



Université  
de Toulouse

# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Physiopathologie moléculaire, cellulaire et intégrée*

---

Présentée et soutenue par *BRIOT Anaïs*  
Le 24 novembre 2009

Titre : *Rôle de LEKTI dans le contrôle de l'inflammation allergique du syndrome de Netherton*

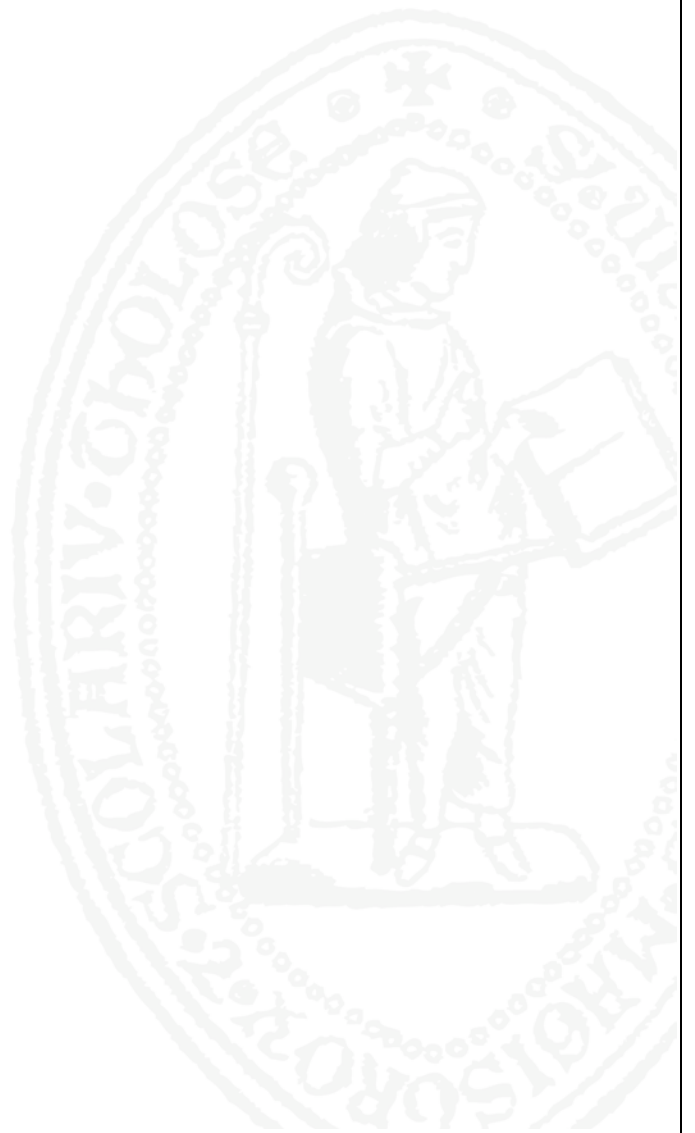
---

### JURY

*Pr Joost Van-Meerwijk, Président*  
*Pr Philippe Musette, Rapporteur*  
*Dr Christopher Mueller, Rapporteur*  
*Pr Martine Bagot, Examineur*  
*Dr Lucette Pelletier, Examineur*  
*Pr Alain Hovnanian, Directeur de Thèse*

---

Ecole doctorale : *Biologie, Santé, Biotechnologie*  
Unité de recherche : *INSERM U563, CPTP, IFR150*  
Directeur(s) de Thèse : *Pr Alain Hovnanian*  
Rapporteurs :





# MERCI !!!!

Le moment que l'on attend et que l'on craint tous (ou presque) au commencement de la thèse est arrivé. Je tiens à remercier les membres de mon jury de soutenance qui ont accepté de lire et d'évaluer les travaux réalisés au court de ces années.

J'adresse mes remerciements à Alain Hovnanian qui m'a accueilli dès le DEA au sein de son équipe, et qui m'a permis de travailler de manière autonome sur un projet très intéressant et enrichissant par sa diversité.

Il ne faut pas oublier que l'avancée de nos projets scientifiques ne serait pas possible sans toutes les personnes qui animent les plateaux techniques du CPTP. A ce titre j'adresse un grand merci à Talal Al Saati, Florence Capilla et Delphine Lestrade du plateau d'HPEX...mon second labo pendant les premières années. Même si les techniques d'histo restent parfois un grand mystère pour moi (surtout lorsqu'il s'agit de cette organe sympathique qu'est la peau !!!) je vous remercie pour nos échanges qui m'ont permis d'obtenir de beaux résultats (parfois laborieux). Je vous remercie pour votre soutien scientifique et pour tout le reste...

Je remercie les membres de l'animalerie, tout particulièrement Aline qui a assisté à mes débuts avec les petites souris et qui a su gérer l'ensemble de nos élevages dont le nombre n'a fait qu'augmenter au court des années.

Merci à Sophie Allart pour son aide sur le plateau d'imagerie, et merci à Fatima L'Faqihi-Olive, Camille Lamare et Valérie Duplan-Eche du plateau de cytométrie pour leur disponibilité malgré un emploi du temps plus que chargé.

Je tiens à dire un grand MERCI !! à Lucette et Gilbert pour m'avoir aiguillé sur une piste qui m'a conduit à « décortiquer » le versant inflammatoire du syndrome de Netherton. Merci pour votre gentillesse, pour votre soutien scientifique, et pour l'aide que vous m'avez apporté pour la préparation de mes communications orales. Je remercie également tous les « Immuno », qui se reconnaîtront, qui m'ont initié aux joies de cette discipline plus que complexe aux yeux des non érudits (i.e. les miens !!!). J'espère pouvoir vous rendre la pareille sur une discipline que je maîtrise un peu mieux.

Je remercie tous les membres du département de génétique, avec qui j'ai pu « grandir » pendant toutes ces années grâce aux échanges scientifiques et techniques dont personne n'a été avare.

Un grand merci aux autres équipes AH. Les ColVII, Matthias, José, Laure, Audrey, Nathalie, Géraldine, Sandrina, Valérie et Sandra. Je ne peux raisonnablement pas énumérer toute l'aide que vous m'avez apporté...aussi bien au niveau de mes galères informatiques, des techniques que vous m'avez transmises, des lames de cryo réalisées à vitesse grand V et de tous nos échanges amicaux...et merci à EL GRINGO...sans toi je n'aurais pas toujours réussi à rester éveillée devant PubMed. Les DARIER, qui eux n'ont pas le droit au nom du gène mais de la maladie. Un clin d'œil tout spécial à Magali avec qui ça a commencé sur « DREAM » (je n'y comprends toujours pas grand-chose à ce facteur de transcription...). Merci Magali pour nos débats scientifiques et pour m'avoir forcé à faire du VELOUZE par un vent de 300km/h de face...j'ai encore mal !!!

