

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2012

N°039

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

D.E.S. de Dermatologie et Vénérologie

Par

Carole POIRAUD

Née le 10 janvier 1983, à la Roche sur Yon (85)

Présentée et soutenue publiquement le 20 juin 2012

PPAR- α , human β -defensin-2 et psoriasine :

Trois nouvelles cibles thérapeutiques

du gluconate de zinc

Présidente : Madame le Professeur Brigitte DRÉNO

Directrice de thèse : Madame le Professeur Brigitte DRÉNO

Sommaire

INTRODUCTION	4
I- La peau et l'épiderme : généralités.....	5
II- La barrière cutanée : fonctions et mécanismes.....	8
A. La fonction de barrière mécanique.....	8
B. La fonction sensorielle.....	8
C. La fonction antiradicalaire.....	9
D. La fonction immunitaire de première ligne.....	9
1. <i>Les cellules de Langerhans</i>	10
2. <i>Les Toll-like Récepteurs</i>	10
3. <i>Les Métalloprotéases matricielles</i>	12
4. <i>Les Peptides antimicrobiens</i>	13
• <i>Les β-défensines humaines</i>	13
• <i>La psoriasine</i>	14
• <i>Implications pathogéniques</i>	15
5. <i>Les cytokines</i>	16
E. La fonction métabolique.....	17
1. <i>Rôle de la peau dans le métabolisme de la vitamine D</i>	17
2. <i>Les récepteurs hormonaux exprimés par le kératinocyte</i>	17
3. <i>Les Peroxisome Proliferator-activated Receptors</i>	18
• <i>PPAR-α : expression et mode d'action</i>	19
• <i>PPAR-α : implication pathogéniques et intérêts thérapeutiques</i>	19
III- Les sels de zinc.....	20
A. Le zinc dans l'organisme humain.....	20
B. Le rôle du zinc dans la peau.....	20
• <i>Action du zinc sur PPAR-α</i>	21
• <i>Action du zinc sur les Peptides antimicrobiens cutanés</i>	22
C. Présentation, contre-indications, effets secondaires.....	22
D. Efficacité thérapeutique du gluconate de zinc.....	23
• <i>Zinc et acrodermatite entéropathique</i>	23
• <i>Zinc et acné</i>	24
• <i>Zinc et maladie de Verneuil</i>	25
• <i>Zinc et autres pathologies cutanées</i>	26
IV- Objectifs.....	27
MATÉRIEL ET MÉTHODES	28
I- Matériel.....	28
A. Peaux de donneurs sains.....	28
B. Modulateurs.....	28
• <i>Oligo-élément</i>	28
• <i>Lipopolysaccharide</i>	28
II- Méthodes.....	30
A. Culture d'explants cutanés.....	30
B. PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR).....	31
• <i>qRT-PCR avec sonde TaqMan : principes et rationnel</i>	31
• <i>Extraction d'ARN totaux</i>	31
• <i>Rétrotranscription</i>	32
• <i>PCR quantitative</i>	32
• <i>Analyse des résultats</i>	32
C. Immunohistochimie.....	33
• <i>Principes et rationnel de l'utilisation de l'Immunohistochimie</i>	33
• <i>Préparation des lames et immunomarquage</i>	33

• <i>Lecture des lames</i>	35
D. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)	35
• <i>Principes de la technique d'ELISA</i>	35
• <i>Technique</i>	35
E. Test de liaison à l'ADN de PPAR- α	36
F. Analyse statistique	37
RÉSULTATS	38
I- Explants de peau saine	38
II- Présentation des résultats	38
III- Première partie : Le gluconate de zinc active PPAR- α dans l'épiderme stimulé par le LPS	39
A. Objectifs	39
B. Méthodologie	39
C. Article	39
IV- Deuxième partie : hBD-2 et psoriasine : deux molécules de l'immunité innée, nouvelles cibles du gluconate de zinc	45
A. Objectifs	45
B. Méthodologie	45
C. Article	45
D. Résultats complémentaires	58
DISCUSSION	61
I- Le modèle et les méthodes utilisés	61
A. Le modèle utilisé : intérêts et limites	61
B. Les modulateurs	62
II- Première partie : Le gluconate de zinc active PPAR- α dans l'épiderme stimulé par le LPS	63
A. Modulation de PPAR- α dans les dermatoses inflammatoires	63
B. Modulation de PPAR- α par le gluconate de zinc	64
C. Conclusion de la première partie	66
III- Deuxième partie : hBD-2 et psoriasine : deux molécules de l'immunité innée, nouvelles cibles du gluconate de zinc	68
A. Modulation des PAMs dans les dermatoses inflammatoires	68
• <i>hBD-2</i>	68
• <i>hBD-4</i>	69
• <i>Psoriasine</i>	70
B. Modulation des PAMs et de l'IL-8 par le gluconate de zinc	71
• <i>hBD-2 et -4</i>	71
• <i>Psoriasine</i>	72
• <i>IL-8</i>	73
C. Conclusion de la deuxième partie	74
IV- Conclusion	75
RÉFÉRENCES	76

Liste des abréviations utilisées

ADN(c) : Acide Désoxyribonucléique (complémentaire)
AE : Acrodermatite entéropathique
AEC : 3-amino-9-ethylcarbazole
AMM : Autorisation de mise sur le marché
AP-1 : Activator Protein-1
ARN(m) : Acide Ribonucléique (messenger)
BSA : Bovine Serum Albumine
CO₂ : Dioxyde de Carbone
CT : Threshold cycle (cycle seuil)
Ctrl : Contrôle
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP : Déoxyribonucléotide-Triphosphate
DO : Densité optique
DTT : Dithiothréitol
E. coli : *Escherichia coli*
ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HaCaT : lignée de kératinocytes humain immortalisés
hBD : β -défensine humaine (human β -defensin)
HPRT1 : Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase 1
HRP : Horseradish Peroxidase
IgG : Immunoglobuline G
IHC : Immunohistochimie
I κ B : Inhibitor of the NF- κ B
IL : Interleukine
kDa : kilo Dalton
LPS : Lipopolysaccharide
MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase
M-MLV : Moloney Murine Leukemia Virus
MMP : Métalloprotéase matricielle
NF- κ B : Nuclear Factor κ B
NK : Natural Killer
NHEK : Normal Human Epidermal Keratinocytes
Oligo(DT) : succession de thymines
P. acnes : *Propionibacterium acnes*
PAM : Peptide antimicrobien
PAMP : Pathogen-associated Molecular Pattern
PBS : Phosphate Buffer Saline
PPAR : Peroxisome Proliferator-activated Receptor
PPRE : Peroxisome Proliferator Response Element
(qRT)PCR : (quantitative Real Time) Polymerase Chain Reaction
RXR : Retinoid X Receptor
TBS : Tris Buffer Saline
THP1 : lignée de monocytes (Human acute monocytic leukemia cell line)
TLR : Toll-like Récepteur
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
UV : Ultra-violets
Zn : Zinc élément

Introduction

Les sels de zinc sont un traitement classique et efficace de plusieurs pathologies dermatologiques, de par leur rôle spécifique de régulateurs de l'immunité de première ligne ou immunité innée. Le gluconate de zinc dispose d'ailleurs en France d'une autorisation de mise sur le marché depuis 1998, dans deux maladies cutanées, l'acrodermatite entéropathique et l'acné inflammatoire.

Cependant, même si certains mécanismes d'action du gluconate de zinc sur l'immunité innée sont déjà connus (activation kératinocytaire, modulation de protéines ou de récepteurs membranaires), il est probable que de nombreux autres soient encore ignorés. Ainsi, nous avons choisi d'étudier dans ce travail la modulation par le gluconate de zinc d'acteurs de l'immunité innée cutanée nous paraissant intéressants de par leur implication dans la physiopathologie des dermatoses inflammatoires et pour lesquels il n'existe actuellement aucune donnée quant à leur modulation par le zinc dans les tissus cutanés.

Nous rappellerons dans un premier temps des données fondamentales sur l'épiderme, sa structure et ses principales fonctions. Dans un deuxième temps, nous ferons le point sur les données les plus récentes concernant les modes d'action et les indications des sels de zinc. Nous décrirons enfin les objectifs de notre étude.

Dans les suites de cette introduction, nous présenterons les méthodes employées, les résultats obtenus, et nous les discuterons.

I- La peau et l'épiderme : généralités

La peau est le plus large organe du corps humain, couvrant une superficie de 1,5 à 2 m² chez l'adulte. La peau est constituée de trois couches distinctes superposées les unes aux autres (Figure 1). L'épiderme est la couche la plus superficielle. Il est la première barrière de protection de l'organisme contre les agressions externes, que celles-ci soient chimiques, physiques, infectieuses... Sous l'épiderme se trouve le derme, couche de tissu conjonctif résistant et élastique, permettant notamment la vascularisation et le maintien de la structure cutanée, et accueillant les annexes cutanées (follicules pilo-sébacés, glandes sudorales). Enfin, sous le derme, se situe l'hypoderme, couche la plus profonde de la peau, constituée de tissu graisseux et formant une interface entre les couches plus superficielles de la peau et les tissus musculo-squelettiques sous-jacents.

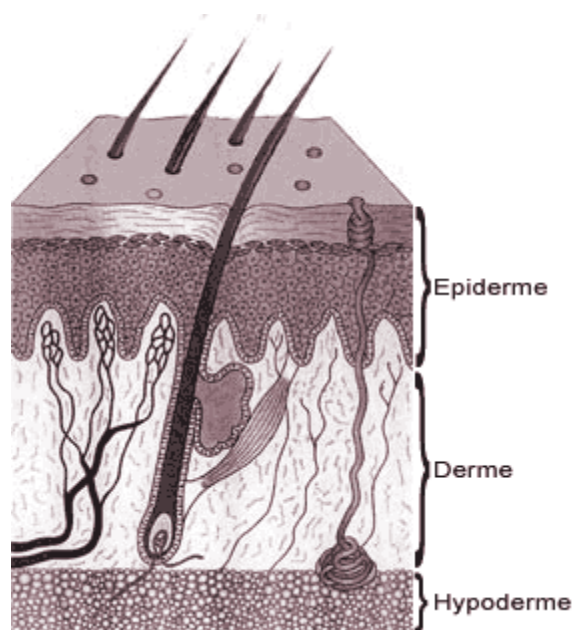


Figure 1. Structure générale de la peau (extrait de <http://www.original-cosmetic.com>)

L'épiderme est un épithélium malpighien kératinisé, dont l'épaisseur varie selon les régions du corps. L'épiderme est stratifié en plusieurs couches superposées (Figure 2). Les kératinocytes sont les cellules constituant l'immense majorité des cellules de l'épiderme et des phanères (ongles, poils, cheveux). Leur rôle principal est la production de kératine, protéine conférant à la peau sa caractéristique de barrière imperméable. Les

kératinocytes se différencient progressivement depuis la couche la plus profonde de l'épiderme jusqu'à la couche la plus superficielle, en se chargeant en kératine mature et en subissant une apoptose dans les couches superficielles. Le kératinocyte est capable de protéger son ADN nucléaire des rayons ultra-violet (UV), en accumulant dans son cytoplasme la mélanine, pigment naturel de la peau.

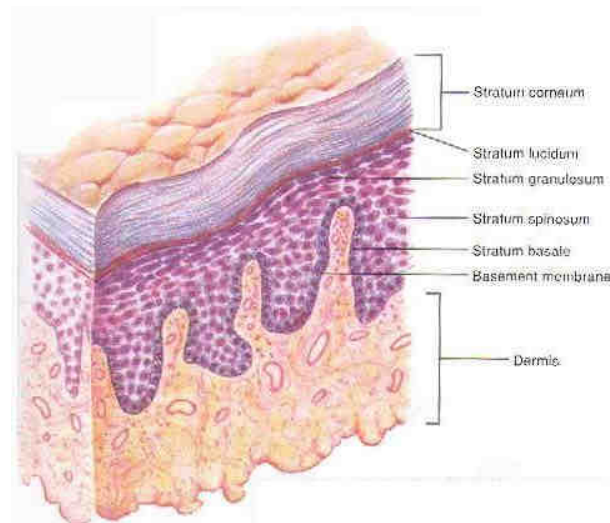


Figure 2. Les différentes couches de l'épiderme (extrait de *Hole's Human Anatomy & Physiology*, 8th edition Shier, Butler & Lewis, 1999)

La couche la plus profonde, se trouvant au contact de la membrane basale séparant derme et épiderme, se nomme la couche basale (stratum basale). La couche basale est constituée d'une seule couche de kératinocytes peu différenciés en phase de prolifération, de mélanocytes (cellules synthétisant la mélanine) et de cellules de Merkel (cellules neuroendocrines).

Au-dessus de la couche basale se trouve la couche épineuse (stratum spinosum), formée par plusieurs couches de kératinocytes en cours de différenciation, au milieu desquels s'immiscent les cellules de Langerhans, qui sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes professionnelles.

Ensuite, on trouve la couche granuleuse (stratum granulosum), constituée également de plusieurs couches de kératinocytes qui poursuivent leur différenciation. Ces kératinocytes voient leur noyau être petit à petit dégradé, et leur concentration en kératines s'accroître.

Dans certaines zones de peau épaisse, comme au niveau palmo-plantaire par exemple, il existe une couche claire (stratum lucidum) entre couche granuleuse et couche cornée. C'est une couche peu épaisse, faite de kératinocytes ayant perdu leur noyau.

Enfin, la couche la plus superficielle de l'épiderme est la couche cornée (stratum corneum). Elle est composée de très nombreuses strates de kératinocytes mortifiés, appelés cornéocytes, reliés plus ou moins fortement entre eux par les cornéodesmosomes. Les kératinocytes de la couche cornée sont essentiellement composés de kératine mature, assurant la fonction de barrière et d'imperméabilité de la peau. Le détachement des cornéocytes constitue le phénomène de desquamation.

II- La barrière cutanée : fonctions et mécanismes

L'épiderme constitue la première barrière naturelle de défense de l'organisme, vis-à-vis des agressions externes (physiques, chimiques, infectieuses...). La fonction barrière de l'épiderme est multifactorielle, reposant entre autres sur des fonctions mécanique, sensorielle, anti-radicalaire, immunitaire ou hormonale...

A- La fonction de barrière mécanique

La peau, et principalement sa couche la plus superficielle, l'épiderme, est la première barrière mécanique protégeant l'intérieur de l'organisme des agressions externes quelles qu'elles soient. Cette propriété de barrière naturelle de l'épiderme est due à sa structure même, et notamment à la solidité des jonctions inter-kératinocytaires, permettant d'en faire un épithélium solide et quasiment imperméable.

Cette barrière permet de réguler les entrées et sorties d'eau, en empêchant notamment l'eau du milieu externe d'entrer dans l'organisme. Des microorganismes pathogènes divers colonisent la peau et peuvent être éliminés grâce à la desquamation de la couche cornée, au pH acide des sécrétions cutanées ou à la présence d'une flore cutanée résidente commensale. De plus, la mélanine contenue dans les kératinocytes leur permet de protéger leur noyau des effets néfastes des rayons UV.

B- La fonction sensorielle

La peau est un des organes les plus riches en récepteurs sensoriels. Ces récepteurs présents principalement dans le derme, permettent au cerveau, après propagation de l'influx nerveux, de percevoir les divers stimuli issus de l'environnement, que ceux-ci soient proprioceptifs, nociceptifs, thermoceptifs... La densité cutanée en récepteurs

sensoriels est variable en fonction des régions corporelles, et est par exemple très élevée au niveau de la pulpe des doigts.

Les récepteurs sensoriels présents dans la peau sont nombreux et possèdent des caractéristiques différentes. Les corpuscules de Meissner permettent de sentir les sensations tactiles fines. Les corpuscules de Ruffini sont sensibles à la pression et à l'étirement de la peau, alors que les corpuscules de Pacini sont quant à eux sensibles à la pression et aux vibrations. Les cellules neuroendocrines de Merkel possèdent des capacités de mécanorécepteurs à la pression. Enfin, des terminaisons nerveuses libres permettent de véhiculer les sensations thermiques et douloureuses.

C- La fonction antiradicalaire

Les radicaux libres sont des molécules instables qui, lorsqu'elles ne sont pas neutralisées par des antioxydants, endommagent de manière irréversible les principaux constituants des cellules de l'organisme. Ces radicaux libres sont fortement suspectés d'être à l'origine du vieillissement cutané, de cancers et maladies diverses de la peau, via leurs capacités de lésions de l'ADN, d'attaque des membranes cellulaires ou d'induction de nécrose (Afanas'ev, 2010). Les radicaux libres peuvent être d'origine exogène, produits par des rayonnements ionisants par exemple, ou bien endogène, apparaissant comme des sous-produits du métabolisme normal de l'oxygène et jouant alors un rôle important dans la communication entre les cellules. Leur concentration peut cependant croître significativement en période de « stress » et endommager les structures cellulaires. C'est ce qu'on appelle le stress oxydatif.

Afin de lutter contre ces radicaux libres, l'organisme met en œuvre des systèmes antiradicalaires, sous forme d'enzymes ou de molécules antioxydantes. Parmi les enzymes antioxydantes présentes au niveau de l'épiderme, on peut citer la superoxyde dismutase ou la glutathion peroxydase.

D- La fonction immunitaire de première ligne

Au niveau épidermique, l'immunité innée ou immunité de première ligne est classiquement représentée par les cellules de Langerhans, cellules présentatrices d'antigènes professionnelles résidentes de l'épiderme. Il faut cependant noter que d'autres cellules immunes non spécifiques peuvent être présentes dans le tissu cutané, de manière physiologique et/ou pathologique, à savoir les monocytes-macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes... Les kératinocytes eux-mêmes sont capables d'intervenir dans la réponse immune innée épidermique, via la mise en jeu de nombreux mécanismes distincts et complémentaires.

1) *Les cellules de Langerhans*

Les cellules de Langerhans, qui sont des cellules dendritiques résidentes, ont un rôle de présentation d'antigènes. Elles dérivent des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, puis migrent dans la circulation pour rejoindre la peau.

Dans l'épiderme, après avoir reconnu et internalisé des antigènes étrangers au soi, les cellules de Langerhans sont capables de se déplacer au niveau des ganglions lymphatiques, afin d'effectuer une présentation des antigènes reconnus aux lymphocytes T, pour entraîner, le cas échéant, une réponse immune adaptative.

2) *Les Toll-like Récepteurs*

En plus de leur rôle premier de barrière mécanique, les kératinocytes sont capables de jouer un rôle majeur dans la défense immunitaire de l'hôte. Il a en effet été démontré que, suite à un stimulus externe notamment bactérien ou suite à un stress environnemental chimique ou physique, le kératinocyte était capable de répondre en produisant des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Steinhoff et al., 2001).

L'activation du kératinocyte semble majoritairement due à l'activation de récepteurs membranaires situés à sa surface, les Toll-like Récepteurs (TLRs). Ces TLRs sont des récepteurs transmembranaires, présents à la surface des cellules des vertébrés, dont les kératinocytes. Ils sont capables de reconnaître spécifiquement certains composants

antigéniques microbiens, les Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMPs) (Aderem et Ulevitch, 2000 ; Tableau I). On peut noter que les bactéries Gram positives seront plutôt reconnues par les TLR-2 et les bactéries Gram négatives par les TLR-4. Le Lipopolysaccharide (LPS) commercial, composant de la membrane des bactéries Gram négatives, est capable d'activer quant à lui à la fois les TLR-2 et -4 à la surface des kératinocytes (Kawai et al., 2002).

PAMP	Pathogen(s)	Essential ligand	Pattern recognition receptors	Biological sequelae
LPS	Most Gram-negative bacteria	Lipid A	LBP, CD14 TLR4, TLR2* Scavenger receptor	Enhance inflammatory response mediated by TLRs Recognize LPS and initiate inflammatory response Endocytosis of LPS (non-inflammatory), ?phagocytosis
Lipoproteins	Eubacteria	Amino-terminal triphosphorylated cysteine† generated by the signal peptidase II cleavage system	TLR2	Initiates inflammatory response
Peptidoglycan	Most bacteria	Undefined	CD14 TLR2	Enhances inflammatory response Initiates inflammatory response
Lipoteichoic acid	Many Gram-positive bacteria	Undefined	TLR2, TLR4‡	Initiates inflammatory response
CpG	Many microbial pathogens	Unmethylated CpG-containing oligonucleotides§	Undefined	Initiates inflammatory response
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	Undefined	TLR2 CD1	Initiates inflammatory response Presents glycolipid to $\alpha\beta$ T cells
<i>N</i> -formyl-Met	Prokaryotes	Amino-terminal <i>N</i> -formylmethionine of proteins synthesized <i>de novo</i>	f-Met receptors 1 and 2	Chemotaxis and release of inflammatory mediators (?)
Mannans and mannoproteins	Yeast	Undefined	Mannose receptor Mannose-binding protein	Phagocytosis, endocytosis and initiation of inflammatory response Opsonization and complement fixation
Zymosan (yeast cell wall)	Yeast	Undefined	Mannose and β -glucan receptors TLR2	Phagocytosis Initiates inflammatory response
Heat shock proteins	Prokaryotes and eukaryotes	Undefined	Undefined	Initiate inflammatory response and promote T cell dependent immune responses

Tableau I. PAMPs and Pattern recognition receptors, d'après Aderem et Ulevitch, 2000.

L'activation des TLRs, suite à la reconnaissance des PAMPs, entraîne dans le cytoplasme cellulaire l'activation de voies de signalisation activant des facteurs de transcription, dont le Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) et l'Activator Protein-1 (AP-1). S'ensuit la transcription de multiples gènes induisant la réponse immune innée (Aderem et Ulevitch, 2000 ; Figure 4).

Dans le kératinocyte, il a notamment été démontré que l'activation de ces voies de signalisation, suite à l'activation des TLRs de surface, permettait la transcription de gènes aboutissant à la sécrétion par le kératinocyte de cytokines, chimiokines et peptides antimicrobiens (Pivarcsi et al., 2003; Jarrousse et al., 2007).

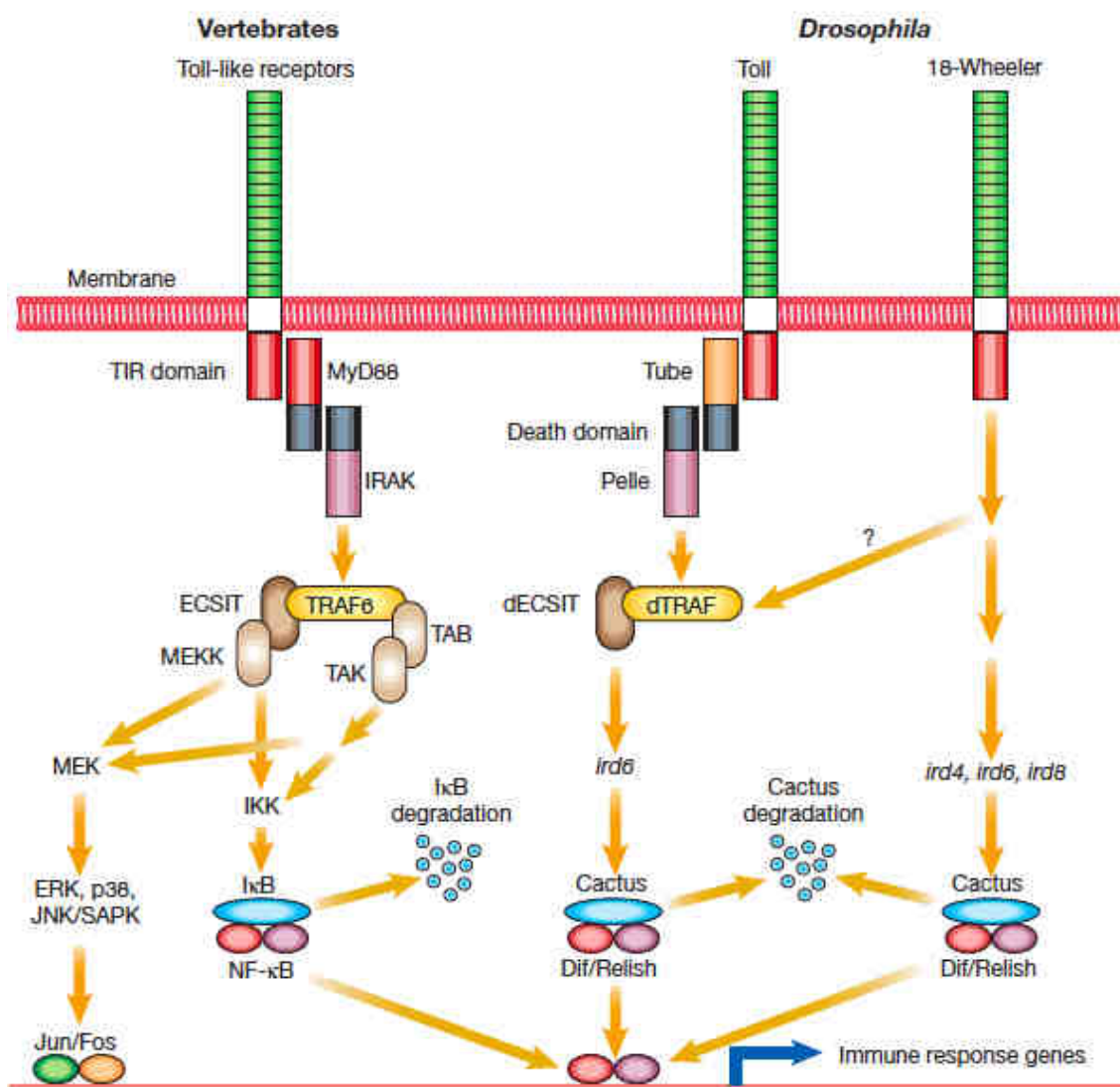


Figure 4. Voies de signalisation activées par les TLRs chez les vertébrés (à gauche) et la drosophile (à droite), d'après Aderem et Ulevitch, 2000. On note que chez les vertébrés, l'activation des TLRs aboutit à l'activation des voies de signalisation de NF- κ B et de l'AP-1 (suite à la dimérisation des protéines Jun et Fos).

