UNIVERSITE DE NANTES FACULTE DE MEDECINE

Rôle de Propionibacterium acnes dans la différenciation et l'immunité innée kératinocytaire

THESE DE DOCTORAT

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

Présentée et soutenue publiquement par

JARROUSSE Véronique

Le 25 Octobre 2006, devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs M. Laurent Misery, PU-PH, Brest M. Michel Simon, Chargé de recherche Inserm, Toulouse

Examinateurs M. Mohamed Hamidou, PU-PH, Nantes Mme Marie Charveron, Docteur en Pharmacie, Toulouse

Directrice de thèse Mme Brigitte Dréno, PU-PH, Nantes

I. INTRODUCTION 4

A. GENERALITES SUR LA PEAU.	7
1. Structure de l'épiderme	9
a) Les kératinocytes	
b) Les mélanocytes	
c) Les cellules de Langerhans	13
d) Recepteurs du sens du toucher	13
2. Annexes dermo-épidermiques	14
a) Les follicules pileux	14
b) Les glandes sudoripares ou sudorales	14
c) Les glandes sébacées	15
d) L'ongle	
3. Structure du derme	15
4. Structure de l'hypoderme	16
B. PATHOLOGIES CUTANEES INFLAMMATOIRES	
1. Lymphomes cutanés T épidermotropes	
a) Le Mycosis fongoïde	
b) Le Syndrome de Sézary	
c) Généralités sur les LCTE	
d) Etiologie des LCTE	
2. Acné	
a) Généralités	
b) Première étape : l'hypersécrétion sébacée	
c) Deuxième étape : la formation du microcomédon	
(1) Rôle des hormones kératinocytaires	
(2) Rôle des cytokines	
(3) Rôle des intégrines	
(4) Rôle de la filaggrine	
(5) Rôle des PPARs kératinocytaires	
d) Troisième étape : la formation des lésions inflammatoires.	
(1) Rôle des polynucléaires	
(2) Rôle des cytokines	
(3) Rôle de l'immunité innée	
(4) Les métalloprotéases (MMP9)	
(5) Rôle des radicaux libres	
(6) Rôle du facteur de transcription NF-kB	
C. PROPIONIBACTERIUM ACNES (P.ACNES)	
1. Généralités sur P.acnes	
2. P.acnes et acné	
D. ELEMENT TRACE: ZINC	
1. Généralités	
2. Zinc et physiologie cutanée	
3. Zinc et Acné	
E. MODELES CUTANES	
1. Kératinocytes normaux humains en monocouche	
2. Explants cutanés	40
II. OBJECTIFS 41	

III. RESULTATS 43	
A. ROLE DE P.ACNES DANS L'IMMUNITE INNEE ET LA DIFFERENCIATION KERATINOCYTAIRE	43
1. Etude des effets de P.acnes sur la différenciation kératinocytaire	43
a) <i>P.acnes</i> induit des modifications de la différenciation des kératinocytes	
b) Article 1 : <i>Propionibacterium acnes</i> modulates keratinocytes differenciation	
2. Etude de la modulation des Toll-like receptors 2 cutanés par le zinc	
a) Le zinc inhibe l'expression de TLR2 par les kératinocytes activés	
b) Article 2: Inhibition of Toll-like Receptor 2 expression by zinc salts	
B. ETUDE COMPLEMENTAIRE: EXPRESSION DES RECEPTEURS TOLL-LIKE 2, 4 ET 9	
KERATINOCYTAIRES DANS LES LYMPHOMES CUTANES T EPIDERMOTROPES	99
1. L'expression des TLRs 2, 4 et 9 kératinocytaires est augmentée dans l'épiderme des pa	itients
atteints de LCTE	99
2. Article 3: Toll-like Receptors 2, 4 and 9 expression in cutaneous T-cell lymphoma (My	cosis
fungoides and Sézary syndrome)	
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES 102	
V. MATERIEL ET METHODES 113	
A. Materiel.	113
1. Modulateurs	113
2. Explants cutanés et kératinocytes normaux humains en monocouche	114
3. Biopsies de patients	
4. Anticorps	116
B. METHODES	117
1. Culture de kératinocytes normaux humains en monocouches	117
2. Culture d'explants cutanés	118
3. Immunohistochimie	119
a) Préparation des lames à partir d'explants cutanés	119
b) Préparation des lames à partir des kératinocytes en monocouche	119
c) Immunomarquage	119
d) Lecture des lames	120
4. Double marquage	120
5. Dosage de l'interleukine-8 par ELISA	121
6. Western-blot	121
a) Extraction protéique	122
b) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	122
c) Transfert des protéines	
d) Immunodetection des proteines	123
7. Analyse statistique	123
VI. RÉFERENCES 124	

Liste des abréviations

Ac: anticorps

ACTH: adreno-corticotropic hormone

ADN: acide désoxyribonucléique

AEC: 3-amino-9ethylcarbazole

AP-1: activator protein 1

APS: persulfate d'ammonium

ARN : acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messager

ATP: adenosine triphosphate

BPE: bovine pituitary extract

BSA: sérum albumine bovine

CD : cluster of différentiation ou antigène de différenciation

CLA: cutaneous lymphocyte associated antigen

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DO: densité optique

EBV: virus d'Epstein-Barr

EDTA: acide ethylene diamine tétracétique

EGF: epithelial growth factor

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

ERK: extracellular signal-regulated protein kinase

FM: fraction membranaire

hBD: human beta-defensin

HC: hydrocortisone

HSV: herpes simplex virus

HTLV-1: human T-cell lymphotrophic virus type-1

IkB: inhibitor of kappa B

ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1

Ig: immunoglobuline

IGF: insulin growth factor

IL: interleukine

INF: interféron

IRF-3: interferon regulatory factor

kDa: kilodalton

KGM: keratinocytes growth medium

KSFM: keratinocytes serum free medium

LCTE: lymphomes cutanés T epidermotropes

LFA-3: leukocyte function associated antigen-3

LPS: lipopolysaccharide

LT: lymphocyte T

MAPK: mitogen activating peptide kinase

MF: mycosis fongoïde

MM: masse moléculaire

MMP: matrix metalloproteinase

MTT: bromure de 3-(4,5-dimethylthizol-2-yl)-2,5-diphenyltétrazolium

MyD-88: myeloid differentiation primary response gene (88)

NF-κB: nuclear factor kappa B

NHEK: normal human epidermal keratinocyte

NK: natural killer

NLS: nuclear localisation signal

P.acnes: Propionibacterium acnes

PAMP: pathogen associated molecular pattern

PBS: phosphate buffer saline

PGN: peptidoglycan

PMA: phorbol 12 myristate 13 acetate

PPAR: peroxisomal proliferator activator receptor

PRR: pattern recognition receptor

PVDF: polyvinylidène difluoride

RSV: respiratory syncytial virus

SA: surnageant A

SB: surnageant B

SDS: sodium dodecyl sulfate

SS: syndrome de Sézary

SVF : sérum de veau fœtal

TBS: tris buffer saline

TIR: cytoplasmic tail of the IL1 receptor

TLR: toll-like receptor

TNF: tumor necrosis factor

UV : ultraviolets

Introduction

A. Généralités sur la peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain, elle couvre en moyenne 1,5 à 2 m² en fonction des individus. De ce fait, elle est aussi l'organe le plus lourd : 5 à 6 kg. Son épaisseur est variable selon les zones du corps, l'âge, le sexe, la race : 1,5 mm en moyenne. Elle est plus fine au niveau des paupières et très épaisse au niveau des plantes de pieds et des paumes.

Elle assure des fonctions multiples telle la protection mécanique et immunologique contre les agressions extérieures, et intervient dans les mécanismes de thermorégulation et de sensation :

- Fonction barrière contre les agressions extérieures, assurée par la couche cornée
- Fonction immunologique, assurée par les cellules de Langerhans
- Fonction bactériologique, la flore microbienne varie de manière qualitative et quantitative selon:
- l'humidité, le pH, la température. Ainsi, l'humidité accroît le nombre de bactéries résidentes et favorise la colonisation par des bactéries Gram négatifs;
- les lipides présents à la surface cutanée inhibent la prolifération de certains germes tels
 les Staphylocoques dorés et les candida, mais favorisent la prolifération de *P.acnes*;
- des phénomènes d'interférences microbiennes, les bactéries résidentes inhibant la colonisation par d'autres germes;
- le processus d'adhésion des bactéries sur les cellules épidermiques joue un rôle important pour la colonisation bactérienne; les mécanismes en sont mal connus, faisant intervenir la surface bactérienne et la synthèse d'adhésines bactériennes, mais également la présence de recepteurs par les cellules épidermiques, ce qui peut expliquer certaines susceptibilités individuelles;

- la synthèse par les kératinocytes de l'épiderme de peptides anti-microbiens tels que les défensines;
- des anticorps présents dans la sueur pourraient jouer un rôle dans l'immunité de surface.
- Fonction de photoprotection :
 - Les mélanocytes sont le site de synthèse de la mélanine, pigment cutané permettant la protection de l'information génétique contenue dans les kératinocytes
 - L'acide urocanique joue également un rôle photoprotecteur en absorbant une partie du rayonnement UV
- Fonction hormonale, sous l'effet des radiations UV, les kératinocytes synthétisent des hormones telles que l'α-MSH et l'ACTH qui sont capables d'induire la mélanogénèse
- Thermorégulation, assurée par les glandes sudoripares
- Fonction neuro-sensorielle, assurée par les cellules de Merkel et les terminaisons nerveuses du derme

La peau est formée de la superposition de trois tissus (Figure 1) :

- L'épiderme est la couche la plus superficielle, il joue principalement un rôle de « barrière »
- Le **derme** est la couche moyenne, c'est un tissu de soutien
- L'hypoderme est la couche la plus profonde, c'est un tissu adipeux

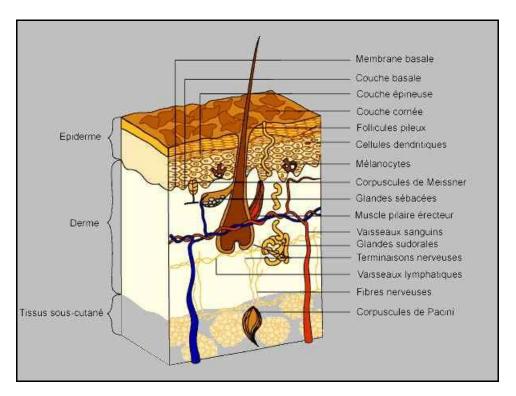


Figure 1 : Structure générale de la peau.

1. Structure de l'épiderme

L'épiderme est une structure très mince dont l'épaisseur varie selon sa localisation. C'est un épithélium stratifié kératinisant constitué de quatre couches cellulaires dont la fonction principale est de proliférer puis de se différencier afin d'assurer le rôle « barrière » de la peau.

On dénombre quatre types cellulaires au sein de cet épiderme (Figure 2):

a) Les kératinocytes

Ils constituent environ 90% des cellules présentes dans l'épiderme. Leur fonction essentielle est de progresser vers la surface de la peau tout en se différenciant afin de former la couche cornée. Le renouvellement complet de l'épiderme, depuis la naissance d'une cellule fille jusqu'à sa desquamation, s'effectue selon un cycle de 30 jours environ. Pendant le processus de différenciation, les kératinocytes

synthétisent la kératine, protéine qui rentre dans la composition de la couche cornée. Au cours de leur évolution depuis la membrane basale, les kératinocytes forment quatre couches distinctes dans l'épiderme :

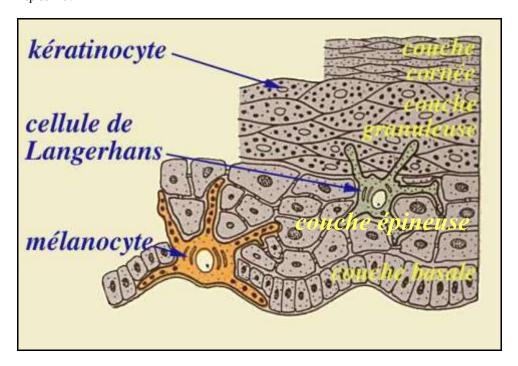


Figure 2 : Structure générale de l'épiderme.

L'assise basale est la couche la plus profonde. Elle est constituée d'une rangée unique de kératinocytes, de forme cubique ou cylindrique, en prolifération. Ces kératinocytes sont implantés sur la membrane basale et épousent les papilles dermiques. Ces papilles correspondent à l'adhésion, sous forme de « tôle ondulée », de l'épiderme au derme par l'intermédiaire d'hémidesmosomes, formant ainsi la jonction dermo-épidermique. Ces papilles constituent une réserve de peau permettant à celle-ci de s'étirer, et augmentent considérablement la surface de contact entre l'épiderme et le derme.

- Le corps muqueux de Malpighi ou stratum spinosum est composé d'environ cinq à six couches de cellules. Les kératinocytes s'aplatissent progressivement au cours de leur progression vers la surface de la peau.
- La couche granuleuse ou stratum granulosum est constitué de une à trois couches de kératinocytes aplatis. A ce stade de la différenciation des kératinocytes, apparaissent de nouvelles structures cellulaires: les grains de kératohyaline (précurseur de la kératine) et les corps d'Odland riches en lipides. Les kératinocytes granuleux déversent dans l'espace extracellulaire un ciment constitué de lipides, cholestérol, acides gras libres saturés et céramides, qui augmentent la cohésion entre les cellules et contribue ainsi au rôle de barrière de l'épiderme.
- La couche cornée ou stratum corneum est la couche la plus superficielle de la peau, elle résulte de l'apoptose des kératinocytes. Ces derniers à ce stade final de leur différenciation sont appelés cornéocytes. Ils sont complètement plats, anucléés, dépourvus d'organites et remplis de kératine. Cette protéine insoluble dans l'eau représente 95% des protéines de l'épiderme et c'est en partie elle qui confère à la peau sa fonction de protection. On distingue deux couches différentes de corneocytes : la couche compacte où les cornéocytes, reliés les uns aux autres par les cornéodesmosomes (structures protéiques jonctionelles dérivées des desmosomes), assure la fonction barrière et la couche desquamante où la dégradation de ces cornéodesmosomes provoque le phénomène de desquamation. Les cellules sont maintenues entre elles par un ciment intercellulaire contenant des lipides dérivant des lipides sécrétés par les kératinocytes granuleux (corps d'Odland) et les enzymes responsables de la desquamation des cornéocytes. La solidité et la compactabilité de la couche cornée assurent l'essentiel de la fonction barrière cutanée. Elles s'opposent notamment à la pénétration dans l'épiderme des champignons, des bactéries et multiples allergènes de l'environnement mais elles s'opposent aussi à la fuite transépidermique d'eau. Le stratum corneum est formé d'un

nombre très variable de couches cellulaires en fonction de la localisation corporelle. On en compte quinze à vingt au niveau de la peau du dos et plusieurs centaines au niveau des plantes des pieds.

b) Les mélanocytes

Ils constituent environ 5% de la population cellulaire totale de l'épiderme. Ces cellules s'insinuent entre les kératinocytes au niveau de la couche basale mais ne possèdent pas de desmosomes leur permettant d'adhérer aux cellules avoisinantes. La fonction principale des mélanocytes est la synthèse des mélanines, pigments cutanés qui sont de deux types : l'eumélanine (mélanine brune ou noire) et la phaéomélanine (mélanine jaune orangé). Sous l'effet des UV, principalement des UVB, la synthèse des mélanines augmente et leur transfert aux kératinocytes, par l'intermédiaire de dendrites, est accéléré. La production de mélanines constitue une réponse adaptative de l'organisme à des expositions prolongées au soleil. Ainsi, après stimulation par les rayons UV, les mélanocytes produisent une pigmentation facultative traduisant la capacité de chaque individu à développer un bronzage, le mécanisme naturel de protection de la peau. Les UVB induisent la formation de dimères dans la chaîne d'ADN entraînant des défauts métaboliques (vieillissement), la mort cellulaire ou l'acquisition de propriétés de multiplication désordonnées (cancers). Tous ces phénomènes sont amplifiés par la production de radicaux libres au niveau des membranes cytoplasmiques. Lors d'une irradiation, les mélanosomes se rassemblent autour du noyau des kératinocytes (phénomène de « capping ») et protègent ainsi le matériel génétique. Les eumélanines ont un pouvoir photoprotecteur environ mille fois supérieur à celui des phaéomélanines. Elles sont capables d'absorber les radicaux libres générés dans les cellules par les radiations UV, empêchant que l'ADN soit endommagé et protègent ainsi la peau des effets nocifs des UV.

c) Les cellules de Langerhans

Elles exercent le rôle de « sentinelles » au sein du corps muqueux de Malpighi. Ces cellules ne sont pas d'origine épithéliale, elles sont en constant renouvellement depuis la moelle osseuse. Les cellules de Langerhans sont libres au sein de l'épiderme et des différentes muqueuses. Elles contiennent une structure unique à ces cellules, les granules de Birbeck (invagination de la membrane) qui interviennent dans l'internalisation des substances étrangères captées pour porter l'information au niveau des ganglions. Les cellules de Langerhans ainsi activées vont quitter l'épiderme pour aller informer le système immunitaire. Les expositions aux radiations UV engendrent une immunosuppression locale due à une diminution des cellules de Langerhans (apoptose).

d) Recepteurs du sens du toucher

- Les corpuscules de Meissner sont des récepteurs du toucher et de la pression superficielle. Ils sont localisés à la jonction du derme et de l'épiderme, principalement au niveau de la pulpe des doigts, paume des mains, mais également de la plante des pieds et des orteils. Les fibres nerveuses pénètrent profondément dans le corpuscule. De nombreuses fibres nerveuses libres sont aussi présentent dans le derme et l'épiderme.
- Les corpuscules de Pacini sont des récepteurs sensibles à la pression qui sont situés profondément dans l'hypoderme et remontent jusque dans le derme. Ce sont de gros récepteurs puisque leur taille varie de 1 à 4 mm de long, pour une épaisseur de 0.5 mm. Ils sont constitués de lamelles cellulaires concentriques entourant une fibre nerveuse. Ces lamelles contiennent un fluide qui se répartit rapidement en fonction des zones de pression.

 Les cellules de Merkel sont peu nombreuses au sein de l'épiderme et sont localisées dans la couche basale. Ce sont des mécanorécepteurs répondant à des stimuli vibratoires et qui sont en liaison avec les fibres nerveuses du derme. La densité de ces cellules est maximale au niveau palmo-plantaire.

2. Annexes dermo-épidermiques

Les annexes cutanées sont ancrées dans le derme et émergent à la surface de l'épiderme (Figure 1).

On distingue :

a) Les follicules pileux

Ils sont répartis sur toute la surface du corps sauf les paumes et les plantes et implantés dans le derme. La pousse du poil se fait selon un cycle en trois phases : La phase anagène de croissance du follicule dont la durée varie en fonction des individus (jusqu'à trois ans), la phase catagène d'involution du poil (environ trois semaines) et la phase télogène d'élimination du poil (environ trois mois) et d'induction de repousse d'un nouveau follicule.

b) Les glandes sudoripares ou sudorales

Les glandes sudoripares (ou sudorales) eccrines : elles ont une fonction sécrétoire et excrétoire et interviennent dans le processus de thermorégulation. Elles sont constituées d'un peloton sudoripare situé dans le derme, que prolonge le canal excréteur jusqu'à l'orifice situé à la surface cutanée. Ces orifices constituent les pores de la peau. On trouve des glandes eccrines sur la quasi-totalité du tégument (2 à 5 millions au total). Elles sont innervées par le système nerveux sympathique, mais le principal neurotransmetteur est l'acétylcholine. Les glandes eccrines sont constituées de cellules épithéliales, qui interviennent dans la sécrétion et la réabsorption d'électrolytes, et de cellules myoépithéliales, qui interviennent comme moteur de l'excrétion sudorale.

Les glandes sudoripares apocrines : elles sont indexées au follicule pilo-sébacé et leur canal débouche dans la portion superficielle de l'orifice folliculaire. Elles sont principalement situées dans la région axilliaire. On en trouve également autour des aréoles mammaires, sur le cuir chevelu, et dans la région génitale. Elles produisent et excretent un soluté dont la composition est différente de celui des glandes eccrines, notamment plus riche en protéines. La sécrétion des glandes apocrines peut se mélanger au sébum sécrété par les glandes sébacées. La dégradation de la sueur stagnant à la surface cutanée par des bactéries produit au bout d'un certain temps une odeur souvent ressentie comme désagréable. Les glandes apocrines interviennent peu dans le processus de thermorégulation. Chez les animaux inférieurs, cette sueur odoriférante pourrait jouer un rôle d'attraction sexuelle.

c) Les glandes sébacées

Les glandes sébacées sont annexées aux follicules pileux. Elles ont pour fonction la synthèse du sébum dans les sébocytes, cellules qui naissent à la base de la glande et libèrent leur contenu dans le canal du follicule pileux lorsqu'elles sont arrivées à maturité. Le sébum produit en continu se répartit alors sur les poils. Il est composé de lipides et de débris cellulaires sébacés.

d) L'ongle

L'ongle est une lame cornée flexible, lisse et translucide qui protège les extrémités digitales et joue un rôle de préhension et de défense.

3. Structure du derme

Le derme est séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique constituée par la membrane basale des kératinocytes. Le derme est une matrice fibrillocellulaire et vasculaire assurant la fonction de tissu de soutien. Les seules cellules du derme sont les fibroblastes, peu nombreux et quiescents (myofibroblastes) tant qu'il n'y a pas lésion du derme et donc nécessité de le reconstruire. Le derme contient différents

types de collagène (collagène de type I, III, IV et VII), des fibres élastiques (ex : élastine), des glycoprotéines (ex : fibronectine) et des protéoglycanes formant la matrice extracellulaire.

On distingue deux niveaux dans le derme :

- le derme superficiel constitué des papilles dermiques où sont réalisés les échanges avec
 l'épiderme
- le derme réticulaire ou profond.

Ce tissu de soutien est le site de terminaison des réseaux vasculaire et nerveux.

4. Structure de l'hypoderme

Ce tissu adipeux est formé de cellules, les adipocytes, spécialisées dans le stockage de lipides, il constitue ainsi une structure de réserve de nutriments et d'énergie. De plus, l'hypoderme confère à la peau une résistance aux chocs thermiques et mécaniques.

B. Pathologies cutanées inflammatoires

1. Lymphomes cutanés T épidermotropes

Les lymphomes cutanés T sont définis par une prolifération lymphoïde cutanée T, et peuvent être séparés en deux grands groupes : les lymphomes épidermotropes et les lymphomes non épidermotropes (Willemze et al, 1997) (Kim et Hope, 1999). Les lymphomes cutanés T épidermotropes ou LCTE représentent 40% de tous les lymphomes cutanés T et se présentent sous deux formes, le Mycosis fongoïde (MF) et le syndrome de Sézary (SS), qui sont regroupés en différents stades selon la classification TNM (Edelson, 1980).

a) Le Mycosis fongoïde

Le Mycosis fongoïde (MF), de bon pronostic (87% de survie à 5 ans), est la forme la plus fréquente de LCTE et son incidence est de trois cas annuels par an et pour un million d'habitants. Il se présente sous la forme de plaques érythémateuses prurigineuses et disséminées s'infiltrant progressivement. On distingue différents stades dans le MF. Le premier stade, qualifié d'érythème pré-mycosique, est caractérisé par des plaques érythémato-squameuses, bien limitées et non infiltrées (Figure 3A). Au second stade, on observe une infiltration de ces plaques par des lymphocytes T, suivie au troisième stade par l'apparition de nodules tumoraux (Figure 3B).

b) Le Syndrome de Sézary

Le syndrome de Sézary, plus rare (un nouveau cas par an et par million d'habitants), est la forme d'emblée leucémique de LCTE, caractérisé par une érythrodermie (Figure 3C), une polyadénopathie et la présence dans le sang de lymphocytes T atypiques au noyau cérébriforme, les cellules de Sézary (Figure 3D). Le syndrome de Sézary a un pronostic plus sombre que le MF avec une survie à 5 ans évaluée à 11%.

