118]. Enfin,



l'étude d'Ockenfelds et al mettait en évidence une augmentation de la sécrétion d'IL6 dans les cultures de kératinocytes psoriasiques mais pas dans les cultures de kératinocytes normaux [120]. Ces résultats très variables peuvent s'expliquer par les différents types cellulaires étudiés. Il est donc difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature mais nos résultats sont en accord avec ceux d'Ockenfelds ne retrouvant pas de modulation de la sécrétion d'IL6 par du lithium à faible dose sur des kératinocytes normaux.

Les sels de lithium utilisée de manière topique, induisent une concentration de lithium dans l'épiderme supérieure à 1mM [38]. Dans notre étude in vitro, 5mM correspond à la concentration maximale de gluconate de lithium utilisable sans entraîner une toxicité excessive sur les kératinocytes (Cf résultats du test MTT). Nos résultats montrent que, à fortes concentrations (5mM), le gluconate de lithium augmente l'expression d'IL10 par les kératinocytes en monocouche stimulés ou non et augmente la sécrétion d'IL10 par les explants cutanés stimulés par le LPS. Des résultats identiques étaient observés dans l'étude de Rapaport et al : seule étude s'étant intéressée aux effets du lithium à la dose de 5mM sur la production de cytokines [119]. Elle était réalisée sur des surnageants de culture de sang total et retrouvait une augmentation de la production de cytokines Th2 (IL4 et IL10) mais également une diminution de production de cytokines Th1 (IL2 et IFN $\gamma$ ). Il faut noter, cependant, dans notre étude, des différences entre les résultats observés dans les deux modèles de culture. En effet, la modulation du gluconate de lithium concerne l'expression d'IL10 dans les cultures de kératinocytes en monocouche alors qu'elle concerne la sécrétion d'IL10 dans les cultures d'explants cutanés. Ceci pourrait s'expliquer par la différence dans le stade de différenciation des kératinocytes dans les deux modèles. En effet, l'expression et la sécrétion d'IL10 est dépendante du

stade de différenciation des kératinocytes [149, 150]. De plus, l'absence de modulation de la sécrétion d'IL10 observée dans le modèle des kératinocytes en monocouche, pourrait s'expliquer par le délai d'incubation trop court pour observer la sécrétion d'IL10 par les kératinocytes seuls. En effet, les deux études ayant rapporté une augmentation de la sécrétion d'IL10 dans des surnageants de cultures de sang total (monocytes) stimulées par LPS, utilisaient des temps d'incubation longs : respectivement 72 heures et 5 jours [118, 119].

Nos résultats montrent également une différence entre les effets du gluconate de lithium, à la concentration de 5mM, observés sur des explants stimulés par le LPS : augmentation significative de la sécrétion d'IL10 ; ou stimulés par le zymosan : absence de modulation significative de la sécrétion d'IL10. Ceci pourrait s'expliquer de deux manières. La première hypothèse serait que la stimulation par le LPS est plus forte que la stimulation par le zymosan, entraînant donc une réponse anti-inflammatoire réactionnelle plus importante, plus précoce et significative. La seconde hypothèse serait que le gluconate de lithium agirait essentiellement sur le microenvironnement inflammatoire cutané mis en évidence dans les lésions de dermatite séborrhéique, qui pour certains auteurs explique la susceptibilité au développement de lésions de dermatite séborrhéique et à la colonisation par *Malassezia*. Mais, il agirait moins sur l'inflammation déclenchée par *Malassezia* elle-même. Ceci pourrait expliquer que le gluconate de lithium soit plus efficace que le kétoconazole dans le maintien de la rémission complète des lésions de dermatite séborrhéique.

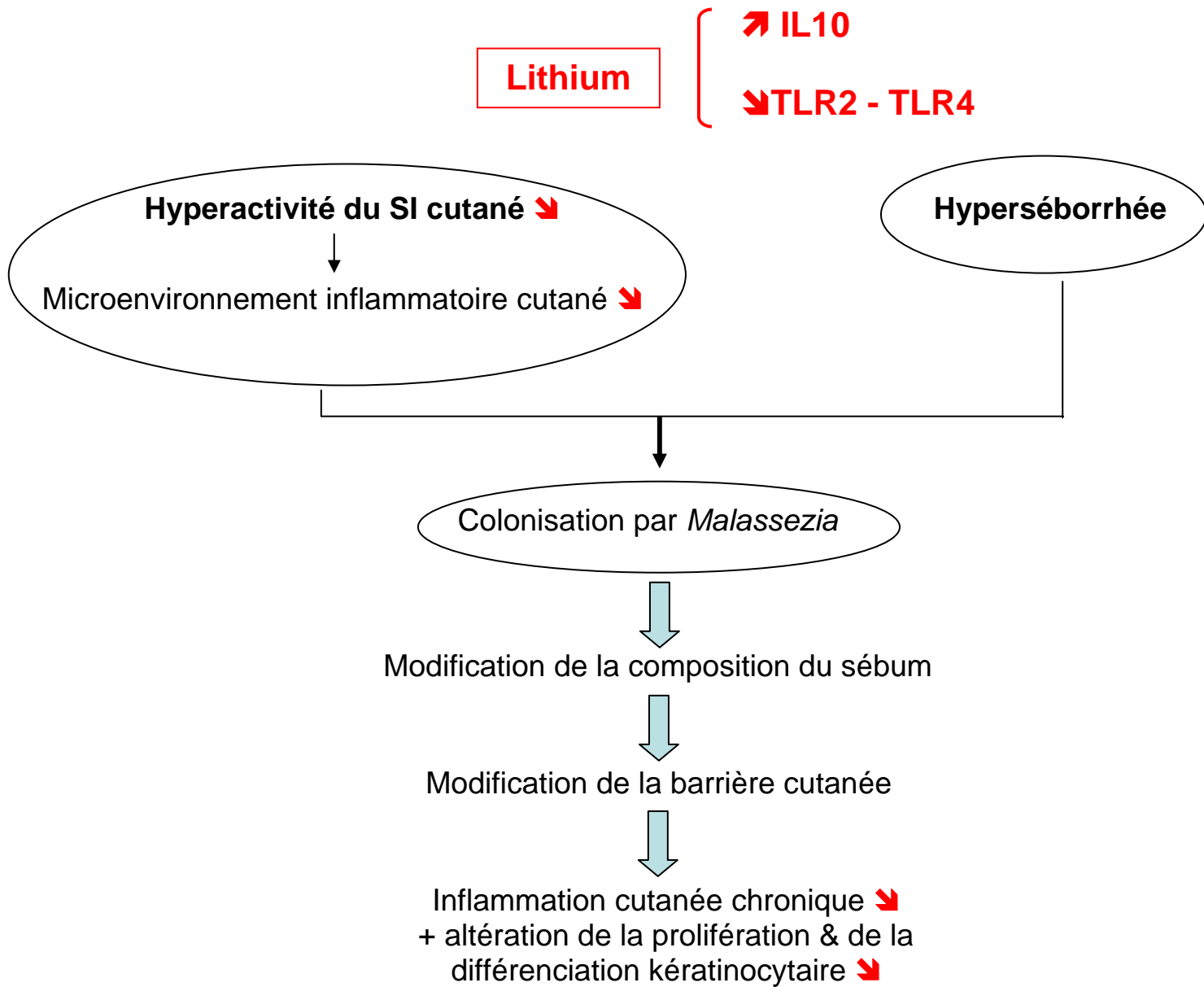
Ainsi, l'effet thérapeutique du gluconate de lithium dans la dermatite séborrhéique pourrait s'expliquer par l'induction de l'expression et de la sécrétion d'IL10. L'IL10 a de multiples fonctions, notamment, elle inhibe les capacités de présentation de