3) Les Métalloprotéases matricielles

Les Métalloprotéases matricielles (MMPs) sont des enzymes zinc-dépendantes, ayant un rôle de dégradation protéolytique de nombreuses protéines matricielles. La famille des MMPs regroupe entre autres les collagénases, gélatinases et stromélysines.

En plus de leur rôle protéolytique, les MMPs sont capables de réguler de nombreux mécanismes cellulaires. Elles sont entre autres connues pour être impliquées dans la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire, l'angiogenèse, la libération de

ligands proapoptotiques et dans la régulation de l'immunité innée. En effet, certaines MMPs sont connues comme étant capables d'agir sur la migration des polynucléaires neutrophiles et la libération de chimiokines et cytokines (Van Lint et Libert, 2007).

4) Les Peptides antimicrobiens

Afin de lutter contre l'invasion des microbes de l'environnement, les épithéliums des vertébrés, dont l'épiderme, sont capables de produire et de sécréter diverses molécules antimicrobiennes, dont celles de la famille des peptides antimicrobiens (PAMs), qui sont de petits peptides (consistant en l'association de 12 à 50 acides aminés) représentant un mécanisme ancestral de défense de l'hôte. Les PAMs disposent de propriétés antimicrobiennes directes, grâce à leur capacité de destruction, de formation de pores ou de canaux ioniques dans les membranes bactériennes (Wiesner et Vilcinskas, 2010). Ils sont également directement impliqués dans l'activation de la défense immunitaire, du fait de propriétés proinflammatoires. Ils peuvent en effet agir en tant qu'agents chimiotactiques, attirant polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T et cellules dendritiques immatures sur le site inflammatoire, et également activer la production de cytokines diverses par les neutrophiles principalement, mais également par d'autres cellules, dont les kératinocytes (Wiesner et Vilcinskas, 2010). La famille des PAMs est une large famille qui comprend, entre autres, les β -défensines humaines, les cathélicidines, la psoriasine, la RNase 7...

- Les β -défensines humaines

Les β -défensines humaines (human β -defensins hBDs) sont les PAMs prédominants chez les mammifères (Wiesner et Vilcinskas, 2010). Il s'agit de petits peptides de 3 à 4 kDa (Schneider et al., 2005). Parmi les hBDs, la hBD-1 est constitutivement exprimée par les épithéliums en faibles quantités et n'est pas inductible. L'expression des 3 autres hBDs connues, à savoir les hBD-2, -3 et -4, est constitutionnelle, en faible quantité dans les épithéliums, mais est fortement inductible (Schneider et al., 2005). Ces 3 hBDs sont synthétisées par de très nombreux épithéliums chez l'homme, y compris l'épiderme, où elles sont produites par les kératinocytes (Schneider et al., 2005).

Dans l'épiderme, hBD-2 et -3 ont été démontrées comme étant synthétisées de manière constitutionnelle par les kératinocytes normaux non inflammatoires (Harder et al., 1997, 2001), tandis que l'expression de hBD-4 par les kératinocytes normaux est encore débattue, avec des études contradictoires (Harder et al., 2004 ; Rivas-Santiago et al., 2012). De plus, la synthèse des hBD-2, -3 et -4 par les kératinocytes peut être directement activée par des agents pathogènes, comme des bactéries Gram positives ou négatives, ou la levure *Candida albicans*, via des facteurs membranaires ou solubles, ou bien par des cytokines pro-inflammatoires, dont le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) et l'Interleukine (IL)-1 β par exemple (Harder et al., 2004). Leur synthèse découle directement de l'activation de voies de signalisation intracellulaires, via l'activation de TLRs sur les membranes cellulaires (Nagy et al., 2005).

Les hBDs ont un spectre antimicrobien très large et peuvent lutter contre de nombreuses bactéries, mais également contre des champignons et même certains virus (Wiesner et Vilcinskas, 2010). Elles peuvent également agir en tant qu'agents chimiotactiques en attirant polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T auxiliaires (ou « helper ») et mémoire, et cellules dendritiques immatures sur le site inflammatoire, et peuvent également activer neutrophiles et kératinocytes et les faire produire des cytokines pro-inflammatoires (Yang et al., 1999; Niyonsaba et al., 2004, 2005).

- La psoriasine

La psoriasine, également connue sous le nom de protéine S100A7, est une petite protéine de 11 kDa, isolée initialement à partir de kératinocytes de peaux psoriasiques (Madsen et al., 1991). La psoriasine est un membre de la famille des protéines S100, caractérisées par la présence de motifs de liaison au calcium (Brodersen et al., 1999).

La psoriasine est principalement exprimée par les kératinocytes, mais également par les sébocytes au niveau cutané (Wiesner et Vilcinskas, 2010).

La psoriasine a été démontrée comme étant présente dans les kératinocytes de l'épiderme normal non inflammatoire (Martinsson et al., 2005). En outre, la synthèse de la psoriasine par les kératinocytes a été décrite comme pouvant être directement inductible par la présence de bactéries comme *Escherichia coli* (*E.coli*) ou par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β (Gläser et al., 2005).

Comme les hBDs, la psoriasine possède des propriétés antibactériennes directes par la formation de pores transmembranaires induisant des gradients de pH, principalement chez les bactéries Gram négatives, mais également des propriétés pro-inflammatoires. Elle peut en effet agir en tant qu'agent chimiotactique direct, en attirant polynucléaires neutrophiles ou lymphocytes T auxiliaires sur le site inflammatoire, et est également un agent activateur des neutrophiles (Zheng et al., 2008).

- *Implications pathogéniques*

Des études récentes ont souligné l'expression aberrante de PAMs dans certaines dermatoses inflammatoires. Ces études ont confirmé que la régulation anormale du système immunitaire inné était une voie pathogénique importante dans ces maladies.

A titre d'exemple, la psoriasine a été décrite comme étant surexprimée dans les lésions cutanées de psoriasis; c'est d'ailleurs en étudiant des kératinocytes de patients atteints de cette pathologie que la molécule a été écrite pour la première fois (Madsen et al., 1991). Mais le psoriasis n'est pas la seule pathologie cutanée dans laquelle l'expression de la psoriasine est aberrante. En effet, elle a été démontrée plus récemment comme étant impliquée dans l'hyperkératinisation folliculaire de l'acné (Ganceviciene et al., 2006). De plus, on sait que la psoriasine est surexprimée dans les lésions cutanées de dermatite atopique et de maladie de Verneuil (Gläser et al., 2009; Schlapbach et al., 2009).

En ce qui concerne hBD-2, plusieurs études ont montré sa surexpression dans des biopsies de lésions cutanées d'acné, principalement au niveau du follicule pilo-sébacé, mais également dans l'épiderme adjacent, en comparaison à des biopsies de peaux normales (Chronnell et al., 2001; Philpott, 2003). Dans le psoriasis comme dans la dermatite atopique, hBD-2 a également été démontrée comme étant surexprimée (Gambichler et al., 2008). Enfin, dans la maladie de Verneuil, une première étude a montré une surexpression de hBD-2 dans des pièces opératoires cutanées chez 6 patients atteints de cette pathologie, sans précision du stade de leur pathologie (Schlapbach et al., 2009), mais une étude plus récente et plus large intéressant 12 patients présentant des stades mineurs à modérés, a montré une sous-expression de cette molécule à la fois dans des biopsies de zones lésionnelles et non-lésionnelles de maladie de Verneuil, en comparaison à des peaux saines (Dréno et al., 2012).

Enfin, en ce qui concerne hBD-4, une seule étude s'est pour le moment intéressée à son expression dans une pathologie cutanée, à savoir la maladie de Verneuil, et a démontré, comme pour hBD-2, une sous-expression de cette molécule dans les zones lésionnelles et non lésionnelles, en comparaison à des peaux saines (Dréno et al., 2012).

5) Les cytokines

Les kératinocytes sont capables de synthétiser et sécréter de nombreuses cytokines, protéines ayant un rôle dans le développement et la pérennisation de la réaction inflammatoire locale, grâce à des propriétés chimiotactiques, mais également dans l'activation des kératinocytes environnants, leur différenciation ou leur prolifération. Les principales cytokines proinflammatoires produites par les kératinocytes sont l'IL-1 α et - β , l'IL-6, l'IL-8 ou encore le TNF- α (Uchi et al., 2000; Feldmeyer et al., 2010).

L'IL-8 est une cytokine proinflammatoire produite par de nombreux types cellulaires (Hébert et Baker, 1993). Elle agit sur le chimiotactisme et la dégranulation des polynucléaires neutrophiles sur le site inflammatoire, via sa liaison à des récepteurs de haute affinité sur la membrane des neutrophiles. Dans des pathologies cutanées inflammatoires, telles que l'acné ou la maladie de Verneuil, caractérisées histologiquement par une infiltration massive de la peau en polynucléaires neutrophiles, on sait que l'IL-8 est présente en grande quantité (Chen et al., 2002). Elle est produite d'une part par les cellules mononucléées présentes dans l'environnement du follicule pilo-sébacé, et d'autre part par les kératinocytes eux-mêmes. La production d'IL-8 par des kératinocytes stimulés par *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ou par le LPS a été prouvée in vitro (Pivarcsi et al., 2003; Grange et al., 2009). La synthèse d'IL-8 est alors dépendante de l'activation des TLR-2 ou -4, et de la mise en œuvre des voies de signalisation de NF- κ B et des Mitogen-activated Protein Kinases (MAP Kinases), dont celle mettant en œuvre AP-1 (Grange et al., 2010).

E- La fonction métabolique

1. Rôle de la peau dans le métabolisme de la vitamine D

La vitamine D est à la fois d'origine exogène alimentaire et d'origine endogène par synthèse cutanée (Meunier, 2008). Les apports alimentaires en vitamine D3 ou cholécalciférol étant relativement faibles, celle-ci est principalement synthétisée dans la peau, grâce à l'action des UV-B sur son précurseur, le 7- β hydrocholestérol, présent naturellement dans l'organisme.

La vitamine D3, qu'elle soit d'origine cutanée ou alimentaire, est ensuite hydroxylée par le foie en 25-OH-vitamine D3, puis par le rein en 1,25-OH-vitamine D3, forme active de la vitamine. Le rôle le plus important de la 1,25-OH-vitamine D3 est d'assurer la promotion de la minéralisation osseuse et de maintenir l'homéostasie phosphocalcique par augmentation de l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Les kératinocytes eux-mêmes expriment des récepteurs à la 1,25-OH-vitamine D3.

2. Les récepteurs hormonaux exprimés par le kératinocyte

Le kératinocyte est capable d'exprimer de très nombreux récepteurs hormonaux, dont nous citerons quelques exemples.

Le kératinocyte peut tout d'abord exprimer des récepteurs à des neuromédiateurs, comme la substance P (Liu et al., 2006). Le dysfonctionnement de ces récepteurs est par exemple impliqué dans la pathogénèse du phénomène de prurit (Chang et al., 2007).

En outre, des récepteurs aux endorphines, telles que la corticotropin releasing hormone (CRH) ou l' α -melanocortin stimulating hormone (α -MSH), ont été identifiés au niveau des kératinocytes (Isard et al., 2009; Muffley et al., 2011). Ces molécules semblent avoir un rôle sur la différenciation kératinocytaire, la cicatrisation cutanée et l'induction de l'inflammation locale. Les kératinocytes sont également capables d'exprimer des récepteurs à l'Insulin-like growth factor (IGF), qui pourraient être impliqués dans l'hyperprolifération kératinocytaire dans des pathologies telles que l'acné (Isard et al., 2011).

Par ailleurs, il a été démontré que les kératinocytes exprimaient des récepteurs aux hormones sexuelles, notamment aux androgènes, telles que la testostérone ou la 5- α dihydrotestostérone (DHT). Les androgènes sont connus pour stimuler l'hyperplasie et pour diminuer la fonction barrière de l'épiderme (Zouboulis et al., 2007). Les kératinocytes expriment également des récepteurs aux progestatifs, alors que les récepteurs aux oestrogènes sont quant à eux exprimés spécifiquement pas les sébocytes (Pelletier et Ren, 2004).

Les kératinocytes expriment également des récepteurs aux hormones thyroïdiennes, notamment la triiodothyronine ou T3. On sait en effet très clairement que les dysthyroïdies s'accompagnent volontiers de symptômes cutanés (xérose, prurit, urticaire...). Enfin, ils possèdent des récepteurs aux rétinoïdes, d'origine endogènes et exogènes, qui sont de deux types, à savoir les Retinoid-X-Récepteurs (ou RXR) et les Retinoic Acid Récepteurs (ou RAR). Ces récepteurs nucléaires vont, comme les récepteurs aux hormones thyroïdiennes et à la vitamine D3, agir isolément ou via des phénomènes de dimérisation, en tant que facteurs de transcription, et réguler de nombreuses fonctions cellulaires, dont la fonction immunitaire (Sørensen et al., 1997).

3. *Les Peroxisome Proliferator-activated Receptors (PPARs)*

Les Peroxisome Proliferator-activated Receptors (PPARs) sont des récepteurs nucléaires appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux (Nuclear Hormone Receptors). Ils agissent en tant que facteurs de transcription et régulent de nombreuses fonctions cellulaires, dont la prolifération, la différenciation, l'apoptose, le métabolisme lipidique et l'inflammation (Delerive et al., 2001).

Après translocation nucléaire de sa forme cytoplasmique inactive, le PPAR pourra être activé par des ligands, d'origine naturelle (acides gras, eicosanoïdes) ou synthétique (glitazones, fibrates). Il pourra alors se coupler avec un RXR. L'hétérodimère PPAR-RXR formé ira alors se lier à une séquence d'ADN double-brin spécifique (Kliwer et al., 1992). Cette séquence, appelée PPAR Response Element (PPRE), est située dans la région promotrice de certains gènes, qui pourront alors être transcrits (Palmer et al., 1995).

Trois différents PPARs ont été identifiés dans les kératinocytes humains, à savoir les PPAR- α , - β/δ et - γ (Kuenzli et Saurat, 2003).

- PPAR- α : expression et mode d'action

PPAR- α est un PPAR ubiquitaire. En effet, il est fortement exprimé dans la graisse brune, le foie, les reins, le cœur et l'épiderme (Kuenzli et Saurat, 2003). Ce PPAR a été relativement bien étudié dans la peau, et des implications thérapeutiques ont même déjà découlé des diverses études menées. Dans l'épiderme, il a déjà été démontré que PPAR- α inhibait la lipogenèse sébacée (Downie et al., 2004), stimulait la différenciation et inhibait la prolifération des kératinocytes (Hanley et al., 1998), régulaient l'apoptose kératinocytaire et améliorait l'homéostasie de la barrière cutanée (Kömüves et al., 2000). PPAR- α possède également des propriétés anti-inflammatoires démontrées. En effet, on sait que PPAR- α possède une fonction antagoniste des capacités de transactivation des voies de signalisation intracellulaires de NF- κ B et d'AP-1, par une interaction directe protéine à protéine avec des éléments de ces voies de signalisation (p65 et c-Jun) (Delerive et al., 1999a).

- PPAR- α : implications pathogéniques et intérêts thérapeutiques

On sait que l'expression de PPAR- α est diminuée dans les lésions de psoriasis, dermatose inflammatoire fréquente (Mössner et al., 2004). De plus, l'application topique d'un agoniste de PPAR- α dans un modèle de souris présentant une dermite de contact, a été démontrée comme étant plus efficace qu'un placebo dans la réduction de l'inflammation cutanée clinique et dans la diminution des taux épidermiques des cytokines anti-inflammatoires TNF- α et IL-1 α (Sheu et al., 2002).

Récemment, l'intérêt d'un topique agoniste naturel de PPAR- α a même été prouvé dans une autre dermatose inflammatoire, la dermatite atopique, chez le nouveau-né humain. Une étude clinique ayant randomisé 40 nouveau-nés entre un traitement topique classique par dermocorticoïdes forts ou un traitement topique par un agoniste de PPAR- α , a en effet démontré une efficacité équivalente entre ces deux traitements, concernant la valeur du SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) et d'un questionnaire de qualité de vie (De Belilovsky et al., 2010). Ces études font des agonistes du PPAR- α un traitement prometteur dans le traitement des dermatoses à composante inflammatoire.

III- Les sels de zinc

A- Le zinc dans l'organisme humain

Les oligo-éléments, dont le zinc fait partie, sont une classe de nutriments d'origine minérale pure, nécessaires à la vie d'un organisme, mais en quantités très faibles. Leur déficit dans l'organisme humain peut parfois être à l'origine de pathologies diverses. C'est le cas notamment des déficits en iode, fer, zinc ou cuivre.

Le corps humain contient 2 à 3 g de zinc, dont la plupart sont liés aux protéines, avec une prédominance dans les tissus cutané, surrénal, pancréatique et cérébral notamment. Les apports en zinc sont d'origine alimentaire, et proviennent quasi-essentiellement des protéines animales. En dépit de la fonction majeure du zinc, le corps en possède seulement des stocks limités, qui sont facilement épuisés et ne peuvent pas compenser de longues périodes de carence.

Le zinc possède un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires et tissulaires, dont la différenciation, l'apoptose, l'immunité ou le métabolisme lipidique et glucidique. Plus de 300 enzymes ont déjà été montrées comme contenant du zinc, celui-ci étant directement impliqué dans leur catalyse, agissant en tant que cofacteur, ou encore ayant un rôle de stabilisation structurale (Berg et Shi, 2006). Il est également bien connu qu'un grand nombre de facteurs de transcription possèdent des motifs moléculaires de liaison au zinc ou « Zinc-binding motifs ». Il a été estimé qu'environ 9% des protéines codées par le génome humain peuvent se lier au zinc (Andreini et al., 2006). Le zinc est également connu comme étant un important stabilisateur de membranes et un modulateur de systèmes hormonaux (Prasad, 1979; Isard et al., 2011).

B- Le rôle du zinc dans la peau

20% du stock en zinc de l'organisme se trouve dans la peau, principalement sous forme de métalloenzymes (Lansdown, 2007). La majorité du zinc cutané se trouve dans l'épiderme et principalement dans la couche granuleuse (Michaelsson et al., 1980).

Dans l'épiderme, le zinc favorise la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la migration kératinocytaire, notamment via la modulation d'intégrines (Tenaud et al., 1999, 2000), et possède une activité de modulation de l'immunité, plus particulièrement de sa partie innée (Brocard et Dréno, 2011).

Le zinc est impliqué dans l'activation des kératinocytes, en modulant l'expression de marqueurs d'activation kératinocytaire, telle que l'Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (Guéniche et al., 1995). De plus, il permet d'induire l'expression de la superoxyde dismutase intrakératinocytaire, afin de protéger l'épiderme de la formation de radicaux libres (Coudray et al., 1993). Il a également été impliqué dans l'inhibition de l'activité des MMPs (Santos et al., 2001). En outre, le zinc est impliqué dans la modulation du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles dans la peau. Cet effet a notamment été démontré chez des patients acnéiques traités par gluconate de zinc (Dréno et al., 1992). Une corrélation étroite entre le nombre de cellules Natural Killers (NK) périphériques et les niveaux de zinc dans le sérum a aussi été établie (Rajagopalan et al., 1995). De plus, on sait que le zinc est essentiel pour l'activité cytotoxique des cellules NK (Brocard et Dréno, 2011). Le zinc peut également moduler l'expression et l'activité des TLRs membranaires. En effet, une étude a notamment montré que le zinc modulait l'expression du TLR-2 kératinocytaire dans des peaux stimulées par *P. acnes* (Jarrousse et al., 2007). Enfin, le zinc est considéré comme étant un important régulateur de la production de cytokines proinflammatoires dans l'épiderme, telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 ou le TNF- α (Wellinghausen et al., 1997; Sainte-Marie et al., 1998; Bao et al., 2003). Selon les études, le zinc a été montré comme régulant positivement ou négativement la production des mêmes cytokines, en fonction des méthodes expérimentales employées, et notamment des concentrations en zinc utilisées pour les incubations *in vitro* ou pour les traitements systémiques *in vivo* (Brocard et Dréno, 2011).

- **Action du zinc sur PPAR- α**

Aucune étude ne s'est jamais intéressée à l'impact du zinc sur l'activation et l'expression de PPAR- α dans l'épiderme. Cependant, le lien entre zinc et PPAR- α a été

étudié dans d'autres tissus. Dans des cultures cellulaires de cellules endothéliales porcines et humaines, ainsi que dans une lignée de cellules THP1 (Human acute monocytic leukemia cell line), le zinc a été montré comme étant un activateur de PPAR- α (Reiterer et al., 2004; Bao et al., 2010). De plus, un traitement systémique par zinc a été observé comme activant la fonction et l'expression de PPAR- α dans un modèle de stéato-hépatite alcoolique murine (Kang et al., 2009).

- **Action du zinc sur les PAMs cutanés**

On peut également noter que peu d'études se sont pour le moment intéressées à un lien éventuel entre un traitement par zinc et l'expression des PAMs au niveau cutané. Concernant les hBDs, seule une étude *in vivo* comparant les niveaux d'expression de hBD-2 et -4 dans des peaux lésionnelles de maladie de Verneuil avant et à l'issue d'un traitement systémique de trois mois par du gluconate de zinc, a démontré que ce traitement était inducteur de l'expression de hBD-4 au niveau protéique épidermique (Dréno et al., 2012). Quant à la psoriasine, elle est connue pour avoir en plus de son motif de liaison au calcium caractéristique, un motif de liaison au zinc, qui paraît avoir un intérêt majeur dans les capacités bactéricides de la molécule (Gläser et al., 2005 ; Brodersen et al., 1999; Lee et al., 2007).

C- Présentation, Contre-indications, Effets secondaires

Le zinc à usage thérapeutique systémique a tout d'abord été présenté sous forme de sulfate de zinc dispensé *per os*. Du fait de problèmes d'intolérance digestive importants chez les patients, une forme mieux tolérée, le gluconate de zinc, là aussi dispensée *per os*, a été mise sur le marché à la fin des années 1980.

Le gluconate de zinc a l'avantage d'être un traitement bien toléré par les patients et simple d'utilisation (une seule prise par jour, à distance des repas). Ce traitement ne connaît pas de contre-indication particulière, hormis des antécédents d'allergie au blé, du fait de la présence d'amidon de blé dans les excipients.

Le gluconate de zinc doit être pris à distance (plus de deux heures si possible) d'un éventuel traitement par tétracyclines, fluoroquinolones ou strontium (diminution de leur absorption digestive par le zinc), et par fer ou calcium (diminution de l'absorption digestive du zinc par le fer et le calcium).