Je remercie tout particulièrement ceux qui ont fait partie de l'aventure SPINK5 (qui continu et continuera pour certains). Merci à Chrystelle et Céline avec qui j'ai fait « mes premiers pas » dans l'aventure SN. Merci de m'avoir appris à ne pas détester la biochimie...les zymo c'est bleu, c'est froid à déposer, c'est bien, et ça m'a surtout permis de rencontrer Mlle Tryptase !! Merci Aurélie pour toute ton aide, qui comprend parmi tant d'autres choses un nombre incalculable de greffes de « moumoute ». Grâce à toi je pourrais toujours me réorienter dans la vente de fourrure de souris. J'espère qu'on améliorera notre technique de réanimation à la seringue. Je te souhaite de trouver une place qui te convient et que tu mérites grandement. Et je pense que tu n'as rien à envier à Speedy Gonzales puisque tu fais toujours tout vite (et c'est un qualificatif léger) et surtout bien. Bon courage pour l'immuno également (tchiiiiizzzz). Merci à Céline B.F. qui ne m'a pas écrasé derrière la porte malgré toutes ses entrées fracassantes. Merci aussi à Fabienne pour son aide, et pour les super histos qui vont, je l'espère, trôner dans un article sur les DKO prochainement. Je remercie Alexandra qui a osé démarrer le projet immuno avec moi. J'espère que nos péripéties au FACS resteront graver dans les mémoires. Je remercie bien évidemment Laëtitia, la « gestionnaire ARC » de haut vol. J'ai pu apprécier la différence du « AVANT/PENDANT » ta présence dans la gestion de tous les projets, commandes, réunions etc...ça se passe de commentaire. Florine, « la petite dernière », je te remercie pour ta présence au quotidien en tant que membre à part entière de l'équipe et pour ton énergie et ta bonne humeur. Matthieu je te remercie également pour ton aide au quotidien et pour avoir le courage d'affronter tous les matins un groupe de filles enragées. Je suis désolée que tu ais dû subir les piles de biblio, cahier, boites de lames (etc..) entre ton bureau et le mien. Le calvaire est bientôt fini, tu auras bientôt plus d'espace vital.

Special thanks to Celine and Matthieu pour s'être battu à mes côté face au xxx Reviewer 3. On a finalement réussi à lui clouer le bec. Champagne !! Merci également à vous deux pour votre aide dans la dernière ligne droite.

Deux fois valent mieux qu'une MERCI LES SPINK5 !!! Pour toute votre aide durant ces années. Je vous souhaite une bonne route par la suite, ici ou ailleurs, dans la bonne humeur, l'entre-aide et l'amour de la science !!!

Je n'oublierai pas mes premiers pas dans la recherche. Merci à Gérard Bouche qui m'a accueilli dans son équipe pendant ma Licence et Merci à Christophe Cazaux et Jean-Phillipe Hoffmann et à toute l'équipe pour m'avoir appris mes toutes premières manip pendant mon stage de Maitrise. Je remercie tout particulièrement Marie-Jeanne Pilaire, « CHEF », qui pendant ce stage m'a encadré et m'a fait découvrir et apprécier le monde de la recherche. Ces deux stages ont été le déclencheur qui m'a propulsé vers le choix de mon orientation en DEA et fatalement vers la thèse.

Enfin je remercie tous ceux qui ont été auprès de moi, les heures pendant lesquelles je n'étais pas au labo. Merci à tous ceux que je porte dans mon cœur, pour m'avoir soutenu dans mes choix, dans mon travail (même si la « recherche », et non la « trouvaille » est obscure pour beaucoup), dans ma vie de tous les jours et pour m'avoir supporté. Quoi de mieux que d'être épanoui au travail et heureux dans la vie ?

Enfin, merci aux mus musculus...pour leur sacrifice aveugle au bénéfice de notre avancée pour guérir les patients SN !!!



## Résumé

Le Syndrome de Netherton (SN, OMIM 256500) est une des ichtyoses héréditaires les plus sévères de l'enfant. Il s'agit d'une génodermatose rare à transmission autosomique récessive, caractérisée par une triade clinique comprenant une érythrodermie desquamative généralisée, une anomalie pilaire spécifique et des manifestations atopiques récurrentes. Le SN est dû à la perte d'expression du gène *SPINK5* codant l'inhibiteur de protéase LEKTI exprimée principalement dans la couche granuleuse de l'épiderme, dans les muqueuses et dans les corpuscules de Hassall du thymus. LEKTI joue un rôle crucial dans la fonction de barrière cutanée via la régulation de l'activité des protéases épidermiques kallikréine (KLK) 5 et 7, qui dégradent les structures d'adhésion intercornéocytaires et entraînent un détachement anormal de la couche cornée. Les souris *Spink5*<sup>-/-</sup> (KO) mourant rapidement en période périnatale, nous avons développé un modèle de greffe de peau sur souris nude. Les greffes KO reproduisent les anomalies histologiques et ultrastructurales du SN, et présentent une inflammation cutanée de type allergique. Les greffons KO sont infiltrés par des polynucléaires éosinophiles et des mastocytes activés. Ceci est secondaire à la surexpression par les kératinocytes KO de molécules pro-inflammatoires et pro-Th2 (TSLP) dès le jour embryonnaire 19,5. L'étude de kératinocytes primaires de patients SN a confirmé que la surexpression de TSLP est une caractéristique intrinsèque aux kératinocytes *SPINK5*<sup>-/-</sup>. Cette surexpression est un mécanisme induit par la KLK5 hyperactive qui clive alors le récepteur PAR2 à la surface des kératinocytes. Ainsi, nous avons identifié la cascade KLK5-PAR2 comme étant directement responsable de l'émission de signaux pro-inflammatoires et pro-allergiques indépendamment des stimuli environnementaux et du système immunitaire adaptatif. Ces résultats identifient la KLK5 comme une cible thérapeutique pertinente puisqu'elle joue un rôle majeur dans les deux versants de la maladie : le défaut de barrière cutanée et la mise en place d'un microenvironnement pro-allergique. L'étude d'animaux déficients à la fois pour *Spink5* et pour *Par2* nous a permis de confirmer l'importance de cette cascade dans l'induction des messages pro-allergiques précoces. Cependant, le contrôle de cette voie ne rétablit pas la fonction de barrière cutanée et ne reverse que partiellement le phénotype inflammatoire dans une peau adulte. Ces résultats soulignent l'importance du contrôle de l'inflammation mais aussi du maintien de la fonction de barrière épidermique pour l'amélioration des symptômes cliniques de la maladie.

Le SN partage des caractéristiques cliniques avec des maladies allergiques comme la dermatite atopique, l'asthme allergique et les allergies alimentaires. Si l'altération de la barrière cutanée peut faciliter la pénétration des allergènes, induisant l'inflammation cutanée sévère et l'hyper-immunoglobulinémie E observées dans le SN, un défaut de barrière ne s'accompagne pas toujours de manifestations atopiques dans les autres ichtyoses. L'association de polymorphismes du gène *SPINK5* avec des manifestations atopiques et l'expression de LEKTI dans le thymus suggère que cet inhibiteur puisse jouer un rôle dans l'homéostasie du système immunitaire. Nous avons donc entrepris d'étudier les conséquences de l'absence de LEKTI sur le phénotype, les propriétés fonctionnelles lymphocytaires et la caractérisation des cellules immunitaires infiltrant les lésions eczématiformes de patients SN. Ces travaux conduiront à une meilleure compréhension du versant immunologique de la maladie qui est, à ce jour, peu décrit dans la littérature.