l'antigène des macrophages et des cellules dendritiques et inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4+. De plus, elle induit une prolifération des cellules Th2 [151], qui sont importantes dans la régulation de la réponse à des microorganismes [149]. L'IL10 agirait donc comme un frein à une réponse Th1 trop importante par conversion des cellules vers un profil Th2 : ce mécanisme de contre-régulation permettrait de restaurer l'homéostasie cutanée au niveau des lésions de DS.

Enfin, ce travail est le premier à avoir étudié les effets du gluconate de lithium sur l'expression de TLR2 et TLR4 par les kératinocytes. Nos résultats montrent que le gluconate de lithium diminue significativement l'expression de TLR2 et TLR4. Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires exprimés par de nombreuses cellules de l'immunité ainsi que par les kératinocytes. Leur activation stimule des voies de signalisation entraînant l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et la production de cytokines. Ils jouent ainsi un rôle essentiel dans l'activation de la réponse immunitaire innée à des agents pathogènes microbiens ou parasitaires. Ils contribuent donc à l'initiation et au maintien de la réponse inflammatoire. TLR2 reconnaît des peptidoglycanes, des lipoprotéines (produits de bactéries ou de parasites) et le zymosan alors que le TLR4 est très spécifique du LPS [152]. Leur rôle comme cible thérapeutique potentielle a été décrit récemment [153]. Par exemple, il a été rapporté que l'effet thérapeutique du Tacrolimus passerait par une diminution de l'expression de TLR2 et TLR4 [154]. Au contraire, l'Imiquimod serait un agoniste des TLRs [155]. La diminution de l'expression de TLR2 et TLR4 induite par le lithium, à la concentration de 5mM, pourrait donc être un autre effet anti-inflammatoire du lithium, en association avec la stimulation de la sécrétion d'IL10. En diminuant l'expression des TLRs, le lithium topique pourrait réguler la sensibilité du

système immunitaire cutané aux stimuli environnementaux. De plus, il a été démontré qu'il existait une augmentation de l'expression de TLR2 par les kératinocytes cultivés en présence de *Malassezia furfur*. La diminution de l'expression de TLR2 permettrait donc de diminuer les effets de *Malassezia* en peau lésionnelle, empêchant ainsi l'exacerbation de l'inflammation cutanée. Cependant, cet effet modulateur du lithium sur TLR2 et TLR4 n'est observé que sur les kératinocytes différenciés (modèle des explants cutanés) et non sur les kératinocytes en phase de prolifération (modèle des kératinocytes en monocouche). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'expression des TLRs est plus intense au niveau des couches suprabasales de l'épiderme, et donc corrélée avec le stade de différenciation des kératinocytes [156].

Le gluconate de lithium ferait donc partie de la classe des agents thérapeutiques modificateurs de la réponse immune [157]. Il modulerait le système immunitaire cutané (cytokines et récepteurs). En effet, nos résultats montrent que, premièrement, le gluconate de lithium stimule l'expression et la sécrétion d'une cytokine anti-inflammatoire (IL10) par les kératinocytes permettant de restaurer l'homéostasie cutanée au niveau des lésions de DS. Deuxièmement, il diminue l'expression de TLR2 et TLR4 par les kératinocytes, diminuant ainsi la sensibilité cutanée aux stimuli environnementaux. Ces deux actions anti-inflammatoires permettraient secondairement de limiter les effets de la colonisation par *Malassezia*.



## CONCLUSION

Ce travail a permis de démontrer que le kératinocyte était bien une cible d'action du gluconate de lithium, pouvant intervenir dans l'efficacité du gluconate de lithium dans la dermatite séborrhéique. Nos résultats montrent que les effets modulateurs du gluconate de lithium sur les kératinocytes sont dose-dépendant. En effet, de faibles concentrations de lithium (1,6mM) ont une action pro-inflammatoire au niveau cutané, principalement par sécrétion de  $TNF\alpha$  par les kératinocytes. Au contraire, à plus forte concentration (5mM), le gluconate de lithium a un effet anti-inflammatoire en stimulant la sécrétion d'IL10 et en diminuant l'expression de TLR2 et TLR4. Or, les concentrations de gluconate de lithium lors d'utilisation en traitement topique sont plus élevées qu'au cours de traitement systémique (où la concentration est de l'ordre de 1mM). Cet effet du gluconate de lithium en rapport avec la concentration pourrait expliquer ce qui est considéré comme un paradoxe : le lithium oral peut aggraver ou déclencher une dermatite séborrhéique alors que le lithium topique a un effet bénéfique sur les lésions de dermatite séborrhéique et semble même plus efficace que le kétoconazole, qui agit essentiellement en diminuant la colonisation par *Malassezia*.