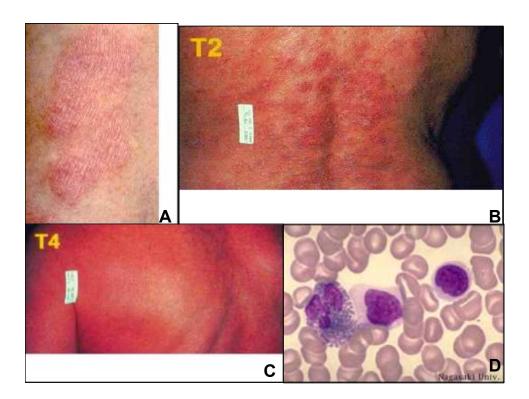


Figure 3 : A : plaques érythémato-squameuses au cours d'un mycosis fongoïde de stade Ia, **B:** plaques infiltrées au cours d'un mycosis fongoïde de stade IIb, **C:** érythrodermie au cours d'un syndrome de Sézary, **D:** observation de cellules de Sézary circulantes (coloration May Grunwald Giemsa) : cellules à noyau encoché en « coup d'ongle »

c) Généralités sur les LCTE

Les LCTE sont caractérisés par un épidermotropisme, c'est-à-dire l'infiltration de l'épiderme par des lymphocytes T activés de phénotype CD2+ CD3+ CD4+ DR+ CD45RO+ exprimant la molécule CLA (cutaneous lymphocyte associated antigen) (Akdis et al, 2000). Cette molécule CLA est un ligand pour la E-sélectine (ELAM1), molécule d'adhésion exprimée à la surface des cellules endothéliales des veinules cutanées, permettant le phénomène de « homing ». Les cellules de Sézary circulantes exprimant CD45RO (phénotype mémoire) et conservant un tropisme cutané (expression de la molécule CLA), elles pourraient avoir été déjà sensibilisées par un antigène d'origine cutanée. L'infiltrat de lymphocytes T, composé de cellules tumorales et de cellules réactionnelles, augmente progressivement au cours des années, pouvant aboutir à une transformation en lymphome cutané de haute malignité : les cellules tumorales perdent leur épidermotropisme donc le contact avec les kératinocytes et se dédifférencient.

d) Etiologie des LCTE

A l'heure actuelle, l'étiologie des LCTE demeure inconnue. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer la transformation néoplasique des LCTE : rôle d'une exposition aux toxiques chimiques, rôle de certains proto-oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur, ou encore rôle d'une stimulation antigénique chronique des lymphocytes T cutanés, mais aucune n'a été confirmée. Bien que l'on suspecte l'implication d'un virus tel que l'EBV (Jumbou al, 1997) (Dréno et al, 1994) (Knol et al, 2005) ou l'HTLV-1 (Pancake et al, 1995) dans la genèse de certains de ces lymphomes, celle-ci reste à démontrer.

2. Acné

a) Généralités

L'acné est le motif le plus fréquent de consultation en dermatologie, cependant, les mécanismes à l'origine de cette affection cutanée sont mal connus.

L'acné est une maladie inflammatoire chronique du follicule pilosébacé sous dépendance hormonale qui se déroule en trois étapes bien définies :

- 1^{er} étape : stimulation de la production de la glande sébacée, induisant une hyperséborrhée qui débute en général à la puberté (Fig. 4B).
- 2^{ème} étape : formation du microcomédon qui est considéré comme la lésion élémentaire de l'acné et qui se ferait à partir :
 - d'anomalies de la prolifération : « ex vivo » les kératinocytes du canal du follicule pilosébacé ont un indice de prolifération supérieur(Ki67), chez le patient acnéique comparé au sujet sain témoin (Knaggs et al, 1994),
 - de l'adhésion et de la différenciation : les kératinocytes de l'infra-infundibulum du follicule pilosébacé ne se détachent pas les uns des uatres et ainsi osbtruent la lumière du canal (Pawin et al, 2004) (Fig. 4C).
- 3^{éme} étape: formation des lésions inflammatoires dans laquelle *Propionibacterium acnes* et
 l'immunité innée semblent jouer un rôle fondamental (Fig. 4D) (Kim, 2005).









Figure 4 : Les trois étapes de formation de l'acné.

Seules les 2 premières étapes sont obligatoires et aboutissent à la formation des lésions rétentionnelles (comédons ouverts et comédons fermés également appelés microkystes), considérées comme les lésions élémentaires de l'acné. L'étape inflammatoire qui aboutit à la transformation des lésions rétentionnelles en papules, pustules et nodules n'est pas obligatoire.

b) Première étape : l'hypersécrétion sébacée

Rôle des androgènes.

A la puberté, la sécrétion sébacée est stimulée par les androgènes. La testostérone est transformée dans le sébocyte par la 5caréductase en dihydrotestostérone (forme active des androgènes). Il est intéressant de noter que la glande sébacée a une sensibilité variable aux hormones suivant sa localisation et que l'activité de la 5caréductase varie suivant les zones cutanées.

 Rôle des récepteurs PPARs (Peroxisome Proliferator Activator Receptor) au niveau des sébocytes.

Les PPARs font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones (NRH). Ils requièrent une hétérodimérisation avec le récepteur aux rétinoïdes X (RXR) pour pouvoir se lier à l'ADN : les PPARs activent l'expression de gènes possédant un « PPAR responsive element » (PPRE) au niveau de leur promoteur. Les PPARs régulent l'expression de gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires : prolifération, différenciation, réponse immunitaire/inflammation. La famille des PPARs est composée de trois isotypes : α , β et γ (Kuenzli et Saurat, 2003). Les 3 formes de PPARs ont été identifiées sur les sébocytes, la forme γ étant la plus abondante. Les acides gras libres, l'acide linoléique et les androgènes activent ces récepteurs en se liant avec les récepteurs RXR des rétinoïdes ce qui induit des modifications de la prolifération et de la différenciation des sébocytes, la synthèse d'acide gras libres et la production d'interleukine 1α et de TNF- α , par la glande sébacée. Ils participent donc à la maturation de la glande sébacée (Zouboulis, 2005).

Rôle de la substance P.

A côté des récepteurs aux androgènes, la glande sébacée possède des récepteurs à la substance P qui est un neuromédiateur. *In vitro*, la substance P stimule la sécrétion sébacée. Elle est produite par les terminaisons nerveuses péri-sébacées qui sont plus riches en substance P chez les patients acnéiques que chez le sujet sain. La substance P entraîne l'expression d'une endopeptidase neutre dans le sébocyte et de l'E-selectine autour de la glande sébacée. L'hyperséborrhée et les poussées d'acné induite par le stress pourraient être expliquées par la production de substance P.

• Rôle de la composition du sébum.

Au cours de l'hyperseborrhée, la composition du sébum est modifiée. En effet, la concentration en acide linoléique est diminuée par dilution ce qui induirait une anomalie de la différenciation kératinocytaire de l'infra-infundibulum intervenant dans la formation du microcomédon. Par ailleurs, les acides gras libres dont la production par la glande sébacée a été montrée modifieraient également la différenciation kératinocytaire (Thiboutot, 2004).

c) Deuxième étape : la formation du microcomédon

L'obstruction du canal du follicule pilosébacé a lieu dans l'infra-infundibulum. Elle est due à des anomalies de la prolifération (hyperprolifération kératinocytaire), de l'adhésion et de la différenciation des kératinocytes qui ne se détachent pas les uns des autres et ainsi obstruent la lumière du canal : c'est la formation du microcomédon. Il s'agit de la lésion élémentaire de l'acné qui est le plus souvent invisible cliniquement. La glande sébacée continuant de produire du sébum qui ne peut plus être évacué, il s'ensuit une dilatation du follicule pilo-sébacé aboutissant à une lésion cliniquement visible : le comédon.

(1) Rôle des hormones kératinocytaires

Des anomalies du métabolisme des androgènes dans les kératinocytes de l'infra-infundibulum pourraient être à l'origine des anomalies de leur prolifération et de leur différenciation : des phénomènes hormonaux locaux accéléreraient la transformation du cholestérol en testostérone et participeraient donc à la formation du micro-comédon (Gingras et al, 2003) (Thiboutot, 2004).

(2) Rôle des cytokines

In vitro, l'Interleukine- 1α induit une hyperkératinization (Guy R et Kealy T, 1998), par ce biais l'II- 1α favoriserait la formation du comédon.

(3) Rôle des intégrines

Les intégrines font partie de la famille des molécules d'adhérence cellulaire et assurent la cohésion entre les kératinocytes. Il s'agit d'hétérodimères composés d'une chaîne alpha et d'une chaîne béta liées de façon non covalente. Les intégrines existent sous deux conformations : une conformation active où la molécule est dépliée et a une affinité plus grande pour son ligand, et une conformation inactive ou la molécule à une forme globulaire avec une faible affinité pour le ligand. Les ligands des intégrines sont : des composants de la matrice extracellulaire ou des molécules d'adhérence sur d'autres cellules. Les intégrines servent à la locomotion cellulaire, peuvent jouer le rôle de récepteur membranaire avec transduction du signal en association avec des protéines kinases et peuvent faire des jonctions avec liaison au cytosquelette via les filaments intermédiaires de kératine (hémidesmosome, adhésion cellulaire à la membrane basale) ou via l'actine (jonction focale, migration). Elles interviennent dans la régulation de la prolifération et la migration kératinocytaires (Van Der Flier et al, 2001). Ainsi, l'intégrine α3/β1 joue un rôle au niveau de l'adhésion des keratinocytes basaux à la membrane basale (contact

basaux) et au niveau de l'adhésion cellulaire. L'intégrine $\alpha 6/\beta 6$ joue un rôle dans l'ancrage à la membrane, dans le maintient du phénotype prolifératif des cellules basales et facilite la morphogénèse. L'intégrine $\alpha V/\beta 6$ est un récepteur de la fibronectine et de la tenascine, son expression est induite en culture et elle est fréquemment exprimée dans les tumeurs touchant les kératinocytes.

Des modifications de l'expression des intégrines pourraient jouer un rôle dans la formation du microcomédon. En effet une diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha 3$ qui joue un rôle dans l'assemblage de la membrane basale, s'accompagne d'une augmentation de la prolifération kératinocytaire tandis que la diminution de l'expression des intégrines $\alpha 2$ et $\alpha 5$ jouerait un rôle dans la modulation de la différenciation kératinocytaire (Jeremy et al, 2003). En particulier, il a été montré des modifications de l'expression des intégrines $\alpha 2$, $\alpha 3$, et $\alpha 5$ des kératinocytes de l'infra-infundibulum de follicules acnéiques (Pawin et al, 2004).

(4) Rôle de la filaggrine

La filaggrine est une protéine cationique de 37 kDa qui est synthétisée dans les cellules granulaires de l'épiderme sous la forme d'un précurseur hautement phosphorylé appelé profilaggrine (Dale, 1985). La profilaggrine est accumulée/stockée dans les granules de kératohyaline. Le gène humain de la profilaggrine code pour une protéine contenant 10-12 répétitions de filaggrine. Chaque motifs de filaggrine est composé de 317 acides aminés (aa) et est séparé des autres motifs par une séquence de 7 aa.. La profilaggrine possède un domaine Nterminal homologue à celui trouvé sur les protéines liant le calcium (calcium binding protein). La filaggrine interagit avec les filaments de cytokératine pour les agréger, ce qui facilite la formation de ponts disulfate intermoléculaires constituant la matrice intracellulaire fibreuse des cellules de la couche cornée. Lorsque les filaments sont agrégés, les résidus arginine (basique) de la filaggrine sont convertis en citrulline par une enzyme appelée PeptidylArginine Deiminase (PAD), ce qui conduit à une diminution de l'affinité de la molécule pour les cytokératines.

Finalement, la dégradation de la filaggrine en acides aminés libres (acides) dans la couche cornée participe à la formation du facteur naturel d'hydratation de cette dernière.

Il a été montré récemment que des mutations (entrainant une perte de fonction) du gène codant pour la filaggrine et qui sont portés par environ 10% des Europeens seraient responsable de l'ichthyose vulgaire et constitueraient un facteur de prédisoposition à la dermatite atopique (Irvine et McLean, 2006).

Une étude de l'expression de la filaggrine et de nombreuses cytokératines par des follicules pilo-sébacés obtenus à partir de peaux saines ou de peaux acnéiques a montré que l'expression des cytokératines étaient identiques sur peaux saines et sur peaux acnéiques tandis que l'expression de la filaggrine sur peaux acnéiques est modifiée (tableau ci-dessous) au niveau du follicule pilosébacé par comparaison aux follicules de peaux saines (Kurokawa et al, 1988).

		Peau normale	Peau acnéique
Cellules de la glande		-	-
sébacée			
Cellules du canal de	Cellules superficielles	+	++
la glande sébacée	Cellules intermédiaires	-	-/+
	Cellules basales	-	-
Cellules épithéliales	Cellules superficielles	++	+++
de l'infudibulum de	Cellules intermédiaires	-	-/++
la glande sébacée	Cellules basales	-	-

(5) Rôle des PPARs kératinocytaires

Les PPARs α et γ sont tous deux faiblement exprimés par les kératinocytes mais leur expression augmente avec la différenciation tandis que le PPAR β/δ est le sous-type dominant dans les kératinocytes humains et sert de marqueur de prolifération. Des anomalies de l'expression des PPARs kératinocytaires pourraient être associées à la formation du microcomédon (Mao-Qiang et al, 2004) (Takao et al, 2003).

Ainsi la formation du microcomédon, lésion initiale de l'acné pourrait être la résultante de plusieurs anomalies du kératinocyte infra-infundibulaire et de son environnement : production IL-1, expression

anormale des intégrines kératinocytaires, expression anormale des PPARs kératinocytaires, anomalies du métabolisme intra-kératinocytaires des androgènes et anomalies de la composition du sébum.

d) Troisième étape : la formation des lésions inflammatoires.

Des études histologiques ont montré qu'au tout début de la formation du comédon, des lymphocytes T sont présents autour du follicule pilo-sébacé (Zouboulis, 2001). Par la suite, *P.acnes* semble jouer un rôle central dans les phénomènes inflammatoires de l'acné. Les travaux les plus récents attirent l'attention sur le rôle majeur de l'immunité innée dans le développement des lésions inflammatoires de l'acné.

(1) Rôle des polynucléaires

Le chimiotactisme des polynucléaires ne dépend pas uniquement des acides gras libres, en effet, la théorie des acides gras libres paraît depuis longtemps insuffisante pour expliquer l'attraction des polynucléaires vers le follicule pilo-sébacé. Notamment, *P.acnes* produit de nombreuses substances qui diffusent dans le follicule pilo-sébacé, 15% d'entres elles ont un poids moléculaire inférieur à 3000 daltons et peuvent donc passer sans difficulté la paroi du comédon où elles auraient un pouvoir attracteur des polynucléaires autour du comédon.

(2) Rôle des cytokines

Généralités

De nombreuses cytokines interviennent dans le processus inflammatoire de l'acné. L'interleukine 1α joue un rôle central, sécrétée par les kératinocytes activés, elle favorise la formation du comédon et stimule l'immunité non spécifique. Le TNF- α , l'interleukine-6 et l'interleukine-8 également produits par les kératinocytes amplifient la réaction inflammatoire au niveau du follicule pilo-sébacé et le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles. *P. acnes* a également un rôle amplificateur de la

réaction inflammatoire in situ en sécrétant des facteurs interleukine 1α -like, interleukine-8-like et TNF- α -like. Des études récentes in vitro, ciblées sur l'infra-infundibulum, montrent le rôle essentiel joué par les cytokines dans le cycle des lésions d'acné : dans un premier temps l'interleukine- 1α favorise la formation du comédon, le TGF- α la rupture du comédon et l'IFN- γ et le TNF- α la diffusion de la réaction inflammatoire. Dans un second temps, ces mêmes cytokines inhibent la production de sébum par différenciation épithéliale des sébocytes, expliquant ainsi la régression spontanée de la lésion d'acné.

• Interleukine-8

L'interleukine-8 a une activité mitogène sur les kératinocytes et joue un rôle de chemoattractant vis a vis des neutrophiles qui en sécrétant des enzymes lysosomales participent à la rupture du follicule et a la réaction inflammatoire. L'hyperprolifération kératinocytaire au niveau du follicule pilo-sébacé est associée à une augmentation de la sécrétion d'IL-8, de plus l'IL-8 induit la prolifération des kératinocytes via son récepteur (IL-8 R) (Nagy et al, 2005).

(3) Rôle de l'immunité innée

(a) Les récepteurs Toll-like

Découverte / Historique

Les récepteurs Toll ont été caractérisés pour la première fois chez l'embryon de Drosophile où ils interviennent dans la mise en place de l'axe dorso-ventral. Lorsque la Drosophile est adulte, ces mêmes récepteurs sont impliqués dans les phénomènes de défense immunitaire. Les insectes ne possédant pas de défense immunitaire spécifique, leur système de défense repose donc sur un ensemble d'acteurs constituant la défense immunitaire innée :

- peptides microbiens (défensines) qui sont actifs contre une large variété de germes ;
- les récepteurs Toll qui reconnaissent des PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) qui sont des motifs conservés chez les organismes pathogènes (LPS, PG, mannanes, etc.).

Après la découverte du rôle de Toll chez la drosophile, plusieurs équipes ont recherché des molécules homologues chez les mammifères (Aderem et Ulevitch, 2000). A ce jour 11 Toll-like Receptors (TLRs) ont été identifiés chez l'Homme (TLR1 à TLR11) (Zhang et al, 2004).

Voies de signalisation

Les TLRs sont constitués d'un domaine transmembranaire riche en leucine et d'un domaine intracellulaire homologue à celui du récepteur de l'interleukine 1 (domaine TIR). L'activation d'un TLR induit une forte réaction inflammatoire, déclenche une réponse antimicrobienne et une production de cytokines via différentes voies d'activation (Figure 5). Différents TLRs mettent en jeu différents adaptateurs : TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 et TLR9 déclenchent la voie de signalisation MyD88 dépendante qui implique l'activation précoce du facteur de transcription NF-κB ce qui conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires. TLR3 et TLR4 déclenchent la voie de signalisation MyD88 indépendante qui active le facteur IRF-3 (interferon (IFN)-regulatory factor) et implique l'activation

tardive du facteur de transcription NF-κB. Les deux voies aboutissent à la production d'INFβ et à l'expression des gènes INF-dépendants (Figure 5) (Akira et Takeda, 2004).

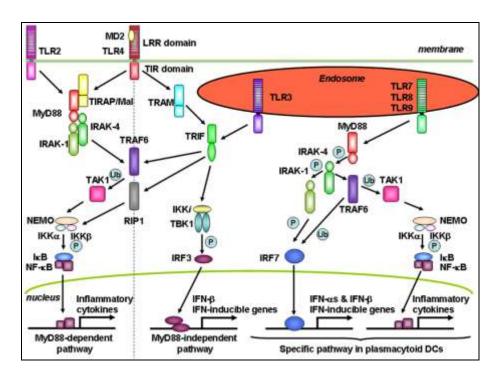


Figure 5 : Cascades de signalisation induites par l'activation des TLRs.

• Les TLRs reconnaissent un large panel de motifs pathogènes (PAMP) :

TLR2 est impliqué dans la détection d'une grande variété de composants bactériens (peptidoglycane, lipoprotéines, lipopeptides, zymosan), la reconnaissance de ces ligands fait probablement intervenir la formation d'hétérodimères: TLR2-TLR6 et TLR2-TLR1. TLR2 détecte également des membres de la famille *Herpesviridae* (Kurt-Jones et al, 2004). TLR2 est situé sur la membrane plasmique et est exprimés par les kératinocytes (Kawai et al, 2002) (Pivarcsi et al, 2003);

TLR4 reconnaît principalement le LPS qui est un composant de la membrane externe des bactéries GRAM positives et l'agent responsable du choc septique. La reconnaissance du LPS fait intervenir une molécule accessoire appelée MD2. TLR4 reconnaît également le respiratory syncytial virus (RSV)

(Haynes et al, 2001). TLR4 est situé sur la membrane plasmique et est exprimés par les kératinocytes (Pivarcsi et al, 2003).

TLR9 reconnaît des motifs spécifiques de nombreux génomes bactériens et viraux (ilôts CpG non méthylés). TLR9 est impliqué dans la détection des membres de la famille *Herpesviridae* (Krug et al, 2004) (Lund et al, 2003). TLR9 est intracellulaire (membrane des compartiments endosomal/vacuole/vésicule).

(b) Les défensines

Chez les mammifères, il existe deux catégories de peptides antimicrobiens : les cathélicidines et les défensines. Chez les vertébrés, les défensines sont divisées en trois sous-catégories : les α défensines, les β défensines et les θ défensines. Les α défensines et les β défensines sont le produit de 2 familles de gènes différents qui ont évolué à partir d'un gène ancestral β défensine. L'évolution des défensines s'est faite par duplication et diversification, ceci reflète probablement une réponse (d'évolution) du système immunitaire envers le changement permanent de l'écologie microbienne de l'habitat de l'hôte. Les θ défensines sont des paralogues des α défensines (dérivant d'une mutation du gène α défensine qui introduit un codon stop et donne un peptide tronqué) (Selsted et al, 2005).

• Structure des défensines

Les défensines sont des peptides courts de 18-45 acides aminés, elles possèdent 3 ponts disulfure, de charge cationique et ne présentent pas de modifications post-traductionelle de type glycosyl ou acyle. Leur structure tertiaire est de type turn-linked strands. Les défensines sont synthétisées sous forme de prépropeptides et leur clivage est site dépendant.

• Les β défensines humaines

A ce jour, il a été identifié 30 gènes de β défensines chez l'homme. HBD1 est le 1^{er} peptide antimicrobien isolé chez l'homme dans le plasma et dans l'urine (forme Nterminale tronquée). Par la suite, hBD2 et hBD3 ont été identifiés au niveau de squames de peaux psoriasique. Une 4^{ème} hBD a été identifiée à partir de l'ARNm mais le peptide hBD4 reste encore à isoler.

Les hBD sont largement exprimées au niveau des épithéliums et des leucocytes, leur expression est constitutive et/ou inductible selon leur site d'expression. L'expression de hBD1 semble être constitutive dans la majorité des tissus mais peut-être régulée positivement. L'activité antimicrobienne de hBD1 est caractérisée par une action bactéricide ou bactériostatique *in vitro*. Les ARNm de hBD2 et hBD3 sont exprimés dans différents tissus et la concentration de hBD2 et hBD3 augmente en cas d'inflammation bronchoalvéolaire ou de pathologie cutanée de type psoriasis (Sorensen et al, 2005).

Régulation de l'expression des défensines

L'expression des α défensines et des θ défensines est constitutive alors que l'expression des β défensines est inductible en réponse à la production de cytokines proinflammatoires TLRs dépendantes (Froy et al, 2005). L'ARNm de hBD1 est constitutivement exprimé dans de nombreux épithéliums mais l'expression des 4 hBD est inductible dans de nombreux tissus. Ainsi l'expression de hBD1 et de hBD2 est régulée positivement dans les monocytes exposés à des bactéries, du LPS, ou à de l'interféron- γ . Les défensines hBD1 à hBD4 sont exprimées par les kératinocytes et hBD2 à hBD4 sont induites en présence de TNF, IL1 β , INF- γ , phorbol myristate acetate (PMA), de bactéries et durant la différenciation induite par le calcium. Au niveau de la peau, hBD2 est stimulée par le LPS de manière NF- κ B-dépendante. La régulation de l'ARNm de hBD3 kératinocytaire est INF- γ dépendante.

L'activation des TLRs conduit à l'expression de β défensines dans de nombreux tissus.

• Defensines et acné.

Philpott (2003) a étudiés les profils d'expression de hBD1 et hBD2 au niveau de follicules pilo-sébacés acnéiques (comedons, papules, pustules) par comparaison aux follicules de peaux saines. La majorité des biopsies d'acné (pustules) montrent une régulation positive de hBD2 au niveau de l'épithélium lésionnel et périlésionnel celle-ci est moins importante avec hBD1.

Les profils d'expressions de HBD1 et hBD2 peuvent être schématisés de la manière suivante :

- HBD1\le peau saine\le pustule\le com\(\)edon\le papule
- HBD 2≤ peau saine< comédon< papule< pustule

(4) Les métalloprotéases (MMP9)

Des métalloprotéases, MMP9 en particulier, sont produites par les kératinocytes et les polynucléaires. Ce sont des collagénases qui participent à la rupture de la paroi du follicule pilo-sébacé et à la diffusion de l'inflammation vers la profondeur. De plus, elles pourraient jouer un rôle dans la genèse des cicatrices.