## Abstract

Netherton syndrome (NS, OMIM 256500) represents one of the most severe forms of inherited ichthyosis of the infant. The disease is a rare autosomal recessive genodermatosis, whose main clinical features include generalized congenital erythroderma, a specific hair shaft defect and recurrent atopic manifestations. We have shown that NS is due to loss of expression of the *SPINK5* (Serine Protease Inhibitor Kazal type, 5) gene encoding LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal Type Inhibitor). LEKTI is preferentially expressed in the granular layer of the epidermis, in mucosae and in Hassall's corpuscles of the thymus. It plays a crucial role in skin barrier function through regulation of epidermal proteases kallikrein (KLK) 5 and 7. In the absence of LEKTI, hyperactivated KLK5 and 7 degrade intercorneocyte adhesion molecules leading to abnormal *stratum corneum* detachment. As *Spink5*-deficient mice (KO) died few hours after birth, we developed graft skin model on nude mice. KO grafted skin reproduced histological and ultrastructural abnormalities of NS skin and exhibited a severe cutaneous allergic inflammation. KO graft dermis was infiltrated with polynuclear eosinophiles and activated mast cells. This is secondary to the overexpression of proinflammatory and proTh2 (TSLP) molecules by keratinocytes, as early as embryonic day 19.5. Analysis of NS primary keratinocytes confirmed that TSLP overexpression is an intrinsic property of *SPINK5*<sup>-/-</sup> keratinocytes. This is the consequence of PAR2 cleavage, on keratinocytes, by hyperactivated KLK5. Indeed, we have identified the KLK5-PAR2 pathway which is directly responsible for proinflammatory and proallergic signaling, independently of environmental stimuli and adaptive immune system. These results identified KLK5 as a pertinent target for SN treatment playing a dual role in skin barrier impairment and immune disorder. Using double knock-out mice deficient for *Spink5* and *Par2*, we confirmed the major role of this cascade in the induction of early pro-inflammatory signaling. However inhibition of this pathway does not improved the skin barrier function and partially reverses cutaneous inflammation in adult skin. These results emphasize the importance of controlling not only inflammation but also skin barrier function in order to improved clinical features of the disease.

NS shares several of the clinical characteristics of allergic diseases, such as atopic dermatitis, allergic asthma and food allergy. Although the primary defect of skin barrier function could facilitate the penetration of allergens, inducing severe skin inflammatory reaction and hyper-immunoglobulinemia E as observed in NS, other ichthyosis with skin barrier defect do not exhibit constant atopic manifestations. In addition, the association of *SPINK5* polymorphisms with atopic diseases and the thymic expression of LEKTI suggest that *SPINK5* could play a role in immune system homeostasis. Thus, we plan to study the impact of LEKTI deficiency on peripheral lymphocytes phenotype and functional properties. Moreover, we will characterize immune cells found in eczematous lesions of NS skin. This project will provide a better understanding of immunological disorder in NS which is not well referenced in the literature.



# TABLE DES MATIERES

Liste des figures .....	9
Liste des tableaux.....	10
Abréviations.....	11
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>PARTIE A- L'épiderme</b> .....	<b>15</b>
I.La peau.....	15
II.L'épiderme interfolliculaire .....	16
1- Composition cellulaire .....	16
1-1-Les kératinocytes.....	16
1-2-Les cellules de Langerhans .....	16
1-3-Les mélanocytes.....	18
1-4-Les cellules de Merkel .....	18
1-5-Les lymphocytes.....	18
2- Stratification et différenciation épidermique.....	19
2-1-La couche basale .....	19
2-2-La couche épineuse .....	20
2-3-La couche granuleuse .....	20
2-4-La couche cornée.....	22
3- La fonction de barrière épidermique physique et chimique .....	22
3-1- Les structures d'adhésions intercellulaires .....	22
3-2- L'enveloppe cornée .....	26
3-3- Les lamelles lipidiques intercornéocytaires .....	29
<b>PARTIE B- Le syndrome de Netherton</b> .....	<b>33</b>
I.Les ichtyoses.....	33
II.Manifestations cliniques du syndrome de Netherton .....	34
III.Manifestations cutanées du syndrome de Netherton.....	36
1- Anomalies histologiques du syndrome de Netherton .....	36
2- Analyse ultrastructurale de l'épiderme SN .....	38
3- Défaut de différenciation terminale.....	40
IV.Physiopathologie du syndrome de Netherton.....	40
1- <i>SPINK5</i> .....	40
2- LEKTI .....	42
3- Modèle murin <i>Spink5</i> <sup>-/-</sup> .....	44
V.Inflammation et allergie dans le syndrome de Netherton .....	47
VI.Traitement du SN .....	48
<b>PARTIE C- La Dermatite Atopique</b> .....	<b>53</b>
I.Aspects cliniques de la dermatite atopique.....	53
1- Définition et aspects cliniques .....	53
2- Histologie .....	54
II.Génétique .....	54
1- Les gènes de la fonction de barrière cutanée .....	56
2- Les gènes de la réponse immune .....	58
III.Physiopathologie de la dermatite atopique .....	58

1- Défaut de barrière cutanée.....	60
2- Immunopathologie.....	61
2-1-Les Lymphocytes CD4 <sup>+</sup> Th2 .....	61
2-2-Les lymphocytes T régulateurs (Treg) .....	64
2-3-Les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPAs) .....	64
2-4-Les polynucléaires éosinophiles .....	65
2-5-Les mastocytes.....	66
2-6-Les kératinocytes.....	66
IV.Les modèles murins de la dermatite atopique .....	68
1- Les souris qui développent spontanément des lésions DA .....	68
2- Les modèles de souris génétiquement modifiées.....	70
3- Modèles de dermatite atopique induits par sensibilisation épicutanée .....	73
V.Traitement de la DA .....	75