Avec un moindre impact sur la dermatite séborrhéique, nous avons également démontré que le gluconate de lithium diminuait la prolifération et induisait la différenciation des kératinocytes. Or, il a été mis en évidence, au niveau des lésions de dermatite séborrhéique, une hyperprolifération et des anomalies de la différenciation des kératinocytes, conséquences de l'inflammation cutanée chronique. Le gluconate de lithium pourrait donc réguler le métabolisme des kératinocytes.

La poursuite de ce travail sur un plus grand nombre de donneurs permettra de confirmer nos résultats. Afin d'optimiser les modèles de culture, des souches de levures de type *Malassezia* pourraient être utilisées. Ceci permettrait ainsi de constituer un modèle de culture encore plus proche des lésions de dermatite séborrhéique observées in vivo et de compléter nos résultats. Par ailleurs, notre travail à l'échelon protéique pourrait être enrichi par des études moléculaires, notamment sur l'effet du lithium sur la voie NF $\kappa$ B. En effet, NF $\kappa$ B régule de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, immunitaire et dans la prolifération cellulaire et met en jeu les TLRs. Des travaux complémentaires seront donc nécessaires pour parfaire la compréhension des mécanismes d'action du lithium topique et éventuellement trouver de nouvelles indications thérapeutiques.

## **REMERCIEMENTS**

Nous remercions le Laboratoire Labcatal pour son aide.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1- Johnson M-LT, Roberts J. prevalence of dermatological diseases among persons 1-74 years of age (<http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanesi/4151.pdf>)
- 2- Plunkett A, Merlin K, Gill D, Zuo Y, Jolley D, Marks R. The frequency of common nonmalignant skin conditions in adults in central victoria, Australia. *Int J Dermatol* 1999 ;38 :901-8
- 3- Wolkenstein P, Bastuji-Garin S, Grob JJ, Ruzsyczynski S, Roujeau JC, Revuz J, au nom de la SFD. Les maladies de peau ; ce qu'elles représentent pour les français-sondage Sofres. Communication à la SFD : mai 2003.
- 4- Foley P, Zup Y, Plunkett A, Merlin K, Marks R. The frequency of common skin conditions in preschool-aged children in Australia : seborrheic dermatitis and pityriasis capitis. *Arch dermatol* 2003 ;139 :318-22.
- 5- Smith KJ, Skelton HG, Yeagerr J, Ledsky R, Mc Carthy W, Baxter D et al. Cutaneous findings in HIV-positive patients : A 42-month prospective study. (MMCARR). *J Am Acad Dermatol* 1994 ;31 :746-54.
- 6- Lifson AR, Hessel NA, Buchbinder SP, Holmberg SD. The association of clinical conditions and serologic tests with CD4+ lymphocyte counts in HIV-infected subjects without AIDS. *AIDS* 1991 ;5 :1209-15
- 7- Guillaume JC, Karneff MC, Revuz J. Dermite séborrhéique et cancers des voies aérodigestives supérieures. *Ann Dermatol Venerol* 1991;118:607-9.
- 8- Barba A, Piubello W, Vantini I, Caliarì S, Cocchetto R, Vallaperta et al. Skin lesions in chronic alcoholic pancreatitis. *Dermatologica* 1982 ;164 :322-6.
- 9- Cowley NC, Farr PM, Shuster S. The permissive effect of sebum in seborrhoeic dermatitis : an explanation of the rash in neurological disorders. *Br J dermatol* 1990 ;122 :71-6.
- 10- Marstrolonardo M, Diarferio A, Logroscino G. Seborrheic dermatitis, increased sebum excretion and parkinson's disease : a survey of (im)possible links. *Med Hypotheses* 2003 ;60 :907-11.
- 11- Maietta G, Grima P, Tagliaferro L, Pellegrino V. Patients with mood depression have a highest prevalence of seborrheic dermatitis. *Acta Dermatol Venereol* 1989;70:432-4.



- 12- Maitte G, Rongioletti F, Rebora A. Seborrheic dermatitis and daylight. *Acta Dermatol Venereol* 1991;171:538-9.
- 13- Gemmer CM, DeAngelis YM, Theelen B, Boekhout T, Dawson TL Jr. Fast, non invasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J Clin Microbiol* 2002;40:3350-7.
- 14- Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol* 2000;38:337-41.
- 15- McGinley KJ, Leyden JJ, Marples RR. Quantitative microbiology of the scalp in non dandruff, dandruff and seborrheic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1975;64:401-5.
- 16- Pechère M, Krischer J, Remondat C, Bertrand C, Trelu L, Saurat JH. *Malassezia* spp carriage in patients with seborrheic dermatitis. *J Dermatol* 1999;26:558-61.
- 17- Skinner RB Jr, Noah PW, Taylor RM, Zanollin MD, West S, Guin JD, Rosenberg EW. Double blind treatment of seborrheic dermatitis with 2% ketoconazole cream. *J Am Acad dermatol* 1985;12:852-6.
- 18- Faegermann J, Aly R, Maibach HI. Quantitative variations in distribution of *pytirosporom orbiculare* on clinically normal skin. *Acta Dermatol Venereol* 1983;63:346-8.
- 19- Heng MC, Hendeerson CI, Barker DC, Haberfelde G. Correlation of *pytirosporom ovale* density with clinical severity of seborrheic dermatitis as assessed by a simplified technique. *J Am Acad Dermatol* 1990;23:82-6.
- 20- Groissier D, Botone EJ, Lebwohl M. Association of *pytirosporom orbiculare* (*Malassezia furfur*) with seborrheic dermatitis with acquired immunodeficiency syndrom (AIDS). *J Am Acad Dermatol* 1989;20:770-3.
- 21- Wilker JR, Nieboer C, Willemze R. Quantitative skin culture of *pytirosporom* yeasts in patients seropositive for the human immunodeficiency virus with and without seborrheic dermatitis. *J Am Acad dermatol* 1992;27:37-9.
- 22- Schectman R, Midley G, Hay RJ. Colonization rates by *Malassezia* species of normal and affected skin of HIV positive seborrheic dermatitis patients. *Br J Dermatol* 1995;133:694-8.
- 23- Baroni A, Orlando M, Donnarumma G, Farro P, Iovene MR, Tufano MA, Buommino E. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates intracellular signalling in human keratinocytes in response to *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* 2006;297:280-8.