(5) Rôle des radicaux libres

Les polynucléaires de patients acnéiques ont une production de radicaux libres plus importante que ceux provenant des sujets sains. Ceci s'accompagne d'une augmentation de l'activité des enzymes anti-radicalaire (gluthation peroxydase et superoxyde dismutase). L'acide linoléique dont la concentration est diminuée dans le sébum du patient acnéique, inhibe la production de radicaux libres.

(6) Rôle du facteur de transcription NF-kB

La famille NF-kB chez les mammifères est constitués de 5 membres : p65(RelA), RelB, cRel, p50(NF-KB1) et p52(NF-KB2) (Li et al, 2004). Ces protéines sont classifiées en deux groupes :

 protéines exprimées sous forme de protéines matures et possédant un domaine d'activation de la transcription en Cterminal : p65(RelA), RelB, cRel; protéines exprimées sous forme d'un précurseur, ne possédant pas un domaine d'activation de la transcription, jouant le rôle de régulateur de la transcription des gènes cibles de NF-kB en maintenant p65(RelA), RelB, cRel dans le cytoplasme.

Le complexe NF-kB est constitué de deux sous-unités permettant de former des homo- ou hétérodimères. Le complexe le plus étudié et donc le mieux connu est composé des sous-unités p50 et p65 (RelA). A l'état inactif, NF-κB est séquestré dans le cytoplasme par une liaison avec des protéines inhibitrices IκB, IκB exerce son action inhibitrice en masquant le NLS (nuclear localisation signal) de NF-κB. La stimulation des cellules entraîne la phosphorylation de IκB, suivi de son ubiquination puis de sa dégradation par le protéasome. NF-κB ainsi libéré peut alors transloquer vers le noyau et activer la transcription de nombreux gènes cibles.

NF-κB est un facteur de transcription clef dans de nombreux mécanismes : immunité innée et adaptative, réaction inflammatoire, développement, prolifération et survie cellulaire. La voie NF-κB peut être activée par différents signaux extracellulaire (cytokines : IL-1 et TNFα, facteurs de croissance, stress, bactéries ou virus). Environ 150 stimulus sont susceptibles de moduler le système NF-κB et l'activation de NF-κB a pour conséquences l'activation de plus de 150 gènes. De plus NF-κB induit la production de protéines pouvant elles-mêmes activer NF-κB (ex : IL1 et TNF).

Il semble que des anomalies du facteur de transcription NF-cB soient associées à de nombreuses pathologies cutanées: psoriasis (anomalie de la prolifération kératinocytaire), incontinia pigmenti (réaction inflammatoire), coup de soleil, maladie de lyme, dermatite allergique de contact, maladies autoimmunes et carcinomes cutanés.

Certains travaux ont suggéré un rôle pour NF-kB (fonctionnel) dans le contrôle de l'inhibition de la prolifération durant la migration et la différenciation des kératinocytes.

C. Propionibactérium acnes (P.acnes)

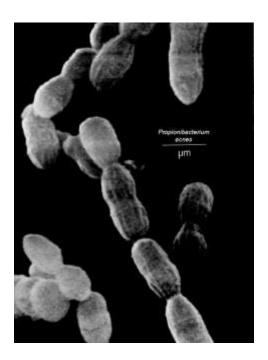


Figure 6: Propionibacterium acnes

1. Généralités sur P.acnes

P.acnes fait partie du genre des propionibacteries cutanées qui sont des bactéries GRAM positif, non motiles et pas strictement anaérobies. P.acnes est isolé à partir des zones cutanées riches en sébum (visage, tronc) et est concentré au niveau du follicule pilo-sébacé. La structure Gram+ de la paroi bactérienne des propionibacteria leur confère une grande stabilité structurale et ainsi une résistance au dessèchement, aux chocs osmotiques et aux stress mécaniques. En effet, la peau est relativement déficiente en eau disponible et est sujette aux variations de température, aux rayonnements solaires, aux concentrations en sels et en ions. P.acnes colonise préférentiellement le follicule pilo-sébacé où il cohabite avec Staphylococcus epidermis et Malassezia furfur.

En 2004 la souche KPA171202 (no.DSM 16379) de *P.acnes* a été séquencée, son génome est constitué d'un seul chromosome circulaire de 2 560 265 de paires de bases et de 2333 gènes potentiels (Bruggemann et al, 2004)

2. P.acnes et acné

Il n'existe pas de lien formel entre *P.acnes* et le développement de l'acné. Il est important de noter que *P.acnes* ainsi que d'autres micro-organismes (*Stapyilococcus epidermis* et *Malassezia fiurfiur*) qui pourraient être impliqués également dans la physiopathologie de l'acné peuvent être isolés à la fois sur peau acnéique et sur peau saine. Un argument en faveur du rôle de *P.acnes* dans l'acné est l'utilisation avec succès des antibiotiques dans le traitement de l'acné, dont l'efficacité est réduite en présence de souches *P.acnes* résistantes. En effet, l'utilisation massive des antibiotiques dans le traitement de l'acné à partir des années 1960 a eu pour conséquence l'apparition de souches antibio-résistantes.

En admettant que *P.acnes* soit impliqué dans l'étiologie de l'acné, les mécanismes par lesquels cette bactérie participe au phénomène inflammatoire demeurent mal connus.

Rôles possibles de P.acnes dans la physiopathologie de l'acné:

- rôle amplificateur de la réaction inflammatoire *in situ* en sécrétant des facteurs interleukine- 1α like, interleukine-8 like et TNF- α like (Graham et al, 2004);
- sécrétion de lipases qui scindent les triglycérides du sébum en glycérol et acides gras libres. Les acides gras libres et d'autres fragments de *P.acnes* diffusent à travers la paroi du comédon et induisent un afflux de polynucléaires neutrophiles par chimiotactisme. Les polynucléaires neutrophiles produisent dans le tissu périfolliculaire des enzymes, notamment des métalloprotéases, qui entraînent une rupture de la paroi du follicule pilo-sébacé avec diffusion en profondeur de l'inflammation (Schaller et al, 2005);
- Immunité innée (Nagy et al, 2005).

D. Elément trace : Zinc

La majorité du zinc cutané siège dans l'épiderme avec une concentration plus importante au niveau de la couche granuleuse (Michaelsson et al, 1980). Une prise orale de zinc augmente la teneur en zinc dans l'épiderme au bout de 72h (Dréno et al, 1980).

1. Généralités

Le zinc est un oligoélément indispensable à la vie de l'organisme humain, intervenant dans de nombreux métabolismes, dans le système immunitaire et les régulations hormonales, ainsi que comme stabilisateur de membrane. Le zinc est un élément trace c'est à dire qu'on ne le trouve qu'à l'état de traces dans l'organisme. De fait, l'organisme humain ne contient qu'environ 2g en tout dont 20% se trouve dans la peau et principalement sous la forme de métalloenzyme à zinc (Lansdwon, 1996). Il est présent dans toutes les cellules, notamment dans les glandes surrénales, la peau, certaines zones du cerveau, le pancréas, des membranes de l'œil, la prostate et le sperme. Il est nécessaire à une centaine de processus enzymatique vitaux au sein du corps humain (Berg et Shi, 1996). Il participe à la synthèse d'ADN, de l'ARN et des protéines, aux processus immunitaires et de guérison des blessures, à la reproduction, à la croissance, il joue un rôle au niveau de l'humeur et de l'apprentissage, ainsi que la vision, le goût et l'odorat; il intervient dans le processus de la coagulation sanguine, ainsi que dans le métabolisme de l'insuline. Les apports en zinc sont d'origine alimentaire et proviennent des protéines d'origine animale. Les besoins journaliers sont variables suivant l'âge et sont normalement couverts par l'alimentation.

2. Zinc et physiologie cutanée

Le zinc favorise la prolifération kératinocytaire et module la différenciation kératinocytaire. Un déficit sévère en zinc s'accompagne d'un aspect icthyosiforme et atrophique de la peau, avec à l'échelon histologique une image de parakératose, et à l'échelon électronique une diminution des grains de kératohyaline et des tonofilaments intra-kératinocytaires (Hanada et al, 1984).

Il intervient également au niveau du derme en stimulant la prolifération des fibroblastes et en augmentant la production de collagène et d'élastine, ceci notamment du fait de son activité enzymatique au niveau de la lysyl oxydases (Weissmann, 1978). Au niveau de la matrice extracellulaire, il a également une action co-enzymatique auprès de plusieurs métalloprotéases. Les sels de zinc présentent aussi une activité cicatrisante qui s'explique notamment par leur action sur la prolifération kératinocytaire, la modulation des cytokines et des intégrines kératinocytaires agissant à la fois par voie locale et systémique.

Son rôle dans l'apoptose kératinocytaire est aussi essentiel. Ainsi *in vitro* un traitement de cultures de kératinocytes par un chélateur du zinc, induit une fuite du zinc du noyau cellulaire suivi très rapidement d'un phénomène d'apoptose cellulaire. Cette action sur l'apoptose kératinocytaire passe notamment par

son rôle de cofacteur auprès de facteurs transcriptionnels intervenant dans l'apoptose cellulaire comme

p53. De plus le zinc étant un antagoniste du calcium, empêche l'activation de l'endonucléase spécifique

Principaux sites d'action :

Zinc et enzymes

de l'apoptose (Dréno, 1997).

Le zinc joue selon les cas soit un rôle co-enzymatique au niveau du site actif, soit un rôle dans le maintien de la structure quaternaire. Le zinc intervient de ce fait dans la synthèse protréique et la division cellulaire en modulant les ADN et ARN polymérases, la transcriptase reverse, l'ARN synthétase, la thymidine kinase et en inhibant la ribonucléase (Prasad, 1997). De plus, il stabilise les acides nucléiques et les organelles intracellulaires, les protégeant contre l'oxydation (Tal, 1968) (Tal, 1969). Le zinc intervient également dans le métabolisme glucidique et lipidique (acides gras essentiels, prostaglandines) (Horrobin et Cunnane, 1980). Ainsi une carence en zinc induit des troubles de la réplication et de la transcription de l'ADN, une diminution du taux des acides nucléiques avec retentissement sur la division cellulaire (Leccia, 1995).

• Zinc et membranes plasmiques

Le zinc est un stabilisateur de membrane (Prasad, 1979). Il agit en contrôlant la structure et la fonction de certaines enzymes membranaires, ainsi il inhibe l'ATPase membranaire et la phospholipase A2, en inhibant la libération d'histamine par compétition avec le calcium au niveau des sites des récepteurs des mastocytes, en stabilisant les composants lipoprotidiques de la membrane (Chapvil, 1973), en s'opposant à la peroxydation des lipides membranaires par l'intermédiaire de la superoxyde dismutase.

• Zinc et processus immunologiques

Le zinc apparaît comme un facteur de résistance aux maladies infectieuses par son action sur le thymus, les polynucléaires (Chapvil et al, 1977) et les lymphocytes T (Crea et al, 1990) (Moulder,1989). Il apparaît également « in vitro » qu'un excès de zinc puisse avoir des effets inhibiteurs sur les défenses immunitaires démontrant donc l'existence d'une dose optimale d'efficacité. Le zinc a également une activité anti-inflammatoire spécifique qui s'exerce au niveau de la peau : les mécanismes de cette activité ne sont que partiellement connus et comprennent notamment les actions suivantes :

- Une action inhibitrice sur le chimiotactisme du polynucléaire démontré in vitro et in vivo chez des patients acnéiques traités par sels de zinc à la dose de deux gélules par jour pendant deux mois (Chapvil et al, 1977),
- Une action inhibitrice de l'expression de certaines intégrines kératinocytaires exprimées par l'épiderme de lésions inflammatoires cutanées à savoir ICAM-1 et LFA-3 (Gueniche et al, 1995).
- O Une action modulatrice sur la production de cytokines épidermiques pro-inflammatoires notamment TNF- α et IL-6 (Sainte marie et al, 1998).
- Une action inductrice de l'expression de la superoxyde dismutase intrakératinocytaire,
 enzyme intervenant dans l'élimination des radicaux libres (Coudray et al, 1993).
- Une action stimulatrice sur les cellules NK et l'activité de phagocytose des macrophages. C'est de plus un cofacteur de la thymuline, hormone intervenant dans la maturation des lymphocytes T.

 Une action stimulatrice sur la production de l'insuline growth factor (IGF), facteur de croissance qui favorise la prolifération kératinocytaire au niveau de l'épiderme.

• Zinc et hormones

Le zinc module l'action de nombreuses hormones: insuline, androgène, ACTH, gustine, glucocorticoïdes et œstrogène. Le zinc présente une activité « anti-androgène » en modulant l'expression de la 5créductase qui intervient directement dans la transformation de la testostérone en dihydrotestostérone (Sugimoto et al, 1995).

3. Zinc et Acné

Les indications thérapeutiques du zinc en pratique dermatologique sont essentiellement l'acné de type inflammatoire (minime à modérée) (Dréno et al, 1989) (Dréno et al, 2001) et l'acrodermatite entéropathique, deux affections où les mécanismes inflammatoires au niveau de la peau sont importants. Dans la littérature, les posologies habituelles pour l'acné sont comprises entre 30 et 60 mg de zinc métal. Aux doses habituelles utilisées, les effets secondaires sont mineurs et concernent principalement le système digestif, à savoir nausées, vomissements et douleurs épigastriques, ceux-ci sont souvent transitoires et nécessitent rarement l'arrêt du traitement.

E. Modèles cutanés

1. Kératinocytes normaux humains en monocouche

La culture de kératinocytes normaux humain en monocouche nous permet de déterminer quels effets de *P.acnes* peuvent être attribué à une action directe sur les kératinocytes.

Ce modèle présente les limitations suivantes :

- La totalité de la culture est constituée de kératinocytes au même stade de différenciation, ici il s'agit de kératinocytes peu différenciés (concentration en calcium du milieu de culture faible : 0.09mM)
- Certains effets de *P.acnes* sur les kératinocytes peuvent être ignorés s'ils nécessitent la présence d'autres types cellulaires (fibroblaste, monocytes...) ou bien une différenciation plus avancée du kératinocyte.

2. Explants cutanés

Les explants cutanés sont obtenus à partir de plasties abdominales et comprennent le derme et l'épiderme. Ce modèle «ex vivo » présente comme intérêt que les kératinocytes sont dans leur contexte physiologique et les interactions avec le derme et les autres types cellulaires sont conservés.

Objectifs

Afin d'étudier les mécanismes de l'inflammation cutanée, nous disposons d'un modèle qui consiste à incuber des monocouches de kératinocytes humains normaux avec des extraits de *P.acnes*. Ces extraits bactériens (SA: surnageant A, SB: surnageant B et FM: fraction membranaire), obtenus après une série de centrifugations et de cassures mécaniques de la paroi bactérienne, nous sont fournis par les laboratoires Pierre Fabre (Toulouse, France). Grâce à ce premier modèle, il a été mis en évidence au laboratoire que l'expression des TLRs 2 et 4 ainsi que l'expression de MMP9 est augmentée en présence de *P.acnes*. De plus une hyperprolifération kératinocytaire à été observée en présence de l'extrait FM de *P.acnes* (Jugeau et al, 2005, en Annexe). Ainsi *P.acnes* jouerait un rôle important au cours de la phase inflammatoire de l'acné mais également dès la phase de formation du microcomédon.

L'objectif principal de ce travail a donc été d'approfondir l'étude du rôle de *P.acnes* dans l'immunité innée et dans la différenciation kératinocytaire.

Nous avons dans un premier temps mis au point un nouveau modèle d'inflammation cutané en incubant les extraits de *P.acnes* avec des explants de peaux humaines, puis nous avons étudié l'action de *P.acnes* sur la différenciation kératinocytaire : en effet des anomalies de la différenciation sont observées lors de la formation du microcomédon qui correspond à une étape clef de la genèse de l'acné. L'expression de la filaggrine et des intégrines $\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha V \beta 6$ a été étudiée en utilisant les deux modèles d'interaction entre *P.acnes* et les kératinocytes dont nous disposons.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux effets anti-inflammatoires du zinc afin de déterminer si celui-ci joue un rôle dans la modulation de l'immunité innée. En particulier, nous avons étudié les effets du zinc sur l'expression de TLR2, de l'interleukine-8 et du facteur de transcription NF-kB en utilisant les deux modèles d'interactions entre *P.acnes* et les kératinocytes dont nous disposons.

Parallèlement nous avons étudié l'expression des TLRs 2, 4 et 9 dans les lymphomes cutanés T épidermotropes (LCTE) qui sont caractérisés par la présence d'un infiltrat important de lymphocytes T CD4+ matures (composé de lymphocytes T réactionnels et tumoraux) dans la peau. L'étiologie de cette pathologie est encore inconnue, mais l'implication d'un agent infectieux est fortement suspectée (EBV/HSV/HTLV I). Les Toll-like Receptors 2, 4 et 9 sont exprimés par les kératinocytes et sont activés lors d'une infection virale. L'objectif de ce travail était d'étudier une nouvelle voie d'activation lymphocytaire T dans les LCTE, notamment en recherchant l'expression des TLR2, 4 et 9 par les kératinocytes au sein de lésions cutanées de LCTE à différents stades de la maladie: parapsoriasis en grandes plaques, mycosis fongoïde (stade I et II) et syndrome de Sézary (stade III).

Résultats

A. Rôle de *P.acn*es dans l'immunité innée et la différenciation kératinocytaire

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier le rôle de *Propionibacterium acnes* dans l'immunité innée et la différenciation kératinocytaire.

1. Etude des effets de *P.acnes* sur la différenciation kératinocytaire

Dans le but d'étudier les effets de *P.acnes* sur la différenciation kératinocytaire, nous avons mis au point un nouveau modèle d'inflammation cutané en incubant les extraits de *P.acnes* (FM: fraction membranaire, contenant le peptidoglycane et l'acide lipotéique, diluée au 1/2, SA: surnageant A, contenant les protéines cytosoliques, et SB: surnageant B, riche en protéines membranaires, dilué au 1/5) avec des explants de peaux humaines.

a) *P.acnes* induit des modifications de la différenciation des kératinocytes

L'acné est une maladie chronique du follicule pilosébacé évoluant par poussée jusqu'à une extinction spontanée. L'objectif de notre travail était de déterminer si P.acnes est impliqué dans les anomalies de la différenciation kératinocytaire qui correspondent à une étape clef de la genèse de l'acné. L'expression de la filaggrine et des intégrines $\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha \nu \beta 6$ a été étudiée en utilisant les deux modèles d'interactions entre P.acnes et les kératinocytes dont nous disposons : les kératinocytes normaux humains en monocouche et les explants cutanés.

Dans le cadre de l'acné, les modifications de l'expression des intégrines sont associées à une surexpression des intégrines. Nous avons choisi de suivre les modifications des intégrines β 1, α 3 et α 6 comme marqueurs d'anomalies de la différenciation des kératinocytes. L'expression de l'intégrine

 $\alpha V\beta 6$ est induite lorsque l'épiderme est endommagé (ex : processus de cicatrisation) nous l'avons donc choisi comme marqueur de « souffrance » des kératinocytes. La présence de la filaggrine (filament aggregating protein) est un marqueur de la phase terminale du processus de kératinisation et de différenciation épidermique.

Nous avons montré que P.acnes induit l'expression de l'intégrine $\beta 1$ par les kératinocytes à la fois sur monocouche et sur explants. L'effet inducteur maximal à été observé avec la fraction SB de P.acnes. Concernant les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\alpha V \beta 6$, leur expression par les kératinocytes en monocouche incubés avec les extraits de P.acnes n'est pas modifiée par rapport au milieu contrôle tandis que l'expression de ces intégrines dans les explants est augmentée en présence des extraits de P.acnes. En particulier, le meilleur effet inducteur est observé avec la fraction FM pour l'intégrine $\alpha 3$ et avec la fraction SB pour les intégrines $\alpha 6$ et $\alpha V \beta 6$.

Nous avons mis en évidence que les extraits de *P.acnes* n'ont aucun effet sur l'expression de la filaggrine par les kératinocytes cultivés en monocouche. Remarquablement, les extraits de *P.acnes* induisent une expression de la filaggrine par les kératinocytes des couches intermédiaires et basales de l'épiderme sur les coupes d'explants de plasties abdominales. Son expression sur peau normale en l'absence de traitement est localisée au niveau de la couche cornée. Sur coupes de biopsies d'acné, nous avons vérifié que la filaggrine était exprimée par les couches suprabasales de l'épiderme. Ces marquages ont été réalisés à l'aide d'un anticorps commercial pouvant interagir également avec le précurseur de la filaggrine : la profilaggrine de masse moléculaire beaucoup plus importante.

Afin d'approfondir notre étude sur l'expression de la filaggrine/profilaggrine induite par les extraits de *P.acnes*, nous avons réalisé des Western-blots à l'aide de deux anticorps non commerciaux fournis gracieusement par Simon M., Toulouse (Simon et al, 1995). L'anticorps AHF2 (anti-human filaggrin 2) interagit à la fois avec la filaggrine (MM: 38 kDa) et la profilaggrine (MM: 400 kDa) tandis que

l'anticorps AHF7 (anti-human filaggrin 7) reconnaît spécifiquement la filaggrine. Ainsi nous avons montré que la quantité totale de filaggrine est augmentée dans les explants incubés pendant 3h ou 24h avec les extraits de *P.acnes* par comparaison avec le milieu contrôle.

Nos résultats suggèrent donc que P.acnes joue un rôle important dans les anomalies de la différenciation kératinocytaire puisque cette bactérie induit à la fois la différenciation des kératinocytes des couches intermédiaires et de la couche basale de l'épiderme avec expression de la filaggrine et des modifications de l'expression des intégrines $\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\alpha \nu \beta 6$. De plus, il apparaît que l'effet inducteur de P.acnes sur les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\alpha \nu 6$ et sur la filaggrine ne peut se manifester que dans un modèle de peau reproduisant la peau normale (explants).

b) Article 1 : *Propionibacterium acnes* modulates keratinocytes differenciation

Manuscrit soumis à Experimental Dermatology

Authors: V Jarrousse*, N Castex-Rizzi ¶ , A Khammari $^{\xi_*}$, M. Charveron ¶ and B Dreno $^{\xi_*}$ MD, PhD

 (\boxtimes)

* INSERM U601, 9 quai Moncousu 44093 Nantes cedex 01, France

^ξ Clinique dermatologique, CHU Hotel-Dieu, 1 place A.Ricordeau, 44000 Nantes, France

¶ Institut de Recherche Pierre Fabre, Laboratoire de Biologie Cellulaire Cutanée, Toulouse, France.

(🖂) Corresponding author: Brigitte Dreno, department of Dermatology, CHU HOTEL DIEU, Place

Alexis Ricordeau, 44035 NANTES Cedex 01, FRANCE

Phone:0033240083118

Fax: 00 33 240083117

e-mail: brigitte.dreno@wanadoo.fr

First author: V Jarrousse

Keywords: filaggrin, integrins, Propionibacterium acnes, acne.

Modulation of integrins and filaggrin expression by Propionibacterium acnes extracts on keratinocytes.

Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dréno B.

INSERM U601, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 01, France.

Propionibacterium acnes plays an important role in the pathogenesis of acne and it is established that this bacteria is involved in the induction and maintenance of the inflammatory phase of acne. The aim of our work was to determine if P. acnes extracts could modulate integrins and filaggrin in vitro expression by keratinocytes. Integrins and filaggrin expression was examined using immunohistochemistry technique both on Normal Human Epiderminal Keratinocytes (NHEK) and on deep-frozen sections of normal human skin explants incubated with three different P. acnes extracts. In addition, the expression of filaggrin was investigated on biopsies of acne lesions and by western-blot associated with its precursor profilaggrin. We demonstrated that P. acnes extracts induced beta1 integrin expression significantly on both proliferating keratinocytes and differentiated keratinocytes. In addition, P. acnes induced alpha3, alpha6s and alphaVbeta6 integrin expression and filaggrin expression on differentiated keratinocytes. Finally P. acnes extracts increased filaggrin expression by suprabasal layer of epidermis of explants. Western-blot confirmed that total amount of filaggrin was increased. These results indicate that P. acnes extracts are directly able to modulate the differentiation of keratinocytes suggesting that this bacteria play a role not only in the development of inflammatory acne lesions but also in the formation of the microcomedo.