## **PARTIE D- Immunité cutanée- Les kératinocytes : cellules du système immunitaire inné ?**

I-Reconnaissance des pathogènes : les Toll-Like Receptors (TLR) .....	79
II- PAR2 .....	80
1- Signalisation intracellulaire induite par PAR2.....	82
2- Régulation de PAR2.....	84
3- Expression cutanée de PAR2.....	84
4- Activation et inhibition de PAR2 dans la peau .....	85
5- Rôle de PAR2 dans l'inflammation cutanée .....	87
III-Les peptides antimicrobiens .....	91
1- Cathélicidines .....	91
2- -Défensines .....	93
IV-Sécrétion de cytokines, chimiokines et molécules pro-inflammatoires par les kératinocytes .....	94
V- Cas particulier d'une cytokine pro-allergique majeure : TSLP.....	95
1- Signalisation TSLP/TSLPR .....	95
1-1- TSLP .....	95
1-2- TSLP-R.....	96
1-3- Signalisation intracellulaire .....	97
2- Induction d'une réponse lymphocytaire T pro-allergique .....	98
2-1- Mise en place d'un environnement pro-Th2 par les DC et les mastocytes activés par TSLP.....	98
2-2- Différenciation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> Th2 sous l'action de TSLP .....	99
2-3- TSLP dans la dermatite atopique et l'asthme allergique.....	102
3- Rôle de TSLP <i>in vivo</i> : Modèles murins d'asthme allergique et de dermatite atopique.....	104
3-1- TSLP est nécessaire au développement de la réaction inflammatoire de type allergique.....	104
3-2- TSLP est suffisant pour induire une réponse de type allergique .....	105
4- Autres fonctions de TSLP .....	107
4-1- TSLP et développement lymphocytaire chez la souris .....	107
4-2- TSLP et homéostasie de T CD4 <sup>+</sup> périphériques .....	108
4-3- TSLP et développement des Treg dans le thymus.....	108
5- Régulation de l'expression de TSLP .....	110
5-1- RXR, Vitamine D et TSLP.....	110
5-2- NF- B et TSLP .....	111
5-3- Autres voies de stimulation.....	111

Objectifs de la thèse .....	113
<b>RESULTATS</b> .....	115
<b>Partie 1</b> : Identification d'un mécanisme moléculaire responsable de l'inflammation cutanée de type allergique en absence de LEKTI .....	117
<b>Partie 2</b> : Rôle de PAR2 dans le développement de l'inflammation secondaire à l'absence de LEKTI .....	121
<b>Partie 3</b> : Etude de la réponse immunitaire chez les patients atteints du syndrome de Netherton.....	131
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	159
<b>Partie A- Rôle de LEKTI dans le contrôle des signaux cutanés pro-inflammatoires et pro-allergiques</b> .....	161
I-Signalisation KLK5-PAR2-TSLP : une propriété intrinsèque aux kératinocytes <i>SPINK5</i> <sup>-/-</sup> .....	161
II-Autres mécanismes pro-allergiques et pro-inflammatoires qui pourraient être régulés par LEKTI.....	163
III-Rôle de LEKTI dans le développement de lésions eczématiformes secondaires au défaut de barrière cutanée.....	165
1- Rôle intrinsèque des kératinocytes <i>SPINK5</i> <sup>-/-</sup> versus détachement de la couche cornée dans le développement d'un phénotype eczématiforme .....	166
2- Défaut de maturation de la filaggrine : un facteur de risque aujourd'hui en première ligne.....	167
3- Le syndrome de Netherton et la dermatite atopique.....	169
<b>Partie B : Rôle de LEKTI dans l'inflammation allergique systémique</b> .....	173
I-Polymorphismes de <i>SPINK5</i> associés à l'atopie .....	173
II-Rôle direct de LEKTI sur la mise en place d'un biais Th2 dans le syndrome de Netherton.....	174
III-Rôle de TSLP dans la propagation de la réponse Th2.....	177
<b>Partie C : Perspectives thérapeutiques du syndrome de Netherton</b> .....	179
I-Inhibition de l'inflammation allergique.....	179
II-Inhibition de la kallikréine 5 : identification d'inhibiteurs efficaces et spécifiques.	180
1- Identification d'inhibiteurs potentiels de la KLK5 .....	180
2- Validation des inhibiteurs <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> .....	181
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	187
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	189
<b>ANNEXES</b> .....	215



## Liste des figures

<b>Figure 1-</b> Structure d'une peau humaine.....	14
<b>Figure 2-</b> Les cellules de Langerhans épidermiques. ....	17
<b>Figure 3-</b> Stratification de l'épiderme interfolliculaire. ....	21
<b>Figure 4-</b> Structures d'adhésions présentes dans l'épiderme. ....	24
<b>Figure 5-</b> Maladies génétiques causées par des mutations des gènes codants les protéines de structure des desmosomes. ....	25
<b>Figure 6-</b> Mise en place de l'enveloppe cornée. ....	27
<b>Figure 7-</b> Les lamelles lipidiques intercornéocytaires. ....	30
<b>Figure 8-</b> Manifestations cliniques du syndrome de Netherton. ....	35
<b>Figure 9-</b> Anomalies histologiques de la peau des patients SN.....	37
<b>Figure 10-</b> Anomalies ultrastructurales de l'épiderme des patients SN.....	39
<b>Figure 11-</b> Schéma de l'organisation du gène SPINK5 et de la protéine LEKTI. ....	41
<b>Figure 12-</b> Schéma de la régulation du mécanisme de desquamation orchestrée par LEKTI.....	43
<b>Figure 13-</b> Erosion cutanée des souriceaux déficients en LEKTI.....	45
<b>Figure 14-</b> Les greffes de peau Spink5-/- reproduisent le phénotype histologique du syndrome de Netherton. ....	46
<b>Figure 15-</b> Manifestations cliniques cutanées de la dermatite atopique.....	52
<b>Figure 16-</b> Phénotype histologique de la dermatite atopique.....	55
<b>Figure 17-</b> Loci de susceptibilité à l'asthme, à la dermatite atopique et à d'autres désordres immunitaires. ....	57
<b>Figure 18-</b> Rôle de la fonction de barrière cutanée dans le développement de la dermatite atopique.....	62
<b>Figure 19-</b> Modèle de sensibilisation épicutanée conduisant à une inflammation cutanée de type allergique.....	74
<b>Figure 20-</b> Structures secondaires et mécanismes d'activation des récepteurs PARs. ....	81
<b>Figure 21-</b> Principales voies de signalisation induites par les protéines G couplés à PAR2. ....	83
<b>Figure 22-</b> Immunohistochimie de PAR2 sur coupe de peau humaine. ....	86
<b>Figure 23-</b> Rôle de PAR2 dans l'inflammation.....	89
<b>Figure 24-</b> Les peptides antimicrobiens (AMPs) dans la peau.....	92
<b>Figure 25-</b> Différenciation des lymphocytes Th2 induite par TSLP. ....	100

<b>Figure 26-</b> Expression de TSLP dans la peau. ....	103
<b>Figure 27-</b> Rôle de TSLP dans l'initiation de l'allergie cutanée. ....	106
<b>Figure 28-</b> TSLP et développement des lymphocytes T régulateurs. ....	109
<b>Figure 29-</b> Schéma récapitulatif du rôle de l'épiderme SPINK5 <sup>-/-</sup> dans le développement de lésions eczématiformes. ....	184