- 24- Midley G, Hay RJ. Serological responses to pityrosporum (*Malassezia*) in seborrhoeic dermatitis demonstrated by ELISA and Western blotting. *Bull Soc Mycol Med* 1988;17:267-76.
- 25- Bergbant IM, Johansson S, Robbins D, Scheynius A, Faegeermann J, Söderström T. An immunological study in patients with seborrhoeic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 1991;16:331-8.
- 26- Bergbant IM. Seborrhoeic dermatitis and pityrosporon ovale: cultural, immunological and clinical studies. *Acta Dermatol* 1991;167:1-36.
- 27- Neuber K, Krober S, Gruseck E, Abeck D, Ring J. Effects of *Pityrosporum ovale* in proliferation, immunoglobulin (IgA, G, M) synthesis and cytokine (IL2, IL10, IFN $\gamma$ ) production of peripheral blood mononuclear cells from patients with seborrhoeic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1996;288:532-6.
- 28- Molinéro LL, Gruber M, Leoni J, Woscoff A, Zwirner NW. Up-regulated expression of MICA and proinflammatory cytokines in skin biopsies from patients with seborrhoeic dermatitis. *Clin Immunol* 2003;106:50-4.
- 29- Faegermann J, Bergbant IM, Dohse M, Scott A, Westgate G. Seborrhoeic dermatitis and pityrosporon (*Malassezia*) folliculitis: characterization of inflammatory cells and mediators in the skin by immunochemistry. *Br J Dermatol* 2001;144:549-56.
- 30- Watanabe S, Kano R, Sato H, Nakamura Y, Hasegawa A. The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2001;116:769-773.
- 31- Baroni A, Perfetto B, Paoletti I, Ruocco E, Canozo N, Orlando M, Buommino E. *Malassezia furfur* invasiveness in a keratinocyte cell line (HaCat): Effects on cytoskeleton and on adhesion molecule and cytokine expression. *Arch Dermatol Res* 2001;293:414-419.
- 32- Riciputo RM, Oliveri S, Micali G, Sapuppo A. Phospholipase activity in *Malassezia* pathogenic strains. *Mycoses* 1996 ;39 :233-5.
- 33- Burton JL, Pye RJ. Seborrhoea is not a feature of seborrhoeic dermatitis. *BMJ* 1983;286:1169-70.
- 34- Shaich B, Korting HC, Hollmann J. Hautlipide bei mit seborrhoea und sebstase assoziierten hauterkrankungen. *Hautarzt* 1993;44:75-80.
- 35- DeAngelis YM, Gemmer CM, Kaczvinsky JR, Kennaely DC, Schwartz JR, Dawson TL Jr. Three etiologic facets of dandruff and seborrheic dermatitis:

- Malassezia fungi, sebaceous lipids, and individual sensitivity. J Invest Dermatol Symp Proc 2005;10:295-297.
- 36- Ro Bi, Dawson TL. The role of sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff. J Invest Dermatol Symp Proc 2005;10:194-7.
- 37- Gupta AK, Madzia SE, Batra R. Etiology and management of seborrheic dermatitis. Dermatology 2004;208:89-93.
- 38- Horrobin DF. Lithium, fatty acid and seborrheic dermatitis: a new mechanism of lithium action and a new treatment of seborrheic dermatitis. Lithium 1990;1:149-55.
- 39- Pinkus H, Mehregan AH. The primary histologic lesion of seborrheic dermatitis and psoriasis. J Invest Dermatol 1966 ;46 :109-16.
- 40- Berbis P. Dermatite séborrhéique: la clinique chez l'adulte. Ann Dermatol Venereol 2004;13:126-9.
- 41- Soeprono FF, Schinella RA, Cockerell CJ, Comite SL. Seborrheic-like dermatitis of acquired immunodeficiency syndrome. A clinicopathologic study. J Am Acad Dermatol 1986;14:242-8
- 42- Schaub NA, Drewe J, Sponagel L, Gilli L, Courvoisier S, Gyr N, Ruffli T, Battegay M, Itin P. Is there a relation between risk group or initial CD4 T cell counts and prevalence of seborrheic dermatitis in HIV-infected patients? Dermatology 1999;198:126-9
- 43- Garcia-Silva J, Almagro M, Pean C, Lopez Calvo S, Castro A, Soriano V, Fonseca E. CD4+ T-lymphocytopenia, Kaposi's sarcoma, HHV-8 infection, severe seborrheic dermatitis, and onychomycosis in a homosexual man without HIV infection. Int J dermatol 1999;38:231-3
- 44- Ippolito F, Passi S, Di Carlo A. Is seborrheic dermatitis a clinical marker of HIV disease, Minerva Ginecol 2000;52:54-8
- 45- Lorette G. La dermatite séborrhéique de l'enfant. Ann Dermatol Venereol 2004;131:123-5
- 46- Katayama I, Sawada Y, Nishioka K. The seborrheic pattern of dermatomyositis. Br J Dermatol 1999;140:978-9
- 47- Perniciaro C, Peters MS. Tinea faciale mimicking seborrheic dermatitis in a patient with AIDS. N Engl J med 1986;314:315-6
- 48- Beetens JR, Loots W, Somers Y, Coene MC, Clerck F. Ketoconazole inhibits the biosynthesis of leukotrienes in vitro and in vivo. Biochem Pharmacol 1986;35:883-91.