Le gluconate de zinc peut être utilisé durant les 2^{ème} et 3^{ème} trimestres de grossesse ou durant l'allaitement. Durant le premier trimestre de grossesse, le gluconate de zinc doit être continué dans l'acrodermatite entéropathique, alors qu'il est conseillé de lui préférer un traitement topique dans l'acné. Le gluconate de zinc peut être utilisé chez le jeune enfant.

Les seuls effets indésirables décrits sont des manifestations gastro-intestinales, essentiellement gastriques, peu fréquentes, de faible intensité et transitoires. Le traitement par gluconate de zinc est compatible avec l'exposition solaire.

D- Efficacité thérapeutique du gluconate de zinc

Le gluconate de zinc (RUBOZINC®, EFFIZINC®) dispose en France d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) depuis 1988, dispensée par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), pour le traitement de deux pathologies cutanées, à savoir l'acné inflammatoire de sévérité mineure et moyenne et l'acrodermatite entéropathique. L'efficacité du gluconate de zinc a en effet été démontrée dans de nombreuses études concernant des patients atteints d'acrodermatite entéropathique et d'acné inflammatoire mineure à modérée.

- **Zinc et acrodermatite entéropathique**

L'acrodermatite entéropathique (AE) est une pathologie très rare, causée par un déficit partiel de l'absorption intestinale du zinc. Cette pathologie congénitale, transmise sur un mode autosomique récessif, est induite par la mutation d'un gène codant pour une molécule transporteuse du zinc (Küry et al., 2002). On peut rapprocher de cette pathologie des formes acquises, nommées pseudo-AE, et induites par une carence en

zinc secondaire à des troubles de l'alimentation ou de l'absorption intestinale, touchant préférentiellement le prématuré (Barbarot et al., 2010).

Cette pathologie se présente cliniquement sous la forme de lésions très inflammatoires, à type d'érythème, d'érosions, de vésiculo-pustules ou de bulles, se localisant dans les zones péri-orificielle du visage, ano-génitale ou au niveau des extrémités. Peuvent être associées des lésions muqueuses à type de gingivites, stomatites ou glossites, ainsi que de fréquentes surinfections cutanées bactériennes ou fongiques.

Le traitement, reposant sur une supplémentation en gluconate de zinc, temporaire dans les formes acquises et à vie dans les formes congénitales, entraîne en quelques jours une rémission des symptômes cliniques et une normalisation des taux plasmatiques en zinc (Hirsh et al., 1976; Maverakis et al., 2007). Devant la rareté de cette pathologie et l'efficacité spectaculaire de ce traitement, aucune étude randomisée contre placebo ou un autre traitement n'a jamais été réalisée dans l'AE.

- **Zinc et acné**

L'acné est une dermatose inflammatoire touchant 70 à 80% de la population, principalement les adolescents (Ghodsi et al., 2009). Elle est une pathologie touchant la glande sébacée, au sein du follicule pilo-sébacé. La glande sébacée est une glande holocrine, formée de cellules sébacées ou sébocytes, et contenant le sébum, constitué de nombreux lipides, essentiellement de triglycérides, d'esters d'acides gras et d'alcools, et à un moindre degré de squalène et de cholestérol. L'acné touche donc préférentiellement les zones séborrhéiques du visage (front, nez, joues, menton), le décolleté et le haut du dos. Cliniquement, l'acné regroupe de nombreuses lésions élémentaires distinctes, qui peuvent être isolées ou associées chez un même patient, à savoir des lésions rétentionnelles (comédons), des lésions inflammatoires (papules, pustules, nodules, kystes) et des lésions cicatricielles.

La physiopathologie de l'acné est complexe et encore partiellement inconnue. On sait que trois facteurs distincts sont en cause dans cette pathologie : un excès de production de sébum (hyperséborrhée), une hyperkératinisation du follicule sébacé et une colonisation par *P. acnes*, corynébactérie Gram positive commensale, induisant le

développement et la pérennisation d'une inflammation in situ (Jeremy et al., 2003). Alors qu'on pensait auparavant que l'hyperkératinisation folliculaire était le stade initial de l'acné, on pense maintenant que l'hyperséborrhée, et surtout la colonisation par *P. acnes* sont des facteurs très précoces (Jeremy et al., 2003; Mourelatos et al., 2007). Le rôle de *P. acnes* dans la pathogénèse de l'acné consisterait de surcroît beaucoup plus en une modulation de l'immunité innée, notamment via l'activation de TLRs, qu'en des phénomènes directement infectieux (Jugeau et al., 2005).

Sur le plan thérapeutique, de nombreux traitements par voie topique ou systémique, peuvent être proposés dans l'acné (Thiboutot et al., 2009). Des algorithmes thérapeutiques ont d'ailleurs été proposés afin d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique à mettre en œuvre, en fonction du patient et de la présentation clinique de l'acné. Parmi les traitements topiques, on peut citer les rétinoïdes, le peroxyde de benzoyle et les antibiotiques. Parmi les traitements systémiques pouvant être proposés, l'efficacité des tétracyclines, des sels de zinc et de l'isotrétinoïne a été largement démontrée (Gollnick et al., 2003).

Le gluconate de zinc a été démontré comme ayant une efficacité supérieure à celle du placebo dans l'acné inflammatoire (Dréno et al., 1989). Les études comparant l'efficacité du gluconate de zinc à celle des tétracyclines par voie systémique sont discordantes, démontrant soit une supériorité de l'antibiotique, soit une absence de différence entre les deux traitements (Revuz et al., 1990; Dréno et al., 2001). Son efficacité est très probablement multifactorielle, reposant sur ses actions sébo-régulatrice, bactériostatique et anti-inflammatoire (Brocard et Dréno, 2011).

- **Zinc et maladie de Verneuil**

La maladie de Verneuil, aussi nommée hidradenitis suppurativa ou acné inversée, est une pathologie chronique relativement rare, touchant préférentiellement l'adulte jeune, souvent fumeur. La maladie de Verneuil touche les follicules pilo-sébacés des régions riches en glandes apocrines (plis rétro-auriculaires, nuque, creux axillaires, plis sous-mammaires, creux inguinaux, région périnéo-fessière). Elle se caractérise par le

développement de lésions nodulaires inflammatoires évoluant secondairement en des lésions abcédées ou fistulisantes, et laissant des cicatrices majeures permanentes.

La physiopathologie de la maladie de Verneuil est mal connue, mais semble associer hyperkératinisation du follicule pilo-sébacé, aboutissant à son occlusion, inflammation et infection secondaire par des corynébactéries. Récemment, il a été démontré que l'immunité innée était fortement impliquée dans cette pathologie, notamment via la mise en évidence d'une dysrégulation de la production de cytokines au niveau des lésions cutanées, mais également en peau péri-lésionnelle chez des patients atteints par la maladie, en comparaison à des sujets sains (Van der Zee et al., 2011; Dréno et al., 2012).

Classiquement, le traitement de la maladie de Verneuil est délicat. Il peut associer antibiotiques topiques ou systémiques, isotrétinoïne, gluconate de zinc, traitement mécanique chirurgical ou par laser CO₂. Récemment, l'efficacité du traitement de la maladie de Verneuil par un anticorps anti-TNF- α , l'infliximab, a été décrit dans plusieurs études, renforçant les arguments impliquant un dysfonctionnement de l'immunité innée dans cette pathologie (Brunasso et Massone, 2011).

Bien qu'il ne dispose pas pour le moment d'une AMM dans la maladie de Verneuil, une étude a démontré l'intérêt d'un traitement par gluconate de zinc à hautes doses, chez 22 patients, ayant tous présenté une rémission complète (N=8) ou partielle (N=14), cet effet étant cependant plutôt suspensif que curatif (Brocard et al., 2007).

- **Zinc et autres pathologies cutanées**

L'intérêt d'un traitement par gluconate de zinc a également été rapporté sous formes de séries de quelques cas dans d'autres dermatoses inflammatoires rares, telles que la furonculose récidivante, la folliculite décalvante, la pustulose érosive du scalp ou la sclérodermie en plaques (Brody, 1977; Foulc et al., 2002; El Kabbaj et al., 2005; Brocard et al., 2012).

IV- Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail a donc été de chercher à analyser si le gluconate de zinc était capable de moduler, d'une part PPAR- α , d'autre part des peptides antimicrobiens, dans un modèle d'explants cutanés stimulés par le LPS, reproduisant *ex vivo* un modèle de dermatose inflammatoire.

Dans notre travail, nous avons étudié les modulations induites par le LPS sur l'expression et la sécrétion de l'IL-8, afin de pouvoir valider notre modèle comme un modèle effectif d'inflammation induite dans les explants cutanés.

La première partie de notre étude s'est intéressée aux modulations induites par le gluconate de zinc, dans les explants cutanés inflammés par le LPS sur l'expression de l'ARN messager (ARNm) et de la protéine PPAR- α , ainsi que sur l'activité facteur de transcription de cette dernière.

La seconde partie de notre travail a étudié les modulations de l'expression protéique et de l'ARNm, ainsi que de la sécrétion extracellulaire des peptides antimicrobiens hBD-2, hBD-4 et psoriasine, dans ces mêmes explants inflammés.

Matériel et Méthodes

I- Matériel

A- Peaux de donneurs sains

Les explants cutanés de peau humaine étaient obtenus à partir d'échantillons de peau saine, issus d'interventions chirurgicales de plasties de réduction abdominale ou mammaire ou de « liftings » de cuisses après lipoaspiration, réalisées dans les services de chirurgie plastique du Centre Hospitalier Universitaire (Docteurs Bellier-Waast et Perrot) et de la Clinique Jules Verne (Docteur Hepner) de Nantes, France. Tous les patients avaient donné préalablement leur consentement au prélèvement cutané pour la réalisation de cette étude, menée conformément aux principes éthiques de la Déclaration d'Helsinki.

B- Modulateurs

- **Oligo-élément**

50 mg de gluconate de zinc (Laboratoire Labcatal, Montrouge, France), équivalents à 6,7 mg de zinc élément (Zn) étaient dilués dans un milieu de culture, le Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) contenant 4,5% de glucose, pour une concentration finale en Zn de 1µg/mL.

- **Lipopolysaccharide (LPS)**

Nous avons utilisé du LPS commercial extrait d'une souche d'*E. coli O111:B4* (Sigma-Aldrich) comme témoin positif de l'inflammation. Le LPS était reconstitué dans du

Phosphate Buffer Saline (PBS) afin d'obtenir une solution mère à la concentration de 1 mg/mL, puis dilué dans du DMEM pour une concentration finale en LPS de 1 μ g/mL.

II- Méthodes

A- Culture d'explants cutanés

Le prélèvement des explants était réalisé grâce à des « biopsy punches » de 4 mm de diamètre, emportant l'épiderme et le derme d'échantillons chirurgicaux des six donneurs sains. L'hypoderme avait été préalablement retiré au bistouri. Cette technique permettait la réalisation d'explants homogènes en taille.

Pour chaque donneur, deux explants étaient immédiatement congelés à -80°C, considérés comme explants contrôles non incubés et utilisés uniquement en Immunohistochimie (IHC). Les autres explants prélevés étaient disposés dans le fond de plaques 24 puits, incubés à 37 °C, en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂, pendant 3, 6 ou 24 heures, dans 250 µL de DMEM seul (utilisé comme contrôle) ou supplémenté par du LPS à la concentration de 1µg/mL. Afin d'évaluer les effets du zinc, des explants étaient préalablement pré-incubés pendant 24 heures dans 250 µL de DMEM contenant du Zn à la concentration de 1µg/mL, puis incubés pendant 3, 6 ou 24 heures dans du DMEM supplémenté avec du LPS et du Zn, tous deux avec une concentration finale de 1µg/mL. Les concentrations des modulateurs et les durées d'incubation étaient choisies en adéquation avec les données de la littérature et l'expérience du laboratoire.

Après les incubations de 3, 6 ou 24 heures, les explants étaient retirés du milieu de culture et lavés en PBS. Pour chaque condition, deux explants étaient congelés à -80°C pour l'étude en IHC, un autre était broyé dans du Trizol pour la qRT-PCR et une extraction nucléaire était réalisée avec le dernier explant pour le test de liaison à l'ADN de PPAR- α . Les surnageants de culture étaient prélevés, centrifugés pour culoter les débris cellulaires, puis conservés à -80°C en vue des dosages ELISA.

B- PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

- **qRT-PCR avec sonde TaqMan : principes et rationnel**

La technique de qRT-PCR permet une détection de fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ARN initialement présente dans l'échantillon analysé, dans notre cas les broyats tissulaires issus des explants cutanés.

La qRT-PCR permet une analyse quantitative de l'ADN synthétisé en temps réel, cycle après cycle. Après extraction et rétrotranscription, l'ADN complémentaire (ADNc) formé va s'hybrider spécifiquement avec une amorce et une sonde spécifiques, la sonde étant couplée à deux fluorochromes, le premier étant émetteur de fluorescence (« reporter ») et le second étant suppresseur de la fluorescence du premier (« quencher »). Une polymérase va ensuite être ajoutée pour entraîner la formation d'un brin d'ADNc et en avançant, va libérer le « reporter », dont la fluorescence ne sera plus réprimée par le « quencher » et sera alors détectable.

Dans notre étude, l'utilisation de cette technique, sensible et très spécifique, nous a permis d'analyser l'expression moléculaire des différents marqueurs étudiés en amont de leur traduction, avec une possibilité de quantification et de comparaison des différentes conditions entre elles.

- **Extraction d'ARN totaux**

Après culture, les explants cutanés étaient broyés dans 1 ml de réactif Trizol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turrax T25 (IKA, Staufen, Allemagne). L'extraction d'ARN était réalisée en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), selon les recommandations du fournisseur. Les concentrations d'ARN total étaient évaluées à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Scientific, Illkirch, France) et la qualité de l'ARN extrait grâce à une puce Agilent technologies (Agilent Technologies, Massy, France).

- **Rétrotranscription**

La rétrotranscription était réalisée à partir de 1 µg d'ARN total pour chaque échantillon. Le volume était ajusté à 25µL en complétant avec de l'eau RNase free. Les ARN étaient dénaturés pendant 2 minutes à 70°C, puis incubés pendant 1 heure 15 minutes à 42°C en présence de DTT 10 mM, Tampon First Strand 1X, dNTP mixture 1mM, Oligo(DT)12-18 Primer 0,5 µg/µg, M-MLV Reverse Transcriptase 8U/µL et RNase-Out Recombinant Ribonuclease inhibitor 0,4U/µL (Invitrogen) dans un volume total de 50 µL/tube.

- **PCR quantitative**

Les quantifications relatives de l'expression des gènes d'intérêt (hBD-2, hBD-4, psoriasine, PPAR- α , IL-8) par rapport à l'HPRT1 (Hypoxanthine PhosphoRibosyl-Transférase 1, en tant que gène de ménage) étaient réalisées à partir de 20 ng d'ADNc par échantillon et des sondes TaqMan correspondantes aux séquences des gènes ciblés (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France), dans un thermocycleur Mx3005P (Stratagène, Lyon, France). Le programme utilisé était le suivant : 1 cycle à 50°C pendant 2 minutes, 1 cycle à 95°C pendant 10 minutes, puis 45 cycles de 30 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. L'efficacité de la réaction était vérifiée par l'utilisation d'une gamme de dilution d'ADNc issus de NHEK stimulés (témoin positif de hBD-2), de testis humain normal (témoin positif de hBD-4), d'une lignée de cellules HaCaT (témoin positif de psoriasine), de tissu hépatique normal (témoin positif de PPAR- α) et d'une lignée de cellules THP1 (témoin positif d'IL-8), réalisée en parallèle des PCR des gènes d'intérêt.

- **Analyse des résultats**

Chaque échantillon était analysé en duplicate, dans deux puits séparés. Pour chaque échantillon d'ADNc, la valeur moyenne des CT (« threshold cycle » ou cycle-seuil)

provenant des duplicates de PCR pour les gènes d'intérêt était normalisée à la valeur du CT pour l'HPRT1. L'expression relative de chaque gène d'intérêt était calculée à partir de l'efficacité de la PCR (E) et de la différence des CT entre un échantillon donné stimulé (x) comparé à un échantillon non stimulé (calibrator), exprimés en comparaison à l'HPRT :

Exemple : Ratio = $(E_{\text{hBD-2}})^{\Delta \text{CT}_{\text{hBD-2}}(\text{calibrator-x})} / (E_{\text{HPRT}})^{\Delta \text{CT}_{\text{HPRT}}(\text{calibrator-x})}$

C- Immunohistochimie

- *Principes et rationnel de l'utilisation de l'IHC*

La technique d'IHC est une technique immunoenzymatique qualitative et semi-quantitative, permettant la localisation d'antigènes dans une coupe de tissu. Les antigènes ciblés sont reconnus au moyen d'anticorps spécifiques. Dans notre cas, le couple antigène-anticorps était ensuite reconnu par un anticorps secondaire biotinylé, réagissant par la suite avec des molécules de streptavidine conjuguée à l'Horseradish Peroxidase (HRP). L'ajout du substrat de l'HRP, le 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC), permettait de visualiser la réaction grâce à la formation d'un produit rouge vif sur le site de l'antigène cible.

Dans notre étude, cette technique nous a permis d'estimer l'importance de l'expression protéique des différents marqueurs étudiés et de la localiser au sein de l'épiderme.

- *Préparation des lames et immunomarquage*

Les lames étaient préparées à partir des explants cutanés incubés congelés. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées grâce à un microtome contenu dans une enceinte cryostatique. Les coupes étaient ensuite fixées sur lames dans l'acétone, puis conservées à -20°C.

Les sites non spécifiques étaient saturés pendant 30 minutes avec du TBS (Tris-Buffered Saline) 0,05% Tween20 w/v, 0,1 % BSA w/v (Sigma-Aldrich). Après blocage

préalable des peroxydases endogènes, les anticorps primaires étaient déposés sur les lames à la dilution appropriée, puis incubés pendant 18 heures à 4°C en atmosphère humide. Les témoins négatifs consistaient en une omission d'anticorps pour les anticorps primaires polyclonaux, et en une incubation par une IgG irrelevante de même isotype pour les anticorps primaires monoclonaux.

Des rinçages de 10 minutes étaient effectués entre chaque étape avec le TBS, 0,05% Tween20, 0,1% BSA, puis les lames étaient successivement incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé (DAKO ChemTek Detection kit peroxydase/AEC, rabbit/mouse ; DAKO, Trappes, France) pendant 30 minutes, avec la streptavidine couplée à l'HRP pendant 30 minutes et enfin avec l'AEC pendant 5 minutes. La réaction était stoppée à l'eau distillée. La contre-coloration des lames était ensuite réalisée avec de l'Hémalun de Mayer pendant 1 à 2 minutes, pour marquer les noyaux cellulaires. Les lames étaient ensuite rincées à l'eau distillée et montées entre lame et lamelle avec un milieu aqueux. Les caractéristiques des différents anticorps primaires utilisés sont résumées dans le Tableau II. Cette technique n'a pu être utilisée pour l'IL-8, du fait de sa solubilité.

Anticorps	Clonalité	Fournisseur	Hôte	Concentration utilisée
hBD-2	Polyclonal IgG	Abcam, San Francisco, USA	lapin	1/50 Solution mère
hBD-4	Monoclonal IgG1	Abcam	souris	5 µg/mL
Psoriasine	Monoclonal IgG1	Abcam	souris	10 µg/mL
PPAR- α	Polyclonal IgG	Lifespan, Seattle, USA	lapin	10 µg/mL

Tableau II. Liste des anticorps utilisés pour la technique d'Immunohistochimie

- **Lecture des lames**

La lecture des lames était réalisée à l'aide d'un microscope Leica (Leica Microsystems, Nanterre, France) et les photographies étaient prises avec un appareil photo numérique Reflex Nikon D70S (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Toutes les expositions étaient de même durée, à la même luminosité et au même grossissement (x25). L'intensité du marquage était évaluée sur quatre champs par deux observateurs indépendants en aveugle. L'intensité du marquage était cotée sur l'échelle suivante: aucun marquage (0), marquage très faible (1), faible (2), modéré (3), fort (4), très fort (5). Les résultats étaient définis par la moyenne de l'intensité de marquage retrouvée par les deux observateurs.

D- Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

- **Principes de la technique d'ELISA**

Le dosage ELISA permet le dosage de protéines dans des liquides biologiques ou surnageants de culture, grâce à un principe de dosage immunoenzymatique de type « sandwich », caractérisé par l'utilisation de deux anticorps dirigés contre la protéine à doser. Le premier, dit anticorps de capture, est fixé au support. Le second, dit anticorps de révélation, était dans notre cas couplé à l'HRP, permettant de catalyser le substrat de la réaction en une substance colorée dont l'intensité est mesurée par une lecture de densité optique (DO). La DO mesurée pour les échantillons est comparée à une courbe-étalon établie en parallèle. Chaque échantillon était analysé en duplicate.

- **Technique**

Afin de déterminer les concentrations en hBD-2, hBD-4, psoriasine et IL-8 relargués dans les surnageants de culture, les milieux étaient récoltés après les durées d'incubation choisies (3, 6 ou 24 heures). Les surnageants étaient centrifugés à la vitesse

de 7000 tours/minute pendant 10 minutes, afin d'éliminer d'éventuels débris cellulaires, puis étaient congelés à -80°C. Les concentrations relarguées en hBD-2, hBD-4, psoriasisine et IL-8 étaient mesurées en utilisant des kits commerciaux, en suivant les instructions des fabricants (Tableau III). Tous les échantillons étaient analysés en duplicate.

Kit	Fournisseur	Longueur d'onde de lecture
Human BD-2 Mini ELISA Development Kit	Peptotech, Neuilly-sur-Seine, France	405 nm, corrigée à 650 nm
Human BD-4 Mini ELISA Development Kit	Peptotech	405 nm, corrigée à 650 nm
CircuLex S100A7/Psoriasisin ELISA Kit	MBL, Clinisciences	450 nm, corrigée à 540 nm
Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience, Paris, France	450 nm

Tableau III. Liste des tests ELISA commerciaux utilisés.

E- Test de liaison à l'ADN de PPAR- α

Des extraits protéiques nucléaires d'explants cutanés étaient réalisés en utilisant un kit d'extraction nucléaire (Nuclear Extraction Kit, Cayman, Interchim, Montluçon, France), selon les instructions du fabricant. La fonction facteur de transcription de PPAR- α était évaluée en mesurant sa capacité de liaison à l'ADN par un dosage immunoenzymatique de type ELISA (PPAR- α Transcription Factor Assay Kit, Cayman).

Une séquence d'ADN double brin spécifique de PPAR- α , le PPRE, était immobilisé sur le fond d'une plaque 96 puits. Le PPRE a la propriété de se lier spécifiquement aux PPAR contenus dans les échantillons d'extraits nucléaires. Le PPAR- α lié au PPRE était ensuite détecté par un anticorps spécifique. L'ajout d'un anticorps secondaire conjugué à l'HRP permettait de catalyser le substrat de la réaction en une substance colorée dont l'intensité était mesurée par une lecture de DO à une longueur d'onde de 450 nm. Chaque échantillon était analysé en duplicate.

F- Analyse statistique

Pour la technique de qRT-PCR, l'expression relative de l'ARNm des différents marqueurs étudiés ont été exprimés par la moyenne d'expression entre les différents donneurs, assortie de l'écart-type, en comparaison au niveau d'expression de base (groupe contrôle Ctrl) ou au niveau d'expression induit par le LPS.

Pour les techniques d'IHC, d'ELISA et pour le test de liaison à l'ADN de PPAR- α , les résultats ont été exprimés par la moyenne d'expression, de sécrétion ou de densité optique entre les différents donneurs, assortie de l'écart-type.

Pour déterminer les différences entre les différents groupes, un test classique de Mann-Whitney était réalisé. Les différences étaient considérées comme significatives pour une valeur de $p < 0,05$.

Résultats

I- Explants de peau saine

L'étude a été réalisée à partir de peaux saines provenant de six donneurs caucasiens sains différents. Trois étaient issues de chirurgies de plastie abdominale, deux de chirurgie de « lifting » de cuisse après lipoaspiration, et une de chirurgie de réduction mammaire. Les prélèvements nous étant adressés sous couvert d'anonymat par les services de chirurgie, nous ne disposions d'aucune autre donnée démographique ou médicale concernant les patients donateurs.

II- Présentation des résultats

Les résultats sont présentés ci-après, dans deux articles. Le premier article s'est intéressé aux modulations induites sur l'expression et l'activité de PPAR- α , le second à celles induites sur l'expression et la sécrétion des peptides antimicrobiens.