<b>Liste des tableaux</b>
---------------------------

<b>Tableau 1-</b> Gènes de la réponse immunitaire dont les polymorphismes sont associés au développement de la dermatite atopique. ....	59
<b>Tableau 2-</b> Souches murines développant spontanément des lésions de DA. ....	69
<b>Tableau 3-</b> Modèles de souris transgéniques développant des lésions de DA. ....	71
<b>Tableau 4-</b> Modèle de souris invalidées pour un gène (knockout) développant des lésions de DA. ....	72
<b>Tableau 5-</b> Implication de différents gènes du système immunitaire dans l'inflammation cutanée après sensibilisation épicutanée. ....	76

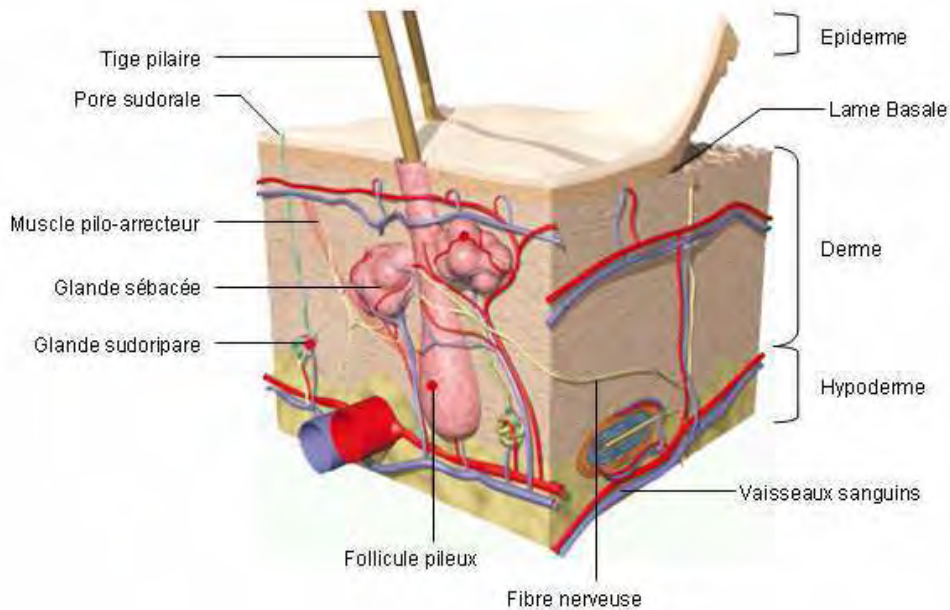
## Abréviations

- CLA** : *Cutaneous Lymphocyte Antigen*
- DA** : Dermatite Atopique
- DC** : Cellule Dendritique
- DKO** : Double Knock-Out
- EDC** : *Epidermal Differentiation Complex*
- Ela2** : Elastase 2
- FLG** : Filaggrine
- GATA3** : *GATA binding protein 3*
- HC** : Corpuscule de Hassal
- ICAM1** : *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*
- IFN** : Interféron
- Ig** : Immunoglobuline
- IL** : Interleukine
- IV** : Ichtyose Vulgaire
- KLK** : Kallikréine
- KO** : Knock-Out
- LC** : Cellule de Langherans
- LEKTI** : *Lympho-Epithelial Kazal Type related Inhibitor*
- LT** : Lymphocyte T
- MDC** : *Macrophage-Derived Chemokine*
- OVA** : Ovalbumine
- PAR** : *Proteinase-Activated Receptor*
- PBMC** : *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
- SN** : Syndrome de Netherton
- SPINK5** : *Serine Protease Inhibitor Kazal type 5*
- TARC** : *Thymus and Activation-Regulated Chemokine*
- T-bet** : *T-Box expressed in T cells*
- TCR** : *T Cell Receptor*
- TLR** : *Toll-Like Receptor*
- TNF** : *Tumor Necrosis Factor*
- Treg** : lymphocyte T régulateur
- TSLP** : *Thymic Stromal LymphoPoietin*
- WT** : *Wild Type*





# INTRODUCTION



**Figure 1- Structure d'une peau humaine.**

La peau est constituée de trois compartiments : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme, en contact directe avec l'environnement, est séparé du derme par la lame basale. Le derme renferme les annexes épidermiques (glandes sudoripares et follicules pilo-sébacés) ainsi que des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Les troncs des vaisseaux sanguins sont logés dans l'hypoderme.

(Modifié d'après <http://www.lecorpshumain.fr/corpshumain/1-peau.html>)

# **PARTIE A- L'épiderme**

## **I. La peau**

La peau est l'organe le plus étendue, représentant 10 % de la masse du corps humain (2m<sup>2</sup> pour 5kg). Elle recouvre la totalité du corps et est en continuité avec les muqueuses.

La peau protège à la fois l'organisme contre l'environnement extérieur et en même temps leur permet d'interagir. Il s'agit une barrière impénétrable aux agents exogènes. Elle constitue un ensemble complexe et dynamique, composé de cellules, de tissus et de matrices, qui assure de multiples fonctions. La peau procure une barrière physique et chimique imperméable aux agents infectieux. Elle est aussi en charge de la thermorégulation, de la protection contre les ultraviolets, de la réparation des blessures et possède un rôle sensoriel. Ces fonctions sont accomplies par un ou plusieurs de ses compartiments majeurs que sont l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Ces composantes sont des unités fonctionnelles interdépendantes et connectées entre elles afin de maintenir la structure et la fonction normale au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire de la peau.

L'épiderme est un épithélium pluristratifié en contact direct avec l'environnement comprenant l'épiderme interfolliculaire et les annexes épidermiques (les follicules pilo-sébacés et les glandes sudoripares). Il constitue une barrière semi-perméable et procure l'essentiel de la fonction de barrière cutanée physique, chimique et immunitaire de la peau.

L'épiderme repose sur le derme sous-jacent. Le derme est un tissu conjonctif de soutien compressible et élastique, essentiellement composé de fibroblastes et de fibres de collagène. Dans le derme sont logés les annexes épidermiques, les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des terminaisons nerveuses. Le derme contient de nombreuses cellules immunitaires résidentes telles que des macrophages, des mastocytes et des cellules dendritiques.

L'hypoderme, le compartiment le plus profond de la peau, est un tissu graisseux qui joue un rôle énergétique et de protection mécanique et thermique de l'organisme. Il est essentiellement composé d'adipocytes agencés en lobules séparés entre eux par des septums conjonctifs et fibreux. Les fibres nerveuses, les troncs des vaisseaux sanguins et lymphatiques sont localisés dans ces septums, qui contiennent

également des cellules telles que des fibroblastes, des dendrocytes et des mastocytes (Figure 1).