Summary

Propionibacterium acnes plays an important role in the pathogenesis of acne vulgaris and it is now well established that this bacteria is involved in the induction and maintenance of the inflammatory phase of acne. However, still few studies focused on P.acnes and keratinocytes interactions. The aim of our work was to determine whether P. acnes could modulate the differentiation of keratinocytes, thus playing a role in the formation of comedo. The expression of $\beta 1, \alpha 3, \alpha 6, \alpha V/\beta 6$ integrins and filaggrin was examined using immunohistochemistry technique both on Normal Human Epiderminal Keratinocytes (NHEK) and on deep-frozen sections of normal human skin explants incubated with three different P.acnes extracts (membrane fraction (FM), supernatant A (SA) and B (SB)). In addition, the expression of filaggrin was investigated on biopsies of acne lesions and by Western-blot associated with its precursor profilaggrin. We have shown that *P.acnes* extracts induced β1 integrins expression significantly on NHEK and on cutaneous explants. $\alpha 3$ and $\alpha 6$ integrins (by all extracts) and $\alpha V\beta 6$ integrins (by SA and SB) were induced only on the keratinocytes of cutaneous explants (basal layer). P.acnes extracts induced filaggrin expression by suprabasal layer (granular and spinous) and basal layer of epidermis of explants skin models (the strongest effect was observed with SA and SB extracts). No modulation was noted for both integrins (excepts \$1 integrin) and filaggrin with NHEK where keratinocytes were not differentiated. Western blot confirmed that total amount of filaggrin was increased in cutaneous explants incubated with P.acnes extracts. In conclusion our results demonstrate for the first time that P.acnes acts directly on keratinocyte differentiation inducing the expression of integrin and filaggrin. These results indicate that *P.acnes* can play a role in the development of acne as soon as the formation of the microcomedo.

Introduction

Acne is a skin disorder of the pilosebaceous unit resulting from multiple factors. Microcomedo is considered as the early step of the formation of acne lesions before closed or opened comedones and inflammatory lesions. The mechanisms inducing the formation of comedones are still partially known, but they are believed to involve hyperkeratinization of the follicle secondary to both hyperproliferation of keratinocytes and abnormalities of their differentiation and decreasing desquamation. The cytokine interleukin- 1α (Il- 1α) has also been implicated in this process because it has been shown to induce hyperkeratinization *in vitro* [1].

Bacterial hypercolonization of the sebaceous follicle, especially P.acnes, has been considered as a major causative factor for acne vulgaris. The precise role that P.acnes plays in the pathogenesis of acne remain unclear but it is widely accepted that inflammation in acne may be mainly mediated by different factors secreted by P.acnes, such as lipase which induce the liberation of free fatty acids from sebum that are pro inflammatory [2]. Recent studies have also shown that P.acnes triggers anti-microbial peptide and cytokine secretion of keratinocytes in vitro [3,4]. P.acnes, itself is able to produce cytokines-like such as TNF- α , IL-1 α and IL-8 [5]. The genome sequence of P.acnes encodes many factors that may have immunomodulatory potential [6]. P.acnes is also able to induce the proliferation of keratinocytes *in vitro*. Confirmed both by MTT viability test and Ki67 immunolabelling[3] [7].

Integrins play a role in the modulation of both differentiation and proliferation of keratinocytes in epidermis [8] [9]. Integrins are heterodimeric transmembrane receptors consisting of one α and one β subunit. The β 1 integrins are found in focal adhesions, but also, as in vivo, concentrate in an "O" ring at the peripheral membrane in contact with the culture substrate [10]. α 3 β 1 and α 6 β 4 (laminin receptor) expression is constitutive whereas α V β 6 (receptor for fibronectin and tenascin) is induced in NHEK culture, on wounding and pathological conditions. The conclusion from analysis of mice lacking β 1 or α 6 β 4 integrins is that β 1 integrins are indeed important for normal epidermal proliferation, whereas the role of α 6 β 4 is primarily one of anchorage. Thus abnormal keratinocytes differentiation induce

alterations of the expression of β 1, α 3, α 6 integrins sub-units. α V β 6 was used as keratinocytes suffering marker. Interestingly, on biopsies of acne lesions, it has been demonstrated that the alteration of keratinocytes differentiation is associated with abnormal integrins expression [11].

In addition, filaggrin is a distinct marker of the terminal phase of the epidermal keratinization process. Human filaggrin (37000 apparent molecular weight), is synthesized in the granular cells of the epidermis as a large, highly phosphorylated precursor, profilaggrin, which accumulates in the keratohyalin granules [12]. A number of keratinization disorders are associated with dysregulation in the formation of keratohyalin granules and in the processing of profilaggrin [13]. Kurukawa et al, [14] have shown that seborrhoeic and acne skin revealed considerable amounts of filaggrin in the intermediate layers of the sebaceous duct and the infundibulum indicating a premature terminal keratinization process in these areas. Furthermore they observed by electron microscopic studies an increased number of keratohyaline granules in acne skin.

Using these different markers of proliferation and differentiation of keratinocytes, the aim of this work was to determinate if *P.acnes* is able directly to modulate the differentiation of keratinocytes and thus to be implicated in the formation of acne lesions as soon as the microcomedo stage.

Material and methods

Material

Bacterial extracts

Three extracts of P. acnes IP53113T (Pierre Fabre, Toulouse, France) were made available to us. The strain was first described in 1968. The membrane fraction (FM) contained peptidoglycan and lipoteichoic acid. Supernatant A (SA) contained cytosolic proteins and supernatant B (SB) was rich in membrane proteins. The membrane fractions of the bacteria were resuspended in KBM without HC (Keratinocyte basal medium without hydrocortisone) (Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 5 μ g/ml insulin, 0.09 mM calcium, 50 μ g/ml gentamycin and 50 η g/ml amphotericin-B.

• Skin explants and Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) culture

Two methods of culture were used: cutaneous explants obtained from surgical samples of healthy abdominal skin and which is an in vitro model closed to in *vivo* situation and Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) obtained from foreskins of healthy donors.

• In vivo study: skin biopsies

Five cutaneous biopsies of inflammatory acne and five biopsies of five healthy skin to serve as control were used in this study.

51

Methods

Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK)

Keratinocyte cultures.

The hypodermis and deep dermis of the skin biopsies were removed and the samples cut into pieces of 1 mm² and incubated overnight at 4°C in trypsin 2X (Sigma, St Quentin Fallavier, France). The following day, the epidermis and dermis were separated with thin forceps. The action of trypsin on the pieces of epidermis was inhibited by the addition of dulbecco's modified eagle's medium (Biowhittaker, Emerainville, france) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen). The detached keratinocytes were centrifuged at 1500r.p.m. for 7 min. The cell pellet was then taken up in keratinocyte serum free medium (Invitrogen) supplemented with 5ng/ml EGF, 25µg/ml BPE, 2,5µg/ml fungizone (Bristol-Myers Squibb, Paris, France) and 1% Penicilin/Streptomycin. Then cells were seeded into 25 cm² flasks, at a density of 4.10⁴ cells/cm². They were cultured at 37°C in a humid environment under 5% CO2. The culture medium was removed every 2 or 3 days. At confluence, keratinocytes were detached by incubation with EDTA for 7 min, then with trypsin (Biowittaker) for 2min. During successive passages, keratinocytes were seeded at a density of 1,5.10⁴ cells.cm² in 75 cm² flasks. Cells were used after a limited number (n=2) of subcultures.

Keratinocyte smears

Keratinocytes from three separate donors were seeded at $1x10^4$ cells per well in Lab-Teks Permanox eight-well plates (Dutcher, Brumath, France) in KBM with HC. The medium was replaced by KBM without HC 24h before the beginning of the experiment. This experimentation was performed using 3 healthy donors samples. The different *P.acnes* extracts (FM 1/2, SA 1/5 and SB 1/5) as previously describe [7] were deposited on keratinocytes for 3, 6 or 24h.

Skin explants.

Punchs (4 mm diameter) from abdominal skin samples, considered as an healthy skin model, were incubated at 37°C in a moist atmosphere in the presence of 5% CO2 for 3, 6 and 24h in Keratinocyte basal medium without hydrocortisone (KGM-HC) (Promocell, Heidelberg, Germany). After incubation, explants were removed from the culture medium and frozen at-80°C. Sections (5μm thick) where then cut with a cryostat, fixed in acetone at 4°C for 10 min and frozen at –20°C.

Labeling of biopsies or smears

Sections of deep-frozen biopsies were fixed in acetone for 10 min. The non-specific sites were saturated for 30mm with TBS (Tris-Buffered Saline) 0.05% Tween20 w/v (Sigma), 0.1% BSA w/v (Bovine Serum Albumin) (Sigma). The primary antibody: anti-human filaggrin, (Harbor Bio-products, Norwood, USA), dilute at 1/500° or anti-human integrin $\alpha 3$ [CD49c] (Chemicon, Temecula, USA) at the concentration $2\mu g/ml$ or anti-human integrin $\alpha V\beta 6$ (Chemicon, Temecula, USA) at the concentration $10\mu g/ml$ or anti-human integrin $\alpha V\beta 6$ (Chemicon, Temecula, USA) at the concentration $10\mu g/ml$ and anti-human integrin $\beta 1$ [CD29] (Serotec, Oxford, UK) at the concentration $2\mu g/ml$ was deposited upon the slides for 30 min in a humid environment at room temperature. Rinses of 10mn were made between each stage using TBS, 0.1% BSA, 0.05% Tween20. The slides were incubated successively with a secondary biotinylated antibody (DAKO ChemTek detection kit peroxidase/AEC, Rabbit/Mouse) (30mn) and streptavidin coupled with peroxidase (30mn). The reaction was stopped with distilled water (10min) and counter-staining was done with Mayer haemalun (VWR International) for about 1 min. The slides were rinsed with distilled water, and mounted in an aqueous medium. The control section included omission of the primary antibody. Two different examiners viewed the slides. Labeling intensity was scored on a four-point scale: null labelling (0), weak labelling (1), moderate

labelling (2) and strong labelling (3).

Western immunoblotting

Explants cultured in control medium or with *P.acnes* explants for 3h were lysed using Sample griding Kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Samples extracts mixed with an equal volume of 2X Laemmli Sample Buffer (Biorad-Rad, Marnes la Coquette, France) containing 50 mM 2β-mercaptoethanol were boiled for 5 min. Equal amount of protein from each explants lysate were electrophoresed on 8% SDS-polyacrylamide gel and electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked overnight using blocking reagent (BM chemiluminescence kit, Roche Diagnostic GmbH, Indianapolis, IN) and then incubated for 1h with anti-human filaggrin primary antibody: AHF2 or AHF7 (kindly provided by M.Simon, Toulouse [13]) diluted at 1/2500°. After four washes in TBS containing 0,05% Tween 20, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary mix anti-mouse/anti-rabbit antibody dilute at 1/5000° (BM chemiluminescence kit). Blots were developed using a classic chemiluminescence detection system (BM chemiluminescence kit)

Statistical analysis

Results were expressed as the mean +/- standard deviation (SD) of n replicates of keratinocytes or explants isolated from n different donors. Data were compared to controls, consisting of keratinocytes or explants treated in the same manner as the test samples but without *P.acnes* extracts. The statistical significance of the data determine by Student T test. A p<0,05 was taken significant.

Results

Integrin expression by NHEK incubated 3h with P.acnes extracts.

The expression of $\beta 1$ integrins was moderate (2,25+/-0,5) in control and increased in presence of *P.acnes* extracts. This increased expression was significant (p=0,02) only for SB (3+/-0) extract (Fig. 1).

The expression of $\alpha 3$ integrin was moderate in control (2,25+/-0,95) and unchanged in presence of *P.acnes* extracts.

The expression of α 6 integrins was weak in presence of medium control (1,25+/-0,5) and slightly but not significantly increased by FM (1,25+/-0,5), SA and SB *P.acnes* extracts (1,5+/-0,57) (p= not significant (NS)).

The expression of $\alpha V\beta 6$ integrins was very weak (0,125+/-0,25) and not modified in presence of *P.acnes* extracts.

Integrins expression on cutaneous explants incubated 3h with P.acnes extracts.

We observed that the expression of $\beta1$ integrins was moderate (2+/-0) in control medium and not significantly increased with SB extract (2+/-1), FM (2,5+/-0,5) and SA (2,33+/-0,57) extracts (p=NS) (Fig. 2).

The expression of $\alpha 3$ integrins was moderate (2+/-0) in control and slightly but not significantly increased in presence of *P.acnes* extracts. The most important induction was noted with FM (2,66+/-0,5) (p=NS).

The expression of α 6 integrins was moderate in control (2,33+/-1,15) and increased not significantly in presence of *P.acnes* extracts, the best effect was observed with SB (3+/-0) (p=NS).

The expression of $\alpha V\beta 6$ integrins was null in control and in presence of FM extract. $\alpha V\beta 6$ integrins expression was mainly increased with SB (1+/-1,17) but not significantly (p=NS).

Filaggrin expression by NHEK incubated 3h with P.acnes extracts.

We observed that filaggrin expression on NHEK was unmodified in presence of *P.acnes* extracts compared to control (Fig. 3).

Filaggrin expression on cutaneous explants incubated 3h with *P.acnes* extracts.

Immunohistochemistry using commercial anti-filaggrin (Fig.4)

We observed that filaggrin in normal skin was localized on stratum corneum (Fig. 4A) whereas on acne lesion this expression was extended to lower part (Fig. 4B).

We noted that the three types of *P.acnes* extracts induced a filaggrin expression by suprabasal layer (granular and spinous) and by basal layer on explants skin models (the strongest effect was observed with SA and SB extracts) (Fig 4 C, D and E).

Western-blot using non-commercial anti-filaggrin AHF2 and AHF7 (Fig. 5)

We demonstrated by western-blot that total amount of filaggrin was increased in protein extracts of cutaneous explants incubated during 3h or 24h with P.acnes compared to control.

Discussion

We show for the first time that *P.acnes* extracts induce a significant increase expression of $\beta 1$ integrins by proliferating keratinocytes (NHEK). Moreover, this induction of β1 expression is more important with SB which is rich in membrane proteins indicating that direct contact between bacteria and keratinocyte is important. On differentiated keratinocytes (explants), the expression of the different integrins (β 1, α 3, α 6 and α V β 6) is also induced but not at a significant level. This induction of expression is obtained with the 3 types of extracts of P. acnes except for αVβ6 (only with SA and SB extracts). No data were found in literature about β1expression and acne. Our study was focalized on interaction between keratinocytes and P.acnes and are in agreement with Holland et al, (1998) [11] study which was focalized on follicle in acne patients. They observed in vivo an aberrant $\alpha 3$ integrin expression around comedones and uninvolved pilosebaceous follicles from acne patients and suggested that these might play a role in the proliferative and differenciation changes seen in early acne lesion development. Complementary role for $\alpha 3\beta 1$ and α6β4 in mediating keratinocyte adhesion and motility have been proposed, with α3β1 being required at the leading edge of the cell and $\alpha6\beta4$ stabilizing attachement distally [15]. While suprabasal $\beta1$ expression may stimulate inflammation through IL-1 α release [16], α 6 β 4 can contribute to skin inflammation via its interaction with TGF-β.

In a second part of our work, we show that *P.acnes* extracts induce filaggrin expression by keratinocytes of suprabasal (granular and spinous) and basal layers on explants skin model whereas no modification of filaggrin expression was observed in NHEK model where keratinocytes were not differentiated. By western-blot we confirmed that total amount of filaggrin was increased in explants incubated with *P.acnes* extracts compared with control. Our results on cutaneous explants do not allow us to definite if the target of *P acnes* is

Filaggrin alone or both profilaggrin and fillagrin. By western-blot we show that only filaggrin is increased in presence of *P. acnes* extracts whereas profilaggrin was totally processed in filaggrin. Thus, we demonstrate that *P.acnes* modulate the terminal phase of differentiation of keratinocytes. Interestingly, this effect was observed with the three extracts of *P.acnes*. FM extract contained peptidoglycan and lipoteichoic acid, SA extract contained cytolosolic proteins and SB was rich in membrane proteins, thus *P.acnes* act on kératinocytes differentiation both via its proteins localized on membrane and its cytoplasmic components excreted.

These results focalized on keratinocytes are in agreement with those obtain by Kurokawa et al, (1988) on pilosebaceous in acne patients. They investigated *in vivo* the distribution of cytokeratins and filaggrin in human pilosebaceous unit in specimens obtained from normal, seborrhoeic, and acne skin [14]. They show that seborrhoeic and acne lesions revealed considerable amounts of filaggrin in the intermediate layers of the sebaceous duct and the infundibulum indicating a premature terminal keratinization process in these areas. Furthermore they observed by electron microscopic studies an increased number of keratohyaline granules in acne skin.

In this study we finally demonstrate that *P.acnes* is able to modify the differentiation of epidermis mainly by increasing the expression of $\beta 1$ integrin and Filaggrin and at a minor level $\alpha 3$, $\alpha 6$ and $\alpha V \beta 6$. Interestingly in a recent paper, we describe that FM extract of *P.acnes* increase the proliferation of keratinocytes confirmed both by MTT viability test and by Ki67 immunolabelling[7]. Hyperproliferation [17] [11] and abnormal differentiation of keratinocytes are to mechanisms which are known to be implicated in microcomedo formation. Furthermore it appears that keratinocytes have to be engaged in a differentiating

process for interacting with P.acnes. Proliferation of P.acnes is strikingly elevated in microcomedomes with 10^5 - 10^6 organisms recovered from individual preclinical lesions [18]. In conclusion our results demonstrate that P.acnes is implicated in acne lesion as soon as the step of formation of the microcomedo. P.acnes appears to be a key component in acne physiopathology, suggesting that this bacteria is an important target for the different treatment of acne.

Acknowledgements

Financial support and *P.acnes* extracts were provided by Laboratoire Pierre Fabre (Toulouse, France). No conflicts of interest exist. We thank surgeons from the plastic surgery Department of Nantes Hospital for abdominal skin samples and the pediatric surgery Department of Nantes Hospital for foreskin samples. The authors thank Simon M. (Toulouse) for antibodies AHF2 and AHF7 gift.

References

- 1. Guy R, Kealey T: The effects of inflammatory cytokines on the isolated human sebaceous infundibulum. J Invest Dermatol 1998;110:410-415.
- 2. Zouboulis CC: Is acne vulgaris a genuine inflammatory disease? Dermatology 2001;203:277-279.
- 3. Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Szell M, Urban E, Kemeny L: Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. J Invest Dermatol 2005;124:931-938.
- 4. Schaller M, Loewenstein M, Borelli C, et al. Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with Propionibacterium acnes and coproporphyrin III. Br J Dermatol 2005;153:66-71.
- 5. Graham GM, Farrar MD, Cruse-Sawyer JE, Holland KT, Ingham E: Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with Propionibacterium acnes and P. acnes GroEL. Br J Dermatol 2004;150:421-428.
- 6. Bruggemann H, Henne A, Hoster F, et al. The complete genome sequence of Propionibacterium acnes, a commensal of human skin. Science 2004;305:671-673.
- 7. Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, et al. Induction of toll-like receptors by Propionibacterium acnes. Br J Dermatol 2005;153:1105-1113.
- 8. Watt FM: Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. Embo J 2002;21:3919-3926.
- 9. van der Flier A, Sonnenberg A: Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res 2001:305:285-298.
- 10. Braga VM, Hajibagheri N, Watt FM: Calcium-induced intercellular adhesion of keratinocytes does not involve accumulation of beta 1 integrins at cell-cell contacts and does not involve changes in the levels or phosphorylation of catenins. Cell Adhes Commun 1998;5:137-149.
- 11. Jeremy AH, Holland DB, Roberts SG, Thomson KF, Cunliffe WJ: Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. J Invest Dermatol 2003;121:20-27.
- 12. Dale BA: Filaggrin, the matrix protein of keratin. Am J Dermatopathol 1985;7:65-68.
- 13. Simon M, Sebbag M, Haftek M, et al. Monoclonal antibodies to human epidermal filaggrin, some not recognizing profilaggrin. J Invest Dermatol 1995;105:432-437.

- 14. Kurokawa I, Mayer-da-Silva A, Gollnick H, Orfanos CE: Monoclonal antibody labeling for cytokeratins and filaggrin in the human pilosebaceous unit of normal, seborrhoeic and acne skin. J Invest Dermatol 1988;91:566-571.
- 15. Goldfinger LE, Hopkinson SB, deHart GW, Collawn S, Couchman JR, Jones JC: The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. J Cell Sci 1999;112 (Pt 16):2615-2629.
- 16. Haase I, Hobbs RM, Romero MR, Broad S, Watt FM: A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. J Clin Invest 2001;108:527-536.
- 17. Cunliffe WJ, Holland DB, Clark SM, Stables GI: Comedogenesis: some new aetiological, clinical and therapeutic strategies. Br J Dermatol 2000;142:1084-1091.
- 18. Leyden JJ, McGinley KJ, Vowels B: Propionibacterium acnes colonization in acne and nonacne. Dermatology 1998;196:55-58.

<u>Figure 1:</u> Histogram represent the intensity of immunlabelling on 3 experiments average (0: nul(-); 1: weak(+); 2: moderate(++); 3: strong(+++)). Expression of β1, α3, α6, αVβ6 integrins on NHEK incubated with *P.acnes* extracts (FM: membrane fraction, SA: supernatant A, SB: supernatant B). *P.acnes* extracts induce β1 integrins expression whereas α3, α6, αVβ6 integrins expression was not modified in NHEK.

Figure 2: Histogram represent the intensity of immunlabelling on 3 experiments average (0: nul(-); 1: weak(+); 2: moderate(+++); 3: strong(++++)). Expression of β 1, α 3, α 6, α V β 6 integrins on cutaneous explants incubated with *P.acnes* extracts (FM: membrane fraction, SA: supernatant A, SB: supernatant B). P.acnes extracts modulate integrins β 1, α 3, α 6, α V β 6 integrins expression by cutaneous explants.

<u>Figure 3:</u> Expression of filaggrin (commercial antibody) on NHEK incubated with *P.acnes* extracts (FM: membrane fraction, SA: supernatant A, SB: supernatant B) compared to control (KGM) (magnification X40). Filaggrin expression in NHEK was not modified in presence of *P.acnes* extracts. This figure represents results obtained with 3 donors.

<u>Figure 4:</u> Expression of filaggrin on cutaneous (commercial antibody) explants incubated with *P.acnes* extracts (FM: membrane fraction (**C**), SA: supernatant A (**D**), SB: supernatant B (**E**)) (magnification X160) compared to normal skin (**A**) and acne lesion (**B**) (magnification X64). *P.acnes* extracts induce filaggrin expression by keratinocytes of suprabasal (granular and spinous) and basal layers on explants skin model. This figure represents results obtained with 3 donors.

Figure 5: Filaggrin (non-commercial antibody) immunoblot on cutaneous explants incubated with *P.acnes* extracts during 3h and 24h. The blots show results obtain with AHF2 antibody, which interact both with profilaggrin and filaggrin (**A**) and AHF7 antibody, which interact only with filaggrin (**B**). Total amount of filaggrin protein was increased in explants incubated with *P.acnes* extracts compared to control. This figure represents results obtained with 3 donors.