- 49- Carr MM, Pryce DM, Ive FA. Treatment of seborrhoeic dermatitis with ketoconazole: I. Response of seborrhoeic dermatitis of the scalp to topical ketoconazole. *Br J Dermatol* 1987;116:213-6.
- 50- Green CA, Farr PM, Shuster S. Treatment of seborrhoeic dermatitis with ketoconazole: II. Response of seborrhoeic dermatitis of the face, scalp and trunk to topical ketoconazole. *Br J Dermatol* 1987;116:217-21.
- 51- Skinner RB Jr, Noah PW, Taylor RM, Zanolli MD, West S et al. Double-blind treatment of seborrhoeic dermatitis with 2% ketoconazole cream. *J Am Acad Dermatol* 1985;12:852-6.
- 52- Danby FW, Maddin WS, Margesson LJ, Rosenthal D. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of ketoconazole 2% shampoo versus selenium sulphide 2,5% shampoo in the treatment of moderate to severe dandruff. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:1008-12.
- 53- Peter RU, Richard-Barthauer U. Successful treatment and prophylaxis of scalp seborrhoeic dermatitis and dandruff with 2% ketoconazole shampoo: results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Dermatol* 1995;132:441-5.
- 54- Dobrev H, Zissova L. Effect of ketoconazole 2% shampoo on scalp sebum level in patients with seborrhoeic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 1997;77:132-4.
- 55- Elewski B, Ling MR, Philips TJ. Efficacy and safety of a new once-daily topical ketoconazole 2% gel in the treatment of seborrhoeic dermatitis: a phase III trial. *J Drugs Dermatol* 2006;5:646-50.
- 56- Dupuy P, Maurette C, Amoric JC, Chosidow O; Study investigator group. Randomized, placebo-controlled, double-blind study on clinical efficacy of ciclopiroxolamine 1% cream in facial seborrhoeic dermatitis. *Br J Dermatol* 2001;144:1033-7.
- 57- Unholzer A, Varigos G, Nicholls D, Schinzel S, Nietsch KH, Ulbricht H et al. Ciclopiroxolamine cream for treating seborrhoeic dermatitis: a double-blind parallel group comparison. *Infection* 2002;30:373-6.
- 58- Chosidow O, Maurette C, Dupuy P. Randomized, open-labeled, non-inferiority study between ciclopiroxolamine 1% cream and ketoconazole 2% foaming gel in mild and moderate facial seborrhoeic dermatitis. *Dermatology* 2003;206: 233-40.
- 59- Roques C, Brousse S, Panizzutti C. In vitro antifungal efficacy of ciclopiroxolamine alone and associated with zinc pyrithione compared to

ketoconazole against *Malassezia globosa* and *Malassezia restricta* reference strains. *Mycopathologica* 2006;162:395-400.

60- Segal R, David M, Ingber A, Lurie R, Sandbank M. Treatment with bifonazole shampoo for seborrhoea and seborrheic dermatitis: a randomized, double-blind study. *Acta Derm venereol* 1992;72:454-5.

61- Zienicke H, Korting HC, Braun-Falco O, Effendy I, Hagedorn M, Kuchmeister B et al. Comparative efficacy and safety of bifonazole 1% cream and the corresponding base preparation in the treatment of seborrheic dermatitis. *Mycoses* 1993;36:325-31.

62- Faegermann J, Jones JC, Hettler O, Loria Y. *Pityrosporum ovale* (*Malassezia furfur*) as the causative agent of seborrheic dermatitis: new treatment options. *Br J Dermatol* 1996;134: 12-5.

63- Rigopoulos D, Katsambas A, Antoniou C, Theocharis S, Stratigos J. Facial Seborrheic dermatitis treated with fluconazole 2% shampoo. *Int J Dermatol* 1994;133: 136-7.

64- Merlino A, Malvano L, Cervetti O, Forte M. Role of *Malassezia furfur* in seborrheic dermatitis in adults and therapeutic efficacy of fenticonazole. *G Ital Dermatol Venereol* 1988;123: 37-49.

65- Faegermann J. Seborrheic dermatitis and *Pityrosporum orbiculare*: treatment of seborrheic dermatitis of the scalp with miconazole-hydrocortisone (Daktacort), miconazole and hydrocortisone. *Br J Dermatol* 1986;11: 695-700.

66- Stratigos JD, Antoniou C, Katsambas A, Bohler K, Fritsch P, Schmolz A et al. Ketoconazole 2% cream versus hydrocortisone 1% cream in the treatment of seborrheic dermatitis. A double-blind comparative study. *J Am Acad dermatol* 1988;19 :850-3.

67- Katsambas A, Antoniou C, Frangouli E, Avgerinou G, Michailidis D et al. Double-blind trial of treatment of seborrheic dermatitis with 2% ketoconazole cream compared with 1% hydrocortisone cream. *Br J Dermatol* 1989;121: 353-7.

68- Ortonne JP, Lacour JP, Vitetta A, Le Fichoux Y. Comparative study of ketoconazole 2% foaming gel and betamethasone dipropionate 0,05% lotion in the treatment of seborrheic dermatitis in adults. *Dermatology* 1992;184: 275-80.

69- Pari T, Pulimood S, Jacob M, George S, Jeyaseelan L, Thomas K. Randomised double blind controlled trial of 2% ketoconazole cream versus 0,05% clobetasol 17-

butyrate cream in seborrheic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998;10 :89-90.

70- Pierard-Franchimont C, Pierard G. A double-blind placebo-controlled study of ketoconazole + desonide gel combination in the treatment of facial seborrheic dermatitis. *Dermatology* 2002;204 :344-7.

71- Bonnetblanc JM, Bernard P. Benzoyl peroxide in seborrheic dermatitis. *Arch Dermatol* 1986;122:752.

72- Bonnetblanc JM, De Prost Y, Bazex J, Maignan-Gayraud P. Treatment of seborrheic dermatitis with benzoyl peroxide. *Ann Dermatol Venereol* 1990;117:123-5.

73- Parsad D, Pandhi R, Negri KS. Topical metronidazole in seborrheic dermatitis- a double blind study. *Dermatology* 2001;202:35-7.

74- Seckin D, Gurbuz O, Akin O. Metronidazole 0,75% gel vs. ketoconazole 2% cream in the treatment of facial seborrheic dermatitis: a randomized, double-blind study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:345-50.

75- Koca R, Altinyazar HC, Esturk E. Is topical metronidazole effective in seborrheic dermatitis? A double-blind study. *Int J Dermatol* 2003;42:632-5.