## **II. L'épiderme interfolliculaire**

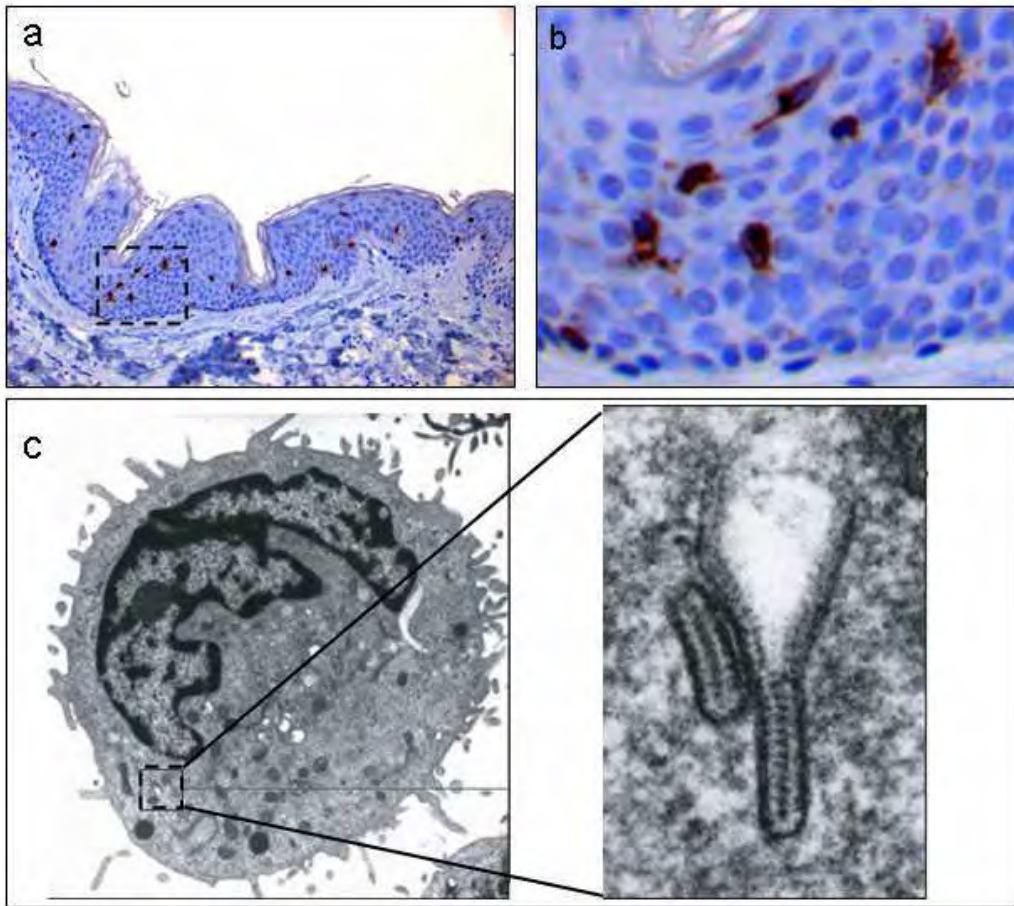
### **1- Composition cellulaire**

#### **1-1- Les kératinocytes**

L'épiderme est un épithélium malpighien (pluristratifié) kératinisé en perpétuel renouvellement et composé de plusieurs types cellulaires. Les kératinocytes représentent le type cellulaire le plus abondant (85-90%). Ces cellules épithéliales, spécialisées dans la synthèse de kératines spécifiques, subissent un processus de différenciation particulier, la kératinisation ou cornification. Durant ce processus de différenciation, les kératinocytes migrent de la couche basale la plus profonde de l'épiderme vers la couche épineuse puis granuleuse, pour enfin former des cellules anucléées et aplaties que sont les cornéocytes de la couche cornée en contact direct avec l'environnement (Figure 3).

#### **1-2- Les cellules de Langerhans**

Les cellules de Langerhans (LCs) sont des cellules dendritiques d'origine hématopoïétique (1, 2) spécialisées des épithéliums. Elles représentent 2 à 4% des cellules épidermiques et se localisent dans les couches basales et suprabasales de l'épiderme. Ces cellules sont caractérisées *in situ* par l'émission de dendrites visibles après marquage immunohistochimique contre l'antigène CD1a. Les LCs présentent un organite particulier visible en microscopie électronique, les granules de Birbeck associées à l'expression d'une lectine qui leur est spécifique, la langérine (3, 4) (Figure 2). Les LCs sont des cellules présentatrices d'antigènes qui sont par conséquent capable d'internaliser les agents pathogènes entrant dans la peau. Ce processus se poursuit par leur maturation et leur migration vers les organes lymphoïdes drainants la peau. Une fois dans les ganglions, elles présenteront les peptides antigéniques aux lymphocytes T afin de déclencher une réponse immune adaptée au stimulus perçu.



**Figure 2- Les cellules de Langerhans épidermiques.**

(a, b) Cellules de Langerhans visualisées par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps dirigé contre la langérine. Les cellules de Langerhans sont visibles en marron dans l'épiderme humain sain (a). Elles émettent de courtes dendrites entre les kératinocytes (b). (c) Cellule de Langerhans isolée à partir de peau humaine et observées en microscopie électronique à transmission. Agrandissement : granules de birbeck caractéristiques en «raquette de tennis».

(Modifié d'après Valladeau (2006) *Med Science* (c))

### **1-3- Les mélanocytes**

Les mélanocytes sont présents au niveau de la couche basale de l'épiderme où leur densité est évaluée à un pour cinq à dix kératinocytes. Ces cellules, issus de la crête neurale embryonnaire, synthétisent le principal pigment naturel de la peau, la mélanine. La mélanine est produite et stockée dans les mélanosomes qui après maturation cheminent dans les prolongements dendritiques des mélanocytes pour être transférée aux kératinocytes voisins (5). Une fois dans les kératinocytes, les mélanosomes forment une enveloppe supranucléaire protégeant leur matériel génétique des effets mutagènes des rayons ultraviolets. Les mélanocytes sont également présents dans les follicules pileux où ils sont responsables de la pigmentation de la tige pileuse (6).

### **1-4- Les cellules de Merkel**

Les cellules de Merkel sont des cellules neuroendocrines présentant des caractéristiques communes à la fois aux kératinocytes (expression de la cytokératine 20 et mise en place de desmosomes avec les kératinocytes voisins) et aux cellules nerveuses (présence de grains neurosécrétoires cytoplasmiques). Elles sont présentes en faible nombre dans la couche basale de l'épiderme et dans la gaine épithéliale externe des follicules pileux. Les cellules de Merkel pourraient jouer un rôle de mécanorécepteurs comme en atteste leur contact fréquent avec les terminaisons nerveuses dermiques. (7-9).

### **1-5- Les lymphocytes**

Dans la peau humaine, les lymphocytes sont essentiellement présents dans le derme. Les lymphocytes T (LT) épidermiques ne représentent que 2 à 3% des cellules CD3<sup>+</sup> de la peau. Ils résident principalement dans les couches basales et suprabasales de l'épiderme souvent à proximité des cellules de Langerhans. La majorité des LTs est CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> et porte le TCR  $\alpha\beta$ , alors qu'une minorité est CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> et de phénotype  $\alpha\gamma$  ou  $\beta\gamma$ .