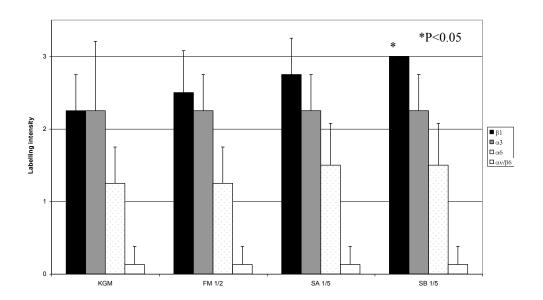


Figure 1

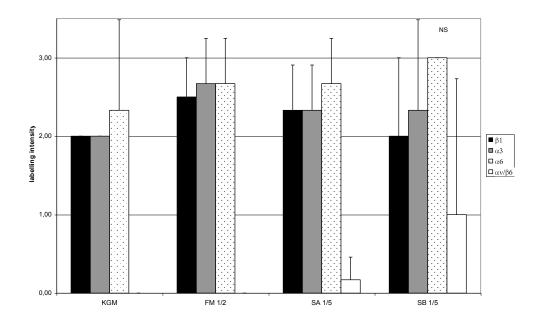
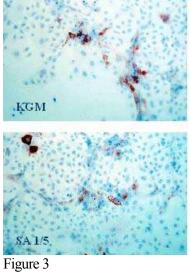
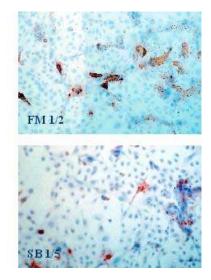
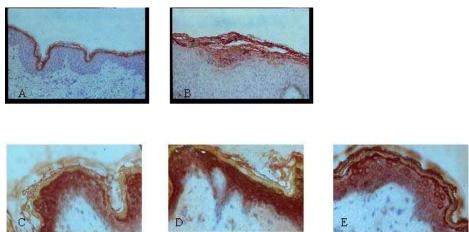
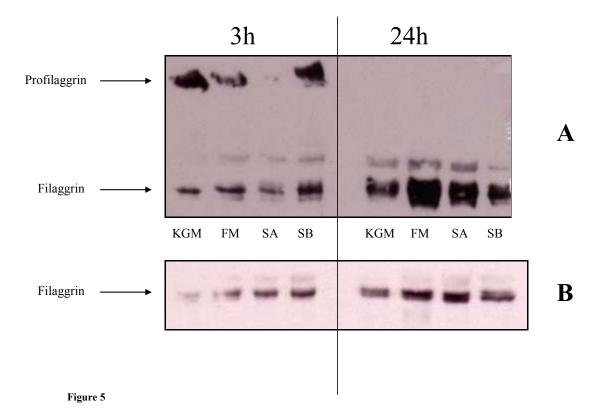


Figure 2









2. Etude de la modulation des Toll-like receptors 2 cutanés par le zinc

Il a été mis en évidence au laboratoire que l'expression des TLR2 et TLR4 par les kératinocytes en monocouche est augmentée en présence des extraits de *P.acnes* (Jugeau et al, 2005, en Annexe). Au cours de cette étude il a également été montré que TLR2 est clairement surexprimé dans les lésions d'acné mais pas TLR4. *P.acnes* est une bactérie GRAM positive et possède des motifs susceptibles d'être reconnus par le TLR2. Ceci suggère fortement que *P.acnes* jouerait un rôle central dans l'induction et le maintien de la phase inflammatoire de l'acné en activant TLR2. Nous avons donc choisi de centrer notre étude sur la modulation de l'expression de TLR2 par le zinc.

a) Le zinc inhibe l'expression de TLR2 par les kératinocytes activés

Afin d'étudier les mécanismes de l'inflammation cutanée provoquée par *P.acnes*, nous avons utilisé le modèle mis au point dans la première partie de l'étude et qui consiste à incuber des explants de peaux humaines avec des composants bactériens. En plus des trois extraits de *P.acnes* (FM, SA et SB), nous avons utilisé du LPS commercial.

Dans ce modèle, le TLR2 est surexprimé en présence des composés bactériens. D'une manière générale, les Toll-like Receptors (TLRs) sont des acteurs importants de l'immunité innée, ils sont présents sur de nombreuses cellules immunitaires (innées), mais aussi sur les cellules de l'épiderme (kératinocytes). Leur activation conduit à la translocation du facteur de transcription NF-kB et à la sécrétion de cytokines proinflammatoires.

Le zinc est utilisé par les dermatologues pour le traitement de l'acné inflammatoire minime à modérée.

La pluralité de son mode d'action anti-inflammatoire n'est que partiellement connu.

Le but de cette étude était de déterminer si les effets anti-inflammatoires du zinc peuvent s'expliquer en partie par une diminution de l'expression des TLR2 kératinocytaires et donc de déterminer si le zinc joue un rôle dans la modulation de l'immunité innée.

L'incubation des kératinocytes en monocouche ou des explants en présence de LPS (1µg/ml) stimule l'expression de TLR2. Les résultats obtenus sur 5 donneurs différents montrent que l'effet inhibiteur optimal du zinc sur l'expression de TLR2 est obtenu à la concentration 1µg/ml et au temps 3h d'incubation.

Au vu de ces résultats nous avons décidé de poursuivre notre étude en utilisant le zinc à la concentration de 1µg/ml et au temps d'incubation 3h.

L'incubation des explants en présence de fractions de *P.acnes* (FM diluée au 1/2, SA et SB diluées au 1/5) durant 3h à 37°C stimule l'expression de TLR2. Les résultats obtenus sur 5 donneurs différents confirment que *P.acnes* est bien un inducteur de l'expression de TLR2. Il est à noter que seul l'extrait FM contenant le peptidoglycane et l'acide lipotéique induit une augmentation de l'expression de TLR2. Cette expression est diminuée en présence de zinc (3h, 1µg/ml). Tandis que les extraits SA (contenant les protéines cytosoliques) et SB (riche en protéines membranaires) sont sans effet sur l'expression de TLR2.

Plusieurs études ont montré (Nagy et al, 2005) (Kim, 2005) que la stimulation des TLR2 par *P.acnes* induit via la voie NF-kB, une augmentation de la sécrétion de l'interleukine-8. Nous nous sommes alors demandé si le zinc a un effet modulateur sur l'expression de NF-kB et de l'IL-8. Nous avons donc étudié par Western-blot l'expression de NF-kB sur des extraits protéiques obtenus à partir d'explants incubés avec les extraits de *P.acnes*. Puis par dosage ELISA nous avons recherché la sécrétion d'IL-8 dans les

surnageants de culture de kératinocytes en monocouches et d'explants incubés avec les extraits de *P.acnes* puis le zinc.

Nos résultats de Western-blot montrent que l'expression totale du facteur de transcription NF-KB n'est pas modifiée en présence des extraits de *P.acnes* et du zinc.

Nous avons montré par dosage ELISA, que l'extrait FM de *P.acnes* induit la sécrétion de l'IL-8 dans le surnageant de culture des kératinocytes en monocouche. Le zinc à la concentration de 1µg/ml n'a pas d'effet modulateur sur cette sécrétion. Le dosage de l'IL-8 dans le surnageant de culture des explants montre un taux basal très élevé de cette cytokine dans le milieu contrôle. Les extraits de *P.acnes* et le zinc n'ont aucun effet modulateur sur la sécrétion de l'IL-8 dans le surnageant de culture d'explants.

b) Article 2:

Inhibition of Toll-like Receptor 2 expression by zinc salts

Manuscrit soumis aux Archives of Dermatological Research

Authors: V Jarrousse*, N Castex-Rizzi[¶], A Khammari *, M. Charveron[¶] and B Dreno * MD, PhD ()

* INSERM U601, 9 quai Moncousu 44093 Nantes cedex 01, France

Clinique dermatologique, CHU Hotel-Dieu, 1 place A.Ricordeau, 44000 Nantes, France

¶ Institut de Recherche Pierre Fabre, Laboratoire de biologie Cellulaire Cutanée, Toulouse, France.

() Corresponding author: Brigitte Dreno, department of Dermatology, CHU HOTEL DIEU, Place

Alexis Ricordeau, 44035 NANTES Cedex 01, FRANCE

Phone:0033240083118 Fax: 00 33 240083117

e-mail: brigitte.dreno@wanadoo.fr

First author: V Jarrousse

Running title: Inhibition of TLR2 expression by zinc salts.

Keywords: Inflammation, Interleukin-8, Propionibacterium acnes, TLR2, Zinc.

Zinc salts inhibit in vitro Toll-like receptor 2 surface expression by keratinocytes.

Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dréno B.

INSERM U601, 9, quai Moncousu, 44093, Nantes Cedex 01, France.

Propionibacterium acnes (P. acnes) plays an important role in the induction and maintenance of the inflammatory phase of acne. At the therapeutic level, it has been shown that zinc salts could have a beneficial effect on mild and moderate inflammatory acne lesions. However, their mechanisms of action are still only partially known. Immediate early immune response is a crucial route in the development of inflammatory reaction and, specifically, activation of Toll-like Receptors (TLRs) leading to nuclear factor (NF)-kappaB translocation and production of inflammatory cytokines such as interleukin-8 (IL-8). The aim of this work was to determine if cytokine secretion and innate immunity could be targets of zinc salts. Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) and skin explants were stimulated by P. acnes extracts and incubated (3 h) with zinc salts (1 microg/mL). Then we successively studied TLR2 expression by immunohistochemistry and IL-8 production by ELISA. After incubation with zinc salts, the increase of TLR2 surface expression in skin upon membrane fraction (FM) of P. acnes challenge was decreased as compared to that in control samples. However, this inhibition does not modify IL-8 secretion by keratinocytes. In conclusion the inhibition of TLR2 surface expression by keratinocytes could be one of the anti-inflammatory mechanisms of zinc salts in acne.

Inhibition of Toll-like Receptor 2 expression by zinc salts.

SUMMARY

Propionibacterium acnes (P.acnes) plays an important role in the induction and maintenance

of the inflammatory phase of acne. At the therapeutic level, it has been shown that zinc salts

could have a beneficial effect on mild and moderate inflammatory acne lesions. Their

mechanisms of action however are still partially known. Immediate immunity plays an

important role in the development of inflammatory reaction and specifically activation of

Toll-like Receptors (TLRs) leading to NF-kB translocation and production of inflammatory

cytokines such as interleukin 8 (IL-8).

The aim of this work was to determine the modulating effect of different concentrations of

zinc salts on TLR2 expression induced on keratinocytes by *P.acnes* extract.

Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) and skin explants were incubated with

P.acnes extracts and zinc gluconate at different concentrations. Then, we successively studied

TLR2 expression by immunohistochemistry, IL-8 production by ELISA and NF-κB

expression by western-blot.

After incubation (3h) with zinc salts (1µg.ml⁻¹), the expression of TLR2 induced by

membrane fraction (FM) of P.acnes was decreases compared with control skin. However,

zinc salts had no effects on NF-kB expression and did not also modulate IL-8 secretion by

keratinocytes.

In conclusion the inhibition of TLR2 expression could be one of the anti inflammatory

mechanisms of zinc salts in acne. This modulation appears independent of NF-κB expression.

Keywords: Inflammation, Interleukin-8, Propionibacterium acnes, TLR2, Zinc.

74

INTRODUCTION

Acne vulgaris is a skin disorder of the pilosebaceous follicles that commonly occurs in adolescence and in young adulthood. Although the precise mechanisms that induce the development and progression of acne remain still unclear, three main factors have been identified: an androgen-stimulated increase in the production of sebum, obstruction of the pilo-sebaceous follicles resulting from abnormal proliferation and differentiation of follicular epithelium, and finally a bacterial factor with *Propionibacterium acnes* which plays a central role in the initiation and the maintenance of inflammatory reaction in and around the pilosebaceous follicles.

Several studies [5,7] have shown a beneficial effect of zinc salts on inflammatory lesions in mild and moderate acne. However, the mechanisms by which zinc salts act on cutaneous inflammation are still partially known [13]. They inhibit the expression of some integrins which play an important role in the interactions between keratinocytes and lymphocytes [8]; modulates pro-inflammatory cytokine production by keratinocytes [16] and exert an anti-oxidative activity through the superoxyde dismutase [15]. Immediate immunity appears an important target of zinc salts. Indeed, it has been shown that zinc salts inhibited the polynuclear neutrophils chemotactism both in vitro and in vivo [6], activate NK cells and the phagocytosic capacity of granulocytes [4].

Recently, among the different actors of the immediate immunity, have been described the Toll-like Receptors, which are receptors specifically activated by microbial components [1]. This activation of TLR by microbial antigens induces a strong production of different inflammatory cytokines by the cell and among them IL-8 which strongly attracts and activates neutrophils and T lymphocytes.

The aim of this work was to determine if the anti-inflammatory activity of zinc salts in acne

could be linked to a modulation of TLR2 expression by the keratinocytes and if this inhibition would linked to NF-κB expression and interleukin (IL)-8 expression.

MATERIALS and METHODS

Materials

Bacterial extracts

Three extracts of *P. acnes* IP53113T (Pierre Fabre, Toulouse, France) were made available to us. The strain was first described in 1968. The membrane fraction (FM) contained peptidoglycan and lipoteichoic acid. Supernatant A (SA) contained cytosolic proteins and supernatant B (SB) was rich in membrane proteins. The membrane fractions of the bacteria were resuspended in KBM without HC (Keratinocyte basal medium without hydrocortisone) (Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 0.1 ng.ml⁻¹ EGF (epidermal growth factor) (Invitrogen), 0.4% BPE (bovine pituitary extract) (Invitrogen), 5μg.ml⁻¹ insulin, 0.09 mM calcium, 50 μg.ml⁻¹ gentamycin and 50 ng.ml-1 amphotericin-B.

Trace element

15mg zinc gluconate (Labcatal, Montrouge, France), were diluted in KBM without HC and incubated with NHEK or cutaneous explants. In order to determine the effects of zinc solution on TLR expression, we tested 6 zinc concentrations: 0,1μg.ml⁻¹; 0,25 μg.ml⁻¹; 0,5 μg.ml⁻¹; 1 μg.ml⁻¹; 1,5 μg.ml⁻¹ and 5 μg.ml⁻¹. We also tested 3 times of incubation: 3h, 6h and 24h. This experimentation was performed using 3 healthy donors' samples.

• Skin explants and Normal human epidermal keratinocytes (NHEK) culture

Two methods of culture were used: cutaneous explants obtained from surgical samples of healthy abdominal skin and normal human epidermal keratinocytes (NHEK) obtained from foreskins of healthy donors.

Methods

• Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK)

Keratinocyte culture

The hypodermis and deep dermis of the skin biopsies were removed and the samples cut into pieces of 1 mm² and incubated overnight at 4°C in trypsin 2X (Sigma, St Quentin Fallavier, France). The following day, the epidermis and dermis were separated with thin forceps. The action of trypsin on the pieces of epidermis was inhibited by the addition of dulbecco's modified eagle's medium (Biowhittaker, Emerainville, france) supplemented with 10% foetal calf serum (Invitrogen). The detached keratinocytes were centrifuged at 1500r.p.m. for 7 min. The cell pellet was then taken up in keratinocyte serum free medium (Invitrogen) supplemented with 5ng.ml¹ EGF, 25μg.ml¹ BPE, 2,5μg.ml¹ fungizone (Bristol-Myers Squibb, Paris, France) and 1% Penicilin/Streptomycin. Then cells were seeded into 25 cm² flasks, at a density of 4.10⁴cells/cm². They were cultured at 37°C in a humid environment under 5% CO2. The culture medium was removed every 2 or 3 days. At confluence, keratinocytes were detached by incubation with EDTA for 7 min, then with trypsin (Biowittaker) for 2min. During successive passages, keratinocytes were seeded at a density of 1.5.10⁴ cells/cm² in 75 cm² flasks. Cells were used after a limited number (n=2) of subcultures.

Keratinocyte smears

Keratinocytes from three separate donors were seeded at 1x10⁴ cells per well in Lab-Teks Permanox eight-well plates (Dutcher, Brumath, France) in KBM with HC. The medium was replaced by KBM without HC 24h before starting the experiment. LPS 1μg.ml⁻¹ with SVF10% was deposed on keratinocytes during 6h incubation then labteks were washed were washed with PBS. LPS 1μg.ml⁻¹ with SVF10% was deposed on explants during 6h incubation then explants were washed with PBS. The different *P.acnes* extracts (FM 1/2, SA 1/5 and SB 1/5) as previously describe [9] were deposited on keratinocytes for 3, 6 or 24h.

Skin explants

Punches (4 mm diameter) from abdominal skin samples, considered as an healthy skin model, were incubated at 37°C in a moist atmosphere in the presence of 5% CO2 for 3, 6 and 24h in Keratinocyte basal medium without hydrocortisone (KGM-HC) (Promocell, Heidelberg, Germany). After incubation, explants were removed from the culture medium and frozen at -80°C. Sections (5μm thick) where then cut with a cryostat, fixed in acetone at 4°C for 10 min and frozen at -20°C. The different *P.acnes* extract (FM 1/2, SA 1/5 and SB 1/5) were deposited on cutaneous explants for 3h. According the results obtained with NHEK, zinc concentration and time of incubation chosen was 1 μg.ml⁻¹ and 3h. This experimentation was performed using 5 healthy donor samples.

Labelling of smears and biopsies

Sections of deep-frozen biopsies were fixed in acetone for 10 min. The non-specific sites were saturated for 30mn with TBS (Tris-Buffered Saline) 0.05% Tween20 w/v (Sigma), 0.1% BSA w/v (Bovine Serum Albumin) (Sigma). The polyclonal rabbit antibody anti-TLR-2 H-175 (TEBU, Le Perray-en-Yvelines, France) was deposited upon the slides for 30 min in a humid environment at room temperature. Rinses of 10mn were made between each stage using TBS, 0.1% BSA, 0.05% Tween20. The slides were incubated successively with a secondary biotinylated antibody (DAKO ChemTek detection kit peroxidase/AEC, Rabbit/Mouse) (30mn) and streptavidin coupled with peroxidase (30mn). The reaction was stopped with distilled water (10min) and counter-staining was done with Mayer haemalun (VWR International) for about 1 min. The slides were rinsed with distilled water, and mounted in an aqueous medium. The control section included omission of the primary antibody. Two different examiners read the slides. Labelling intensity was scored on a four-point scale: null labelling (0), weak labelling (1), moderate labelling (2) and strong labelling (3).

• Production of interleukin-8

Explants and NHEK were stimulated in presence of *P.acnes* extract (FM diluted at 1/2, SA diluted at 1/5, SB diluted at 1/5). To determine the IL-8 concentration, the culture media were harvested after 3h, 6h and 24h of culture and stored at -80°C until assay. The concentration of IL-8 in the explants supernatant was measured by a commercially available enzyme-linked immunoabsorbent assay kit (BD Biosciences, le Pont de Claix, France), used in accordance with the manufacters instructions. All samples were assayed in duplicate.

Western blot

Explants cultured in control medium or incubated with *P.acnes* explants for 3h and then with zinc for 3h were lysed using Sample griding Kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Samples extracts mixed with an equal volume of 2X Laemmli Sample Buffer (Biorad-Rad, Marnes la Coquette, France) containing 50 mM 2-mercaptoethanol were boiled for 5 min. Equal amount of protein from each explants lysate and standards for NF-κB and recombinant protein molecular weight marker (161-0374, Biorad-Rad, Marnes la Coquette, France) were electrophoresed on 8% SDS-polyacrylamide gel and electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked overnight using blocking reagent (BM chemiluminescence kit, Roche Diagnostic GmbH, Indianapolis, IN) and then incubated for 1h with primary antibody: NF-κB p65 (C-20): sc-372 (TEBU, Le Perray-en-Yvelines, France) dilute at 1/1000°. After four washes in TBS containing 0,05% Tween 20, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary mix anti-mouse/anti-rabbit antibody dilute at 1/5000° (BM chemiluminescence kit). Blots were developed using a classic chemiluminescence detection system (BM chemiluminescence kit)

Statistical analysis

Results were expressed as the mean +/- standard deviation (SD) of n replicates of keratinocytes or explants isolated from n different donors. Data were compared to controls, consisting of keratinocytes or explants treated in the same manner as the test samples but without trace elements or LPS or *P.acnes* extracts. The statistical significance of the data was determined by T test. A P<0.05 was taken significant.

RESULTS

LPS and Toll-like Receptor 2 expression by Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK).

Zinc gluconate decreased TLR2 expression by NHEK previously stimulated by LPS (1μg.ml⁻¹) (Fig. 1A). After 3h, TLR2 expression of keratinocytes decreased in a dose-dependent manner from 2,33 (+/- 0,58) with 0,1μg.ml⁻¹ of zinc to 1 (+/- 0,87) with 1,5μg.ml⁻¹ of zinc.

LPS and Toll-like Receptors 2 expression on cutaneous explants.

Zinc gluconate decrease TLR2 expression by keratinocytes in cutaneous explants previously stimulated by LPS (1μg.ml⁻¹). TLR2 expression on cutaneous explants decrease with the three concentrations of zinc salts tested (Fig 1B).

According the results, the concentration of $1\mu g.ml^{-1}$ of zinc with 3h of incubation was used in further experiments.

Induction of TLR2 by Pacnes.

When cutaneous explants were incubated with *P.acnes* extracts during 3h (Fig. 1C), the expression of TLR2 was induced: 2,20 (+/-0,76) on cutaneous explants incubated with FM1/2 extracts (Fig. 2B) compared to control: 1,70 (+/-0,55) (Fig. 2A) but not with the SA1/5: (1,80 +/- 0,67) and SB1/5: 1,90 (+/- 0,76) extracts.

After incubation of cutaneous explants during 3h with zinc prior FM1/2 extract, the expression of TLR2 was significantly lower (p=0.08) 1,20 (+/-0,65) (Fig. 2C) than control expression. The expression of TLR2 on cutaneous explants incubated with SA: 1,80 (+/-0,71)

or SB: 1,90 (+/-0,82) and then with zinc was not modified.

Expression of NF-kB ex vivo in cutaneous explants extracts incubated with *P.acnes* extracts and zinc.

NF- κ B expression was studied in 3 cutaneous explants extracts incubated with *P.acnes* extracts with or without zinc $(1\mu g.ml^{-1})$ by western immunoblotting.

We observed that NF-κB expression was not modulated by *P.acnes* extracts or by zinc (Fig.3).

Interleukine 8 secretion by NHEK and by cutaneous explants incubated with *P.acnes* extracts and zinc.

NHEK (Fig.4A)

Interleukin-8 secretion was significantly (p<0.001) increased by FM: 515 pg.ml⁻¹ (+/- 30) in NHEK compared to control medium: 20 pg.ml⁻¹ (+/- 9). Interleukin-8 secretion of keratinocytes after incubation with zinc (1µg.ml⁻¹ during 3h) was not modified.

• Cutaneous explants (Fig. 4B)

We observed that interleukin-8 secretion was not stimulated by *P.acnes* extracts compared to control. Interleukin-8 patterns secretion after incubation of zinc (1µg.ml⁻¹, during 3h) was similar to that observed with *P.acnes* extracts only.

DISCUSSION

Our study shows that in vitro zinc salts down regulates the expression of TLR2 induced either by LPS ($1\mu g.ml^{-1}$) or FM on the keratinocytes at the concentration of $1\mu g.ml^{-1}$ during 3h. The results are similar using either cutaneous explants which is a model closed to in vivo conditions or NHEK.

Recently, we have shown that extracts of *P.acnes* are able to increase TLR2, TLR4 and MMP9 expression by keratinocytes [9]. In particular, we have shown on acne biopsies that TLR2 was clearly over expressed in comparison to TLR4. These facts suggested that *P.acnes* plays a central role in the induction and maintenance of the inflammatory phase of acne through TLR2. This present study was focalised on *P.acnes* (GRAM+) extracts effects on TLR2 expression by keratinocytes. Indeed TLR2 specifically recognize GRAM+ pattern (peptidoglycan: PGN) whereas TLR4 recognize GRAM- pattern (LPS).

Our study confirms that *P.acnes* is able to induce effectively the expression of TLR2. Interestingly, only the membrane fraction (FM) which contain peptidoglycan (PGN) and lipoteichoic acid, not supernatant A (SA) which contain cytosolic proteins or supernatant B (SB) which was rich in membrane proteins are able to activate TLR2. Therefore, FM extract of *P.acnes* contain one or several pattern (PGN) which specifically activate TLR2 expression by keratinocytes.

Zinc was recognized to be essential for human health in1963 [12]. Zinc salts have first been used as systemic treatment of inflammatory acne in 1970. The first available chemical form was zinc sulfate. Zinc gluconate became available to clinicians at the end of the eighties. The latter salt would have superior bio availability, enabling a decrease of the dose of zinc administered, leading to an improved gastrointestinal acceptability.

Zinc salts acts in acne mainly on inflammatory lesions. It has been shown until now that its anti inflammatory activity has different targets [7]. Indeed, zinc acts via an inhibition of

polymorphonuclear cell chemotaxis [6] and via an inhibition of the growth of *P.acnes* [17]. Its anti-inflammatory activity in acne could also be related to a decrease in TNF- α and IL-6 production [16] and the modulation of the expression of integrins [19, 20], mainly ICAM-1 and LFA-3 [8]. Zinc salts also have a specific action on type 5α -reductase, shown in vitro [18].