76- Faegermann J. Propylene glycol in the treatment of seborrheic dermatitis of the scalp: a double-blind study. *Cutis* 1988;42:69-71.

77- Kowazick L, Schlenaidner UK. An open pilot study of calcipotriol in seborrheic eczema. *J Dermatol Treat* 1998;9:49-51.

78- Berth-Jones J, Adnitt PI. Topical calcipotriol is not effective in facial seborrheic dermatitis. *J Dermatol Treat* 2001;12:179.

79- Meshkinpour A, Sun J, Weinstein G. An open pilot study using tacrolimus ointment in the treatment of seborrheic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:145-7.

80- Braza TJ, DiCarlo JB, Soon SL, McCall CO. Tacrolimus 0,1% ointment for seborrheic dermatitis: an open-label pilot study. *Br J Dermatol* 2003;148:1242-4.

81- Crutchfield CE 3<sup>rd</sup>. Pimecrolimus: a new treatment for seborrheic dermatitis. *Cutis* 2002;70:207-8.

82- Warshaw EM, Wohlhuter RJ, Liu A, Zeller SA, Wenner RA, Bowers S, Scultz JC, Katz HI, McCormick CL, Parneix-Spake A. Results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled efficacy trial of pimecrolimus cream 1% for the treatment of moderate to severe facial seborrheic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2006;21.

- 83- Ford GP, Farr PM, Ive FA, Shuster S. The response of seborrheic dermatitis to ketoconazole. *Br J Dermatol* 1984;11:603-7.
- 84- Scaparro E, Quadri G, Virno G, Orifici C, Milani M. Evaluation of the efficacy and tolerability of oral terbinafine (daskil) in patients with seborrheic dermatitis. A multicenter, randomized, investigator-blinded, placebo-controlled trial. *Br J Dermatol* 2001;144:54-7.
- 85- Pierard GE, Ausma J, Henry F, Vroome V, Wouters L, Borgers M, Cauwenbergh G, Pierard-Franchimont C. A pilot study on seborrheic dermatitis using pramiconazole oral anti-Malassezia agent. *Dermatology* 2007;214: 162-9.
- 86- Pirkhammer D, Seeber A, Honigsmann H, Tanew A. Narrow-band ultraviolet B (ATL-01) phototherapy is an effective and safe treatment option for patients with severe seborrheic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2000 ;143:964-8.
- 87- Quereux G, Dreno B, Chosidow O. Traitement de la dermatite séborrhéique. *Ann Dermatol Vénéréol* 2004 ;131 :130-4.
- 88- Mortureux P, Labrèze C, Couprie B, Taïeb A. Etude en double aveugle contre excipient du kétoconazole crème 2% dans le traitement de la dermatite séborrhéique du nourrisson. *Ann Dermatol Vénéréol* 1995 ;122 :S84.
- 89- Michel JL, Coinde E, Chalencon V, Stephan JL. Hyperéosinophilie majeure induite par une application locale de kétoconazole chez un prématuré. *Ann Dermatol Vénéréol* 2000 ;127 :405-7.
- 90- Kupfer-Bessagnet I, Misery L, Plantin P. Traitement de la dermatite séborrhéique. *Ann Dermatol Vénéréol* 2004 ;131 ;998.
- 91- Wannankhul S, Chiabunkana J. Comparative study of 2% ketoconazole cream and 1% hydrocortisone cream in the treatment of infantile seborrheic dermatitis. *J Med Assoc Thai* 2004 ;87 :568-71.
- 92- Christodoulou GN, Vareltzides AG. Positive side effects of lithium ? *Am J Psychiatr* 1978 ;135 :1249
- 93- Christodoulou GN, Georgala S, Vareltzides AG, Catsarou A. Lithium in seborrheic dermatitis. *Psychiat J Univ Ottawa* 1983 ;8 :27-9.
- 94- Dreno B, Moyse D. Lithium gluconate in the treatment of seborrheic dermatitis : a multicenter, randomised, double-blind study versus placebo. *Eur J Dermatol* 2002 ;12 :549-52.

- 95- Dreno B, Chosidow O, Revuz J, Moyse D. Lithium gluconate 8% vs ketoconazole 2% in the treatment of seborrhoeic dermatitis : a multicenter, randomized study. *Br J Dermatol* 2003 ;148 :1230-6.
- 96- Baraban JM, Worley PF, Snyder SH. Second messenger systems and psychoactive drug action : focus on the phosphoinositide system and lithium. *Am J Psychiatry* 1989 ;146 :1251-60.
- 97- Shaldubina A, Agam G, Belmaker RH. The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later. *Prog Neuro-psychopharmacol & Biol Psychiatr* 2001;25:855-66.
- 98- Bitran JA, Manji HK, Potter WZ, Gusovsky F. Down regulation of PKC alpha by lithium in vitro. *Psychopharmacol Bull.* 1995;31:449-52.
- 99- Manji HK, Potter WZ, Lenox RH. Signal transduction pathways. Molecular targets of lithium's action. *Arch Gen Psychiatry* 1995 ;52 :531-43.
- 100- DiGiovanna JJ, Aoyagi T, Taylor JR, Halprin KM. Inhibition of epidermal adenylyl cyclase by lithium carbonate. *J Invest Dermatol*1981 ;76 :259-63.
- 101- Quiroz JA, Gould TD, Manji HK. Molecular effects of lithium. *Mol Interv* 2004 ;4 :259-72.
- 102- Dichtl B, Stevens A, Tollervey D. Lithium toxicity in yeast due to the inhibition of RNA processing enzymes. *Embo J* 1997;16:7184-95.
- 103- Horrobin DF. Effect of lithium on essential fatty acid and prostaglandin metabolism. In : lithium and cell physiology, Springer-Verlag. New-York eds, 1990 :137-49.
- 104- Chang MC, Jones CR. Chronic lithium treatment decreases brain phospholipase A2 activity. *Neurochem res* 1998; 23:887-92.
- 105- Wilson R, Fraser WD, McKillop JH, Smith J, O'Reilly DS, Thompson JA. The « in vitro » effects of lithium on the immune system. *Autoimmunity* 1989 ;4 :109-14.
- 106- Rybakowski JK, Amsterdam JD, Prystowsky MD. Blood cell indices in affective patients during lithium prophylaxis. *Lithium* 1993 ;4 :205-9.
- 107- Nordenberg J, Fenig E, Landau M, Weizman R, Weizman A. Effects of psychotropic drugs on cell proliferation and differentiation. *J Biochem Pharmacol* 1999 ;58 :1229-3.
- 108- Hasgekar NN, Gohkhale PP, Amin MK, Shesadri R, Lalitha VS. Lithium inhibits growth in a murine neural precursor cell line . *Cell Biol Int* 1996;20:781-786.