Dans la peau de souris sauvage, il existe une sous-population de lymphocytes T dendritiques épidermiques portant le récepteur TCR  $\alpha\beta$ . La relation entre ces lymphocytes T dendritiques épidermiques murins et les lymphocytes épidermiques humains n'est cependant pas encore connue.

## **2- Stratification et différenciation épidermique**

L'épiderme est le résultat d'un programme de stratification complexe et précis mis en place durant l'embryogenèse. Chez la souris, ce processus débute, aux alentours du huitième jour de l'embryogénèse, lorsque les cellules de l'ectoderme de surface s'engagent vers une destinée épidermique. Après la gastrulation, le neuroectoderme peut s'engager vers la formation du système nerveux ou de l'épithélium cutané. A la croisée de cette détermination les voies de signalisation Wnt et les BMPs (Bone Morphogenic Protein) sont essentielles pour la formation de l'épiderme embryonnaire connu sous le nom de périoderme. Ce dernier sera ensuite éliminé une fois que l'épiderme sera stratifié et différencié, quelques jours avant la naissance (jour embryonnaire 18,5) (10, 11).

Lors de la stratification épidermique, les kératinocytes entreprennent une migration de la profondeur vers la partie superficielle de l'épiderme au sein de 4 couches successives : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. La différenciation des kératinocytes est régulée par de nombreux facteurs dont la concentration calcique. En effet, il existe au sein de l'épiderme un gradient calcique positif de la couche basale à la couche granuleuse qui coïncide avec l'état de différenciation des kératinocytes (12). L'augmentation du calcium extracellulaire et intracellulaire est nécessaire à l'expression des gènes de la différenciation terminale tels que la profilaggrine, l'involucrine, la loritrine et les transglutaminases (13, 14).

L'homéostasie épidermique repose sur le contrôle de la prolifération, de la différenciation des kératinocytes et leur élimination par desquamation. Des perturbations de ces mécanismes peuvent conduire à des processus pathologiques.

### **2-1- La couche basale**

La couche basale est une monocouche de kératinocytes cubiques capables de proliférer et d'assurer le renouvellement constant de l'épiderme. Les kératinocytes basaux expriment les kératines 5 et 14 reliées aux structures d'adhésion intercellulaires (desmosomes) ou aux hémidesmosomes qui permettent leur ancrage à la lame basale. La division des cellules basales permet d'une part le maintien du nombre de cellules prolifératives et d'autre part l'entrée en différenciation. Deux modèles de division coexistent. Le premier modèle implique une division symétrique, où les deux cellules filles obtenues se retrouvent adjacentes sur le plan horizontal.

L'une de ces cellules pourrait se détacher de la lame basale et entrer en différenciation tout en migrant vers les couches supérieures, alors que l'autre serait maintenue dans la couche basale en tant que cellule proliférative. Le second modèle est celui de la division asymétrique donnant deux cellules filles adjacentes sur le plan vertical. Ce modèle s'appuie sur la capacité des progéniteurs à se diviser en orientant leur fuseau mitotique de telle sorte qu'une cellule se retrouve dans le compartiment épineux et que l'autre soit maintenu dans la couche basale (15) (Figure 3). Dans la peau de souris adulte 85% des divisions observées sont asymétriques (16).

### **2-2- La couche épineuse**

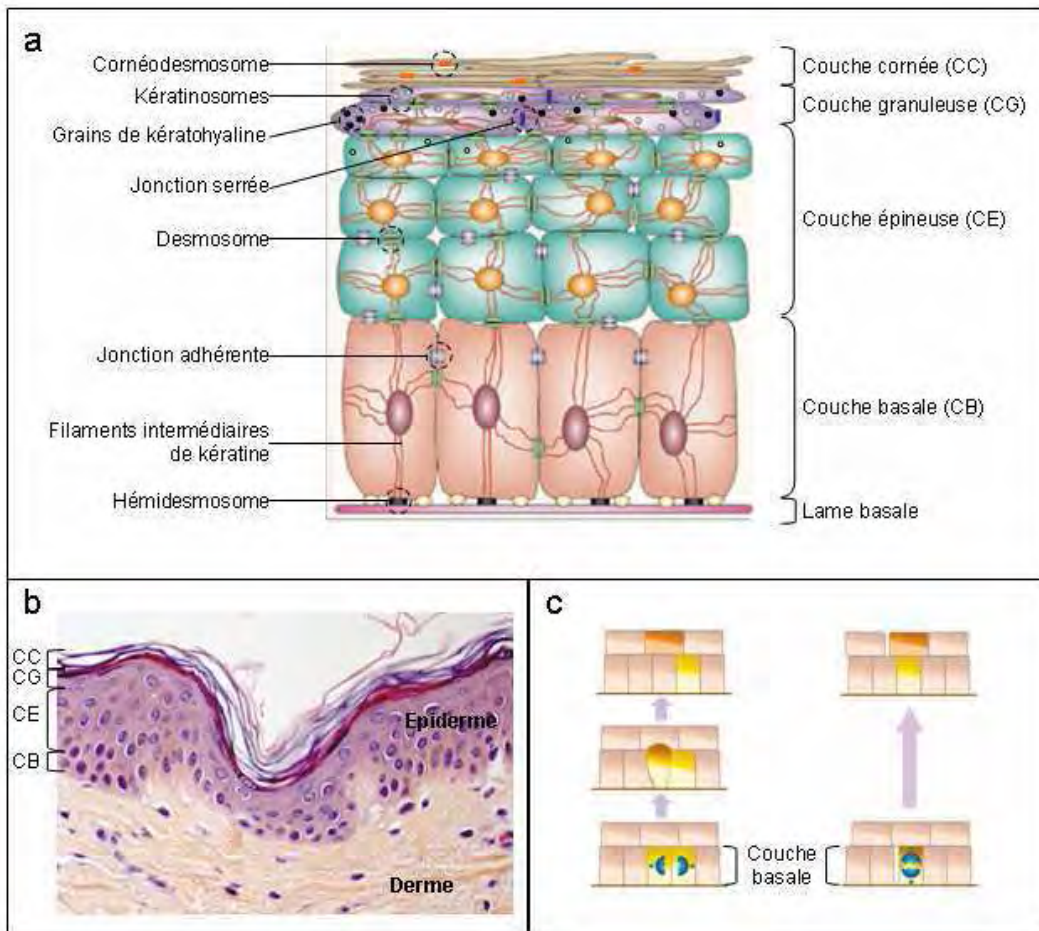
La couche épineuse doit son nom à l'aspect particulier des kératinocytes qui apparaissent polyédriques et présentent de nombreuses «épines» cytoplasmiques reliées par un grand nombre de desmosomes aux cellules adjacentes. La couche épineuse est constituée de cinq à dix assises de kératinocytes qui ont perdu leur pouvoir prolifératif. Les kératinocytes sont caractérisés par la synthèse des kératines 1 et 10 remplaçant les kératines basales (17). En plus des nombreux desmosomes, d'autres types de jonctions (les jonctions adhérentes) renforcent la cohésion cellulaire au sein de la couche épineuse (Figure 3).