This paper adds another anti-inflammatory target of zinc salts with TLR2. Indeed, we have shown that zinc salts decrease TLR2 expression by keratinocytes induced by FM extracts of *P.acnes*.

Concerning the activation of TLR2, the intracellular domain of TLR2 may trigger a MyD88dependent pathway (IRAK) and tumour necrosis factor receptor-activated factor 6 (TRAF6), which ultimately lead to the nuclear translocation of the nuclear factor (NF)-κB. NF-κB then modulates the expression of many immune response genes [2]. By western-blot, we have shown that NF-κB expression was not modulated by *P.acnes* extracts or by zinc (1μg.ml⁻¹). Nearly 2000 transcription factors require zinc for their structural integrity [3]. Interestingly, in previous works performed with cells of non epithelial origin, Prasad et al have shown that in zinc-deficient HUT-78 cells (Th0 malignant human lymphoblastoid cell line), phosphorylated IκB and Iκκ, ubiquitinated IκB and binding of NF-κB to DNA were all significantly decreased. Furthermore zinc increases the translocation of NF-κB from cytosol to nucleus. The authors conclude that zinc plays an important role in the activation of NF-kB in HUT-78 cells [14]. Whereas Uzzo et al, demonstrate that zinc supplementation induces phosphorylation of the members of three major MAPK subfamilies regulating AP-1 and NF- κB activation while blocking TNF- α mediated degradation of the inhibitory subunit $I\kappa B$ and nuclear translocation of Rel A in prostate cancer cells. They also showed that treatment of these cells with zinc reduces expression of IL-6, IL-8, MMP9 and ICAM-1 [21]. As ours results, did not demonstrate a modulation of NF- κ B in the keratinocytes, thus we can rise the hypothesis that the effect of zinc on NF- κ B activation may differ from one cell type to the other one. This may be due to the fact that different pathways of NF- κ B activation exist in different cells and more studies are required to fully understand the molecular mechanisms of zinc action of NF- κ B activation in different cell types.

By ELISA we firstly confirmed that FM extracts of *P.acnes* induced interleukin-8 secretion by NHEK and that zinc (1μg.ml⁻¹) has no modulation on IL-8 secretion. Concerning the cutaneous explants, we observed a high basal level of IL-8 secretion which could explain the absence of any modulation by the extracts of P. acnes. Previously, Nagy et al, (2005) [11] demonstrated that Interleukin-8 secretion induced by *P.acnes* on keratinocytes are both TLR2 and TLR4 dependent. In addition, they have shown that four strains of *P.acnes* significantly induced the IL-8 mRNA expression by interactions between *P.acnes* and keratinocytes and that IL-8 gene expression could be inhibited by anti-TLR2 neutralizing antibodies. Furthermore, Kim et al, [10] have shown that *P.acnes* induces cytokines (IL-6, IL-8, IL-12) release of monocytes via TLR2 in acne.

In conclusion, our results demonstrate for the first time, that zinc salts inhibits TLR2 expression by keratinocytes induced both by *P.acnes* FM extracts and LPS. This inhibition appears independent of NF-kB expression and not related to an inhibition of interleukine-8 secretion.

Figure 1: Histograms represent the average intensity of immunolabelling (0 : nul(-); 1 : weak(+); 2 : moderate(++); 3 : strong(+++)). (A) Expression of TLR2 on NHEK with Zinc during 3h. (B) Expression of TLR2 on cutaneous explants incubated with Zinc during 3h. (C) Expression of TLR2 on cutaneous explants incubated 3h with *P.acnes* extract (FM : membrane fractions, SA : supernatant A, SB : supernatant B) and then with Zinc during 3h. Zinc down-regulates the expression of TLR2 induced either by LPS (1μg.ml⁻¹) or FM on NHEK and on cutaneous explants at the concentration 1μg.ml⁻¹ during 3h.

Figure 2: Expression of TLR2 on cutaneous explants incubated with *P.acnes* extracts during 3h. Control without *P.acnes* (A), cutaneous explants incubated with FM (B). Only FM induces an expression of TLR2 by keratinocytes. After incubation with zinc solution (1μg.ml⁻¹) during 3h, the expression of TLR2 decreased (C).

Figure 3: NF-κB immunoblot on cutaneous explants incubated with *P.acnes* extracts during 3h and then with zinc (1μg.ml⁻¹) during 3h. The blot showed double strand, non specific strand was determinate using NF-κB blocking peptide. NF-κB expression was not modulated by *P.acnes* extracts or by zinc.

Figure 4: Interleukin (IL)-8 secretion by NHEK (A) and by explants (B) incubated during 24h with *P.acnes* extracts (membrane fraction: FM, supernatant A and B: SA and SB) and then with zinc (1g/ml) during 3h. FM extracts of *P.acnes* induced interleukin-8 secretion by NHEK. Zinc (1µg.ml⁻¹) has no modulation on IL-8 secretion.

ACKNOLEDGEMENTS

Zinc gluconate were kindly supplied by Labcatal (Montrouge, France), Financial support and *P.acnes* extracts were provided by Laboratoire Pierre Fabre (Toulouse, France). No conflicts of interest exist. We thank surgeons from the plastic surgery Department of Nantes Hospital for abdominal skin samples and the pediatric surgery Department of Nantes Hospital for foreskin samples.

REFERENCES

- [1] Aderem A, Ulevitch RJ. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature 406: 782-7.
- [2] Akira S, Takeda K. (2004) Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 4: 499-511.
- [3] Berg JM, Shi Y. (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. Science 271: 1081-5.
- [4] Chvapil M, Stankova L, Zukoski Ct et al. (1977) Inhibition of some functions of polymorphonuclear leukocytes by in vitro zinc. J Lab Clin Med 89: 135-46.
- [5] Dreno B, Amblard P, Agache P et al. (1989) Low doses of zinc gluconate for inflammatory acne. Acta Derm Venereol 69: 541-3.
- [6] Dreno B, Trossaert M, Boiteau HL et al. (1992) Zinc salts effects on granulocyte zinc concentration and chemotaxis in acne patients. Acta Derm Venereol 72: 250-2.
- [7] Dreno B, Moyse D, Alirezai M et al. (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 203: 135-40.
- [8] Gueniche A, Viac J, Lizard G et al. (1995) Protective effect of zinc on keratinocyte activation markers induced by interferon or nickel. Acta Derm Venereol 75: 19-23.
- [9] Jugeau S, Tenaud I, Knol AC et al. (2005) Induction of toll-like receptors by Propionibacterium acnes. Br J Dermatol 153: 1105-13.

- [10] Kim J. (2005) Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. Dermatology 211: 193-8.
- [11] Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A et al. (2005) Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. J Invest Dermatol 124: 931-8.
- [12] Prasad AS, Miale A, Jr., Farid Z et al. (1963) Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypognadism. J Lab Clin Med 61: 537-49.
- [13] Prasad AS. (1998) Zinc and immunity. Mol Cell Biochem 188: 63-9.
- [14] Prasad AS, Bao B, Beck FW et al. (2001) Zinc activates NF-kappaB in HUT-78 cells. J Lab Clin Med 138: 250-6.
- [15] Prasad AS, Bao B, Beck FW et al. (2004) Antioxidant effect of zinc in humans. Free Radic Biol Med 37: 1182-90.
- [16] Sainte-Marie I, Jumbou O, Tenaud I et al. (1998) Comparative study of the in vitro inflammatory activity of three nickel salts on keratinocytes. Acta Derm Venereol 78: 169-72.
- [17] Strauss JS, Stranieri AM. (1984) Acne treatment with topical erythromycin and zinc: effect of Propionibacterium acnes and free fatty acid composition. J Am Acad Dermatol 11: 86-9.
- [18] Sugimoto Y, Lopez-Solache I, Labrie F et al. (1995) Cations inhibit specifically type I 5 alpha-reductase found in human skin. J Invest Dermatol 104: 775-8.

- [19] Tenaud I, Sainte-Marie I, Jumbou O et al. (1999) In vitro modulation of keratinocyte wound healing integrins by zinc, copper and manganese. Br J Dermatol 140: 26-34.
- [20] Tenaud I, Leroy S, Chebassier N et al. (2000) Zinc, copper and manganese enhanced keratinocyte migration through a functional modulation of keratinocyte integrins. Exp Dermatol 9: 407-16.
- [21] Uzzo RG, Crispen PL, Golovine K et al. (2006) Diverse effects of zinc on NF-{kappa}B and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression. Carcinogenesis.

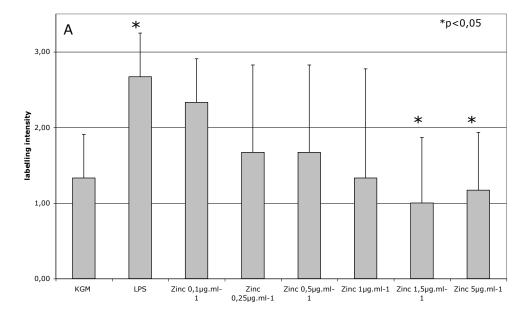


Fig.1A

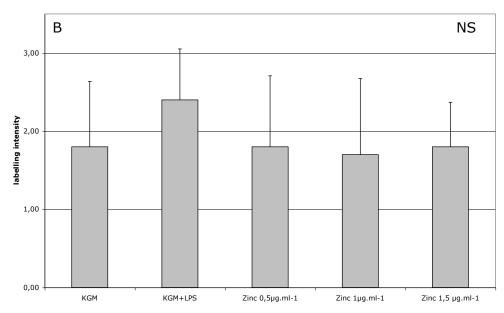


Fig.1B

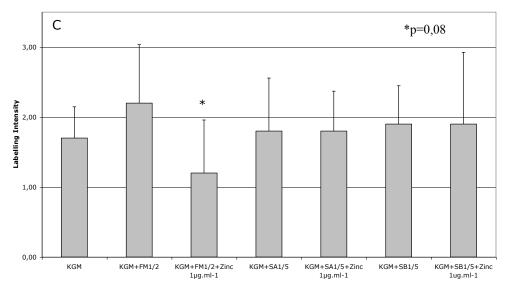


Fig.1C

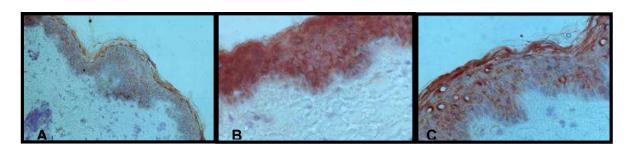


Fig.2

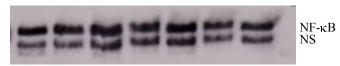


Fig. 3

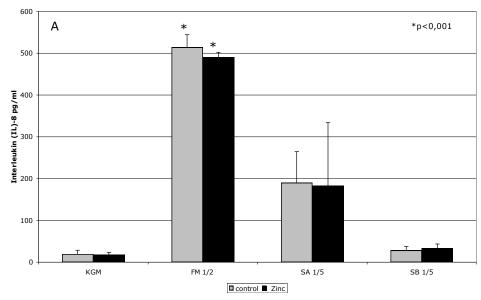


Fig.4A

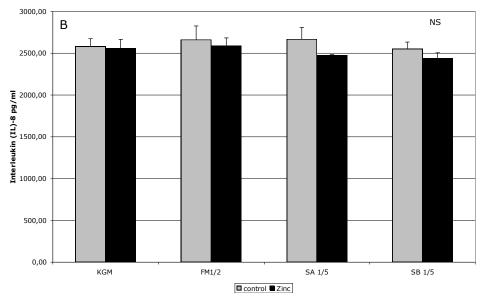


Fig.4B

B. Etude complémentaire : Expression des récepteurs Toll-like 2, 4 et 9 kératinocytaires dans les Lymphomes cutanés T épidermotropes

Notre étude principale était centrée sur les interactions entre les kératinocytes et un agent infectieux et nous a permis de montrer que les extraits de *P.acnes* ont un effet inducteur sur l'expression du TLR2 kératinocytaire principalement et dans une moindre mesure sur TLR4. Ces résultats nous ont amenés à nous demander si nous pouvions retrouver cette activation des TLRs dans une autre pathologie cutanée où un agent infectieux est suspecté: les lymphomes cutanés T épidermotropes (LCTE).

1. L'expression des TLRs 2, 4 et 9 kératinocytaires est augmentée dans l'épiderme des patients atteints de LCTE

Les LCTE qui se divisent en Mycosis fongoïde (MF) et en Syndrome de Sézary (SS) représentent 40% des lymphomes cutanés. Les LCTE sont caractérisés par la présence d'un infiltrat important de lymphocytes T CD4+ matures (composé de lymphocytes T réactionnels et tumoraux) dans la peau. L'étiologie de ce phénomène est encore inconnue, mais l'implication d'un virus est fortement suspectée (EBV/HSV/HTLV I).

Les Toll-like Receptors sont des récepteurs de l'immunité innée, leur activation conduisant à une réaction inflammatoire importante et à la sécrétion de cytokines déclenchée par l'activation du facteur de transcription NF-kB. Les Toll-like Receptors 2, 4 et 9 sont exprimés par les kératinocytes et peuvent être activés lors d'une infection virale. Il est possible que la sécrétion de cytokines par les kératinocytes suite à la stimulation des TLRs favorise et/ou entretienne l'activation lymphocytaire T chronique.

L'objectif de ce travail était d'étudier une nouvelle voie d'activation potentielle des lymphocytes T dans les LCTE, notamment en recherchant l'expression des TLR2, 4 et 9 par les kératinocytes au sein de

lésions cutanées de LCTE à différents stades de la maladie: parapsoriasis en grandes plaques, MF (stade I et II) et SS (stade III).

Nous avons montré que l'expression de ces trois TLRs par les kératinocytes des biopsies de peaux contrôles (peaux saines, eczéma et psoriasis) est faible.

L'expression de ces TLRs dans le parapsoriasis est similaire à celle observée sur peaux contrôles.

Remarquablement, l'expression des TLR2, 4 et 9 est fortement augmentée sur les coupes de Mycosis fongoïde (stade I et stade IIb): de plus il semble que l'expression de TLR2 et TLR4 augmente avec le stade de MF. Il est à souligner que nous avons vérifié par double marquage que les lymphocytes T (CD3+, CD4+) ne sont pas impliqués dans l'augmentation de l'expression de TLR2. Toutefois nos résultats de double marquage ne pas permettent pas d'exclure totalement une participation des cellules de Langerhans dans cette augmentation.

Paradoxalement, sur les coupes de biopsies de Syndrome de Sézary, l'expression de ces trois TLRs est intermédiaire entre celle observée sur coupes de peaux contrôles et celle observée sur coupes de MF. Enfin, le MF et le SS présentent des profils d'expression de TLRs 2, 4 et 9 différents : la totalité des épidermes de patients atteints de MF exprime ces trois TLRs tandis qu'un tiers des épidermes des

patients atteints de SS n'expriment pas du tout TLRs 2, 4 et 9.

En conclusion nous avons montré que l'expression des TLR 2, 4 et 9 est augmentée dans les lésions épidermiques de MF.

2. Article 3: Toll-like Receptors 2, 4 and 9 expression in cutaneous T-cell lymphoma (Mycosis fungoides and Sézary syndrome)

European Journal of Dermatology 2006; 16(6): 1-7

V. Jarrousse, G. Quereux, S. Marques-Briand, AC. Knol, A. Khammari, B. Dréno

Discussion et Perspectives

L'étude principale de notre travail a porté sur l'étude du rôle de *P.acnes* dans l'immunité innée et la différenciation kératinocytaire.

L'acné est une maladie chronique du follicule pilosébacé qui touche 80% des adolescents et 40% des femmes entre 25 et 40 ans. Les acnés sévères représentent 10 à 15% des acnés et nécessitent un traitement afin d'éviter l'apparition de cicatrices. D'une manière générale, l'acné a un fort retentissement sur la qualité de vie bien qu'il n'y ait pas de relation entre le nombre de boutons et l'impact psychologique.

Les trois étapes d'apparition de l'acné sont bien définies : tout d'abord une hypersécrétion sébacée suivie de la formation du microcomédon qui résulte d'anomalies de la prolifération et de la différenciation cellulaire et enfin la formation de lésions inflammatoires dans laquelle *Propionibacterium acnes* et l'immunité innée semblent jouer un rôle fondamental (Pawin et al, 2004).

La recherche sur l'acné s'attache à mieux comprendre les mécanismes induisant l'apparition du microcomédon et le développement de la réaction inflammatoire dans le but de développer des traitements ciblant les lésions débutantes de l'acné et d'éviter l'évolution vers des lésions inflammatoires et l'apparition de cicatrices.

Récemment nous avons montré sur des kératinocytes en monocouche que l'extrait FM de *P.acnes* induit une augmentation de la prolifération des kératinocytes et que les extraits SA et SB ont un effet toxique sur les kératinocytes (Jugeau, 2005, en Annexe). Ces résultats suggèrent qu'au moins un des composants de la paroi de *P.acnes* contenu dans l'extrait FM stimule directement la prolifération des kératinocytes, tandis que des composants internes contenus dans les extraits SA et SB probablement sécrétés par *P.acnes* ont un effet délétère sur les kératinocytes. Ainsi *P.acnes* semble jouer un rôle dès l'étape de

formation du microcomédon à la fois par contact direct avec les kératinocytes et par sécrétion de molécules toxiques.

L'objectif de la première partie de ce travail était de déterminer si *P.acnes* est impliqué dans les anomalies de la différenciation kératinocytaire. Nos expérimentations ont été menées à la fois sur monocouches de kératinocytes (modèle *in vitro*) et sur explants de plastie abdominales (modèle *ex vivo*). L'utilisation de ces deux modèles en parallèle nous permet d'étudier l'effet de *P.acnes* sur l'épiderme dans un contexte proche de l'*in vivo* (explants) et de vérifier ces effets sur le kératinocyte seul (monocouche).

Nous avons montré que les extraits de P.acnes induisent l'expression de l'intégrine $\beta 1$ à la fois par les kératinocytes en monocouches et les explants. L'expression des intégrines $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha V\beta 6$ par les kératinocytes en monocouche n'est pas modifiée en présence des extraits de P.acnes. Sur explants, nous avons observé que l'expression des intégrines $\alpha 3$ et $\alpha 6$ semble être induite par les trois types d'extraits de P.acnes (FM, SA et SB). L'intégrine $\alpha V\beta 6$ semble être induite uniquement en présence de SA et SB, ce qui serait en accord avec les résultats obtenus avant à mon arrivée au laboratoire montrant que les surnageants A et B ont un effet toxique sur les kératinocytes (Jugeau et al, 2005, en Annexe).

de patients acnéiques au niveau desquels ils ont observé des anomalies de l'expression de l'intégrine $\alpha 3$. Ces auteurs émettent l'hypothèse que ces modifications sont impliquées dans l'hyperprolifération et les

Nos résultats sont en accord avec l'étude de Cunliffe et al, (2000) centrée sur les follicules pilo-sébacés

anomalies de la différenciation kératinocytaire qui sont associés au développement du microcomédon.

La filaggrine est un marqueur de la différenciation terminale des kératinocytes. Nous avons mis en évidence que les extraits de *P.acnes* n'ont aucun effet sur l'expression de la filaggrine sur les kératinocytes cultivés en monocouche. Remarquablement, les extraits de *P.acnes* induisent une expression de la filaggrine par les kératinocytes des couches intermédiaires et basales de l'épiderme sur les coupes d'explants de plasties abdominales. Son expression sur peau normale en l'absence de traitement est localisée au niveau de la couche cornée. Sur coupes de biopsies d'acné, nous avons vérifié

que la filaggrine était exprimée par les couches suprabasale de l'épiderme. Ces marquages ont été réalisés à l'aide d'un anticorps commercial pouvant interagir également avec le précurseur de la filaggrin : la profilaggrin de masse moléculaire beaucoup plus importante.

Afin de confirmer notre étude sur l'expression de la filaggrine/profilaggrine induite par les extraits de *P.acnes* nous avons réalisé des western-blot à l'aide de deux anticorps non commerciaux fournit gracieusement par M.Simon, Toulouse (Simon et al, 1995). L'anticorps AHF2 (anti-human fillagrin 2) interagit à la fois avec la filaggrine (MM: 38 kDa) et la profilaggrine (MM: 400 kD) tandis que l'anticorps AHF7 (anti-human filaggrin 7) reconnaît spécifiquement la filaggrine. Ainsi nous avons montré que la quantité totale de filaggrine est augmentée dans les explants incubés pendant 3h ou 24h avec les extraits de *P.acnes* par comparaison avec le milieu contrôle.

Notre étude est focalisée sur la réponse des kératinocytes en présence de *P.acnes*. Dans une étude centrée sur l'expression des cytokeratines et de la filaggrine dans les follicules pilosébacés de patients acnéiques, Kurukawa et al, (1988), ont montrés que la répartition de la filaggrine était modifiée par rapport aux follicules de peaux saines. Ils ont également observé en microscopie électronique une augmentation du nombre de granules de kératohyaline (stockage de la profilaggrine) dans la peau de patients acnéiques.

Dans cette étude nous montrons que *P.acnes* induit des modifications de l'expression des intégrines et de la filaggrine. Récemment nous avons également montré que la fraction FM de *P.acnes* induit une augmentation de la prolifération des kératinocytes confirmé à la fois par un test MTT et un immunomarquage avec le marqueur de prolifération Ki67.

Il apparaît que l'effet inducteur potentiel de P. acnes sur les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\alpha V\beta 6$ et sur la filaggrine ne peut se manifester que dans un modèle de peau reproduisant la peau normale (explants). L'hyperprolifération, les anomalies de la différenciation des kératinocytes associées à des modifications de l'expression des intégrines sont connues pour être impliqués dans la formation du microcomédon.

En conclusion, nos résultats suggèrent que *P.acnes* est impliqué dans la formation du micromédon. Cette bactérie semble être un élément clef dans la physiopathologie de l'acné et constitue une cible thérapeutique cruciale dans le traitement des lésions débutantes de l'acné.

Il serait intéressant de poursuivre ce travail par l'étude (en immunohistochimie) de marqueurs de différenciation de l'épiderme complémentaires : cytokératine 1 et 10, involucrine, transglutaminase 1. Cependant , deux études (Kurukawa et al, 1988) (Hughes et al, 1996) centrées sur le follicule pilosébacé montrent que l'expression des cytokératines (K1, K10) n'est pas modifiée dans l'épiderme des patients acnéiques étudiés. Afin de compléter nos résultats obtenus au niveau protéomique, il serait intéressant de réaliser une analyse transcriptionnelle de l'expression des intégrines et de la filaggrine.

Préalablement à mon arrivée au laboratoire, il a été mis en évidence que l'expression des TLR2 et TLR4 par les kératinocytes en monocouche est augmentée en présence des extraits de *P.acnes* (Jugeau et al, 2005, en Annexe). Au cours de cette étude, il a également été montré que TLR2 est clairement surexprimé dans les lésions d'acné mais pas TLR4. *P.acnes* est une bactérie GRAM positive et possède des motifs susceptibles d'être reconnu par les TLR2. Ces faits suggèrent fortement que *P.acnes* joue un rôle central dans l'induction et le maintien de la phase inflammatoire de l'acné en activant TLR2. Nous avons choisi de centrer la deuxième partie de notre travail sur la physiopathologie de l'acné en étudiant la modulation de l'expression de TLR2 par le zinc.

Nous avons utilisé pour nos expérimentations les deux modèles d'inflammation cutanés précédemment décris. Nous avons montré que dans le modèle *ex vivo* (explants), les TLR2 sont surexprimés en présence des composés bactériens.

L'activation des TLR2 par un composant bactérien conduit à la translocation du facteur NF-kB et à la sécrétion de cytokines proinflammatoires dont l'interleukine-8 (Nagy et al, 2005).

La pluralité du mode d'action anti-inflammatoire du zinc dans le traitement de l'acné inflammatoire minime à modérée n'est que partiellement connu.

Le but de cette étude est de déterminer si les effets anti-inflammatoires du zinc peuvent s'expliquer en partie par une diminution de l'expression des TLR2 kératinocytaires et donc de déterminer si le zinc joue un rôle dans la modulation de l'immunitée innée.