III- Première partie :

Le gluconate de zinc active PPAR- α

dans l'épiderme stimulé par le LPS

A- Objectifs

L'objectif principal de ce travail était d'étudier un possible effet modulateur du gluconate de zinc sur l'expression et l'activation de PPAR- α dans des explants cutanés stimulés par le LPS, représentant un modèle de dermatose inflammatoire *ex vivo*.

B- Méthodologie

Nous avons utilisé des explants cutanés de peau saine que nous avons incubés pendant 3, 6 ou 24 heures, en présence de LPS ou de milieu seul, comme contrôle négatif. Afin d'étudier les modulations induites par le gluconate de zinc, certains explants étaient pré-incubés pendant 24 heures en présence de gluconate de zinc, avant d'être stimulés par le LPS. Ensuite, l'expression épidermique de la protéine PPAR- α était analysée grâce à une technique d'IHC, l'expression d'ARNm de PPAR- α dans les explants grâce à une technique de qRT-PCR, et l'activité fonctionnelle de PPAR- α grâce à une technique de type ELISA.

C- Article

Les résultats de cette étude sont présentés ci-après sous forme d'un premier article publié dans *Experimental Dermatology*.

Poiraud, C., Quéreux, G., Knol, A. C., Allix, R., Khammari, A., et Dréno, B. (2012). Zinc gluconate is an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- α in the epidermis. *Exp. Dermatol* 21, 347-351.

Zinc gluconate is an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- α in the epidermis

Carole Poiraud^{1,2}, Gaëlle Quereux^{1,2}, Anne-Chantal Knol¹, Rémy Allix³, Amir Khammari^{1,2} and Brigitte Dreno^{1,2}

¹INSERM U892, Nantes University Hospital, Nantes, France; ²Department of Dermato-Oncology, Nantes University Hospital, Nantes, France; ³Private Statistical Consultant, Nantes, France

Correspondence: Brigitte Dreno, Department of Dermato-Oncology, CHU Nantes Hôtel Dieu, 1, place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France. Tel.: +33-2-40-08-31-18, Fax: +33-2-40-08-31-17, e-mail: brigitte.dreno@wanadoo.fr

Abstract: Peroxisome proliferator-activated receptors- α (PPARs- α) are nuclear receptors with anti-inflammatory properties. Zinc gluconate is efficient in the treatment of several inflammatory dermatoses. The aim of our work was to determine whether the modulation of PPAR- α expression and activity could be one of the mechanisms of action of zinc gluconate anti-inflammatory activity in inflammatory dermatoses. Thus, we used *ex vivo* skin explants incubated with lipopolysaccharide (LPS), a pro-inflammatory molecule, with or without zinc gluconate. We evaluated PPAR- α protein expression using immunohistochemistry, PPAR- α DNA-binding activity using an ELISA-like technique, and PPAR- α mRNA levels using quantitative PCR. On the one hand, we found that PPAR- α

epidermal protein expression was stimulated by LPS and that LPS suppressed PPAR- α mRNA expression, without modifying its function. On the other hand, in inflammatory LPS-stimulated explants, zinc gluconate significantly upregulated PPAR- α function and mRNA expression level, without changing its epidermal protein expression. These results suggest that zinc gluconate may be a PPAR- α agonist, which might play a role in the anti-inflammatory activity of this molecule.

Key words: epidermis – LPS – peroxisome proliferator-activated receptors- α – zinc gluconate

Accepted for publication 30 January 2012

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are nuclear receptors acting as transcription factors (1). After a translocation of their cytoplasmic inactive form into the cell nucleus, PPARs are activated by natural (as free fatty acids) or synthetic (as fibrates) ligands, then dimerized with a retinoid X receptor and specifically bound to a double-stranded DNA sequence containing the PPAR response element (PPRE) (2). This DNA sequence is located in the promoter region of genes regulating proliferation, differentiation, apoptosis, lipid metabolism and also inflammation (3).

Three different PPARs have been identified in human keratinocytes: PPAR- α , PPAR-b/d and PPAR-c (4). PPARs activation inhibits the sebaceous lipogenesis (5), stimulates the differentiation and decreases the proliferation of keratinocytes (6), and regulates keratinocyte apoptosis and improves the cutaneous barrier homeostasis (7,8). PPARs have also anti-inflammatory properties. PPAR- α and PPAR-b/d agonists have particularly been shown to inhibit TGF α -induced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) that acts as a pro-inflammatory substance (9,10). PPAR- α is known to be a downregulator of the transactivation capacities of NF- κ B and AP-1 signalling pathways (11). PPAR- α expression is decreased in psoriatic epidermis (12). Topical PPAR- α activators have been proven to decrease tumor necrosis factor- α and interleukin-1 α levels in the epidermis of a contact dermatitis mouse model (13). Recently, De Belilovsky et al. (14) demonstrated the interest of a natural PPAR- α agonist cream in the treatment of atopic dermatitis in children.

Zinc gluconate has been reported to be an effective treatment for several inflammatory dermatoses, such as mild to moderate

inflammatory acne vulgaris or hidradenitis suppurativa (15,16). In advanced acne grades, zinc serum levels have been shown to be lower than in a control group (17). Zinc salts have been demonstrated to have specific anti-inflammatory properties, specifically with regard to the innate immune system. Indeed, zinc salts inhibit granulocytes chemotaxis (18), are implicated in natural killer cells and keratinocytes activation (19,20), increase integrin production in differentiated keratinocytes (21) and inhibit Toll-like receptor-2, tumor necrosis factor- α and interleukin-8 (22).

Links between zinc and PPAR- α activation have been reported in porcine vascular endothelial cells, human monocytic leukaemia and endothelial cells, and in a mouse alcohol-induced steatosis model (23–25). In this context, the aim of our work was to investigate whether zinc gluconate was able to modulate PPAR- α expression and activity in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated skin explants. We thus demonstrated that LPS downregulated PPAR- α mRNA expression, without downregulating its function and epidermal protein expression, and that zinc gluconate significantly upregulated PPAR- α function and mRNA expression level, without changing its epidermal protein expression.

Methods

Bacterial extracts

Lipopolysaccharide, used for its pro-inflammatory properties, was extracted from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and reconstituted in phosphate-buffered saline. LPS was diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) to a final concentration of 11 g/ml and incubated with skin explants.

Trace element

Zinc gluconate (15 mg zinc gluconate = 2 mg zinc element; Lab-catal, Montrouge, France) was diluted in DMEM to a final zinc concentration of 1 µg/ml.

Healthy skin explants

Normal human skin explants – an *ex vivo* condition modelling the *in vivo* situation – were obtained from surgical samples of healthy skin donors undergoing abdominoplasty, gynaecomastia surgery or thigh lifting, from the Plastic Surgery Departments of Nantes University Hospital and Nantes Jules Verne Private Hospital (France). All patients provided their written, informed consent. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki, and the Medical Ethical Committee of Nantes University Hospital approved all described studies.

Skin explant technique

Skin punches (4 mm diameter) from six healthy donors, considered as a healthy skin model, were incubated at 37°C in a moist atmosphere in the presence of 5% CO₂ for 3, 6 or 24 h in DMEM alone (used as control) or supplemented with 1 µg/ml LPS. Several explants were directly frozen at –80°C, without being incubated, to have a control for non-incubated skin. To evaluate zinc effects, several explants were preincubated with 1 µg/ml zinc gluconate for 24 h and then incubated for 3, 6 or 24 h with LPS and zinc gluconate, both at a final concentration of 1 µg/ml. After incubations of 3, 6 or 24 h, the explants were removed from the culture medium. Four explants were used for each independent condition: two were frozen at –80°C, and two others were immediately used for RNA and nuclear extractions.

Immunoperoxidase

Immunohistochemistry was performed using the streptavidin/peroxidase technique as previously described (22). We used frozen sections (5 µm thick) of skin explants. Monoclonal primary antibody for PPAR-α (LifeSpan BioSciences, Cliniscience, Montrouge, France) was deposited on the slides for 18 h at 4°C overnight in a humid environment. Irrelevant mouse IgG antibody was used as a negative control.

Microscopy and scoring

Slides were read using a Leica microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France), and photographs were taken with a digital SLR Camera D70S (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). All exposures were done with the same duration, using the same luminosity and magnification (×25). Immunostaining intensity within the epidermis was scored by two independent observers, who were unaware of the tissue source or incubation conditions. Labelling intensity was scored on a five-point scale: null labelling [0], very weak labelling [1], weak labelling [2], moderate labelling [3], strong labelling [4] and very strong labelling [5].

Peroxisome proliferator-activated receptors-α DNA-binding assay

Nuclear extracts from skin explants were prepared using a Nuclear Extraction Kit (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France) and following the manufacturer's instructions. Briefly, PPAR-α function was assessed by measuring the DNA-binding ability with a PPAR-α transcription factor assay kit containing a 96-well ELISA plate (Cayman Chemicals). A specific double-stranded DNA sequence containing the PPRE was immobilized on the bottom of the wells, and PPARs contained in

a nuclear extract bound specifically to the PPRE. PPAR-α was detected by the addition of a rabbit polyclonal antibody directed against PPAR-α, followed by an incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for colorimetric quantification.

Real-time quantitative reverse-transcription PCR

Skin explants were disrupted in 1 ml Trizol Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with an Ultra-Turrax T25 homogenizer (IKA, Staufen, Germany). mRNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtabouef, France). mRNA concentrations were evaluated using a Nanodrop (Thermo Scientific, Illkirch, France), and RNA integrity using Agilent technology (Agilent Technologies, Massy, France). Reverse transcription was performed using 1 µg of total RNA, and relative quantification of PPAR-α and HPRT (housekeeping gene) expression was performed using real-time quantitative PCR as previously described (26), using the corresponding TaqMan probes (TaqMan gene expression assays; Applied Biosystems, Courtabouef, France) and 20 ng of complementary DNA samples, on a Mx3005P apparatus (Stratagene, Lyon, France). Thermal cycling was at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 45 cycles at 95°C for 30 s and 60°C for 1 min. PCR efficiency was determined using normal liver total RNA as a positive control for PPAR-α, performed in parallel to plot the standard curves for PPAR-α. Mean threshold cycle (CT) values from duplicate PCRs were normalized to mean CT values for the housekeeping gene (HPRT) from the same complementary DNA preparations. Relative expression ratio of a target was calculated on the basis of the PCR efficiency (E) and CT deviation between a given skin sample (x) and non-stimulated skin samples (calibrator), expressed in comparison with HPRT: $\text{ratio} = ((E \text{ PPAR-}\alpha)^{\Delta\text{CT}} \text{ PPAR-}\alpha(\text{calibrator-x})) / ((E \text{ HPRT})^{\Delta\text{CT}} \text{ HPRT}(\text{calibrator-x}))$.

Statistical analysis

Peroxisome proliferator-activated receptors-α protein levels and DNA-binding activity were expressed as means ± SD. For PPAR-α mRNA analysis, mRNA relative expressions were expressed as means ± SD compared with the basal level (Ctrl) or the LPS-induced level (LPS) for each incubation time. To determine the differences between all experimental groups (Ctrl, LPS, zinc, zinc + LPS), a Mann-Whitney test was performed. LPS/zinc-stimulating effects as compared with controls and the effect of zinc preincubation on LPS stimulation as compared with LPS alone were all considered significant for a value $P < 0.05$.

Results**Peroxisome proliferator-activated receptors-α expression in the epidermis of non-inflammatory skin explants**

Peroxisome proliferator-activated receptors-α were expressed in the epidermis of normal non-inflammatory skin explants (Fig. 1a). The staining was present in all the layers of the epidermis but was stronger in the basal layer. Immunostaining was not observed in the dermis of skin explants, except in few endothelial cells.

Ex vivo modulation of peroxisome proliferator-activated receptors-α expression in LPS-induced inflammatory skin explants

After a 6-h incubation, LPS significantly increased PPAR-α expression in the epidermis of skin explants, with a 2.33 ± 0.52 basal expression level with the control (Ctrl) medium increasing to 3.50 ± 0.55 with LPS ($P < 0.05$; Figs 1 and 2).

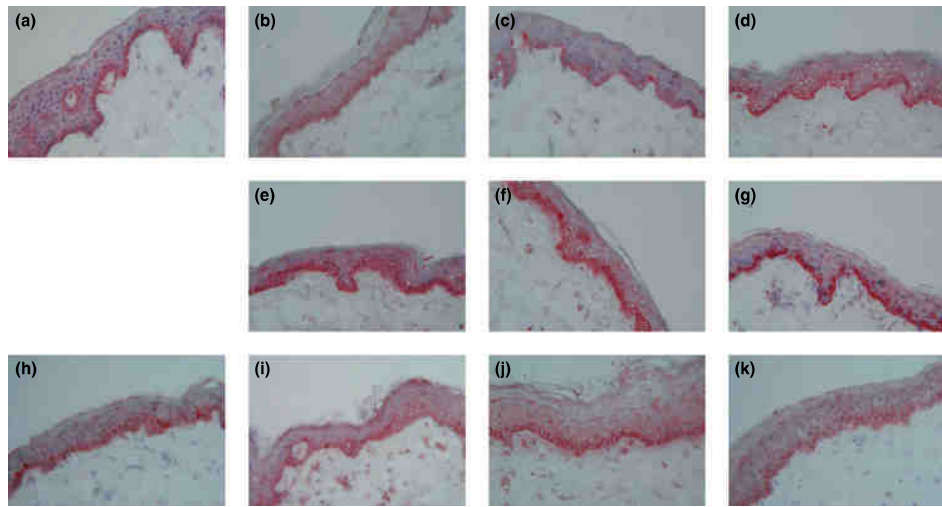


Figure 1. Peroxisome proliferator-activated receptors- α (PPAR- α) cutaneous protein expression is modulated by zinc gluconate in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated inflammatory skin. Detection of PPAR- α expression in normal non-inflammatory skin explants (a) after 3 h (b and e), 6 h (c and f) and 24 h (d and g) of incubation with Dulbecco's modified Eagle's medium alone (control, Ctrl) (b, c and d) or LPS (e, f and g), after a 24-h incubation with zinc gluconate alone (h), and with a 24-h preincubation with zinc gluconate (i, j and k) before LPS addition for 3 h (i), 6 h (j) or 24 h (k).

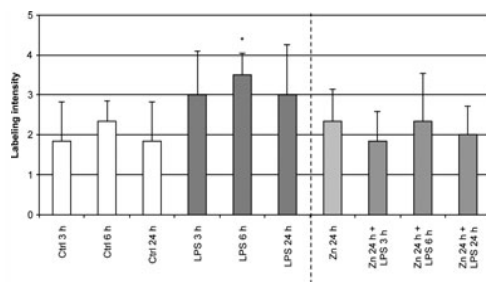


Figure 2. Zinc gluconate modulates peroxisome proliferator-activated receptors- α (PPAR- α) epidermal protein expression in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated skin explants. PPAR- α epidermal expression in skin explants, after incubation with Dulbecco's modified Eagle's medium alone (Ctrl) or LPS for 3, 6 or 24 h, with zinc gluconate alone for 24 h (Zn) or with a 24-h preincubation with zinc gluconate before LPS addition for 3, 6 or 24 h. Scale: null labelling (0), very weak labelling (1), weak labelling (2), moderate labelling (3), strong labelling (4) and very strong labelling (5). Values are expressed as means \pm SD ($n = 6$). * $P < 0.05$.

Peroxisome proliferator-activated receptors- α DNA-binding activity in LPS-stimulated skin explants nuclear extracts

No modulation of PPAR- α DNA-binding activity was obtained with LPS, at any incubation time (3, 6 or 24 h), as compared with the Ctrl medium ($P > 0.05$; Fig. 3).

Real-time quantitative RT-PCR analysis of peroxisome proliferator-activated receptors- α in LPS-stimulated skin explants

Peroxisome proliferator-activated receptors- α mRNA level was significantly inhibited only after a 24-h incubation with LPS (inhibition factor = 0.69 ± 0.15 ; $P < 0.01$; Fig. 4a).

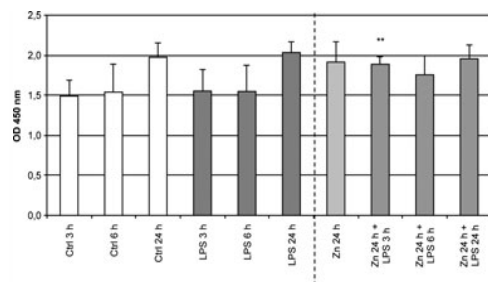


Figure 3. Zinc gluconate modulates nuclear peroxisome proliferator-activated receptors- α (PPAR- α) activity in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated inflammatory skin. DNA-binding activity of nuclear-extracted PPAR- α in skin explants, after incubation with Dulbecco's modified Eagle's medium alone (Ctrl) or LPS for 3, 6 or 24 h, with zinc gluconate alone for 24 h (Zn), or with a 24-h preincubation with zinc gluconate before LPS addition for 3, 6 or 24 h. Values are expressed as means \pm SD ($n = 6$). OD, optic density. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Modulation of peroxisome proliferator-activated receptors- α expression by zinc gluconate in skin explants

The 24-h incubation with zinc (Zn) gluconate did not modulate PPAR- α expression in the epidermis of non-inflammatory skin explants, as compared with the Ctrl medium ($P > 0.05$; Figs 1 and 2). Furthermore, the 24-h preincubation with Zn gluconate did not significantly modulate the LPS-induced PPAR- α expression in the epidermis of skin explants ($P < 0.05$).

Peroxisome proliferator-activated receptors- α DNA-binding activity modulation by zinc gluconate in skin explants nuclear extracts

After a 24-h incubation of non-inflammatory skin explants with zinc gluconate, no modulation of PPAR- α DNA-binding activity

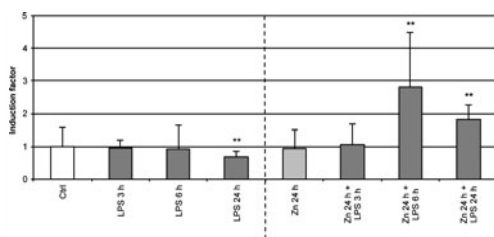


Figure 4. Peroxisome proliferator-activated receptors- α (PPAR- α) mRNA expression is modulated by zinc gluconate in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated skin explants. PPAR- α mRNA relative expression after incubation with LPS for 3, 6 or 24 h, with zinc gluconate alone for 24 h (Zn), or with a 24-h preincubation with zinc gluconate before LPS addition for 3, 6 or 24 h, as compared with the basal level (Ctrl), which was considered as 1. Values are expressed as means \pm SD ($n = 6$). * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

was obtained, as compared with the Ctrl medium ($P > 0.05$; Fig. 3). However, a 24-h preincubation with zinc gluconate significantly increased PPAR- α DNA-binding activity in LPS-stimulated skin explants, as compared with LPS-stimulated explants without preincubation with zinc gluconate (1.55 ± 0.27 – 1.89 ± 0.09 ; $P < 0.01$; Fig. 3).

Real-time quantitative RT-PCR analysis of zinc gluconate modulation of peroxisome proliferator-activated receptors- α in skin explants

A 24-h incubation with Zn alone did not significantly modulate PPAR- α mRNA level, as compared with the Ctrl medium ($P > 0.05$; Fig. 4a). However, a preincubation with zinc gluconate significantly increased PPAR- α mRNA level in LPS-stimulated skin explants for 6 and 24 h, as compared with LPS alone (induction factor = 3.24 ± 1.50 after 6 h, and 2.67 ± 1.58 after 24 h; $P < 0.01$; Fig. 4b).

Discussion

In this study, we found that PPAR- α was constitutively expressed in all the layers of the epidermis of normal non-inflammatory skin explants, especially in the basal layer. Zinc gluconate increased PPAR- α mRNA synthesis and DNA-binding activity in the epidermis of LPS-induced inflammatory skin explants, without significantly modulating PPAR- α epidermal protein expression.

Peroxisome proliferator-activated receptors- α is expressed by human keratinocytes, sebocytes, hair follicles, basal cells of sebaceous glands, reconstructed skins and in foetal mouse skins (27–30). To our knowledge, no study has shown to date a preferential PPAR- α basal localization in the epidermis, both in normal and in stimulated skins. With regard to PPAR- α intracellular localization, it has been observed that PPAR- α can have both a cytoplasmic and a nuclear localization, corresponding respectively to its inactive and active forms, this last one resulting from the translocation of the inactive form into the nucleus where it can act as a transcription factor (29).

In addition to its regulatory roles on the differentiation, proliferation, apoptosis and lipid metabolism, PPAR- α has also been reported to inhibit inflammation. Indeed, PPAR- α inhibits the inflammatory response in aortic smooth muscle cells (31). PPAR- α agonists reduce the duration of leukotriene B₄ or arachidonic acid-induced inflammatory response in PPAR- α knockout mice, whereas inflammation is prolonged in non-treated mice (32). This

anti-inflammatory effect is due to the fact that PPAR- α can antagonize NF- κ B and AP-1 signalling pathways by physically interacting with p65 and c-Jun (11,33) and by inducing the inhibitory protein I κ B α gene transcription (34).

Lipopolysaccharide, which is a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, is considered as a reference pro-inflammatory substance (35). Studies have shown that LPS-induced inflammation suppresses PPAR- α expression both in mouse liver and in lung (36,37). In this study, we demonstrated that LPS stimulation decreased PPAR- α transcription in human skin explants, while its cytoplasmic protein expression was increased without changing its functional activity. According to these findings, LPS may induce a recycling mechanism of the PPAR- α nuclear form into a cytoplasmic form, leading to PPAR- α protein accumulation in the cytoplasm of the keratinocytes, this protein becoming detectable by our immunostaining technique. Then, inflammation may suppress PPAR- α synthesis and function in human skin explants, in a similar manner than shown previously in mouse liver and lung (36,37). Thus, the stimulation of skin explants by LPS may induce a negative feedback mechanism on PPAR- α synthesis and induce the accumulation of its inactive form, in order to prevent PPAR- α to play its anti-inflammatory role.

In proteins containing zinc finger domains, such as nuclear receptors, zinc element coenzyme function may explain zinc gluconate-induced PPAR- α mRNA synthesis and DNA-binding activity observed in LPS-stimulated skin explants. A link between zinc and PPAR- α has been reported in few studies. Indeed, zinc is required for the anti-inflammatory properties of PPAR- α agonists in porcine vascular endothelial cells (23). The authors hypothesized that zinc might contribute to the PPAR-retinoid X receptor protein complex assembly and stability. *In vivo*, it was demonstrated that zinc leads to increased PPAR- α protein expression in human monocytic leukaemia THP1 and endothelial cells (25). Finally, a zinc supplementation in a mouse alcohol-induced steatosis model induces PPAR- α mRNA synthesis and increases PPAR- α DNA-binding capacities (24).

In our study, we showed that zinc gluconate increased PPAR- α mRNA synthesis and DNA-binding activity in the epidermis of LPS-induced inflammatory skin explants. Surprisingly, we noted that a zinc gluconate preincubation did not upregulate PPAR- α protein expression in LPS-stimulated skin explants. This discrepancy may be explained by the nuclear translocation of PPAR- α -synthesized proteins and their activation as transcription factors. Thus, PPAR- α protein, acting as a DNA-binding transcription factor, may undergo conformational changes and become undetectable by an immunostaining technique. Thus, our results indicate that, in the epidermis, zinc may both increase PPAR- α transcription factor capacities, in a cofactor-like way, and stimulate PPAR- α synthesis.

It is interesting to note that zinc can be used in clinical practice to treat inflammatory skin disorders. Indeed, zinc gluconate has been proven to be more efficient than placebo in inflammatory acne (15) and in hidradenitis suppurativa (16) (30 and 90 mg zinc element/day, respectively). The efficiency of zinc-based treatment has also been reported in other inflammatory diseases, such as recurrent furunculosis and erosive pustulosis of the scalp (38,39). Acne is probably the skin disease in which

PPAR- α has been the most studied. Indeed, PPAR- α is an important sebocyte regulator, these cells being essential in acne pathogenesis. PPAR- α also regulates sebocyte differentiation (8), protects sebocytes from apoptosis (40) and regulates sebaceous lipogenesis (8,30). Moreover, PPAR- α is activated in P-squalene-induced inflammation in keratinocytes (41). To our knowledge, no work has previously reported any PPAR- α expression or activity in acne, hidradenitis suppurativa or other inflammatory skin disease lesions, as compared with normal skins. In inflammatory dermatoses, PPAR- α upregulation in response to zinc treatment may contribute to reduce skin inflammation and proliferation, and to stimulate keratinocyte apoptosis and differentiation as well as skin barrier homeostasis.