- 109- Paduart O, Heenen M. Pharmacological action of lithium in the pathogenesis of psoriasis. *Eur J Dermatol* 1995 ;5 :413-5.
- 110- Davies JA, Garrod DR. Induction of early stages of kidney tubule differentiation by lithium ions. *Dev Biol* 1995 ;167 :50-60.
- 111- Friedenbergr WR, Mars JJ. The effect of lithium carbonate on lymphocyte, granulocyte et platelet function. *Cancer* 1980;45:91-7.
- 112- Bloomfield FJ, Young MM. Influence of lithium and fluoride on degranulation of human neutrophils in vitro. *Inflammation* 1982;6:257-67.
- 113- Lazarus GS, Gilgor RS, Durham NC. Psoriasis, polymorphonuclear leukocytes and lithium carbonate: an important clue. *Arch Dermatol* 1979;115:1183-4
- 114- Kucharz EJ, Sieralowski S, Staite ND, Goodwin JS. Mechanism of lithium induced augmentation of T-cells proliferation. *Int J Immunopharmacol* 1988;10:253-9.
- 115- Fernandez LA, Fox RA. Perturbation of human immune system. *Clin Exp Immunol* 1980;41:527-32.
- 116- Sparsa A, Bonnetblanc JM. Lithium. *Ann Dermatol Venereol* 2004 ;131 :255-261.
- 117- Rybabowski JK. Antiviral and immunomodulatory effect of lithium. *Pharmacopsychiatry* 2003 ;33 :159-64.
- 118- Maes M, Song C, Lin A, Pioli R, Kenis G, Kubera M, Bosmans E. In vitro immunoregulatory effects of lithium in healthy volunteers. *Psychopharmacol* 1999 ;143 :401-7.
- 119- Rapaport MH, Manji HK. The effects of lithium on ex vivo cytokine production. *Biol Psychiatry* 2001 ;50 :217-224.
- 120- Ockenfels HM, Wagner SN, Keim-Maas C, Funk R, Nussbaum G, Goos M. Lithium and psoriasis : cytokine modulation of cultured lymphocytes and psoriatic keratinocytes by lithium. *Arch Dermatol Res* 1996 ;288 :173-8.
- 121- Lambert D, Beylot C, Mazet J, Verret JL, Delperon C, Weber M. Drug eruptions caused by lithium salts. *Ann Med Interne* 1984 ;135 :637-8.
- 122- Yeung CK, Chan HH. Cutaneous adverse effects of lithium : epidemiology and management. *Am J Clin Dermatol* 2004 ;5 :3-8.
- 123- Chan HH, Wing Y, Su R, et al. A control study of cutaneous side effects of chronic lithium therapy. *J Affect Disord* 2000 ;57 :107-13.
- 124- Bloomfield FJ, Young MM. Enhanced release of inflammatory mediators from lithium-stimulated neutrophils in psoriasis. *Br J Dermatol* 1983 ;109 :9-13.

- 125- Wolf R, D'Avino M, De Angelis F, Ruocco E, Lombardi ML. Effects of lithium carbonate ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) on in-vitro-cultured normal human skin explants. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2000;14:97-9
- 126- Lin XR, Huang T, Yang CM. Histological changes induced by application of lithium carbonate to mouse ear skin. *Arch Dermatol Res* 1990;282:280-281.
- 127- Bosetti F, Rintala J, Seeman R, Rosenberg TA, Contreras MA, Rapoport SI et al. Chronic lithium downregulates cyclooxygenase-2 activity and prostaglandin E (2) concentration in rat brain. *Mol Psychiatry* 2002;7:845-50.
- 128- Boyle J, Burton JL, Faergemann J. use of topical lithium succinate for seborrhoeic dermatitis. *Br Med J* 1986 ;292 :28.
- 129- Cuelenaere C, De Bersaques J, Kint A. Use of topical lithium succinate in the treatment of seborrhoeic dermatitis. *Dermatology* 1992 ;184 :194-7.
- 130- Leeming JP, Burton JL. Lithium succinate and seborrhoeic dermatitis : an antifungal mode of action ? *Br J Dermatol* 1990 ;122 :718-9.
- 131- Nenoff P, Hausteil UF, Munzberger C. In vitro activity of lithium succinate against *Malassezia furfur*. *Dermatology* 1995 ;190 :48-50.
- 132- Asensio J, Ruiz-Argüeso T, Rodriguez-Navarro A. Sensitivity of yeasts to lithium. *Antonie van Leeuwenhoek* 1976;42:1-18.
- 133- Smith BE, O'Day DH, Proteau GA. Lithium in the mating response and cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:401-7.
- 134- Yenush L, Belles JM, Lopez-Coronado JM, Gil-Mascarell R, Serrano R, Rodriguez PL. A novel target of lithium therapy. *FEBS Lett* 2000;467:321-5.
- 135- Spielberg BD, Dela Cruz J, Law TH, York JD. Alteration of lithium pharmacology through manipulation of phosphoadenosine phosphate metabolism. *J Biol Chem* 2005;280:5400-5.
- 136- Efalith Multicenter Trial Group. A double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of lithium succinate ointment in the treatment of seborrheic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:452-7.`
- 137- Langtry JAA, Rowland Payne CME, Staughton RDC, Stewart JCM, Horrobin DF. Topical lithium succinate ointment (Efalith) in the treatment of AIDS-related seborrhoeic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 1997;22:216-9.
- 138- Schou M. Pharmacology and toxicology of lithium. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1976;16:231-43.