Nous avons montré *in vitro* et *ex vivo* que le zinc (1µg/ml, 3h d'incubation) régule négativement l'expression des TLR2 par les kératinocytes préalablement stimulés soit par du LPS (1µg/ml, 6h) soit par l'extrait FM de *P.acnes*. Ces faits suggèrent fortement que *P.acnes* joue un rôle central dans l'induction et le maintien de la phase inflammatoire de l'acné en activant TLR2.

Nos résultats confirment que *P.acnes* est bien un inducteur de l'expression de TLR2. Il est à noter que seul l'extrait FM contenant les éléments de la paroi bactérienne induit une augmentation de l'expression de TLR2, tandis les extraits SA (contenant les proteines cytosoliques) et SB (riche en proteines membranaires) sont sans effet sur l'expression de TLR2. Ces résultats suggèrent que l'effet inducteur de *P.acnes* sur l'expression de TLR2 est associé à au moins une des molécules contenue dans l'extrait FM, il semble donc que l'effet inducteur de *P.acnes* nécessite un contact avec les kératinocytes.

Le zinc dans le traitement de l'acné agit essentiellement sur les lésions inflammatoires. Son action antiinflammatoire est médiée par de nombreux mécanismes :

- inhibition du chemotactisme des polynucléaires (Chapvil et al, 1977);
- inhibition de la croissance de *P.acnes* ;
- diminution de l'expression du TNFα et de l'interleukine-6 (Sainte-Marie et al, 1998) ;
- modulation de l'expression des intégrines, de ICAM-1 et LFA-3 (Gueniche et al, 1995);
- modulation la 5α-reductase (enzyme intervenant dans la transformation de la testosterone) (Sugimoto et al, 1995).

Nos résultats suggèrent que nous pouvons ajouter l'inhibition de l'expression des TLR2 a cette liste, en effet nous avons montré que le zinc diminue l'expression de TLR2 par les kératinocytes préalablement stimulé par l'extrait FM de *P.acnes*.

Mise en forme : Puces et numéros

L'activation de TLR2 déclenche la voie d'activation MyD88 dépendante qui conduit à l'activation précoce du facteur de transcription NF-kB qui active la transcription de nombreux gènes de cytokines pro-inflammatoires. Nos résultats de western-blot montrent que l'expression totale de NF-kB n'est pas modifiée en présence des extraits de *P.acnes* et /ou du zinc. Environ 2000 facteurs de transcription ont besoin du zinc pour leur intégrité structurelle. Les études portant sur le rôle du zinc dans l'activation de NF-kB dans différents types cellulaires sont contradictoires. Prasad et al, (2001) ont montrés sur des cellules non épithéliales déficiente en zinc (HUT-78) que la phosphorylation de IkB et Ikk, ainsi que l'ubiquination IkB et la liaison de NF-kB à l'ADN sont significativement diminué. De plus le zinc stimule la translocation de NF-kB vers le noyau. Les auteurs en concluent que le zinc joue un rôle dans l'activation de NF-kB dans les cellules de la lignée HUT-78. Au contraire, Uzzo et al, (2006) démontrent que la suplémentation en zinc dans des cellules cancéreuses de la prostate induit la phosphorylation des MAPK qui régulent l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF-kB et bloque la translocation de RelA vers le noyau. Ils ont également montré que le traitement de ces cellules avec le zinc diminue l'expression de l'interleukine-6, de l'interleukine-8, MMP9 et ICAM-1.

Nos résultats montrent que le zinc n'a pas d'effet sur l'expression de NF-κB dans les kératinocytes , ce qui nous amène à émettre l'hypothèse que l'effet du zinc sur l'activation de NF-κB diffère d'un type cellulaire à l'autre. Nous avons confirmé par dosage ELISA que l'extrait FM de *P.acnes* induit la sécrétion de l'interleukine-8 par les kératinocytes normaux humains en monocouche. Le zinc à la concentration de 1μg/ml n'a pas d'effet modulateur sur cette sécrétion. Le dosage de l'interleukine-8 dans le surnageant de culture des explants montre un taux basal très élevé de cette cytokine (probablement dû à la sécrétion de cette cytokine par d'autres types cellulaires) et qui pourrait expliquer l'absence d'effets des extraits de *P.acnes*. L'induction de la sécrétion de l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-12 par des monocytes suite à une activation de TLR2 par *P.acnes* à été montré par un autre groupe (Kim et al, 2002). Nagy et al, (2005) ont montrés que la sécrétion d'interleukine-8 par les kératinocytes préalablement activés par *P.acnes* est dépendant à la fois de TLR2 et TLR4. De plus ces auteurs ont

montré en incubant des kératinocytes en monocouche avec 4 souches différentes de *P.acnes* que l'expression de l'ARNm de l'IL-8 était significativement augmenté et que l'expression du gène correspondant pouvait être inhibée par l'utilisation d'anticorps anti-TLR2 et anti-TLR4 bloquant. En conclusion nous démontrons pour la première fois que le zinc inhibe l'expression de TLR2 par les kératinocytes préalablement activés par l'extrait FM de *P.acnes* ou le LPS (1µg/ml). Cette inhibition semble être indépendante de l'expression de NF-κB et n'est pas liée à une inhibition de la sécrétion de l'IL-8.

L'étude de l'expression de NF-kB à été réalisée sur des extraits de protéines totales, il serait intéressant de faire cette expérimentation sur des extraits nucléaires et de compléter l'étude de l'activation de ce facteur de transcription par gène rapporteur.

Il serait intéressant de poursuivre l'étude de la sécrétion de l'IL-8 en présence des extraits de *P.acnes* en utilisant des anticorps anti-TLR2 bloquant. Nous n'avons pas reussi à mettre au point cette expérimentation sur explants, la mise au point sur les kératinocytes en monocouche semble plus abordable, en effet l'accessibilité des TLRs kératinocytaires est sûrement réduite au niveau des explants. Enfin une analyse transcriptionnelle de TLR2 et de l'IL-8 apporterait des résultats complémentaires intéressants.

Dans le cadre de nos recherches portant sur la physiopathologie de l'acné nous nous sommes intéressés dans une première partie au rôle potentiel de *P.acnes* sur la différenciation des kératinocytes. Dans une deuxième partie nous avons recherché l'effet potentiel du zinc sur l'inflammation cutanée provoquée par des composants de *P.acnes*. Nos résultats suggèrent que *P.acnes* induit des anomalies de la différenciation et stimule la prolifération des kératinocytes. Le zinc semble avoir une action inhibitrice sur l'expression de TLR2 mais qui ne se traduit pas par une diminution de la sécrétion de la cytokine IL-8.

Le fil conducteur de notre travail de thèse a été centré sur les interactions entre les kératinocytes et un agent infectieux et nous a permis de montrer que les extraits de *P.acnes* ont un effet inducteur sur l'expression des TLR2 kératinocytaire principalement et dans une moindre mesure sur TLR4. Ces résultats nous ont amenés à nous demander si nous pouvions retrouver cette activation des TLRs dans une autre pathologie cutanée ou un agent infection est suspecté: les lymphomes cutanés T épidermotropes (LCTE).

L'objectif de cette étude complémentaire était d'étudier une nouvelle voie d'activation potentielle des lymphocytes T dans les LCTE. Nous avons recherché l'expression des TLR2, 4 et 9 par les keratinocytes au sein de lésions cutanées de LCTE à différents stades de la maladie: parapsoriasis en grandes plaques, MF (stade I et II) et SS (stade III).

Par immunomarquage, nous avons montrés que l'expression kératinocytaires de TLRs 2, 4 et 9 en peaux inflammatoires (dermatite atopique et psoriasis) est identique a celle observée sur peaux saines. Nos résultats corroborent ceux de la littérature : par exemple, Curry et al, (2003) en effet ces auteurs ont montrés que TLR2 est faiblement exprimé par les kératinocytes de la couche basale, que TLR4 est exprimé par les kératinocytes de la couche supra-basale et que TLR9 est faiblement ou pas du tout exprimés au niveau dermique et épidermique. Concernant la dermatite atopique, Ong Y, (2006) montre que la reconnaissance de Staphylococcus par l'immunité innée est défectueuse en cas de dermatite atopique, il emet l'hypothèse que la faible expression de hBD-2 observée au cours de cette pathologie est due a un défaut d'expression de TLR2. Dans le cas du psoriasis, les kératinocytes de la couche basale exprime fortement TLR1 mais pas TLR2, ni TLR4 ou TLR9. Il est a noter qu'un autre groupe a montré sur peau saine que TLR2 est exprimé constitutivement tandis que TLR4 est dans la plupart des cas indetectable et que sur peaux psoriasique l'expression de TLR2 est plus importante au niveau de la couche granulaire tandis que l'expression de TLR4 est identique a celle observée sur peau saine.

Nous avons montrés que l'expression des trois TLRs dans le parapsoriasis est faible et similaire a celle que nous avons observé sur peaux saines. Remarquablement, sur biopsies de patients atteint de MF, nous

avons observé une augmentation significative de l'expression de TLR2, TLR4 et TLR9. De plus il semble que l'expression de TLR2 et TLR4 augmente en corrélation avec le stade de MF. Concernant le syndrome de Sézary, l'expression des trois TLRs est intermediaire entre celle observée sur peaux saine et celle observée sur peaux de MF. Nos observations peuvent être corrélée aux profils cytokiniques des lymphomes cutanés T épidermotrope, en effet Saed et al, (1994) ont démontré que les lésions cutanées de MF sont caractérisée par un profil cytokine de type Th1 tandis que les lésions cutanés et le sang des patients atteint de syndrome de Sézary présentent un profil cytokinique de type Th2. De plus, Schnare et al, (2001) ont montrés que l'activation de l'immunité spécifique et l'induction des effecteurs de la réponse Th1 nécessite une activation préalable des TLRs tandis que les effecteurs de la réponse de type Th2 semblent être indépendant de l'activation des TLRs.

L'activation des TLRs conduit à l'activation du facteur de transcription NF-κB et par conséquent la transcription de nombreux gènes pro-inflammatoires. TLR2, TLR4 et TLR9, déclenchent la voie de signalisation MyD88 dépendante et donc l'activation précoce de NF-κB qui permet la transcription de cytokines pro-inflammatoires. Cependant TLR4 peut également déclencher la voie de signalisation MyD88 indépendante qui active IRF-3 puis l'activation tardive de NF-κB ce qui abouti finalement à la production d'INF-β et à l'expression de gène INF inductibles.

Izban et al, (2000) ont montrés que l'activation constitutive de NF-κB par les cellules neoplasiques de LCTE est une caractéristique des biopsies de peaux MF qu'ils ont testés avant mise en place du traitement. Il est à noter que les auteurs ont également observé que NF-κBp65 (RelA) était activés dans les kératinocytes et qu'ils expliquent cette activation par la sécrétion de cytokines par les cellules neoplasiques de MF.

Nos résultats nous amènent à emettre une autre hypothèse : l'activation de NF-kB observé dans les kératinocytes pourrait être la conséquence de l'activation de TLR2, TLR4 et TLR9. En effet, nous avons montrés que l'expression de ces trois TLRs par les kératinocytes est augmentée dans la peau de MF. Il est a souligner que nous avons vérifié par double marquage que les lymphocytes T (CD3+ et CD4+) ne

sont pas impliqués dans l'augmentation de l'expression de TLR2. Toutefois nos résultats ne nous permettent pas d'exclure que les cellules de Langerhans participent en partie à cette augmentation.

Les recepteurs Toll-like 2, 4 et 9 peuvent être activés par des antigènes viraux, en particuliers, TLR4 reconnaît le RSV (respiratory syncytial viruses) et des infections retrovirales, TLR2 et TLR9 sont impliqués dans la reconnaissance des virus de la famille des Herpes. Kurt-Jones et al, (2004) ont montrés que la réponse à HSV1 faisait intervenir TLR2 et la sécrétion de cytokines inflammatoires qui semblent avoir dans ce cas des conséquences négatives pour l'organisme.

Les Herpes constituent une famille de virus qui cause une inflammation chronique qui pourrait être reliée à l'activation des TLRs2, 4 et 9 par ces virus. Nous avons montré que les kératinocytes des patients LCTE expriment des proteines EBV ainsi que la présence de protéines EBV dans les cellules de Langerhans. Les patients atteints de LCTE développent très fréquemment des infections sévères de type Herpes. Eliopoulos et al, (1997) ont montrés que l'expression stable ou transitoire de la proteine membranaire de latence 1 (LMP1) dans des kératinocytes SV40 transformés induit une sécrétion d'IL-6 après activation de NF-κB.

L'ensemble de nos résultats nous amène à émettre l'hypothèse suivante concernant la réaction inflammatoire observée dans la peau de MF: les virus de famille Herpes (EBV, HSV) activent TLR2, TLR4 et TLR9 dont l'expression par les kératinocytes est augmentée sur peaux de MF conduisant à l'activation du facteur de transcription NF-kB. L'activation de la voie des TLRs induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui pourraient contribuer à maintenir l'activation chronique de l'infiltrat CD4+ dans les lésions épidermiques de LCTE.

En conclusion, nous avons démontré que l'expression des TLRs 2,4 et 9 est augmenté dans les lésions épidermique de MF. Leur activation pourrait jouer un rôle dans l'induction et la maintenance de l'infiltrat de lymphocyte T dans les lésions épidermiques de MF et de SS.

Ce travail à été réalisé sur des biopsies de patients avant mise en place du traitement (T0), il serait intéressant de compléter cette étude en étudiant les effets de différents traitements (Puvathérapie, Interferon) sur les profils d'expression des TLR 2, 4 et 9.

Matériel et Méthodes

A. Matériel

1. Modulateurs

Lipopolysaccharide (LPS)

Nous avons utilisé du LPS de *Escherichia Coli* (souche 0111 :B4), commercial (Sigma, St Louis, USA). Après reconstitution dans 1 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline), nous avons obtenu une solution mère de LPS à la concentration de 1mg/ml.

• Propionibacterium acnes

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

Le surnageant A (SA) et le culot C sont obtenus après centrifugation de la culture bactérienne, puis plusieurs cycles de congélation/décongélation et enfin centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min. Le surnageant B (SB) est obtenu après une deuxième centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min, le culot restant constitue l'extrait fraction membranaire (FM). L'extrait FM est reconstitué en remettant en suspension le culot dans du Keratinocyte Basal Medium sans hydrocortisone (KBM-HC) (Promocell, Heidelberg, Allemagne) complémenté avec 0,1 ng/ml d' EGF, 0,4% de BPE, 5 μg/ml d' insuline, 0,09 mM de calcium, 50 μg/ml de gentamycine et 50 ng/ml d' amphotéricine-B (KGM-HC).

<u>Répartition des compartiments cellulaires dans les 3 fractions (FM, SA et SB)</u>: la paroi et la membrane cytoplasmique (peptidoglycane et acide lipotéicoïque) se retrouvent après cassure par choc thermique dans le culot C (FM) et une faible proportion des éléments les plus légers dans le surnageant B. Le

surnageant A contiendrait les éléments du cytosol (enzymes..). A ce jour, la composition exacte (détermination de la nature et localisation des éléments de la paroi) des trois extraits n'a pas été réalisée.

• Elément trace : le zinc

Le gluconate de zinc nous a été aimablement fourni par Labcatal (Montrouge, France). Le zinc a été dilué dans du KGM- HC (Promocell) pour les expériences réalisées sur les kératinocytes en monocouche et sur les explants cutanés.

Modulateur	Concentrations	Temps d'incubation
Extrait FM de P.acnes	Dilution au 1/2°	3h, 6h et 24h
Extrait SA de <i>P.acnes</i>	Dilution au 1/5°	3h, 6h et 24h
Extrait SB de <i>P.acnes</i>	Dilution au 1/5°	3h, 6h et 24h
LPS	1μg/ml + SVF 10%	6h
Zinc	1μg/ml	3h

<u>Tableau 1</u>: Récapitulatif des modulateurs utilisés dans les expérimentations sur kératinocytes en monocouche et sur explants.

2. Explants cutanés et kératinocytes normaux humains en monocouche

Nous avons utilisé deux modèles d'étude des kératinocytes : les kératinocytes normaux humains en monocouche obtenus à partir de prépuces de donneurs sains et les explants cutanés obtenus à partir de plasties abdominales de donneurs sains.

3. Biopsies de patients

Dans l'étude portant sur l'expression des TLRs dans les LCTE, nous avons utilisé des biopsies de peaux pathologiques fixées au formaldéhyde puis inclues en paraffine afin de réaliser des coupes au microtome.

Nous avons utilisé comme contrôles les biopsies suivantes : peaux saines (n=5), dermatite atopique (n=5) et psoriasis (n=5) et comme biopsies de LCTE, les biopsies suivantes : parapsoriasis (n=6) ; Mycosis fongoïde (n=18) et Syndrome de Sézary (n=19).

Au cours de notre étude sur les interactions entre *P.acnes* et les kératinocytes nous avons utilisé des biopsies cutanées de patients acnéiques qui ont été congelées dans l'azote liquide puis conservées à – 80°C afin de réaliser des coupes au cryostat. Des biopsies de peau saine ont servi de contrôle.

4. Anticorps

Antigène	Clonalité	Origine	Fournisseur	Concentration
Filaggrine	Monoclonal, IgG1	Souris	HarborBio-product	1/500°
			Norwood, USA	
Intégrine $\alpha 3$	Monoclonal, IgG1	Souris	Chemicon,	2μg/ml
			Temecula, USA	
Intégrine α 6	Monoclonal,IgG2a	Souris	Chemicon,	10μg/ml
			Temecula, USA	
Intégrine αVβ6	Monoclonal, IgG1	Souris	Chemicon,	10μg/ml
			Temecula, USA	
Intégrine β1	Monoclonal,IgG2a	Souris	Serotec,	2μg/ml
			Oxford, UK	
TLR2	Polyclonal	Lapin	Tebu	5μg/ml

<u>Tableau 2</u>: Récapitulatif des anticorps utilisés sur les coupes d'explants, sur les kératinocytes en monocouches et sur les coupes de biopsies d'acné (filaggrine et TLR2).

Antigène	Clonalité	Origine	Fournisseur	Concentration
TLR2	Polyclonal	Lapin	Tebu, Le Perray en	4μg/ml
			Yvelines, France	
TLR4	Polyclonal	Lapin	Tebu, Le Perray en	4μg/ml
			Yvelines, France	
TLR9	Polyclonal	Chèvre	Tebu, Le Perray en	4μg/ml
			Yvelines, France	

<u>Tableau 3</u>: Récapitulatif des anticorps utilisés sur les coupes de biopsies en paraffine.

Antigène	Clonalité	Origine	Fournisseur	Concentration
Non humain	Monoclonal, IgG1	Souris	Dako,	
			Trappes, France	-
Non humain	Monoclonal,IgG2a	Souris	Dako,	
			Trappes, france	-

<u>Tableau 4</u>: Récapitulatif des anticorps isotypes irrelevants utilisé comme témoins négatifs

Antigène	Clonalité	Origine	Fournisseur	Concentration
TLR2	Polyclonal	Lapin	Tebu, Le Perray en	1/3°
			Yvelines, France	
CD3	Monoclonal, IgG1	Souris	Dako, Trappes, France	1/5°
CD4	Monoclonal, IgG1	Souris	Dako, Trappes, France	1/5°
CD1a	Monoclonal, IgG1	Souris	BeckmanCoulter, Marseille, France	Prêt à l'emploi

<u>Tableau 5</u>: Récapitulatif des anticorps utilisés en double marquage sur des coupes au cryostat de biopsies de patient atteint de MF.

Antigène	Clonalité	Origine	Fournisseur	Concentration
Filaggrine	Monoclonal, IgG1	Souris	M.Simon	1/2500°
			Toulouse, france	
Filaggrine	Monoclonal, IgG1	Souris	M.Simon,	1/2500°
profilaggrine			Toulouse, France	
NF-κB	Polyclonal	Lapin	Tebu	1/1000°

<u>Tableau 6</u>: Récapitulatif des anticorps utilisé au cours des expérimentations de Western-blot.

B. Méthodes

1. Culture de kératinocytes normaux humains en monocouches

Les kératinocytes normaux humains ont été obtenus à partir de prépuces de donneurs sains provenant du service de chirurgie infantile du CHU de Nantes. L'hypoderme et le derme profond ont été retirés avant de découper le prélèvement en morceaux de 1 mm² et de les incuber une nuit à 4°C dans de la trypsine 2X (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Le lendemain, l'épiderme et le derme ont été séparés à l'aide de pinces fines et l'action de la trypsine sur les morceaux d'épiderme a été inhibée par addition de DMEM (Dubelcco's modified eagle medium) (BioWhittaker, Emerainville, France) supplémenté avec

10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les kératinocytes qui se sont détachés des morceaux d'épiderme ont été centrifugés à 1500 tours par minute (rpm) pendant 7 min. Le culot cellulaire a ensuite été repris dans du KSFM (Keratinocyte Serum-Free Medium) (Invitrogen) complémenté avec 5 ng/ml d'EGF (Epidermal Growth Factor) (Invitrogen), 25 μg/ml de BPE (Bovine Pituitary Extract) (Invitrogen), 2,5 μg/ml de Fungizone (Bristol-Myers Squibb, Paris, France) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (Sigma) puis les cellules ont été ensemencées en flacons de 25 cm², à la densité de 40 000 cellules/cm². La culture a été réalisée à 37°C, en atmosphère humide et en présence de 5 % de CO₂. Le milieu de culture a été renouvelé tous les 2 à 3 jours. Dans le but de détacher les kératinocytes de leur support de culture primaire, ils ont été incubés avec du PBS/EDTA (Phosphate Buffer Saline / Ethylenediaminetetraacetic acid) pendant 7 min puis avec de la trypsine 1X pendant 2 minutes. Lors des passages successifs, les kératinocytes ont été ensemencés à la densité de 15 000 cellules/cm² dans des flacons de 75 cm². Pour l'ensemble des expériences, les cellules ont été utilisées après un nombre restreint de passage (n = 2).

2. Culture d'explants cutanés

Les explants cutanés ont été réalisés à l'aide de « biopsy punches » de 4mm de diamètre sur des plasties abdominales considérées comme un modèle de peau saine. Les explants ont ensuite été incubés à 37°C dans une atmosphère humide en présence de 5% CO2, en présence du modulateur (Tableau 1) dans du Keratinocyte basal medium sans hydrocortisone (KGM-HC) (Promocell, Heidelberg, Germany). Après incubation, les explants sont retirés du milieu de culture, rincés puis congelés dans l'azote liquide et conservés -80°C.

3. Immunohistochimie

a) Préparation des lames à partir d'explants cutanés

Les coupes au microtome de 5µm d'épaisseur des biopsies inclues en paraffine ont été préalablement déparaffinées dans du toluène (2 fois 5 min). Le toluène a ensuite été ôté par passage des lames dans deux bains successifs de 5 min dans de l'alcool absolu, puis les lames ont été progressivement réhydratées dans des bains successifs (5 min) d'alcool (70%, 50%, 30%) et d'eau.

Les coupes au cryostat de biopsies et d'explants congelés ont été fixées à l'acétone pendant 10 minutes.

b) Préparation des lames à partir des kératinocytes en monocouche

Les kératinocytes de trois donneurs différents ont été ensemencés à la densité cellulaire de 10 000 cellules/puits en Lab-teks 8 puits Permanox (VWR International, Pessac, France) dans du KBM avec hydrocortisone. Le milieu a été remplacé par du KBM sans hydrocortisone 24h avant le début de l'expérience puis les kératinocytes ont été mis en présence des différents modulateurs (Tableau 1).

c) Immunomarquage

Les sites non spécifiques ont été saturés pendant 30 min avec du TBS (Tris-Buffered Saline) Tween20 0,05% p/v (Sigma), BSA 0,1% p/v (Bovine Serum Albumin) (Sigma). L'anticorps primaire a été déposé à la dilution appropriée (Tableau 2 et 3) sur les lames pendant 30 min en milieu humide et à température ambiante. Un anticorps IgG irrelevant de même isotype que l'anticorps primaire (Tableau 4) a été utilisé comme témoin négatif. Des rinçages de 15 min ont été effectués entre chaque étape avec la solution de TBS/BSA 0,1%/Tween20 0,05%. Les lames ont été incubées successivement avec l'anticorps secondaire biotinylé (DAKO ChemTek detection kit peroxydase/AEC, Rabbit/Mouse) (30min) puis avec la Streptavidine couplée à la peroxydase (30min) avant de déposer l'AEC (3-amino-9-éthylcarbazole; substrat de la Péroxydase), pendant 5 min. La réaction a été stoppée par l'eau distillée

(10min) et la contre coloration faite à l'Hémalun de Mayer (VWR International) pendant 1 min environ.