In conclusion, in human skin explants, LPS seems to induce a negative feedback mechanism on PPAR- α synthesis. Besides, PPAR- α appears as a new target of zinc gluconate in inflammatory skin disorders. Thus, it would be of interest to test *in vivo* the

effects of the combination of oral or topical zinc gluconate with topical PPAR- α agonist in inflammatory skin disorders, to investigate whether PPAR- α agonists would enhance zinc gluconate clinical efficiency.

Acknowledgements

Zinc gluconate was kindly provided by Labcatal Laboratories (Montrouge, France). We thank Drs Bellier-Waast, Perrot and Hepner, from the Plastic Surgery Departments of Nantes University Hospital and Nantes Jules Verne Private Hospital, for having provided us skin samples.

Author contributions

C Poiraud conducted the research and wrote the paper. B Dréno and G Quéreux were co-directors of this work. AC Knol provided advice. AC Knol, A Khammari and B Dréno critically revised the paper. R Allix statistically analysed the data.

Conflict of interests

The authors have declared no conflicting interests.

References

- Delerive P, Fruchart J C, Staels B. *J Endocrinol* 2001; **169**: 453–459.
- Kliewer S A, Umesono K, Noonan D J *et al.* *Nature* 1992; **358**: 771–774.
- Palmer C N, Hsu M H, Griffin H J *et al.* *J Biol Chem* 1995; **270**: 16114–16121.
- Kuenzli S, Saurat J-H. *Br J Dermatol* 2003; **149**: 229–236.
- Downie M M T, Sanders D A, Maier L M *et al.* *Br J Dermatol* 2004; **151**: 766–775.
- Hanley K, Jiang Y, He S S *et al.* *J Invest Dermatol* 1998; **110**: 368–375.
- Kömüves L G, Hanley K, Man M Q *et al.* *J Invest Dermatol* 2000; **115**: 361–367.
- Jiang Y J, Kim P, Lu Y F *et al.* *Exp Dermatol* 2011; **20**: 595–599.
- Meissner M, Berlinski B, Doll M *et al.* *Exp Dermatol* 2011; **20**: 425–429.
- Meissner M, Berlinski B, Gille J *et al.* *Clin Exp Dermatol* 2011; **36**: 911–914.
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S *et al.* *J Biol Chem* 1999; **274**: 32048–32054.
- Mössner R, Kaiser R, Matern P *et al.* *Arch Dermatol Res* 2004; **296**: 1–5.
- Sheu M Y, Fowler A J, Kao J *et al.* *J Invest Dermatol* 2002; **118**: 94–101.
- De Bellilovsky C, Roo-Rodriguez E, Baudouin C *et al.* *J Dermatolog Treat* 2010; **22**: 359–365.
- Dreno B, Amblard P, Agache P *et al.* *Acta Derm Venereol* 1989; **69**: 541–543.
- Brocard A, Knol A-C, Khammari A *et al.* *Dermatology (Basel)* 2007; **214**: 325–327.
- Amer M, Bahgat M R, Tosson Z *et al.* *Int J Dermatol* 1982; **21**: 481–484.
- Dreno B, Trossaert M, Boiteau H L *et al.* *Acta Derm Venereol* 1992; **72**: 250–252.
- Rajagopalan S, Winter C C, Wagtmann N *et al.* *J Immunol* 1995; **155**: 4143–4146.
- Guéniche A, Viac J, Lizard G *et al.* *Acta Derm Venereol* 1995; **75**: 19–23.
- Tenaud I, Sainte-Marie I, Jumbou O *et al.* *Br J Dermatol* 1999; **140**: 26–34.
- Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A *et al.* *Eur J Dermatol* 2007; **17**: 492–496.
- Reiterer G, Toborek M, Hennig B. *J Nutr* 2004; **134**: 1711–1715.
- Kang X, Zhong W, Liu J *et al.* *Hepatology* 2009; **50**: 1241–1250.
- Bao B, Prasad A S, Beck F W J *et al.* *Am J Clin Nutr* 2010; **91**: 1634–1641.
- Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 2002–2007.
- Rivier M, Safonova I, Lebrun P *et al.* *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 1116–1121.
- Michalik L, Desvergne B, Tan N S *et al.* *J Cell Biol* 2001; **154**: 799–814.
- Alestas T, Ganceviciene R, Fimmel S *et al.* *J Mol Med* 2006; **84**: 75–87.
- Trivedi N R, Cong Z, Nelson A M *et al.* *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 2002–2009.
- Staels B, Koenig W, Habib A *et al.* *Nature* 1998; **393**: 790–793.
- Devchand P R, Keller H, Peters J M *et al.* *Nature* 1996; **384**: 39–43.
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G *et al.* *Circ Res* 1999; **85**: 394–402.
- Delerive P, De Bosscher K, Vanden Berghe W *et al.* *Mol Endocrinol* 2002; **16**: 1029–1039.
- Skidmore B J, Chiller J M, Morrison D C *et al.* *J Immunol* 1975; **114**: 770–775.
- Tai E S, bin Ali A, Zhang Q *et al.* *FEBS Lett* 2003; **546**: 237–240.
- Becker J, Delayre-Orthez C, Frossard N *et al.* *Pulm Pharmacol Ther* 2008; **21**: 324–330.
- Brody I. *Lancet* 1977; **24**: 1358.
- El Kabbaj N, Dereure O, Guillot B. *Ann Dermatol Venereol* 2005; **132**: 475–477.
- Schuster M, Zouboulis C C, Ochsendorf F *et al.* *Br J Dermatol* 2011; **164**: 182–186.
- Ottaviani M, Alestas T, Flori E *et al.* *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 2430–2437.

IV- Deuxième partie :
hBD-2 et psoriasine : deux molécules de l'immunité innée,
nouvelles cibles du gluconate de zinc

A- Objectifs

L'objectif principal de ce travail était d'étudier un possible effet modulateur du gluconate de zinc sur l'expression des peptides antimicrobiens hBD-2, hBD-4 et psoriasine, ainsi que de l'IL-8, dans des explants cutanés stimulés par le LPS, représentant un modèle de dermatose inflammatoire *ex vivo*.

B- Méthodologie

Nous avons utilisé des explants cutanés de peau saine que nous avons incubés pendant 3, 6 ou 24 heures, en présence de LPS ou de milieu seul, comme contrôle négatif. Afin d'étudier les modulations induites par le gluconate de zinc, certains explants étaient pré-incubés pendant 24 heures en présence de gluconate de zinc, avant d'être stimulés par le LPS. Ensuite, l'expression épidermique de hBD-2, hBD-4 et de la psoriasine était analysée en IHC, leur sécrétion extracellulaire grâce à des techniques d'ELISA, et leur expression d'ARNm grâce à la réalisation d'une qRT-PCR.

C- Article

Les résultats de cette étude sont présentés ci-après sous forme d'un second article soumis pour publication dans *The European Journal of Dermatology*.

Title human β -defensin-2 and psoriasin, two new innate immunity targets of zinc gluconate

Short title hBD-2 and psoriasin, two new targets of zinc gluconate

Authors

Carole POIRAUD^{1,2}, Gaëlle QUEREUX^{1,2}, Anne-Chantal KNOL¹, Thomas Zuliani¹, Rémy ALLIX³, Amir KHAMMARI^{1,2} and Brigitte DRENO^{1,2}

¹INSERM U892, ²Department of Dermato-Oncology

Nantes University Hospital, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France;

³Private statistical consultant, Nantes, France

Abstract

Background. Antimicrobial peptides (AMPs) are a large family of peptides implicated in innate immunity, especially in the epidermis. Zinc gluconate has been proven to be efficient to treat inflammatory dermatoses, such as acne vulgaris. **Objectives.** The aim of our work was to determine whether AMPs could be new targets of zinc gluconate treatment in inflammatory dermatoses. **Material and Methods.** To test this hypothesis, we used an ex vivo Lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory skin explant model, with or without zinc gluconate pretreatment. We evaluated human β -defensin-2 (hBD-2), human β -defensin-4 (hBD-4) and psoriasin protein expression and release by immunohistochemistry and ELISA, as well as mRNA expression level by quantitative PCR. **Results.** We found that hBD-2 and psoriasin mRNA expression levels and hBD-2 extracellular release, but not hBD-4 expression and release, were significantly upregulated by zinc gluconate in LPS-stimulated inflammatory skin explants. **Conclusion.** These results suggest that hBD-2 and psoriasin may be two main targets of zinc gluconate, involved in its anti-inflammatory activity in dermatoses.

Key words

Antimicrobial peptides, epidermis, human beta-defensins, psoriasin, zinc

Introduction

Skin is a major defence barrier against microbial challenges. Besides the mechanical barrier role of the stratum corneum, the epidermis can fight against invading microbes, by producing and releasing antimicrobial peptides (AMPs) which are small peptides representing an ancestral mechanism of the host defence. AMPs have direct antimicrobial properties, through the formation of pores in bacterial membranes (1), and are also involved in the activation of the immune defence, because they are direct pro-inflammatory agents. They act as chemotactic agents attracting neutrophils, helper and memory T cells, and immature dendritic cells into the inflammatory site, and also activate neutrophils and keratinocytes to produce inflammatory cytokines (1–5). The AMPs family includes the human β -defensins (hBDs), cathelicidins and psoriasin (also known as S100A7 protein).

hBDs and psoriasin are synthesized by distinct epithelia, including the epidermis, where they are produced by the keratinocytes (6,7). hBD-2 and psoriasin have been found in the normal epidermis (8,9), while hBD-4 expression is still matter of debates with contradictory studies (10,11). Nevertheless, keratinocyte hBD-2, hBD-4 and psoriasin synthesis has been described to be directly inducible by pathogens, *via* direct contact or soluble factors, or by pro-inflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin (IL)-1 β (7,10,12). Recent studies highlighted the aberrant expression of AMPs in inflammatory dermatoses such as psoriasis, atopic dermatosis, hidradenitis suppurativa and acne vulgaris (13–15). These studies confirmed that the abnormal regulation of the innate immune system is an important pathogenic pathway in such diseases.

Zinc gluconate is effective to treat several inflammatory dermatoses. Indeed, it has been reported to be more efficient than placebo in moderate inflammatory acne vulgaris (16). It has also been showed to decrease lesion number and intensity in a non-controlled pilot-study comprising 22 patients presenting hidradenitis suppurativa (17). Few studies reported a link between AMPs expression and zinc levels. A study has reported that hBD-2 and hBD-4 protein levels were very low in hidradenitis suppurativa lesions, this pathology being associated with a deficit of the cutaneous innate immunity (18). In this study, a three-month treatment with zinc gluconate was shown to significantly increase hBD-4 *in vivo* expression in the epidermis of lesionnal hidradenitis suppurativa skin. In parallel, psoriasin is known to have a zinc-binding motif which could be important in psoriasin-induced bactericidal activity (7,19,20).

In this context, the aim of our work was to evaluate whether zinc gluconate was able to modulate hBD-2, hBD-4 and psoriasin expression in inflammatory skin using Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated skin explants as a model.

Materials and Methods

Bacterial extracts. Commercial LPS extracted from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was reconstituted in phosphate-buffered saline. LPS was diluted in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma-Aldrich) to a final concentration of 1 µg/mL and incubated with skin explants.

Trace element. Zinc gluconate (Labcat, Montrouge, France; 15 mg zinc gluconate = 2 mg zinc element) was diluted in DMEM to a final zinc concentration of 1 µg/mL.

Healthy skin explants. Normal human skin explants - an ex vivo condition modelling the in vivo situation - were obtained from surgical samples of healthy skin donors undergoing abdominoplasty, gynecomastia surgery or thigh lifting, from the Plastic Surgery Departments of Nantes University Hospital and Nantes Jules Verne Private Hospital (France). All patients provided their written, informed consent. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki, and the Medical Ethical Committee of Nantes University Hospital approved all described studies.

Skin explants technique. Skin punches (4 mm diameter) from 6 healthy donors, considered as a healthy skin model, were incubated at 37°C in a moist atmosphere in the presence of 5% CO₂ for 3 or 6 hours in DMEM alone (used as control) or supplemented with 1 µg/mL LPS. To evaluate zinc effects, several explants were pre-incubated with 1 µg/mL zinc gluconate for 24 hours and then incubated for 3 or 6 hours with LPS and zinc gluconate, both at a final concentration of 1 µg/mL. After the incubations, the explants were removed from the culture medium. Three explants were used for each independent condition: two were frozen at -80°C, and one other was immediately performed for RNA extraction. For each donor, two explants were directly frozen at -80°C, without being incubated, to be performed for immunohistochemistry technique only, as normal skin explants.

Immunoperoxidase. Immunohistochemistry was performed using the streptavidin/peroxidase technique as previously described (21). We used frozen sections (5µm thick) of skin explants. Monoclonal primary antibodies for hBD-2, hBD-4 and psoriasin (Abcam, San Francisco, California) were deposited on the

slides for 18 hours at 4°C in a humid environment. Irrelevant mouse IgG antibody was used as a negative control.

Microscopy and scoring. Slides were read using a Leica microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France), and photographs were taken with a digital SLR Camera D70S (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). All exposures were done for the same duration, using the same luminosity and magnification (x25). Two independent observers, who were unaware of the tissue source or incubation conditions, scored labelling intensity within the epidermis. Labelling intensity was scored on a five-point scale: null labelling (0), very weak labelling (1), weak labelling (2), moderate labelling (3), strong labelling (4), and very strong labelling (5).

Enzyme-linked Immunosorbent assays (ELISA). To determine hBD-2, hBD-4, psoriasin and IL-8 release in skin explant supernatants, the culture media was harvested after 3 or 6 hours of culture and stored at -80°C until assayed. Before proceeding to the assays, culture supernatants were centrifuged at 7000 rpm during 10 minutes to remove any cellular residue. The released concentration of hBD-2, hBD-4, psoriasin and IL-8 in the explant supernatants were measured using human BD-2 and human BD-4 mini ELISA development kits (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France), Circulex S100A7/Psoriasin ELISA Kit (MBL, Clinisciences, Nanterre, France) and human IL-8 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, Paris, France), according to the manufacturer's instructions. All samples were assayed in duplicates.

Real-time quantitative reverse-transcription PCR. Skin explants were crushed in 1mL Trizol Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with an Ultra-Turrax T25 homogenizer (IKA, Staufen, Germany). mRNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). mRNA concentrations were evaluated using a Nanodrop (Thermo Scientific, Illkirch, France) and RNA integrity using Agilent technology (Agilent Technologies, Massy, France). Reverse transcription was performed using 1 µg of total RNA and relative quantification of hBD-2, hBD-4, psoriasin, IL-8 and HPRT (housekeeping gene) expression was performed using real-time PCR, with the corresponding TaqMan probes (TaqMan gene expression assays; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 20 ng of complementary DNA samples, in a Mx3005P apparatus (Stratagene, Lyon, France). Thermal cycling was at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles at 95°C for 30 seconds and 60°C for 1 minute. PCR efficiency was determined using total RNA obtained from a stimulated keratinocyte cell line (as a positive control for hBD-2), normal testis (as a positive control for hBD-4), HaCaT cell line

(as a positive control for psoriasis), THP1 monocytic cell line (as a positive control for IL-8), performed in parallel to plot the standard curves for hBD-2, hBD-4, psoriasis and IL-8. Mean threshold cycle (CT) values from duplicate PCRs were normalized to mean CT values for the housekeeping gene (HPRT) from the same complementary DNA preparations. The relative expression ratio of a target was calculated on the basis of the PCR efficiency (E) and CT deviation between a given skin sample (x) and non-stimulated skin samples (calibrator), expressed in comparison with HPRT: ratio = $((E^{hBD-2})^{\Delta CT_{hBD-2(calibrator-x)}})/((E^{HPRT})^{\Delta CT_{HPRT(calibrator-x)}})$.

Statistical analysis. Protein expression levels (immunohistochemistry) and releases (ELISA) were expressed as the means \pm SD. For mRNA analysis, mRNA relative expressions were expressed as the means \pm SD reported to the basal level (Ctrl) or the LPS-induced level (LPS) for each incubation time. To determine differences between all experimental groups (Ctrl, LPS, zinc+LPS), a Mann-Whitney test was performed. The significance of the stimulating effects of LPS as compared to controls and the effect of zinc preincubation on LPS stimulation as compared to LPS alone, were all assessed at a $p < 0.05$ value.

Results

Immunohistochemical analysis: protein level

hBD-2, hBD-4 and psoriasis were expressed over the entire epidermis including the basal cells, supra basal layers and stratum corneum in normal non-incubated skin explants (Fig.1).

In 3-hour LPS-incubated skin explants (called 3-hour inflammatory skin explants ISE), hBD-2 expression was increased over the entire epidermis as compared to 3-hour DMEM-incubated skin explants (called 3-hour control skin explants CSE) ($p < 0.05$; Fig.2a). No modulation of the different proteins was noted in 6-hour ISE as compared to 6-hour CSE (Fig.2).

A 24-hour preincubation with zinc gluconate (Zn) of 3-hour ISE did not induce any modulation of the 3 proteins. A 24-hour Zn preincubation of 6-hour ISE significantly decreased hBD-2 and psoriasis expression in the epidermis as compared to 6-hour ISE alone ($p < 0.05$; Fig.2a and c).

Quantitative real-time RT-PCR analysis

hBD-4 mRNA was not detected in any condition (data not shown).

In 3-hour ISE, IL-8 mRNA levels were significantly increased as compared to 3-hour CSE ($p < 0.01$; Fig.3). In 6-hour ISE, both psoriasis and IL-8 mRNA levels were significantly increased as compared to

6-hour CSE ($p < 0.05$ for psoriasin; $p < 0.01$ for IL-8; Fig.3).

A 24-hour Zn preincubation of 3-hour ISE significantly increased hBD-2 and psoriasin mRNA expression levels as compared to 3-hour ISE alone ($p < 0.01$; Fig.3). A 24-hour Zn preincubation of 6-hour ISE significantly increased psoriasin and IL-8 mRNA expression levels as compared to 6-hour ISE alone ($p < 0.01$; Fig.3).

Release in culture supernatants (ELISA technique)

hBD-4 protein release was not detected in any culture supernatants (data not shown).

LPS-incubation induced only a significant increase in IL-8 release in both 3- and 6-hour ISE as compared to CSE ($p < 0.01$; Fig.4c).

A 24-hour Zn preincubation of 3-hour ISE led to a significant increase in hBD-2 and IL-8 release as compared to 3-hour ISE alone ($p < 0.05$ for hBD-2, $p < 0.01$ for IL-8; Fig.4a and c). A 24-hour Zn preincubation of 6-hour ISE induced only a significant increase in hBD-2 release as compared to 6-hour ISE alone ($p < 0.01$; Fig.4a).

Discussion

Firstly, our study confirmed that hBD-2 and psoriasin were expressed at the protein level on all the layers of the epidermis, as it has previously been described (11,22,23).

Secondly, we showed that LPS modulated AMPs expression. Indeed, LPS incubation led to significantly increase hBD-2 epidermal protein expression level and psoriasin mRNA expression level. To confirm the validity of our inflammatory model, we checked the modulation of IL-8, a well-known pro-inflammatory cytokine and confirmed an increase in its mRNA expression level and protein release in LPS-stimulated skin explants, as previously described in keratinocytes (24,25). Although this modulator does not perfectly recreate a pathological inflammation, commercial LPS was chosen because of its well-known pro-inflammatory properties, in particular through the activation of distinct Toll-like receptors in keratinocytes (26).

The results we obtained with explants were in agreement with previous results showing that LPS induces the expression of the protein hBD-2 in the skin (27). Similarly, hBD-2 has been reported to be overexpressed in vivo in the epidermis of acne vulgaris lesions (13,28). Interestingly, we did not identify any modulation of hBD-2 mRNA expression level or protein release by LPS whereas we observed

increased protein expression levels at 3 hours. This can be explained by the fact that hBD-2 mRNA may be modulated earlier than at 3 hours, which is the first incubation duration used in our model. Concerning hBD-4, its expression in the normal epidermis is debated (10,11). In our study, we did not show any hBD-4 mRNA expression and protein release in normal and inflammatory skins. At the protein level, we noted an epidermal expression of hBD-4 in each condition, suggesting a lack of specificity of the antibody. While in lung tissue hBD-4 has been shown to be inducible by LPS (29), we did not note any modulation of hBD-4 expression or release with LPS in the skin. Psoriasin has been reported to be overexpressed in hidradenitis suppurativa lesions (15), and to be involved in abnormal follicular hyperkeratinization (30). LPS has previously been described to stimulate psoriasin mRNA expression in keratinocyte cell lines (31), which is in accordance with our results obtained with skin explants. However, LPS did not modulate psoriasin epidermal protein expression level and release in our study, which may be explained by insufficient LPS concentration or incubation duration.

As regards zinc gluconate, we demonstrated that hBD-4 is not a target of zinc. We did not note any modulation of this AMP at any level (mRNA and protein expression or release). Concerning hBD-2 and psoriasin, we demonstrated that in LPS-stimulated skin explants, zinc gluconate increased both hBD-2 and psoriasin at the mRNA expression level and in addition stimulated hBD-2 release.

Zinc gluconate is efficient in clinical practice to treat some inflammatory skin disorders, such as inflammatory acne vulgaris (16). It has also been described to be efficient in case reports concerning patients presenting hidradenitis suppurativa, recurrent furunculosis or erosive pustulosis of the scalp among others (17,32). Zinc salts have specific anti-inflammatory properties, especially as cofactors of many coenzymes, mainly as regulators of the innate immunity (32). For instance, zinc salts have been demonstrated to inhibit granulocyte chemotaxis (33), be implicated in Natural Killer cell and keratinocyte activation (34,35), increase integrin expression in differentiated keratinocytes (36) and modulate the Toll-like receptors (TLRs) and proinflammatory cytokines in keratinocytes (18,21).

A link between zinc gluconate and β -defensin expression was only reported once previously in an *in vivo* study on hidradenitis suppurativa (18), revealing that a three-month treatment with zinc gluconate led to increased hBD-4 epidermal protein expression levels in lesional hidradenitis suppurativa skin, whereas hBD-2 and hBD-4 protein basal expression was low in this pathology. In our model, zinc gluconate was not able to modulate hBD-4 expression, although it enhanced hBD-2 mRNA expression level and

extracellular release. It has already been described that different zinc gluconate concentrations can induce distinct effects on apoptosis and on the regulation of the epidermis innate immunity, in a dose-dependent way (18). The zinc-induced enhanced hBD-2 expression that was found in our model may be explained by the modulation of TLRs, as it was described in hidradenitis suppurativa (18), and a consecutive activation of signaling pathways, such as NF- κ B pathway, by zinc gluconate.

Psoriasin has a zinc-binding motif (19). Its antimicrobial activity is known to be zinc sensitive and was hypothesized that zinc sequestration by psoriasin would lead to bacterial killing (7,20). Indeed, zinc sulfate-pretreated psoriasin has shown diminished antimicrobial activity against *Escherichia coli* (20). Conversely, our work demonstrated that, in LPS-stimulated inflammatory skin explants, zinc gluconate was able to increase psoriasin mRNA synthesis, which seems to be paradoxical. Nonetheless, this zinc-induced increased mRNA expression level was not associated with enhanced psoriasin epidermal protein expression and release, which may be explained by post-translational regulations of the protein. Thus, as it has been described for hBDs, the use of distinct zinc gluconate concentrations and distinct experimental conditions may induce distinct effects on psoriasin expression and activity.

In conclusion, our work showed that hBD-2 and psoriasin, two markers of the cutaneous innate immunity, are modulated by zinc gluconate and can play a major role in the anti-inflammatory activity of zinc gluconate treatment in different cutaneous pathologies, such as acne and hidradenitis suppurativa.

Acknowledgements

Zinc gluconate was kindly provided by Labcatal Laboratories (Montrouge, France), which also gave a grant for this work to Brigitte Dréno.

The authors state no conflict of interest.

We thank Drs Bellier-Waast, Perrot and Hepner, from the Plastic Surgery Departments of Nantes University Hospital and Nantes Jules Verne Private Hospital, for having provided us skin samples.