- 139- Kock A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* 1990;172:1609-14.
- 140- Muta T, Takeshige K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4. *Eur J Biochem* 2001 ;268 :4580-89
- 141- Sanguedolce MV, Capo C, Bongrand P, Mege JL. Zymosan-stimulated TNF- $\alpha$  production by human monocytes. *J Immunol* 1992 ;148 :2229-36
- 142- Sanguedolce MV, Capo C, Bouhamdan M, Bongrand P, Huang CK, Mege JL. Zymosan-induced tyrosine phosphorylations in human monocytes. Role of protein kinase C. *J Immunol* 1993 ;151 :405-14.
- 143- 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
- 144- Gado K, Gigler G. Zymosan inflammation : a new method suitable for evaluating new anti-inflammatory drugs. *Agents and Actions* 1991 ;32 :119-121.
- 145- Basset-Seguin N, Wright Caughman S, Yancey KB. A-431 cells and human keratinocytes synthesize and secrete the third component of complement. *J Invest Dermatol* 1990;95:621-25.
- 146- Warner RR, Schwartz JR, Boissy Y, Dawson TL. Dandruff has an altered stratum corneum ultrastructure that is improved with zinc pyrithione shampoo. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:897-903.
- 147- Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Suffys P, Van Roy F, Fiers W. Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:9494-9498.
- 148- Beyaert R, Schulze-Osthoff K, Van Roy F, Fiers W. Synergistic induction of interleukin-6 by tumor necrosis factor and lithium chloride in mice: possible role in triggering and exacerbation of psoriasis by lithium treatment. *Eur J Immunol* 1992;22:2181-2184.
- 149- Boniface A, Lecron JC, Bernard FX, Dagregorio G, Guillet G, Nau F, Morel F. Keratinocytes as targets for IL-10 related cytokines: a putative role in the pathogenesis of psoriasis. *Eur Cytokine Netw* 2006 ;16:1-11.

- 150- Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. Interleukin-10 production by cultures human keratinocytes: regulation by UVB and UVA1 radiation. *J Invest Dermatol* 1995;104:3-6.
- 151- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Gara A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 14:3444.
- 152- Pivarsci A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-szarbo A, Koreck A, Szell M et al. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 2003;15:721-30.
- 153- Cristofaro P, Opal SM. Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs* 2006;66:15-29
- 154- Xie ZQ, Liu LL, Yang GY, Zhu XJ. Effect of topical tacrolimus ointment on expression of Toll-like receptors 2 and 4 in lesional atopic dermatitis skin. *Beijing Da Xue Bao* 2006;38:420-3.
- 155- McInturff JE, Modlin RL, Kim J (2005) The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol* 125:1-8.
- 156- Pivarsci A, Koreck A, Bodai L, Szell M, Szeg C, Belso N, Kenderessy-Szabo A, Kemeny L. Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCat keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2004; 296:120-124.
- 157- Sauder DN. Mechanism of action and emerging role of immune response modifier therapy in dermatologic conditions. *J Cutan Med Surg* 2004 ;8 :3-12.

## ANNEXE

### ETUDE DE L'EXPRESSION DE CYTOKINES SUR BIOPSIE DE DERMATITE SEBORRHEIQUE : TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

Marqueur étudié	Intensité d'expression	Localisation
TNF $\alpha$	++	Couches suprabasales
IL6	+	Couches suprabasales
IL10	+	Couches basales
TGF $\beta$ 1	+	Dermique, périvasculaire
K10	+++	Couches suprabasales
Filaggrine	++	Couche cornée et granuleuse
TLR2	+++	Couches suprabasales
TLR4	++	Couches suprabasales

NOM : BALLANGER

Prénom : Fabienne

**TITRE** : Mise en évidence des effets anti-inflammatoires du Gluconate de lithium dans la dermatite séborrhéique

## RESUME

Le gluconate de lithium (Li) topique est un traitement efficace de la dermatite séborrhéique (DS). Cependant, son mécanisme d'action reste mal compris. Le but de notre travail était d'étudier in vitro, l'effet modulateur du Li sur la prolifération, la différenciation kératinocytaire, l'expression et la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires et sur l'expression des Toll-like receptors (TLR) 2 et 4. Pour cela, des kératinocytes cultivés en monocouche et des explants cutanés étaient stimulés ou non avec du LPS ou du zymosan afin d'induire une inflammation, puis étaient incubés avec le Li à 1,6 ; 3 ou 5mM, ou avec un milieu contrôlé. L'expression de Ki67, de la kératine 10, de la filaggrine, des cytokines  $TNF\alpha$ , IL6, IL10,  $TGF\beta 1$  et des récepteurs TLR2 et 4 était déterminée par immunohistochimie et la sécrétion des cytokines quantifiée par une méthode ELISA.

Concernant la prolifération kératinocytaire, le nombre de cellules exprimant le Ki67 diminuait en présence de Li, de manière dose dépendante. Mais cette modulation n'était significative que lors de stimulation préalable des kératinocytes par LPS. Concernant les marqueurs de différenciation, le Li à la concentration de 5mM, était associé à une augmentation de l'expression de K10 par les kératinocytes en monocouche et à une extension de l'expression de la filaggrine au niveau des couches spineuses des explants. Concernant les cytokines, il était mis en évidence une augmentation significative de la sécrétion de  $TNF\alpha$  avec 1.6 mM de Li et une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IL10 par les kératinocytes avec 5mM de Li. Le Li à 5mM diminuait également significativement l'expression de TLR2 et TLR4 par les kératinocytes différenciés. L'effet immunomodulateur du Li apparaît donc dose-dépendant. Ceci expliquerait l'effet paradoxal du Li selon la voie d'utilisation : exacerbation de la DS lors d'administration systémique (taux faible de Li dans la peau), amélioration de la DS sous traitement topique induisant des taux plus élevés de Li dans l'épiderme. Notre étude met en évidence deux mécanismes anti-inflammatoires des sels de lithium : induction de la sécrétion d' IL10 par les kératinocytes et inhibition de l'expression de TLR2 et TLR4.

**MOTS CLES** : Dermatite séborrhéique, Gluconate de lithium, Cytokines, TLR.