Les lames ont été rincées à l'eau distillée, puis montées en milieu aqueux (GelTol Aqueous Mounting Medium, Immunotech, Marseille, France).

d) Lecture des lames

La lecture des lames a été réalisée par 2 personnes différentes et l'appréciation du marquage a été estimée selon quatre niveaux d'intensité: marquage nul (-), marquage faible (+), marquage moyen (++) et marquage fort (+++).

4. Double marquage

L'expérimentation de double marquage a été réalisée sur des coupes sériées fixées dans l'acétone pendant 10 minutes à 4°C. Les lames ont été incubées 15 min dans du phosphate buffered saline (PBS), bovine serum albumin (BSA) 0.1% (Sigma, St Louis, USA) afin de saturer les sites non spécifiques puis incubées en présence du premier anticorps primaire anti-TLR2 H-175 polyclonal antibody (TEBU, Le peray-en-Yvelines, France) dilué 1/3°. Les lames ont été ensuite rincées puis incubées pendant 30 min avec le fragment F(ab') de chèvre anti IgG de lapin (H+L) couplé FITC (Beckman Coulter, Marseille, France) dilué au 1/10° puis rincées et incubées en présence de sérum normal de chèvre dilué au 1/10° pendant 30 min (saturation des sites non spécifiques). Après rinçage puis incubation pendant 30 min avec le second anticorps primaire CD3 ou CD4 (DAKO, Trappes, France) dilué 1/5° ou CD1a (Beckman Coulter, Marseille, France) prêt à l'emploi , les lames ont été rincées puis incubées pendant 30 min avec le fragment F(ab')₂ de chèvre anti IgG de souris (H+L)-Biotin (Beckman Coulter, Marseille, France) dilué au 1/40°. Les lames ont ensuite été rincées puis incubées en présence de Streptavidine-PEtexas Red (Sav-PE-TxR) Conjugate (BD Biosciences, Le Pont De Claix, France). Après un dernier rinçage, les lames ont été montées en milieu aqueux (GelTol Aqueous Mounting Medium, Immunotech, Marseille, France) et enfin observées à l'aide d'un microscope Leitz ARISTOPLAN en utilisant un laser

à la longueur d'onde de 450-470nm. Les photographies ont été prises grâce à un appareil numérique (D70S, Nikon) avec un temps d'exposition de 8 secondes.

5. Dosage de l'interleukine-8 par ELISA

L'ELISA permet le dosage de protéines dans les liquides biologiques et les surnageants de culture. Un dosage immuno-enzymatique de type « sandwich » est utilisé, caractérisé par l'utilisation de deux anticorps dirigés contre la molécule à doser. Le premier anticorps, dit de fixation, permet la capture de l'antigène. Le second, dit de révélation, est couplé à une enzyme, la péroxydase qui catalysera une réaction colorée. La quantité d'enzyme fixée est alors proportionnelle à celle de la protéine d'intérêt dans l'échantillon. L'intensité de coloration sera mesurée par une lecture de la DO et comparée à une courbe étalon établie en parallèle.

La quantité d'interleukine-8 contenue dans les surnageants de culture d'explants et de monocouche quantifiée a l'aide d'un kit ELISA commercial (BD Biosciences, le Pont de Claix, France), utilisé selon les instructions du fournisseur.

6. Western-blot

Cette technique permet de détecter une protéine spécifique dans un échantillon. Les protéines sont séparées sur gel de polyacrylamide grâce à un champ électrique. Pour annuler les différences de charge et les séparer uniquement en fonction de leur poids moléculaire, les protéines sont saturées avec du SDS, molécule chargée très négativement. Une fois séparées, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à un champ électrique. La protéine d'intérêt est ensuite révélée à laide d'un Ac spécifique qui sera reconnu par un Ac secondaire couplé à la péroxydase. Une réaction de chimioluminescence permettra la visualisation de la protéine d'intérêt grâce à un film photographique.

a) Extraction protéique

Les extraits protéiques obtenus à partir des explants cutanés incubés en milieu contrôle ou en présence des modulateurs (extraits de *P.acnes*, zinc) ont été réalisés à l'aide d'un kit (Sample griding Kit, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) utilisé en suivant les instructions du fournisseur. Puis le dosage de la quantité totale en protéine contenue dans nos extraits à été réalisé à l'aide d'un kit (BCA protein Assay Kit, Pierce, Rockford, USA) utilisé en accord avec les instructions du fournisseur.

b) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

L'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes. Les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes dans du bleu Laemmli 1X en présence de β2-mercaptoéphanol. Les échantillons sont déposés en quantité de protéines totales équivalentes sur les gels de SDS-polyacrylamide (15%). La migration des échantillons et du marqueur de poids moléculaire recombinant (BioRad, Marne la Coquette, France) par électrophorèse a été effectuée à 200V constant sur un Mini-protean III (BioRad) pendant 1h. Le tampon de migration est constitué de 25 mM de Tris (pH 8,3), 192 mM de Glycine et 0,1%(w/v) de SDS.

c) Transfert des protéines

Après migration, les gels et les éponges de transfert sont équilibrés dans le tampon de transfert contenant 25 mM de Tris (pH8,3), 192 mM de Glycine et 20% de méthanol pendant 1 heure. Les membranes de polyvinylidène difluoride (PVDF, Immobilon P, Millipore) ont été préalablement activées 15 secondes dans du méthanol avant d'être équilibrées dans le tampon de transfert. Après préparation du « sandwich » de transfert, les protéines ont été transférées du gel sur la membrane de PVDF sous un voltage constant de 100V pendant 1h en système réfrigéré (Mini Transblot, BioRad).

d) Immunodetection des proteines

Après transfert, les membranes ont été lavées en TBS 1X avant d'être saturées une nuit à 4°C dans du TBS 1X-Tween 20 0,05% (TBS-T). Le lendemain, les membranes ont été lavées trois fois 15 minutes dans un mélange TBS-T à température ambiante. Ce tampon a été utilisé pour toutes les autres étapes intermédiaires de lavage. Les membranes ont été incubées pendant 2h avec l'anticorps primaire (Tableau 6) dilué dans TBS-T. L'anticorps secondaire (anti-souris/anti-lapin couplé à la péroxydase, BM chemiluminescence kit, Roche Diagnostic GmbH, Indianapolis, IN) a ensuite été dilué au 1/12500 et incubé avec les membranes pendant 1h à température ambiante. Enfin, la révélation a été effectuée en incubant le substrat de la péroxydase (kit BM) pendant 1 minute à température ambiante avec les membranes.

7. Analyse statistique

Nous avons utilisé dans la partie étude des interactions entre *P.acnes* et les kératinocytes, un test de comparaison des moyennes : le test de Student. Nos résultats sont exprimés en moyenne +/- la déviation standard obtenue à partir de n explants ou n cultures de kératinocytes en monocouche. La comparaison est faite par rapport au contrôle que sont les explants ou les kératinocytes traités dans les mêmes conditions que nos tests mais sans les modulateurs.

Dans la partie étude de l'expression des TLRs dans les LCTE nous avons utilisé un test de comparaison de pourcentage : le test du Khi2.

Dans les deux cas, nous avons considéré comme significatif p < 0,05.

Réferences

- Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." Nature **406**(6797): 782-7.
- Akdis, M., S. Klunker, et al. (2000). "Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on human CD4(+) and CD8(+) Th2 cells." <u>Eur J Immunol</u> **30**(12): 3533-41.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol 4(7): 499-511.
- Berg, J. M. and Y. Shi (1996). "The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc." Science **271**(5252): 1081-5.
- Braga, V. M., N. Hajibagheri, et al. (1998). "Calcium-induced intercellular adhesion of keratinocytes does not involve accumulation of beta 1 integrins at cell-cell contacts and does not involve changes in the levels or phosphorylation of catenins." <u>Cell Adhes</u> Commun **5**(2): 137-49.
- Bruggemann, H., A. Henne, et al. (2004). "The complete genome sequence of Propionibacterium acnes, a commensal of human skin." <u>Science</u> **305**(5684): 671-3.
- Chvapil, M., L. Stankova, et al. (1977). "Inhibition of some functions of polymorphonuclear leukocytes by in vitro zinc." <u>J Lab Clin Med</u> **89**(1): 135-46.
- Coudray, C., S. Rachidi, and A. Favier. 1993. Effect of zinc on superoxide-dependent hydroxyl radical production in vitro. *Biol Trace Elem Res* 38:273.
- Crea, T., V. Guerin, F. Ortega, and P. Hartemann. 1990. [Zinc and the immune system]. *Ann Med Interne (Paris)* 141:447.
- Cunliffe, W. J., D. B. Holland, et al. (2000). "Comedogenesis: some new aetiological, clinical and therapeutic strategies." <u>Br J Dermatol</u> **142**(6): 1084-91.
- Curry, J. L., J. Z. Qin, et al. (2003). "Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin." Arch Pathol Lab Med 127(2): 178-86.
- Dale, B. A. (1985). "Filaggrin, the matrix protein of keratin." Am J Dermatopathol 7(1): 65-8.

- Dreno, B., D. Moyse, et al. (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 203(2): 135-40.
- Dreno, B., J. F. Stalder, C. Pecquet, H. L. Boiteau, and H. Barriere. 1984. Variations in cutaneous zinc concentrations after oral administration of zinc gluconate.

 Acta Derm Venereol 64:341.
- Dreno, B., P. Amblard, et al. (1989). "Low doses of zinc gluconate for inflammatory acne."

 Acta Derm Venereol 69(6): 541-3.
- Dreno, B., P. Celerier, et al. (1994). "Presence of Epstein-Barr virus in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sezary syndrome." Acta Derm Venereol **74**(5): 355-7.
- Edelson, R. L. (1980). "Cutaneous T cell lymphoma: mycosis fungoides, Sezary syndrome, and other variants." <u>J Am Acad Dermatol</u> **2**(2): 89-106.
- Edelson, R. L. (1980). "Cutaneous T-cell lymphoma." J Dermatol Surg Oncol 6(5): 358-68.
- Eliopoulos, A. G., M. Stack, et al. (1997). "Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors." Oncogene **14**(24): 2899-916.
- Froy, O. (2005). "Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptordependent and independent signalling pathways." Cell Microbiol **7**(10): 1387-97.
- Gingras, S., C. Turgeon, et al. (2003). "Characterization and modulation of sex steroid metabolizing activity in normal human keratinocytes in primary culture and HaCaT cells." <u>J Steroid Biochem Mol Biol</u> **87**(2-3): 167-79.
- Graham, G. M., M. D. Farrar, et al. (2004). "Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with Propionibacterium acnes and P. acnes GroEL." <u>Br J Dermatol</u> **150**(3): 421-8.

- Gueniche, A., J. Viac, et al. (1995). "Protective effect of zinc on keratinocyte activation markers induced by interferon or nickel." <u>Acta Derm Venereol</u> **75**(1): 19-23.
- Guy, R. and T. Kealey (1998). "The effects of inflammatory cytokines on the isolated human sebaceous infundibulum." <u>J Invest Dermatol</u> **110**(4): 410-5.
- Hanada, K., T. Hada, S. Satoh, I. Hashimoto, and Y. Katabira. 1984. Electron microscopic observation of dyskeratotic cells in acquired zinc deficiency. J Dermatol 11:322.
- Haynes, L. M., D. D. Moore, et al. (2001). "Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus." <u>J Virol</u> **75**(22): 10730-7.
- Horrobin, D. F., and S. C. Cunnane. 1980. Interactions between zinc, essential fatty acids and prostaglandins: relevance to acrodermatitis enteropathica, total parenteral nutrition, the glucagonoma syndrome, diabetes, anorexia nervosa and sickle cell anaemia. *Med Hypotheses* 6:277.
- Hughes, B. R., C. Morris, et al. (1996). "Keratin expression in pilosebaceous epithelia in truncal skin of acne patients." Br J Dermatol **134**(2): 247-56.
- Irvine, A. D., and W. H. McLean. 2006. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 126:1200.
- Izban, K. F., M. Ergin, et al. (2000). "Constitutive expression of NF-kappa B is a characteristic feature of mycosis fungoides: implications for apoptosis resistance and pathogenesis."

 Hum Pathol 31(12): 1482-90.
- Jeremy, A. H., D. B. Holland, et al. (2003). "Inflammatory events are involved in acne lesion initiation." <u>J Invest Dermatol</u> **121**(1): 20-7.
- Jugeau, S., I. Tenaud, et al. (2005). "Induction of toll-like receptors by Propionibacterium acnes." Br J Dermatol **153**(6): 1105-13.
- Jumbou, O., C. Mollat, et al. (1997). "Increased anti-Epstein-Barr virus antibodies in

- epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma: a study of 64 patients." <u>Br J Dermatol</u> **136**(2): 212-6.
- Kawai, K., H. Shimura, et al. (2002). "Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes." <u>J Dermatol Sci</u> **30**(3): 185-94.
- Kim, J. (2005). "Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses." Dermatology 211(3): 193-8.
- Kim, J., M. T. Ochoa, et al. (2002). "Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses." <u>J Immunol</u> **169**(3): 1535-41.
- Kim, Y. H. and R. T. Hoppe (1999). "Mycosis fungoides and the Sezary syndrome." <u>Semin</u> Oncol **26**(3): 276-89.
- Knaggs, H. E., D. B. Holland, C. Morris, E. J. Wood, and W. J. Cunliffe. 1994.
 Quantification of cellular proliferation in acne using the monoclonal antibody
 Ki-67. J Invest Dermatol 102:89.
- Knol, A. C., G. Quereux, et al. (2005). "Presence of Epstein-Barr virus in Langerhans cells of CTCL lesions." <u>J Invest Dermatol</u> **124**(1): 280-2.
- Krug, A., G. D. Luker, et al. (2004). "Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9." <u>Blood</u> **103**(4): 1433-7.
- Kuenzli, S. and J. H. Saurat (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology." <u>Br J Dermatol</u> **149**(2): 229-36.
- Kurokawa, I., A. Mayer-da-Silva, et al. (1988). "Monoclonal antibody labeling for cytokeratins and filaggrin in the human pilosebaceous unit of normal, seborrhoeic and acne skin." <u>J</u>

 <u>Invest Dermatol</u> **91**(6): 566-71.
- Kurt-Jones, E. A., M. Chan, et al. (2004). "Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1315-

- Lansdown, A. B. 1996. Zinc in the healing wound. Lancet 347:706.
- Li, Z. W., R. C. Rickert, et al. (2004). "Genetic dissection of antigen receptor induced-NF-kappaB activation." Mol Immunol **41**(6-7): 701-14.
- Lund, J., A. Sato, et al. (2003). "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells." <u>J Exp Med</u> **198**(3): 513-20.
- Mao-Qiang, M., A. J. Fowler, et al. (2004). "Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activation stimulates keratinocyte differentiation." <u>J Invest Dermatol</u> **123**(2): 305-12.
- Michaelsson, G., K. Ljunghall, and B. G. Danielson. 1980. Zinc in epidermis and dermis in healthy subjects. *Acta Derm Venereol* 60:295.
- Moulder, K., and M. W. Steward. 1989. Experimental zinc deficiency: effects on cellular responses and the affinity of humoral antibody. *Clin Exp Immunol* 77:269.
- Nagy, I., A. Pivarcsi, et al. (2005). "Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors." J Invest Dermatol 124(5): 931-8.
- Ong, P. Y. (2006). "Is/are pattern recognition receptor(s) for Staphylococcus aureus defective in atopic dermatitis?" Dermatology **212**(1): 19-22.
- Pancake, B. A., D. Zucker-Franklin, et al. (1995). "The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients." J Clin Invest **95**(2): 547-54.
- Pawin, H., C. Beylot, et al. (2004). "Physiopathology of acne vulgaris: recent data, new understanding of the treatments." <u>Eur J Dermatol</u> **14**(1): 4-12.
- Philpott, M. P. (2003). "Defensins and acne." Mol Immunol 40(7): 457-62.

- Pivarcsi, A., L. Bodai, et al. (2003). "Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes." Int Immunol 15(6): 721-30.
- Prasad, A. S. 1979. Clinical, biochemical, and pharmacological role of zinc. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 19:393.
- Prasad, A. S., B. Bao, et al. (2001). "Zinc activates NF-kappaB in HUT-78 cells." <u>J Lab Clin</u>

 <u>Med</u> **138**(4): 250-6.
- Prost-Squarcioni, C. 2006. [Histology of skin and hair follicle]. Med Sci (Paris) 22:131.
- Saed, G., D. P. Fivenson, et al. (1994). "Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile." <u>J Invest</u> Dermatol **103**(1): 29-33.
- Sainte-Marie, I., O. Jumbou, et al. (1998). "Comparative study of the in vitro inflammatory activity of three nickel salts on keratinocytes." Acta Derm Venereol **78**(3): 169-72.
- Schaller, M., M. Loewenstein, et al. (2005). "Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with Propionibacterium acnes and coproporphyrin III." <u>Br J Dermatol</u> **153**(1): 66-71.
- Schnare, M., G. M. Barton, et al. (2001). "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses." Nat Immunol **2**(10): 947-50.
- Selsted, M. E. and A. J. Ouellette (2005). "Mammalian defensins in the antimicrobial immune response." Nat Immunol **6**(6): 551-7.
- Simon, M., M. Sebbag, et al. (1995). "Monoclonal antibodies to human epidermal filaggrin, some not recognizing profilaggrin." J Invest Dermatol **105**(3): 432-7.
- Sorensen, O. E., D. R. Thapa, et al. (2005). "Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli." <u>J Immunol</u> **174**(8): 4870-9.
- Sugimoto, Y., I. Lopez-Solache, et al. (1995). "Cations inhibit specifically type I 5 alphareductase found in human skin." J Invest Dermatol **104**(5): 775-8.

- Takao, J., T. Yudate, et al. (2003). "Expression of NF-kappaB in epidermis and the relationship between NF-kappaB activation and inhibition of keratinocyte growth." <u>Br J Dermatol</u> 148(4): 680-8.
- Tal, M. 1968. On the role of Zn2+ and Ni2+ in ribosome structure. *Biochim Biophys Acta* 169:564.
- Tal, M. 1969. Metal ions and ribosomal conformation. Biochim Biophys Acta 195:76.
- Thiboutot, D. (2004). "Regulation of human sebaceous glands." <u>J Invest Dermatol</u> **123**(1): 1-12.
- Uzzo, R. G., P. L. Crispen, et al. (2006). "Diverse effects of zinc on NF-{kappa}B and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression." Carcinogenesis.
- van der Flier, A. and A. Sonnenberg (2001). "Function and interactions of integrins." <u>Cell</u>

 Tissue Res **305**(3): 285-98.
- Watt, F. M. (2002). "Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation." Embo J **21**(15): 3919-26.
- Weismann, K. 1978. What is the use of zinc for wound healing? *Int J Dermatol* 17:568.
- Willemze, R., H. Kerl, et al. (1997). "EORTC classification for primary cutaneous lymphomas:

 a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European

 Organization for Research and Treatment of Cancer." <u>Blood</u> **90**(1): 354-71.
- Zhang, D., G. Zhang, et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." <u>Science</u> **303**(5663): 1522-6.
- Zouboulis, C. C. (2001). "Is acne vulgaris a genuine inflammatory disease?" <u>Dermatology</u> **203**(4): 277-9.
- Zouboulis, C. C., A. Eady, et al. (2005). "What is the pathogenesis of acne?" <u>Exp Dermatol</u>
 14(2): 143-52.

Résumé

L'acné est une maladie chronique du follicule pilo-sébacé sous dépendance hormonale qui se déroule en trois phase: la stimulation de la production de la glande sébacée qui induit une hyperséborrhée débutant en général à la puberté, puis la formation du micro-comédon qui est considéré comme la lésion élémentaire de l'acné et qui se ferait à partir d'anomalies de la prolifération, de l'adhésion et de la différenciation des kératinocytes et, enfin la formation des lésions inflammatoires dans laquelle *Propionibacterium acnes (P.acnes)* et l'immunité innée semblent jouer un rôle fondamental. Les Lymphomes Cutanés T Epidermotropes (LCTE): Mycosis Fongoïde (MF) et Syndrome de Sézary (SS) sont caractérisés par la présence d'un infiltrat important de lymphocytes T CD4+ matures (composé de lymphocytes T réactionnels et tumoraux). L'étiologie des LCTE demeure inconnue toutefois l'implication d'un agent infectieux (EBV, HTLV-1) est fortement suspectée.

Notre objectif était d'étudier le rôle de *P.acnes* dans l'immunité innée et la différenciation kératinocytaire.

Afin d'analyser les effets de *P.acnes* sur la différenciation kératinocytaire et l'immunité innée, nous avons mis au point un modèle cutané d'acné en incubant les extraits de *P.acnes* (FM: fractions membranaires, SA: surnageant A et SB: surnageant B), soit avec des kératinocytes normaux humains en monocouches, soit avec des explants cutanés. En utilisant ce modèle nous avons étudié l'expression des intégrines β 1, α 3, α 6, α V β 6 et de la filaggrine. Nos résultats suggèrent que *P.acnes* joue un rôle important dans les anomalies de la différenciation kératinocytaire puisque cette bactérie induit des modifications de l'expression des intégrines et de l'expression de la filaggrine. Nous avons également montré que l'immunité innée kératinocytaire était activée par P.acnes: en effet, l'expression du Toll-like Récepteur 2 (TLR2, récepteurs de l'immunité innée) par les kératinocytes est stimulée par l'extrait FM en particulier. Le zinc est utilisé par les dermatologues pour le traitement de l'acné de type inflammatoire minime à modérée. La pluralité du mode d'action antiinflammatoire du zinc n'est que partiellement connue. Nos résultats montrent que le zinc inhibe l'expression de TLR2 lorsque celle-ci est induite par l'extrait FM de *P.acnes*. Cette inhibition n'est pas liée à une modification de l'expression de NF-κB ou de l'interleukine-8.

Ainsi, *P.acnes* semble jouer un rôle clé dans la physiopathologie de l'acné en agissant sur les kératinocytes dès l'étape du microcomedon jusqu'à la réaction inflammatoire.

En parallèle, nous avons étudié les modulations de l'immunité innée dans une pathologie cutanée inflammatoire ou un agent infectieux est suspecté : les LCTE. Nous avons montré que les profils d'expression des TLRs 2, 4 et 9 au sein des MF étaient différents de ceux observés au cours du SS : en effet la

totalité des MF étudiés exprime ces trois TLRs dont un tiers très fortement tandis qu'un tiers des SS étudiés n'exprime pas du tout TLRs 2,4 et 9. En conclusion, nous démontrons que l'expression des TLRs 2, 4 et 9 est augmentée dans l'épiderme de patients MF.

Cette activation par un agent infectieux pourrait jouer un rôle dans l'induction et le maintien de l'infiltrat de lymphocytes T dans les lésions cutanées de mycosis fungoïde et du syndrome de Sézary.

<u>Mots clés</u>: *Propionibacterium acnes*, Acné, Zinc, Filaggrine, Récepteurs Toll-like, Lymphomes Cutanés T Epidermotopes.

RESUME: The aim of this work was to determinate the effects of Propionibacterium acnes in keratinocytes differentiation and innate immunity. Our results suggest that P.acnes play a part in abnormal keratinocytes differentiation indeed P. acnes extract modulate integrins and filaggrin expression. We also show that FM P.acnes extract induce TLR2 expression. Zinc could partially inhibit this expression. In conclusion, P.acnes seems to play an important part in acne physiopathology from microcomedon to the inflammation. Concurrently, we have studied innate immunity modulation in cutaneous T cell lymphoma (CTCL). The origin of this pathology remains unknown but the implication of viruses is highly suspected. We show that TLRs 2, 4 and 9 expressions by keratinocytes was increase in CTCL epidermis compare to normal skin.

Furthermore TLRs 2, 4 and 9 pattern expression in MF skin was different to that observed in SS skin. In conclusion, the activation of TLRs 2, 4 and 9 by an infectious antigen could play a role in the chronic activation of T lymphocytes in the skin of CTCL patients

Titre anglais:

Effects of Propionibacterium acnes in keratinocytes differentiation and innate immunity