References

1. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 2010; 1: 440–64.
2. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525–8.
3. Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 2004; 111: 273–81.
4. Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol* 2005; 175: 1776–84.
5. Zheng Y, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation. *Immunology* 2008; 124: 357–67.
6. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med* 2005; 83: 587–95.
7. Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder J-M. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 2005; 6: 57–64.
8. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387: 861.
9. Martinsson H, Yhr M, Enerbäck C. Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. *Exp Dermatol* 2005; 14: 161–8.
10. Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder J-M. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 522–9.
11. Rivas-Santiago B, Trujillo V, Montoya A, et al. Expression of antimicrobial peptides in diabetic foot ulcer. *J Dermatol Sci* 2012; 65: 19–26.
12. Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Széll M, Urbán E, Kemény L. Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 931–8.
13. Chronnell CM, Ghali LR, Ali RS, et al. Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in acne vulgaris lesions. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1120–5.
14. Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, et al. Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147: 17–24.
15. Schlapbach C, Yawalkar N, Hunger RE. Human beta-defensin-2 and psoriasin are overexpressed in lesions of acne inversa. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61: 58–65.
16. Dreno B, Amblard P, Agache P, Sirot S, Litoux P. Low doses of zinc gluconate for inflammatory acne. *Acta Derm Venereol* 1989; 69: 541–3.
17. Brocard A, Knol A-C, Khammari A, Dréno B. Hidradenitis suppurativa and zinc: a new therapeutic approach. A pilot study. *Dermatology* 2007; 214: 325–7.
18. Dréno B, Khammari A, Brocard A, et al. Hidradenitis Suppurativa: The Role of Deficient Cutaneous Innate Immunity. *Arch Dermatol* 2012; 148: 182–6.
19. Brodersen DE, Nyborg J, Kjeldgaard M. Zinc-binding site of an S100 protein revealed. Two crystal structures of Ca²⁺-bound human psoriasin (S100A7) in the Zn²⁺-loaded and Zn²⁺-free states. *Biochemistry* 1999; 38: 1695–704.
20. Lee KC, Eckert RL. S100A7 (Psoriasin)--mechanism of antibacterial action in wounds. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 945–57.
21. Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dréno B. Zinc salts inhibit in vitro Toll-like receptor 2 surface expression by keratinocytes. *Eur J Dermatol* 2007; 17: 492–6.
22. Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 106–11.
23. Reithmayer K, Meyer KC, Kleditzsch P, et al. Human hair follicle epithelium has an antimicrobial defence system that includes the inducible antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) and RNase 7. *Br J Dermatol* 2009; 161: 78–89.
24. Pivarcsi A, Bodai L, Réthi B, et al. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 2003; 15: 721–30.

25. Grange PA, Raugeaud J, Calvez V, Dupin N. Nicotinamide inhibits *Propionibacterium acnes*-induced IL-8 production in keratinocytes through the NF-kappaB and MAPK pathways. *J Dermatol Sci* 2009; 56: 106–12.
26. Kawai K, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyama K, Ito M. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2002; 30, 185-194.
27. Chadebech P, Goidin D, Jacquet C, Viac J, Schmitt D, Staquet MJ. Use of human reconstructed epidermis to analyze the regulation of beta-defensin hBD-1, hBD-2, and hBD-3 expression in response to LPS. *Cell Biol Toxicol* 2003; 19: 313–24.
28. Philpott MP. Defensins and acne. *Mol Immunol* 2003; 40: 457–62.
29. Yanagi S, Ashitani JI, Ishimoto H, et al. Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. *Respir Res* 2005; 6: 130.
30. Ganceviciene R, Fimmel S, Glass E, Zouboulis CC. Psoriasin and follicular hyperkeratinization in acne comedones. *Dermatology* 2006; 213: 270-2.
31. Büchau AS, Hassan M, Kukova G, et al. S100A15, an antimicrobial protein of the skin: regulation by *E. coli* through Toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2596–604.
32. Brocard A, Dréno B. Innate immunity: a crucial target for zinc in the treatment of inflammatory dermatosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 1146-52.
33. Dreno B, Trossaert M, Boiteau HL, Litoux P. Zinc salts effects on granulocyte zinc concentration and chemotaxis in acne patients. *Acta Derm Venereol* 1992; 72: 250–2.
34. Rajagopalan S, Winter CC, Wagtmann N, Long EO. The Ig-related killer cell inhibitory receptor binds zinc and requires zinc for recognition of HLA-C on target cells. *J Immunol* 1995; 155: 4143–6.
35. Guéniche A, Viac J, Lizard G, Charveron M, Schmitt D. Protective effect of zinc on keratinocyte activation markers induced by interferon or nickel. *Acta Derm Venereol* 1995; 75: 19–23.
36. 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.

Figures and legends

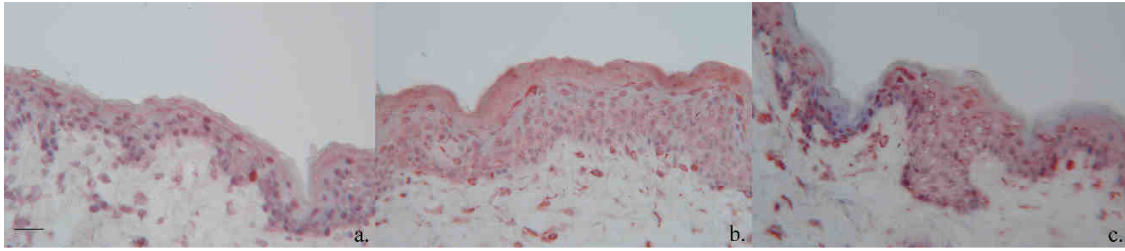


Figure 1. AMPs in normal skin explants. Detection of hBD-2 (a), hBD-4 (b) and psoriasin (c) expression over the entire height of the epidermis of normal non-incubated skin explants. (Magnification x25). Bar = 30 μ m.

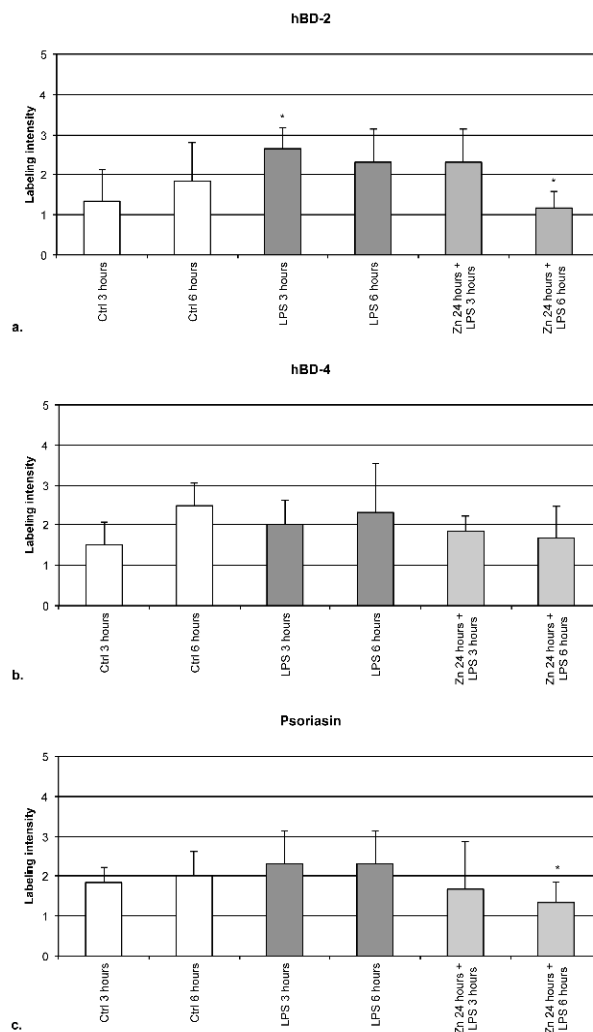


Figure 2. Zinc gluconate modulates the epidermal protein expression of hBD-2 and psoriasin, but not hBD-4, in LPS-stimulated skin explants. hBD-2 (a), hBD-4 (b) and psoriasin (c) epidermal expression in skin explants, after incubation with DMEM alone (Ctrl skin explants CSE) or LPS (LPS-incubated inflammatory skin explants ISE) for 3 or 6 hours or 24-hour zinc gluconate (Zn)-preincubated ISE. Epidermal protein expression in ISE was compared to CSE, and epidermal protein expression in Zn-preincubated ISE was compared to ISE, for each incubation time. Values are expressed as the means \pm SD (n=6). *, p<0.05.

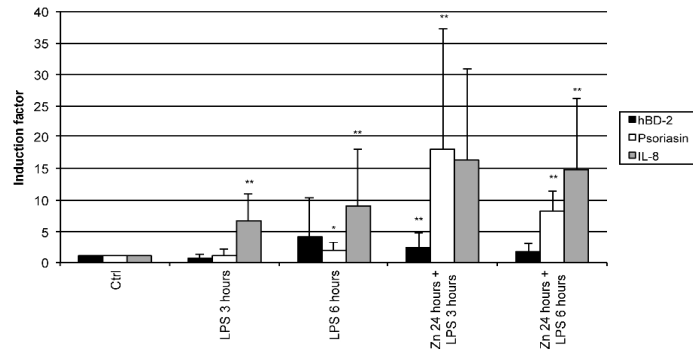


Figure 3. hBD-2, psoriasin and IL-8 mRNA expression level is modulated by zinc gluconate in LPS-stimulated skin explants. hBD-2, psoriasin and IL-8 mRNA relative expression in skin explants after incubation with DMEM alone (CSE) or LPS (ISE) for 3 or 6 hours or 24-hour Zn-preincubated ISE. mRNA relative expression in ISE was compared as mRNA relative expression in CSE, and mRNA relative expression in Zn-preincubated ISE was compared as mRNA relative expression in ISE, for each incubation time. Values are expressed as the means \pm SD (n=6). *, p<0.05. **, p<0.01.

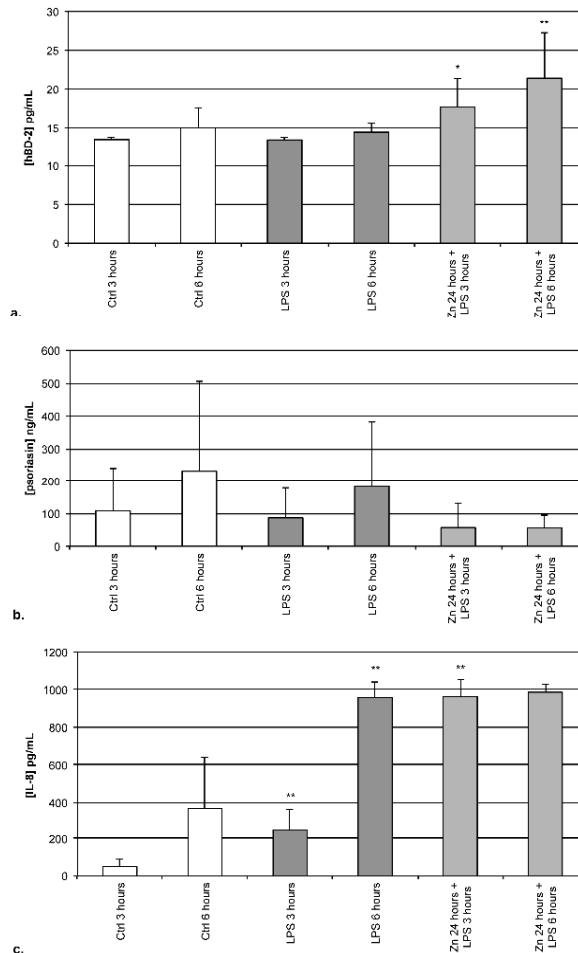


Figure 4. Zinc gluconate modulates the release of hBD-2 and IL-8, but not psoriasin in LPS-stimulated skin explants. hBD-2 (a), psoriasin (b) and IL-8 (c) concentrations measured in skin explant supernatants, after incubation with DMEM alone (CSE) or LPS (ISE) for 3 or 6 hours, or 24-hour Zn-preincubated ISE. Protein release in ISE supernatants was compared to CSE, and protein release in Zn-preincubated ISE supernatants was compared to ISE, for each incubation time. Values are expressed as means \pm SD (n=6). *, p<0.05; ** p<0.01.

D- Résultats complémentaires

Les résultats obtenus pour les durées d'incubation de 24 heures par le milieu seul, le LPS et le zinc seul sont présentés ci-après. Par souci de clarté, il a été choisi de ne pas présenter ces données dans l'article. Pour les durées d'incubation de 24 heures, aucune sécrétion d'hBD-4 dans les surnageants de culture, ni aucune expression de l'ARNm d'hBD-4 n'ont été retrouvées.

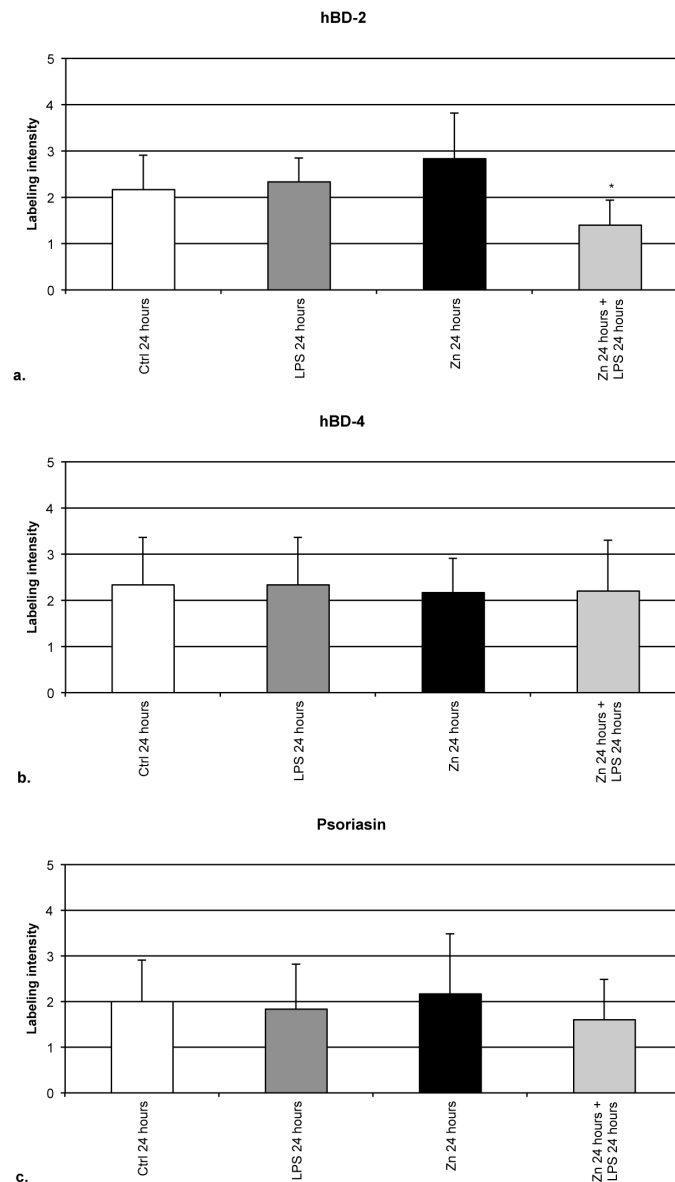


Figure 5. Expression de hBD-2(a), hBD-4(b) et de la psoriasine(c) dans l'épiderme des explants cutanés en IHC, après incubation dans le milieu seul (Ctrl), le LPS ou le Zn pendant 24 heures, et avec une pré-incubation de 24 heures par le Zn avant ajout de LPS pendant 24 heures. (n=6 ; * p<0,05).

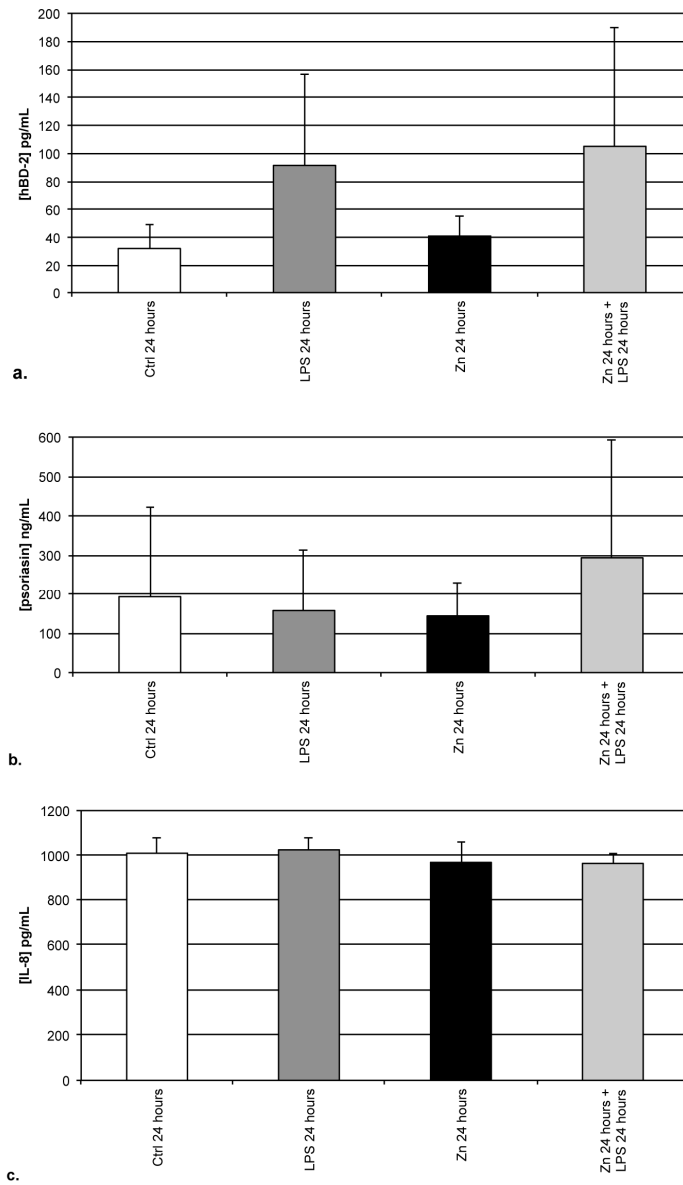


Figure 6. Concentrations en hBD-2(a), psoriasine(b) et IL-8(c) dans les surnageants de culture des explants cutanés en ELISA, après incubation dans le milieu seul (Ctrl), le LPS ou le Zn pendant 24 heures, et avec une pré-incubation de 24 heures par le Zn avant ajout de LPS pendant 24 heures. (n=6 ; $p>0,05$).

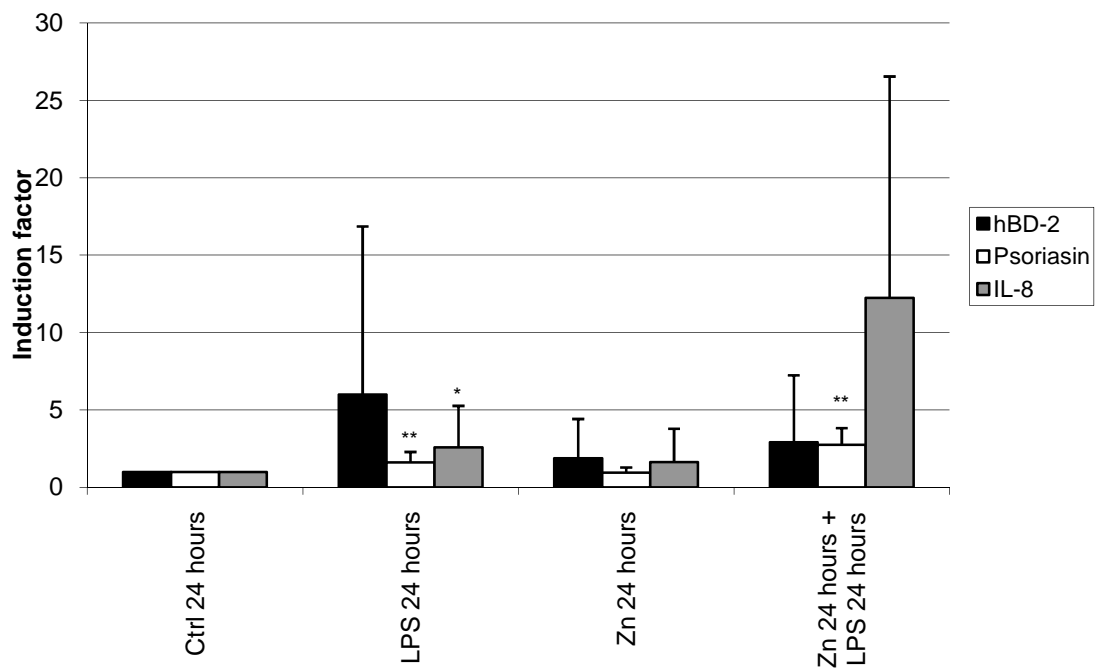


Figure 7. Expression de l'ARNm de hBD-2 (noir), de la psoriasine (blanc) et de l'IL-8 (gris) dans les explants cutanés en qRT-PCR, après incubation dans le milieu seul (Ctrl), le LPS ou le Zn pendant 24 heures, et avec une pré-incubation de 24 heures par le Zn avant ajout de LPS pendant 24 heures. (n=6 ; *p<0,05 ; **p<0,01).

Discussion

Nous discuterons tout d'abord du modèle expérimental utilisé dans notre travail. Ensuite, nous discuterons les résultats obtenus, en nous intéressant en premier lieu aux modulations induites sur l'expression et l'activité de PPAR- α , puis à celles induites sur l'expression des peptides antimicrobiens, par les différents modulateurs étudiés.

I- Le modèle et les méthodes utilisés

A- Le modèle utilisé : intérêts et limites

Nous avons utilisé un modèle de dermatose inflammatoire recréée *ex vivo*, grâce à une stimulation par le LPS d'explants cutanés issus de donneurs sains.

Ce modèle nous a permis de réaliser une étude globale de l'épiderme et du derme, car il contient tous les types cellulaires de ces couches de la peau, notamment des kératinocytes à tous les stades de différenciation, en respectant leurs interactions et également les échanges survenant au niveau de la jonction dermo-épidermique. L'explant cutané est le modèle expérimental cutané le plus proche de l'*in vivo* (Lebonvallet et al., 2010), mais il ne permet cependant pas une étude stricte de la physiologie kératinocytaire. Pour ce faire, un modèle *in vitro* de kératinocytes en monocouches aurait été plus adapté, mais a contrario, il ne nous aurait pas permis de réaliser une étude de l'épiderme et du derme dans leur intégralité, avec tous les types et les interactions cellulaires.

Du fait de la grande variabilité génétique et des divers facteurs intrinsèques et extrinsèques pouvant modifier la structure et l'aspect de la peau d'un individu, le modèle de l'explant cutané induit une certaine hétérogénéité entre les donneurs. Ceci explique probablement que, dans notre étude, la valeur des écart-types soit parfois importante.

B- Les modulateurs

Les explants ont été stimulés par le LPS, qui est un composant majeur de la paroi cellulaire de la plupart des bactéries Gram négatives, et qui est considéré comme une des substances proinflammatoires de référence (Skidmore et al., 1975). Bien que ce modulateur ne recrée pas parfaitement une inflammation pathologique, le LPS permet néanmoins d'induire une inflammation large et globale dans la peau. En effet, le LPS commercial active des TLRs distincts au niveau des kératinocytes, à savoir le TLR-2, mais également le TLR-4 (Kawai et al., 2002).

Afin de recréer de manière la plus fidèle possible l'impact d'un traitement par zinc dans une dermatose inflammatoire, nous avons utilisé une méthode de pré-incubation pendant 24h des explants cutanés avec le Zn, avant d'induire une inflammation avec le LPS. Les durées d'incubation par les différents modulateurs ont été choisies en fonction de l'expérience du laboratoire, reposant sur plusieurs études précédentes sur les mécanismes d'action du zinc dans l'inflammation cutanée (Tenaud et al., 1999; Jarrousse et al., 2007; Isard et al., 2011).

II- Première partie :

Le gluconate de zinc active PPAR- α

dans l'épiderme stimulé par le LPS

Dans notre travail, nous avons constaté que PPAR- α était exprimé de façon constitutive dans toutes les couches de l'épiderme de la peau normale non-inflammatoire, et particulièrement dans la couche basale. Par ailleurs, nous avons démontré que le gluconate de zinc augmentait la synthèse de l'ARNm de PPAR- α , ainsi que son activité de liaison à l'ADN, dans les explants cutanés inflammatoires stimulés par le LPS, sans moduler son expression protéique cytoplasmique.

A- Modulation de PPAR- α dans les dermatoses inflammatoires

On sait que PPAR- α est exprimé par les kératinocytes et les sébocytes humains, les follicules pileux, les cellules basales des glandes sébacées, les peaux reconstruites et dans les peaux de fœtus de souris (Rivier et al., 1998; Michalik et al., 2001; Alestas et al., 2006; Trivedi et al., 2006). À notre connaissance, aucune étude n'a montré à ce jour comme la nôtre, de localisation préférentielle de la protéine PPAR- α dans la couche basale de l'épiderme, à la fois dans des peaux normales et inflammatoires. En ce qui concerne la localisation intracellulaire de PPAR- α , il a été rapporté que PPAR- α avait soit une localisation cytoplasmique, soit une localisation nucléaire, correspondant respectivement à des formes inactives et actives de PPAR- α , la forme active résultant d'une translocation de la forme inactive dans le noyau et de son activation pour pouvoir jouer son rôle de facteur de transcription (Alestas et al., 2006).

Outre son rôle dans la régulation du métabolisme lipidique, de la différenciation, de la prolifération et de l'apoptose, PPAR- α a également été montré comme pouvant avoir un potentiel anti-inflammatoire. En effet, on sait notamment que PPAR- α inhibe la réponse inflammatoire dans les cellules musculaires lisses aortiques (Staels et al., 1998). De plus, l'activation de PPAR- α permet de réduire la durée de la réponse inflammatoire induite par le leucotriènes B₄ ou l'acide arachidonique chez la souris normale, alors que,

chez la souris knock-out pour PPAR- α , l'inflammation est nettement prolongée (Devchand et al., 1996). Cet effet anti-inflammatoire est dû au fait que PPAR- α est capable d'antagoniser les voies de signalisation de NF- κ B et d'AP-1, par une interaction directe protéine à protéine avec les protéines p65 et c-Jun et en induisant la transcription du gène de la protéine inhibitrice I κ B (Delerive et al., 1999a, 1999b, 2002).

A l'heure actuelle, des études ont démontré que l'inflammation induite par le LPS supprimait l'expression de PPAR- α , à la fois dans le foie et dans les poumons de souris (Tai et al., 2003; Becker et al., 2008). Dans notre étude, nous avons démontré que la stimulation d'explants cutanés normaux par le LPS diminuait la transcription de PPAR- α , tandis que son expression protéique cytoplasmique était augmentée, sans modification de son activité fonctionnelle. Ces résultats nous amènent à penser que le LPS pourrait induire un mécanisme de recyclage de la forme nucléaire active de PPAR- α en une forme cytoplasmique inactive, conduisant à l'accumulation de la protéine PPAR- α dans le cytoplasme des kératinocytes, devenant alors détectable par la technique d'IHC employée. Ainsi, l'induction d'une inflammation dans la peau serait capable de réprimer la synthèse et la fonction de PPAR- α , d'une manière similaire à ce qui a déjà été décrit dans le foie et les poumons de souris (Tai et al., 2003; Becker et al., 2008). La stimulation des explants cutanés par le LPS induirait donc un mécanisme de rétroaction négative sur la synthèse de PPAR- α , aboutissant à l'accumulation de sa forme inactive dans le cytoplasme cellulaire, afin d'empêcher PPAR- α de jouer son rôle anti-inflammatoire.

B- Modulation de PPAR- α par le gluconate de zinc

Il est bien connu que l'élément zinc possède une importante fonction de coenzyme de nombreuses protéines, notamment celles contenant des domaines en « doigt de zinc » (zinc-finger domains), tels que les récepteurs nucléaires. C'est cette fonction coenzyme qui pourrait expliquer l'action stimulatrice du gluconate de zinc sur la synthèse de l'ARNm et sur l'activité de liaison à l'ADN de PPAR- α , qui a été observée dans des explants de peau pré-incubés par le gluconate de zinc puis stimulés par le LPS, dans notre travail.

Des liens entre zinc et PPAR- α ont été rapportés dans quelques études. Dans la cellule vasculaire endothéliale, les PPARs sont connus pour avoir un rôle protecteur contre les altérations et l'inflammation de l'endothélium causant l'athérosclérose. Dans les cellules endothéliales porcines, il a été montré que la présence de zinc était nécessaire pour permettre l'activation de PPAR- α , afin qu'il joue son rôle protecteur de l'athérosclérose (Reiterer et al., 2004). Les auteurs de l'article suscités ont supposé que le zinc pouvait contribuer à l'assemblage et la stabilité du complexe protéique PPAR-RXR. In vivo, il a également été démontré que le zinc conduisait à augmenter l'expression de la protéine PPAR- α dans les lignées de cellules THP1 (Human acute monocytic leukemia cell line) et les cellules vasculaires endothéliales humaines (Bao et al., 2010). En outre, PPAR- α est l'un des facteurs de transcription impliqué dans la pathogénèse de la stéato-hépatite alcoolique. Une étude s'est donc intéressée à l'impact d'une supplémentation en zinc dans un modèle murin de stéato-hépatite alcoolique, et il a été démontré que cette supplémentation permettait l'induction de la synthèse d'ARNm de PPAR- α et de ses capacités de liaison à l'ADN (Kang et al., 2009). Il apparaît donc que, dans tous les tissus suscités, le zinc permet d'augmenter les capacités de facteur de transcription de PPAR- α , probablement en agissant comme un cofacteur, mais également de stimuler sa synthèse et son expression.

Dans notre étude, nous avons montré que le gluconate de zinc augmentait la synthèse de l'ARNm de PPAR- α , ainsi que son activité de liaison à l'ADN dans l'épiderme d'explants cutanés inflammés par le LPS. Étonnamment, nous n'avons a contrario noté aucune stimulation par le gluconate de zinc de l'expression de la protéine PPAR- α dans ces mêmes explants cutanés inflammés. Cette apparente contradiction peut néanmoins tout à fait être expliquée par un phénomène de translocation nucléaire de la protéine PPAR- α et par son activation afin de pouvoir jouer son rôle de facteur de transcription, la forme active de la protéine PPAR- α ainsi formée subissant très probablement des changements conformationnels et devenant alors indétectable par la technique d'IHC employée. Ainsi, nos résultats indiquent que, dans l'épiderme à l'instar des autres tissus précédemment cités, le zinc est tout à fait capable d'augmenter les capacités fonctionnelles de PPAR- α en tant que facteur de transcription, en agissant comme un cofacteur, tout en stimulant également sa synthèse.

Il est intéressant de noter que le zinc peut être utilisé en pratique clinique pour traiter

certaines dermatoses inflammatoires. En effet, le gluconate de zinc a été prouvé comme étant plus efficace qu'un placebo dans l'acné inflammatoire (Dréno et al., 1989) et dans l'hidradénite suppurée (Brocard et al., 2007), aux doses respectives de 30 et 90 mg de zinc élément par jour. L'acné est probablement la maladie de peau dans laquelle PPAR- α a été le plus étudié. Il est notamment connu que PPAR- α est un régulateur important des sébocytes, cellules essentielles dans la pathogenèse de l'acné, en régulant notamment leur différenciation (Downie et al., 2004), les protégeant de l'apoptose (Schuster et al., 2011) et modulant la lipogenèse sébacée (Downie et al., 2004; Trivedi et al., 2006). En outre, PPAR- α est activé lors de l'inflammation induite par les squalènes dans les kératinocytes (Ottaviani et al., 2006). Une seule étude récente s'est intéressée à l'expression *in vivo* d'un PPAR dans les lésions d'acné (Elmongy et Shaker, 2012). Il s'agissait d'une étude concernant le PPAR β/δ . Elle a démontré une augmentation significative de l'expression de ce PPAR dans des biopsies de lésions de patients atteints d'acné, en comparaison à des biopsies de peau non atteinte des mêmes patients et à des peaux de patients non-acnéiques. À notre connaissance, aucun travail n'a, à ce jour, étudié l'expression ou l'activité de PPAR- α dans l'acné, dans la maladie de Verneuil ou dans d'autres pathologies cutanées inflammatoires, en comparaison à des peaux normales.

Dans certaines dermatoses inflammatoires, il apparaît donc que la régulation de PPAR- α en réponse à un traitement par gluconate de zinc puisse contribuer à réduire l'inflammation cutanée et la prolifération kératinocytaire, tout en stimulant également l'apoptose et la différenciation kératinocytaire ainsi que l'homéostasie de la barrière cutanée.

C- Conclusion de la première partie : PPAR- α , inflammation et zinc

En conclusion, dans les explants de peau humaine, le LPS apparaît comme un inhibiteur de la synthèse et de la fonction de PPAR- α . Par ailleurs, PPAR- α se révèle comme une nouvelle cible du gluconate de zinc dans les pathologies inflammatoires cutanées.

Ainsi, il serait intéressant de tester *in vivo* les effets d'une combinaison thérapeutique associant du gluconate de zinc par voie orale ou topique avec un agoniste topique de

PPAR- α dans les troubles inflammatoires de la peau, afin de déterminer si les agonistes de PPAR- α amélioreraient l'efficacité clinique du gluconate de zinc.

III- Deuxième partie :

hBD-2 et psoriasine : deux molécules de l'immunité innée, nouvelles cibles du gluconate de zinc

Dans notre étude, nous avons tout d'abord confirmé que hBD-2 et la psoriasine étaient exprimées au niveau protéique dans toute l'épaisseur de l'épiderme de la peau normale, comme cela avait été décrit précédemment (Ali et al., 2001; Reithmayer et al., 2009; Rivas-Santiago et al., 2012). Dans un deuxième temps, nous avons démontré que l'expression de ces PAMs était modulée par le LPS. En effet, l'incubation par le LPS des explants cutanés était capable de conduire à une augmentation significative du niveau d'expression de la protéine épidermique hBD-2 et de l'ARNm de la psoriasine. Pour confirmer la validité de notre modèle inflammatoire, nous avons vérifié que dans notre modèle, le LPS induisait bien la synthèse de l'ARNm et la sécrétion de la protéine de l'IL-8, cytokine proinflammatoire de référence, comme décrit précédemment dans les kératinocytes (Pivarcsi et al., 2003; Grange et al., 2009).

Enfin, en ce qui concerne la modulation des PAMs par le zinc, nous avons démontré que hBD-4 n'était pas une cible thérapeutique du gluconate de zinc. Nous n'avons en effet constaté de modulation de ce PAM à aucun niveau (expression d'ARNm et protéique ou sécrétion). A contrario, en ce qui concerne hBD-2 et la psoriasine, nous avons démontré dans notre travail que dans des explants de peau stimulés par le LPS, le gluconate de zinc augmentait à la fois la synthèse d'ARNm pour hBD-2 et psoriasine et également la sécrétion extracellulaire de la protéine hBD-2, tout en diminuant l'expression protéique épidermique de ces deux molécules.

A- Modulation des Peptides antimicrobiens dans les dermatoses inflammatoires

- **hBD-2**

En ce qui concerne hBD-2, les résultats que nous avons obtenus à partir de l'étude des

explants cutanés étaient en accord avec les résultats d'études antérieures montrant que le LPS induisait l'expression de la protéine hBD-2 dans des épidermes reconstitués (Chadebech et al., 2003). De manière intéressante, nous n'avons pas identifié de modulation du niveau d'expression de l'ARNm codant pour la protéine en réponse à l'incubation par le LPS, alors que nous avons observé une augmentation significative du niveau d'expression épidermique de la protéine hBD-2 après 3 heures d'incubation. Ceci nous paraît pouvoir être expliqué par le fait que l'ARNm codant pour hBD-2 aurait été synthétisé très précocement (plus tôt qu'au temps 3 heures utilisé dans notre étude), puis dégradé et donc rendu indétectable par la technique de qRT-PCR utilisée. Le fait que l'expression protéique épidermique de hBD-2 soit augmentée par la stimulation par le LPS, sans induction de la sécrétion extracellulaire protéique, peut s'expliquer par le fait que l'inflammation induite dans notre modèle est capable d'entraîner une synthèse de hBD-2, mais n'est en revanche pas suffisante pour induire une sécrétion efficace de la protéine, à visée pro-inflammatoire.

En ce qui concerne l'implication physiopathogénique de ces résultats, on rappelle que plusieurs études ont montré une surexpression de hBD-2 dans des biopsies de lésions cutanées d'acné, de psoriasis et de dermatite atopique (Chronnell et al., 2001; Philpott, 2003; Gambichler et al., 2008). Dans la maladie de Verneuil, les études sont quant à elles pour le moment contradictoires (Schlapbach et al., 2009; Dréno et al., 2012). Bien que notre étude avec le LPS ne permette pas de reproduire complètement le tableau de telle ou telle pathologie, on peut estimer que notre modèle reproduit par analogie les pathologies sus-citées, dans lesquelles hBD-2 est synthétisée en grandes quantités, afin de jouer son rôle proinflammatoire, notamment chimiotactique et favorisant la sécrétion cytokinique.

- **hBD-4**

En ce qui concerne l'expression épidermique de hBD-4 dans la peau normale, les études sont contradictoires. Dans une première étude de 2004, portant sur des cultures de kératinocytes en monocouche, les auteurs retrouvaient une expression faible mais présente de l'ARNm de hBD-4, associée à une exacerbation de cette expression

secondairement à des incubations avec diverses cytokines et *Pseudomonas aeruginosa* (Harder et al., 2004). Dans une étude plus récente, concernant des biopsies de peau péri-ulcéreuse de pieds diabétiques, l'expression de hBD-4 au niveau ARNm et protéine était noté comme étant quasi nulle chez les patients contrôles présentant une peau saine (Rivas-Santiago et al., 2012). Dans notre étude, nous n'avons retrouvé aucune expression d'ARNm codant pour hBD-4, ni aucune sécrétion extracellulaire de la protéine hBD-4, que ce soit dans les explants de peau normale, dans les explants inflammatoires, ou dans les explants pré-incubés en présence de gluconate de zinc. Au niveau protéique, nous avons cependant constaté une expression épidermique de hBD-4 dans toutes les conditions, ce qui suggère un manque de spécificité de l'anticorps anti-hBD-4 utilisé. Alors que dans le poumon, l'expression de la protéine hBD-4 a été démontré comme étant inductible par le LPS (Yanagi et al., 2005), nous n'avons constaté aucune modulation de l'expression d'ARNm, de la protéine ou de la sécrétion de hBD-4 induite par le LPS dans la peau.

Sur le plan physiopathogénique, on rappelle qu'une seule étude s'est pour le moment intéressée à l'expression protéique épidermique de hBD-4 dans une pathologie cutanée, à savoir la maladie de Verneuil, et a démontré, une sous-expression de cette molécule dans les zones lésionnelles et non lésionnelles, en comparaison à des peaux saines (Dréno et al., 2012). Afin de préciser l'implication exacte de hBD-4 dans les dermatoses inflammatoires, il serait intéressant que de futures études s'intéressent à l'expression du transcrite de hBD-4 dans ces pathologies. Il apparaît en tout cas que le modèle utilisé dans notre étude ne permet pas d'induire quelque expression ou sécrétion de hBD-4, ce qui ne présage en rien de sa réelle expression *in vivo*.

- **Psoriasine**

En ce qui concerne la psoriasine, le LPS a déjà été décrit comme étant stimulateur de la synthèse de son ARNm dans des lignées cellulaires de kératinocytes (Büchau et al., 2007), ce qui est conforme aux résultats que nous avons obtenus avec des explants cutanés. Nous notons néanmoins qu'une étude plus récente n'observait pas de modulation de la synthèse de l'ARNm codant pour la psoriasine en réponse au LPS,

dans un modèle de kératinocytes en monocouche, mais ce travail utilisait des concentrations en LPS 10 fois inférieures aux nôtres (Abtin et al., 2008).

Bien que nous ayons noté une induction de l'expression du transcrite de la psoriasine en réponse au LPS, nous n'avons observé aucune modulation du niveau d'expression épidermique de la protéine, ni de sa sécrétion extracellulaire, ce qui pourrait être expliqué par des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. On peut éventuellement supposer qu'une modulation de l'expression protéique et de la sécrétion aurait pu être mise en évidence en utilisant des concentrations plus élevées en LPS ou des durées d'incubation plus longues.

Au niveau physiopathogénique, la psoriasine a été décrite comme étant surexprimée dans les lésions cutanées de psoriasis, d'acné, de dermatite atopique et de maladie de Verneuil (Madsen et al., 1991; Ganceviciene et al., 2006; Gläser et al., 2009; Schlapbach et al., 2009). Notre modèle d'inflammation induite par le LPS reproduit donc partiellement ces pathologies, dans lesquelles l'exacerbation de la synthèse de la psoriasine, comme de hBD-2, est très probablement un mécanisme pro-inflammatoire, visant à induire une réaction inflammatoire locale, à visée bactéricide, immunomodulatrice et chimiotactique.

B- Modulation des Peptides antimicrobiens et de l'IL-8 par le gluconate de zinc

- **hBD-2 et -4**

Un lien entre le gluconate de zinc et l'expression des hBDs n'a été signalé, à notre connaissance, qu'une fois auparavant dans une étude *in vivo* sur la maladie de Verneuil (Dréno et al., 2012). Cette étude a révélé qu'un traitement systémique de trois mois à base de gluconate de zinc conduisait à une expression accrue de la protéine hBD-4 au niveau épidermique dans la peau lésionnelle de patients atteints de maladie de Verneuil, en comparant cette expression à celle observée chez un même patient avant tout traitement. Il n'existe à notre connaissance aucune donnée de la littérature sur l'effet du zinc sur hBD-2 et -4 dans des kératinocytes ou explants en culture.

Dans notre modèle, le gluconate de zinc n'est pas apparu comme étant capable de moduler l'expression de hBD-4, alors qu'il a permis d'augmenter significativement la synthèse d'ARNm codant pour hBD-2 et la libération extracellulaire de hBD-2. Il a également été retrouvé dans notre travail une diminution significative de l'expression épidermique protéique de hBD-2, correspondant très probablement au fait que la protéine hBD-2 synthétisée après traduction de l'ARNm néoformé, est directement relarguée par les cellules épidermiques.

Il avait déjà été décrit que l'utilisation de différentes concentrations de gluconate de zinc pouvait induire des effets distincts sur l'apoptose et sur la régulation de l'immunité innée épiderme, d'une manière dose-dépendante (Dréno et al., 2012). Ainsi, les différences retrouvées entre notre étude *ex vivo* et l'étude *in vivo* sus-citée, peuvent être expliquées.

Ainsi, du point de vue thérapeutique, on peut supposer qu'à une certaine posologie, qui reste à déterminer, le gluconate de zinc est capable d'exacerber très nettement la synthèse et la sécrétion de hBD-2, à des niveaux nettement supérieurs aux niveaux pathologiques, et que ce phénomène puisse être un des mécanismes de l'efficacité du gluconate de zinc dans des pathologies comme l'acné ou la maladie de Verneuil. Pour ce faire, le gluconate de zinc pourrait permettre d'induire l'activation de TLRs à la surface des kératinocytes et consécutivement de voies de signalisation intracellulaires, comme celle mettant en jeu NF- κ B.

- **Psoriasine**

La psoriasine est connue pour avoir un motif de liaison au zinc (Brodersen et al., 1999). Son activité antimicrobienne est sensible à la présence de zinc et il a été émis l'hypothèse que ce soit justement un mécanisme de séquestration de zinc par la psoriasine qui soit à l'origine de l'activité bactéricide de cette dernière (Gläser et al., 2005; Lee et Eckert, 2007). En effet, il a été montré qu'une saturation en zinc de la psoriasine entraînait une diminution de ses capacités bactéricides sur des colonies d'*E. coli* (Lee et Eckert, 2007). A contrario, notre travail a démontré que, dans les explants de peau inflammatoires stimulés par le LPS, le gluconate de zinc était en mesure

d'augmenter significativement le niveau d'expression de l'ARNm codant pour la psoriasine, ce qui peut paraître paradoxal. Néanmoins, cette exacerbation de la synthèse du transcrit de la psoriasine n'était pas associée à une augmentation consécutive de l'expression épidermique ou de la sécrétion de la protéine. Ces phénomènes peuvent être expliqués par de potentiels mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. On peut émettre l'hypothèse qu'une modulation de l'expression protéique et de la sécrétion aurait pu être mise en évidence par exemple avec des concentrations plus élevées en LPS ou en gluconate de zinc, ou en utilisant des durées d'incubation plus longues. Ainsi, comme cela a été décrit avec hBD-2, des concentrations variées en gluconate de zinc dans le tissu cutané semblent pouvoir induire des modulations variées de la psoriasine.

- **Interleukine-8**

Bien que l'étude de cette cytokine ait eu dans notre travail un rôle de preuve de la viabilité de notre modèle d'inflammation utilisant le LPS, l'analyse des résultats concernant cette cytokine après pré-incubation par le gluconate de zinc paraît avoir tout de même un intérêt scientifique. En effet, nous avons observé qu'une pré-incubation par le gluconate de zinc dans les explants cutanés stimulés par le LPS induisait une augmentation significative de la synthèse de l'ARNm codant pour l'IL-8, ainsi que de la sécrétion extracellulaire de la cytokine. Il avait été démontré dans une étude précédente sur des explants stimulés par *P. acnes*, que le zinc n'avait pas d'effet direct sur la production d'IL-8 au niveau protéique (Jarrousse et al., 2007), mais la durée d'incubation par le zinc utilisée alors était de 3 heures seulement, contre 24 heures dans notre étude. Aucune étude n'avait montré auparavant, à notre connaissance, de modulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 par le Zn.

C- Conclusion de la seconde partie : Peptides antimicrobiens, inflammation et zinc

En conclusion, notre travail a montré que hBD-2 et la psoriasine, deux molécules importantes de l'immunité innée cutanée, ainsi que l'IL-8, cytokine pro-inflammatoire, étaient modulées par le gluconate de zinc et pouvaient jouer un rôle dans l'activité anti-inflammatoire du traitement par gluconate de zinc, utilisé dans différentes pathologies cutanées inflammatoires comme l'acné et la maladie de Verneuil.

IV- Conclusion

Dans cette étude, nous avons donc démontré, dans un modèle *ex vivo* de dermatose inflammatoire, proche des conditions *in vivo*, que l'inflammation cutanée par le LPS induisait une inactivation de PPAR- α , et favorisait la synthèse de hBD-2 et de la psoriasine, sans effet sur la synthèse de hBD-4.

Afin de confirmer l'implication physiopathogénique des molécules sus-citées dans des pathologies inflammatoires cutanées telles que l'acné, la maladie de Verneuil ou le psoriasis par exemple, les perspectives de recherche pourraient être celles de l'étude en PCR quantitative et en activité de ces molécules dans des biopsies cutanées de peaux pathologiques en comparaison à des biopsies de peaux saines.

Par ailleurs, nous avons observé que, *ex vivo*, le gluconate de zinc était capable de moduler les marqueurs étudiés dans les explants de peau inflammatoire, via l'activation de PPAR- α et la stimulation de la synthèse de hBD-2, de la psoriasine et de l'IL-8. Il pourrait donc également être intéressant de réaliser des études *in vivo* de l'expression de ces marqueurs avant et après un traitement systémique par gluconate de zinc chez des patients atteints d'acné ou de maladie de Verneuil.

Ce travail nous a permis d'élargir nos connaissances sur les mécanismes physiopathogéniques de l'inflammation cutanée et sur les mécanismes d'action thérapeutique du zinc. Il nous amène à suggérer notamment l'intérêt potentiel de l'association thérapeutique du gluconate de zinc et d'un agoniste du PPAR- α , par voie topique ou systémique, dans des dermatoses inflammatoires telles que l'acné inflammatoire et la maladie de Verneuil.

Enfin, ces résultats soulèvent également la possible efficacité du traitement par gluconate de zinc par analogie dans d'autres dermatoses inflammatoires, qui pourrait être testée dans des études randomisées contre placebo ou traitement de référence.

Références

- Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Gruber, F., Schröder, J. M., et Tschachler, E. (2008). Flagellin is the principal inducer of the antimicrobial peptide S100A7c (psoriasin) in human epidermal keratinocytes exposed to *Escherichia coli*. *FASEB J* 22, 2168-2176.
- Aderem, A. et Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Afanas'ev, I. B. (2010). Signaling by reactive oxygen and nitrogen species in skin diseases. *Curr. Drug Metab* 11, 409-414.
- Ali, R. S., Falconer, A., Ikram, M., Bissett, C. E., Cerio, R., et Quinn, A. G. (2001). Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J. Invest. Dermatol* 117, 106-111.
- Alesta, T., Ganceviciene, R., Fimmel, S., Müller-Decker, K., et Zouboulis, C. C. (2006). Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands. *J. Mol. Med* 84, 75-87.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., et Rosato, A. (2006). Zinc through the three domains of life. *J. Proteome Res* 11; 3173-3178.
- Bao, B., Prasad, A. S., Beck, F. W. J., et Godmere, M. (2003). Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 285, 1095-1102.
- Bao, B., Prasad, A. S., Beck, F. W. J., Fitzgerald, J. T., Snell, D., Bao, G. W., Singh, T., et Cardozo, L. J. (2010). Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: a potential implication of zinc as an atheroprotective agent. *Am. J. Clin. Nutr* 91, 1634-1641.
- Barbarot, S., Chantier, E., Kuster, A., Hello, M., Roze, J. C., Blouin, E., et Stalder, J. F. (2010). Symptomatic acquired zinc deficiency in at-risk premature infants: high dose preventive supplementation is necessary. *Pediatr. Dermatol* 27, 380-383.
- Becker, J., Delayre-Orthez, C., Frossard, N., et Pons, F. (2008). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha expression during lung inflammation. *Pulm. Pharmacol. Ther* 21, 324-330.
- Berg, J. M., et Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271, 1081-1085.
- Brocard, A., Knol, A. C., Khammari, A., et Dréno, B. (2007). Hidradenitis suppurativa and zinc: a new therapeutic approach. A pilot study. *Dermatology (Basel)* 214, 325-327.

- Brocard, A., Quereux, G., Moyse, D., et Dréno, B. (2010). Localized scleroderma and zinc: a pilot study. *Eur. J. Dermatol* 20, 172-174.
- Brocard, A., et Dréno, B. (2011). Innate immunity: a crucial target for zinc in the treatment of inflammatory dermatosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol* 25, 1146-1152.
- Brodersen, D. E., Nyborg, J., et Kjeldgaard, M. (1999). Zinc-binding site of an S100 protein revealed. Two crystal structures of Ca²⁺-bound human psoriasin (S100A7) in the Zn²⁺-loaded and Zn²⁺-free states. *Biochemistry* 38, 1695-1704.
- Brody, I. (1977). Treatment of recurrent furunculosis with oral zinc. *Lancet* 2, 1358.
- Brunasso, A. M. G., et Massone, C. (2011). Treatment of hidradenitis suppurativa with tumour necrosis factor-alpha inhibitors: An update on infliximab. *Acta Derm. Venereol* 91, 70-71.
- Büchau, A. S., Hassan, M., Kukova, G., Lewerenz, V., Kellermann, S., Würthner, J. U., Wolf, R., Walz, M., Gallo, R. L., et Ruzicka, T. (2007). S100A15, an antimicrobial protein of the skin: regulation by E. coli through Toll-like receptor 4. *J. Invest. Dermatol* 127, 2596-2604.
- Chadebech, P., Goidin, D., Jacquet, C., Viac, J., Schmitt, D., et Staquet, M. J. (2003). Use of human reconstructed epidermis to analyze the regulation of beta-defensin hBD-1, hBD-2, and hBD-3 expression in response to LPS. *Cell. Biol. Toxicol* 19, 313-324.
- Chang, S. E., Han, S. S., Jung, H. J., et Choi, J. H. (2007). Neuropeptides and their receptors in psoriatic skin in relation to pruritus. *Br. J. Dermatol* 156, 1272-1277.
- Chen, Q., Koga, T., Uchi, H., Hara, H., Terao, H., Moroi, Y., Urabe, K., et Furue, M. (2002). Propionibacterium acnes-induced IL-8 production may be mediated by NF-kappaB activation in human monocytes. *J. Dermatol. Sci* 29, 97-103.
- Chronnell, C. M., Ghali, L. R., Ali, R. S., Quinn, A. G., Holland, D. B., Bull, J. J., Cunliffe, W. J., McKay, I. A., Philpott, M. P., et Müller-Röver, S. (2001). Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in acne vulgaris lesions. *J. Invest. Dermatol* 117, 1120-1125.
- Coudray, C., Rachidi, S., et Favier, A. (1993). Effect of zinc on superoxide-dependent hydroxyl radical production in vitro. *Biol. Trace Elem. Res* 38, 273-287.
- De Belilovski, C., Roo-Rodriguez, E., Baudoin, C., Menu, F., Chadoutaud, B., et Msika, P. (2010). Natural peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist cream demonstrates similar therapeutic response to topical steroids in atopic dermatitis. *J. Dermatolog. Treat* 22, 359-365.

- Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Fruchart, J. C., Tedgui, A., Haegeman, G., et Staels, B. (1999a). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem* 274, 32048-32054.
- Delerive, P., Martin-Nizard, F., Chinetti, G., Trottein, F., Fruchart, J. C., Najib, J., Duriez, P., et Staels, B. (1999b). Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ. Res* 85, 394-402.
- Delerive, P., Fruchart, J. C., et Staels, B. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J. Endocrinol* 169, 453-459.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Fruchart, J.-C., Haegeman, G., et Staels, B. (2002). DNA binding-independent induction of IkappaBalpha gene transcription by PPARalpha. *Mol. Endocrinol* 16, 1029-1039.
- Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J., et Wahli, W. (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384, 39-43.
- Downie, M. M. T., Sanders, D. A., Maier, L. M., Stock, D. M., et Kealey, T. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor and farnesoid X receptor ligands differentially regulate sebaceous differentiation in human sebaceous gland organ cultures in vitro. *Br. J. Dermatol* 151, 766-775.
- Dréno, B., Amblard, P., Agache, P., Sirot, S., et Litoux, P. (1989). Low doses of zinc gluconate for inflammatory acne. *Acta Derm. Venereol* 69, 541-543.
- Dréno, B., Trossaert, M., Boiteau, H. L., et Litoux, P. (1992). Zinc salts effects on granulocyte zinc concentration and chemotaxis in acne patients. *Acta Derm. Venereol* 72, 250-252.
- Dréno, B., Moyse, D., Alirezai, M., Amblard, P., Auffret, N., Beylot, C., Bodokh, I., Chivot, M., Daniel, F., Humbert, P., Meynadier, J., et Poli, F. (2001). Multicenter randomized comparative double-blind controlled clinical trial of the safety and efficacy of zinc gluconate versus minocycline hydrochloride in the treatment of inflammatory acne vulgaris. *Dermatology (Basel)* 203, 135-140.
- Dréno, B., Khammari, A., Brocard, A., Moyse, D., Blouin, E., Guillet, G., Léonard, F., et Knol, A. C. (2012). Hidradenitis suppurativa: the role of deficient cutaneous innate immunity. *Arch. Dermatol* 148, 182-186.
- El Kabbaj, N., Dereure, O., et Guillot, B. (2005). Erosive pustulosis of the scalp: 3 cases. *Ann. Dermatol. Venereol* 132, 475-477.

- Elmongy, N. N., et Shaker O. (2012). Expression of Peroxisome Proliferator Activator Receptor β/δ (PPAR β/δ) in acne vulgaris. *Eur. J. Dermatol* 22, 42-45.
- Feldmeyer, L., Werner, S., French, L. E., et Beer, H. D. (2010). Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *Eur. J. Cell Biol* 89, 638-644.
- Foulc, P., David, A., et Dréno, B. (2002). Rapp Hodgkin's syndrome: folliculitis of the scalp cured with zinc oxide salts. *Ann. Dermatol. Venereol* 129, 325-326.
- Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N. S., Othlinghaus, N., Brockmeyer, N. H., Altmeyer, P., et Kreuter, A. (2008). Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. *Int. Arch. Allergy Immunol* 147, 17-24.
- Ganceviciene, R., Fimmel, S., Glass, E., et Zouboulis, C. C. (2006). Psoriasin and follicular hyperkeratinization in acne comedones. *Dermatology (Basel)* 213, 270-272.
- Ghodsi, S. Z., Orawa, H., et Zouboulis, C. C. (2009). Prevalence, severity, and severity risk factors of acne in high school pupils: a community-based study. *J. Invest. Dermatol* 129, 2136-2141.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., et Schröder, J. M. (2005). Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol* 6, 57-64.
- Gläser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J. M., et Schwarz, T (2009). The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J. Invest. Dermatol* 129, 641-649.
- Gollnick, H., Cunliffe, W., Berson, D., Dréno, B., Finlay, A., Leyden, J. J., Shalita, A. R., et Thiboutot, D. (2003). Management of acne: a report from a Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. *J. Am. Acad. Dermatol* 49, S1-37.
- Grange, P. A., Raingeaud, J., Calvez, V., et Dupin, N. (2009). Nicotinamide inhibits *Propionibacterium acnes*-induced IL-8 production in keratinocytes through the NF-kappaB and MAPK pathways. *J. Dermatol. Sci* 56, 106-112.
- Grange, P. A., Weill, B., Dupin, N., et Batteux, F. (2010). Does inflammatory acne result from imbalance in the keratinocyte innate immune response? *Microbes Infect* 12, 1085-1090.
- Guéniche, A., Viac, J., Lizard, G., Charveron, M., et Schmitt, D. (1995). Protective effect of zinc on keratinocyte activation markers induced by interferon or nickel. *Acta Derm. Venereol* 75, 19-23.

- Hanley, K., Jiang, Y., He, S. S., Friedman, M., Elias, P. M., Bikle, D. D., Williams, M. L., et Feingold, K. R. (1998). Keratinocyte differentiation is stimulated by activators of the nuclear hormone receptor PPARalpha. *J. Invest. Dermatol* *110*, 368-375.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., et Schröder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* *387*, 861.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., et Schröder, J. M. (2001). Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem* *276*, 5707-5713.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., et Schröder, J. M. (2004). Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J. Invest. Dermatol* *123*, 522-529.
- Hébert, C. A., et Baker, J. B. (1993). Interleukin-8: a review. *Cancer Invest* *11*, 743-750.
- Hirsh, F., Michel, B., et Strain, W. H. (1976). Gluconate zinc in acrodermatitis enteropathica. *Arch. Dermatol* *112*, 475-478.
- Isard, O., Knol, A. C., Castex-Rizzi, N., Khammari, A., Charveron, M., et Dréno, B. (2009). Cutaneous induction of corticotropin releasing hormone by *Propionibacterium acnes* extracts. *Dermatoendocrinol* *1*, 96-99.
- Isard, O., Knol, A. C., Ariès, M. F., Nguyen, J. M., Khammari, A., Castex-Rizzi, N., et Dréno, B. (2011). *Propionibacterium acnes* activates the IGF-1/IGF-1R system in the epidermis and induces keratinocyte proliferation. *J. Invest. Dermatol* *131*, 59-66.
- Jarrousse, V., Castex-Rizzi, N., Khammari, A., Charveron, M., et Dréno, B. (2007). Zinc salts inhibit in vitro Toll-like receptor 2 surface expression by keratinocytes. *Eur. J. Dermatol* *17*, 492-496.
- Jeremy, A. H. T., Holland, D. B., Roberts, S. G., Thomson, K. F., et Cunliffe, W. J. (2003). Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J. Invest. Dermatol* *121*, 20-27.
- Jugeau, S., Tenaud, I., Knol, A. C., Jarrousse, V., Quereux, G., Khammari, A., et Dréno, B. (2005). Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br. J. Dermatol* *153*, 1105-1113.
- Kang, X., Zhong, W., Liu, J., Song, Z., McClain, C. J., Kang, Y. J., et Zhou, Z. (2009). Zinc supplementation reverses alcohol-induced steatosis in mice through reactivating hepatocyte nuclear factor-4alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Hepatology* *50*, 1241-1250.

- Kawai, K., Shimura, H., Minagawa, M., Ito, A., Tomiyama, K., et Ito, M. (2002). Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci* 30, 185-194.
- Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., et Evans, R. M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.
- Kuenzli, S., et Saurat, J. H. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. *Br. J. Dermatol* 149, 229-236.
- Kömüves, L. G., Hanley, K., Man, M. Q., Elias, P. M., Williams, M. L., et Feingold, K. R. (2000). Keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis: topical application of PPARalpha activators restores tissue homeostasis. *J. Invest. Dermatol* 115, 361-367.
- Küry, S., Dréno, B., Bézieau, S., Giraudet, S., Kharfi, M., Kamoun, R., et Moisan, J. P. (2002). Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat. Genet* 31, 239-240.
- Lansdown, A. B., Mirastschijsko, U., Stubbs, N., Scanlon, E., et Agren, M. S. (2007). Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen* 15, 2-16.
- Lebonvallet, N., Jeanmaire, C., Danoux, L., Sibille, P., Pauly, G., et Misery, L. (2010). The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. *Eur. J. Dermatol* 20, 671-684.
- Lee, K. C., et Eckert, R. L. (2007). S100A7 (Psoriasin)--mechanism of antibacterial action in wounds. *J. Invest. Dermatol* 127, 945-957.
- Liu, J. Y., Hu, J. H., Zhu, Q. G., Li, F. Q., et Sun, H. J. (2006). Substance P receptor expression in human skin keratinocytes and fibroblasts. *Br. J. Dermatol* 155, 657-662.
- Madsen, P., Rasmussen, H. H., Leffers, H., Honoré, B., Dejgaard, K., Olsen, E., Kiil, J., Walbum, E., Andersen, A. H., et Basse, B. (1991). Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein « psoriasin » that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol* 97, 701-712.
- Martinsson, H., Yhr, M., et Enerbäck, C. (2005). Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. *Exp. Dermatol* 14, 161-168.
- Meunier, L. (2008). Expositions solaires et vitamine D. *Ann. Dermatol. Venereol* 135, 549-550.

- Maverakis, E., Fung, M. A., Lynch, P. J., Draznin, M., Michael, D. J., Ruben, B., et Fazel, N. (2007). Acrodermatitis enteropathica and an overview of zinc metabolism. *J. Am. Acad. Dermatol* 56, 116-124.
- Michaëlsson, G., Ljunghall, K., et Danielson, B.G. (1980). Zinc in epidermis and dermis in healthy subjects. *Acta Derm. Venereol* 60, 295-299.
- Michalik, L., Desvergne, B., Tan, N. S., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusset, J., Peters, J. M., Kaya, G., Gonzalez, F. J., Zakany, J., Metzger, D., Chambon, P., Duboule, D., et Wahli, W. (2001). Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR β mutant mice. *J. Cell. Biol* 154, 799-814.
- Mourelatos, K., Eady, E. A., Cunliffe, W. J., Clark, S. M., et Cove, J. H. (2007). Temporal changes in sebum excretion and propionibacterial colonization in preadolescent children with and without acne. *Br. J. Dermatol* 156, 22-31.
- Mössner, R., Kaiser, R., Matern, P., Krüger, U., Westphal, G. A., Brockmöller, J., Ziegler, A., Neumann, C., König, I. R., et Reich, K. (2004). Variations in the genes encoding the peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res* 296, 1-5.
- Muffley, L. A., Zhu, K. Q., Engrav, L. H., Gibran, N., S., et Hocking, A. M. (2011). Spatial and temporal localization of the melanocortin 1 receptor and its ligand α -melanocyte-stimulating hormone during cutaneous wound repair. *J. Histochem. Cytochem* 59, 278-88.
- Nagy, I., Pivarcsi, A., Koreck, A., Széll, M., Urbán, E., et Kemény, L. (2005). Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J. Invest. Dermatol* 124, 931-938.
- Niyonsaba, F., Ogawa, H., et Nagaoka, I. (2004). Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 111, 273-281.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Okumura, K., et Ogawa, H. (2005). The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J. Immunol* 175, 1776-1784.
- Ottaviani, M., Alestas, T., Flori, E., Mastrofrancesco, A., Zouboulis, C. C., et Picardo, M. (2006). Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: a possible role in acne vulgaris. *J. Invest. Dermatol* 126, 2430-2437.

- Palmer, C. N., Hsu, M. H., Griffin, H. J., et Johnson, E. F. (1995). Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J. Biol. Chem* 270, 16114-16121.
- Pelletier, G., et Ren, L. (2004). Localization of sex steroid receptors in human skin. *Histol. Histopathol* 19, 629-636.
- Philpott M. P. (2003). Defensins and acne. *Mol. Immunol* 40, 457-462.
- Pivarsci, A., Bodai, L., Réthi, B., Kenderessy-Szabó, A., Koreck, A., Széll, M., Beer, Z., Bata-Csörgö, Z., Magócsi, M., Rajnavölgyi, E., Dobozy, A., et Kemény, L. (2003). Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int. Immunol* 15, 721-730.
- Prasad, A. S. (1979). Clinical, biochemical, and pharmacological role of zinc. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 19, 393-426.
- Rajagopalan, S., Winter, C. C., Wagtmann, N., et Long, E. O. (1995). The Ig-related killer cell inhibitory receptor binds zinc and requires zinc for recognition of HLA-C on target cells. *J. Immunol* 155, 4143-4146.
- Reiterer, G., Toborek, M., et Hennig, B. (2004). Peroxisome proliferator activated receptors alpha and gamma require zinc for their anti-inflammatory properties in porcine vascular endothelial cells. *J. Nutr* 134, 1711-1715.
- Reithmayer, K., Meyer, K. C., Kleditzsch, P., Tiede, S., Uppalapati, S. K., Gläser, R., Harder, J., Schröder, J.-M., et Paus, R. (2009). Human hair follicle epithelium has an antimicrobial defence system that includes the inducible antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) and RNase 7. *Br. J. Dermatol* 161, 78-89.
- Revuz, J, Amblard, P, et Dréno, B (1990). Efficacité du gluconate de zinc dans le traitement de l'acné inflammatoire. *Abstr. Dermatol*, 2-4.
- Rivas-Santiago, B., Trujillo, V., Montoya, A., Gonzalez-Curiel, I., Castañeda-Delgado, J., Cardenas, A., Rincon, K., Hernandez, M. L., et Hernández-Pando, R. (2012). Expression of antimicrobial peptides in diabetic foot ulcer. *J. Dermatol. Sci* 65, 19-26.
- Rivier, M., Safonova, I., Lebrun, P., Griffiths, C. E., Ailhaud, G., et Michel, S. (1998). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol* 111, 1116-1121.
- Sainte-Marie, I., Jumbou, O., Tenaud, I., et Dréno, B. (1998). Comparative study of the in vitro inflammatory activity of three nickel salts on keratinocytes. *Acta Derm. Venereol* 78, 169-172.

- Santos, M. C., Souza, A. P., Gerlach, R. F., Tabchoury, C. M., et Line, S. R. (2001). Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing. *Br. J. Dermatol* 145, 854-855.
- Schlapbach, C., Yawalkar, N., et Hunger, R. E. (2009). Human beta-defensin-2 and psoriasin are overexpressed in lesions of acne inversa. *J. Am. Acad. Dermatol* 61, 58-65.
- Schneider, J. J., Unholdzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., et Korting, H. C. (2005). Human defensins. *J. Mol. Med* 83, 587-595.
- Schuster, M., Zouboulis, C.C., Otsendorf, F., Müller, J., Thaçi, D., Bernd, A., Kaufmann, R., et Kippenberger, S. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor activators protect sebocytes from apoptosis: a new treatment modality for acne? *Br. J. Dermatol* 164, 182-186.
- Sheu, M. Y., Fowler, A. J., Kao, J., Schmuth, M., Schoonjans, K., Auwerx, J., Fluhr, J. W., Man, M.-Q., Elias, P. M., et Feingold, K. R. (2002). Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. *J. Invest. Dermatol* 118, 94-101.
- Skidmore, B. J., Chiller, J. M., Morrison, D. C., et Weigle, W. O. (1975). Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities. *J. Immunol* 114, 770-775.
- Sørensen, S., Sølvesten, H., Politi, Y., et Kragballe, K. (1997). Effects of vitamin D3 on keratinocyte proliferation and differentiation in vitro: modulation by ligands for retinoic acid and retinoid X receptors. *Skin Pharmacol* 10, 144-52.
- Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebreton, M., Torra, I. P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J. C., Chapman, J., Najib, J., et Staels, B. (1998). Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393, 790-793.
- Steinhoff, M., Brzoska, T., et Luger, T. A. (2001). Keratinocytes in epidermal immune responses. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol* 1, 469-476.
- Tai, E. S., Bin Ali, A., Zhang, Q., Loh, L. M., Tan, C. E., Retnam, L., El Oakley, R. M., et Lim, S. K. (2003). Hepatic expression of PPARalpha, a molecular target of fibrates, is regulated during inflammation in a gender-specific manner. *FEBS Lett.* 546, 237-240.
- Tenaud, I., Sainte-Marie, I., Jumbou, O., Litoux, P., et Dréno, B. (1999). In vitro modulation of keratinocyte wound healing integrins by zinc, copper and manganese. *Br. J. Dermatol* 140, 26-34.

- Tenaud, I., Leroy, S., Chebassier, N., et Dréno, B. (2000). Zinc, copper and manganese enhanced keratinocyte migration through a functional modulation of keratinocyte integrins. *Exp. Dermatol* 9, 407-416.
- Thiboutot, D., Gollnick, H., Bettoli, V., Dréno, B., Kang, S., Leyden, J. J., Shalita, A. R., Lozada, V. T., Berson, D., Finlay, A., Goh, C. L., Herane, M. I., Kaminsky, A., Kubba, R., Layton, A., Miyachi, Y., Perez, M., Martin, J. P., Ramos-E-Silva, M., See, J. A., Shear, N., et Wolf, J. Jr. (2009). New insights into the management of acne: an update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne group. *J. Am. Acad. Dermatol* 60, S1-50.
- Trivedi, N. R., Cong, Z., Nelson, A. M., Albert, A. J., Rosamilia, L. L., Sivarajah, S., Gilliland, K. L., Liu, W., Mauger, D. T., Gabbay, R. A., et Thiboutot, D. M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors increase human sebum production. *J. Invest. Dermatol* 126, 2002-2009.
- Uchi, H., Terao, H., Koga, T., et Furue, M. (2000). Cytokines and chemokines in the epidermis. *J. Dermatol. Sci* 24, S29-38.
- Van der Zee, H. H., De Ruiter, L., Van den Broecke, D. G., Dik, W. A., Laman, J. D., et Prens, E. P. (2011). Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: a rationale for targeting TNF- α and IL-1 β . *Br. J. Dermatol* 164, 1292-1298.
- Van Lint, P., et Libert, C. (2007). Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol* 82, 1375-1381.
- Wellinghausen, N., Kirchner, H., et Rink, L. (1997). The immunobiology of zinc. *Immunol. Today* 18, 519-521.
- Wiesner, J., et Vilcinskis, A. (2010). Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1, 440-464.
- Yanagi, S., Ashitani, J. I., Ishimoto, H., Date, Y., Mukae, H., Chino, N., et Nakazato, M. (2005). Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. *Respir. Res* 6, 130.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., et Oppenheim, J. J. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286, 525-528.
- Zouboulis, C. C., Chen, W. C., Thornton, M. J., Qin, K., et Rosenfield, R. (2007). Sexual hormones in human skin. *Horm. Metab. Res* 39, 85-95.

NOM : **POIRAUD** Prénom : **Carole**

PPAR- α , human β -defensin-2 et psoriasine : Trois nouvelles cibles thérapeutiques du gluconate de zinc

Résumé

Le zinc est un régulateur de l'immunité innée, efficace pour traiter certaines dermatoses inflammatoires. Nous avons étudié la modulation par le zinc de molécules impliquées dans l'immunité innée : le Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α (PPAR- α), les β -défensines humaines -2 et -4 (hBD-2 et -4) et la psoriasine, dans un modèle *ex vivo* de dermatose inflammatoire. Des explants cutanés obtenus à partir de donneurs sains étaient stimulés par du Lipopolysaccharide (LPS), avec ou sans pré-incubation par le gluconate de zinc. L'expression cutanée protéique et transcriptionnelle, la sécrétion extra-cellulaire et l'activité des marqueurs étaient ensuite analysées. A travers notre travail, nous avons démontré que le zinc stimulait la synthèse d'hBD-2, de la psoriasine, et avait un rôle activateur sur le PPAR- α .

Mots-clés: Immunité innée ; Kératinocytes ; PPAR ; Peptides antimicrobiens ; Zinc