### **2-3- La couche granuleuse**

La couche granuleuse est la dernière couche nucléée de l'épiderme. Elle est composée d'une à trois couches de kératinocytes qui apparaissent aplaties parallèlement à la surface de l'épiderme. Les kératinocytes granuleux sont caractérisés par la présence de granules cytoplasmiques dépourvues de membrane, les grains de kératohyaline. Ces grains correspondent à des agrégats protéiques hautement insolubles contenant des protéines essentielles à la formation de l'enveloppe cornée, étape ultime de la cornification.

Le cytoplasme des kératinocytes granuleux renferme également des structures vésiculaires, les corps lamellaires ou kératinosomes. Ces vésicules contiennent des molécules de nature protéique et lipidique qui seront sécrétées à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée (18) (Figure 3).





**Figure 3- Stratification de l'épiderme interfolliculaire.**

(a) Schéma des différentes couches de kératinocytes de l'épiderme et des éléments structuraux essentiels des kératinocytes. (b) Histologie d'une coupe de peau humaine colorée à l'hématoxyline/éosine (CC : couche cornée ; CG : couche granuleuse ; CE : couche épinoïde ; CB couche basale). (c) Représentation schématique des différents modèles de division symétrique (gauche) ou asymétrique (droite) des cellules basales de l'épiderme. La division d'une cellule basale donne naissance à deux cellules filles, dont l'une persistera dans la couche basale et conservera ses propriétés de cellules proliférative et l'autre se différenciera en kératinocyte épinoïde.

(Modifié d'après Fuchs (2002) *Nat Rev Genet* (a) ; Fuchs (2007) *Nature* (c))

## **2-4- La couche cornée**

La dernière étape de la kératinisation donne naissance à des cellules aplaties, anucléées et dépourvues d'organelles, les cornéocytes. La couche cornée, ou *stratum corneum* est constituée de cinq à dix strates de cornéocytes (Figure 3). Ceux-ci renferment une matrice fibreuse de kératines maintenues par l'enveloppe cornée, une structure composée d'un ensemble de protéines qui vient renforcer la membrane plasmique. Les lamelles lipidiques intercornéocytaires issues de la sécrétion des kératinosomes, forment une «colle» participant à la cohésion et à l'imperméabilité de la couche cornée (18).

Les cornéocytes les plus superficiels sont destinés à être éliminés lors de la desquamation. Au cours de ce processus, des enzymes protéolytiques sécrétées par les kératinosomes dans l'espace intercornéocytaires vont progressivement dégrader les structures d'adhésion (cornéodesmosomes). Parmi ces enzymes on retrouve les protéases à sérine (kallikréines 5 et 7), des protéases à cystéine et des protéases à aspartate (cathepsine D) (19-21). Les protéases et leurs inhibiteurs participant à ce processus sont finement régulés par le microenvironnement, notamment le pH de la couche cornée (22).

## **3- La fonction de barrière épidermique physique et chimique**

L'épiderme est en contact direct avec l'environnement extérieur. Il subit en permanence des agressions physiques, chimiques, biologiques et mécaniques. De plus, il doit contrôler la perte en fluide de l'organisme afin de maintenir l'homéostasie corporelle. L'ensemble de ces fonctions est essentiellement assuré par la couche cornée. L'efficacité de la barrière repose sur des structures qui lui sont propres et qui incluent les systèmes de cohésion intercellulaire, la résistance des cellules assurées par l'enveloppe cornée et l'imperméabilité conférée par les lamelles lipidiques intercornéocytaires.

### **3-1- Les structures d'adhésions intercellulaires**

Au sein de l'épiderme, on distingue quatre types de jonctions intercellulaires établies entre les kératinocytes : les jonctions serrées, les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes, retrouvées uniquement dans les couches vivantes de

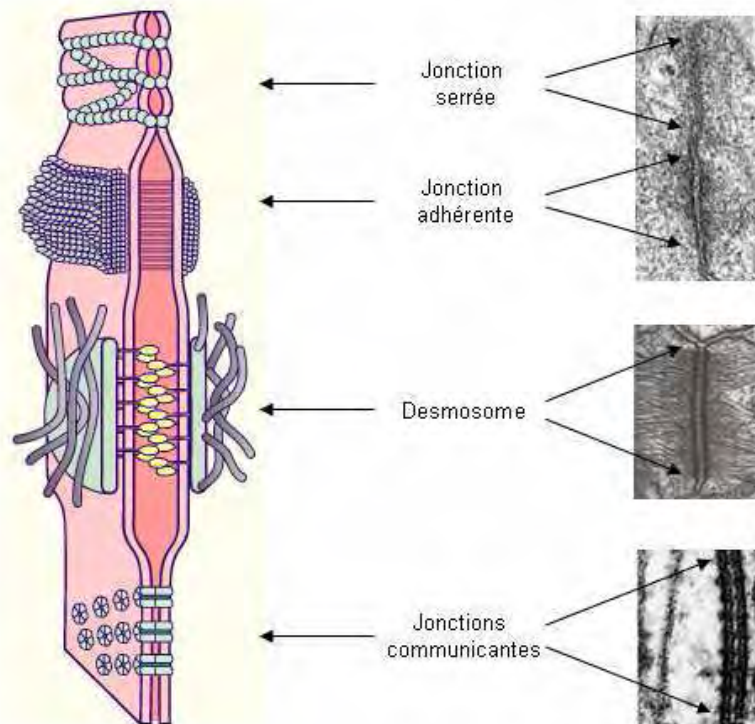
l'épiderme, et les desmosomes répartis de la couche basale à la couche cornée (Figure 4).

Les jonctions serrées se localisent le long des membranes latérales de la couche granuleuse. Elles participent à la régulation des flux paracellulaires d'eau et de molécules solubles comme l'atteste le modèle murin invalidé pour une protéine essentielle à la formation de ces structures, la claudine-1. Ces animaux présentent une peau ridée associée à une augmentation dramatique de la perte en eau transépidermique qui conduit à leur mort durant le premier jour de vie (23).

Les jonctions communicantes (Gap) forment des tunnels intercellulaires qui assurent le transport d'électrolytes, de seconds messagers et de métabolites entre le cytoplasme de cellules adjacentes. Formées d'anneaux issus de l'assemblage de connexines, ces structures assurent le couplage électrique et biochimique entre les cellules de l'épiderme (24). Leur rôle dans la fonction de barrière et l'homéostasie épidermique est illustré par le modèle murin de surexpression de la connexine 26 (25) et par les désordres de la kératinisation observés dans le syndrome de Vohwinckel, la kératodermie palmoplantaire avec surdité et le syndrome KID (26). Toutes ces pathologies sont dues à des mutations dans des gènes codant des protéines des Gap jonctions.

Les jonctions adhérentes servent de points d'ancrage aux filaments d'actine du cytosquelette (27, 28). En leur absence, l'assemblage des autres jonctions intercellulaires, notamment les desmosomes, est compromise (29).

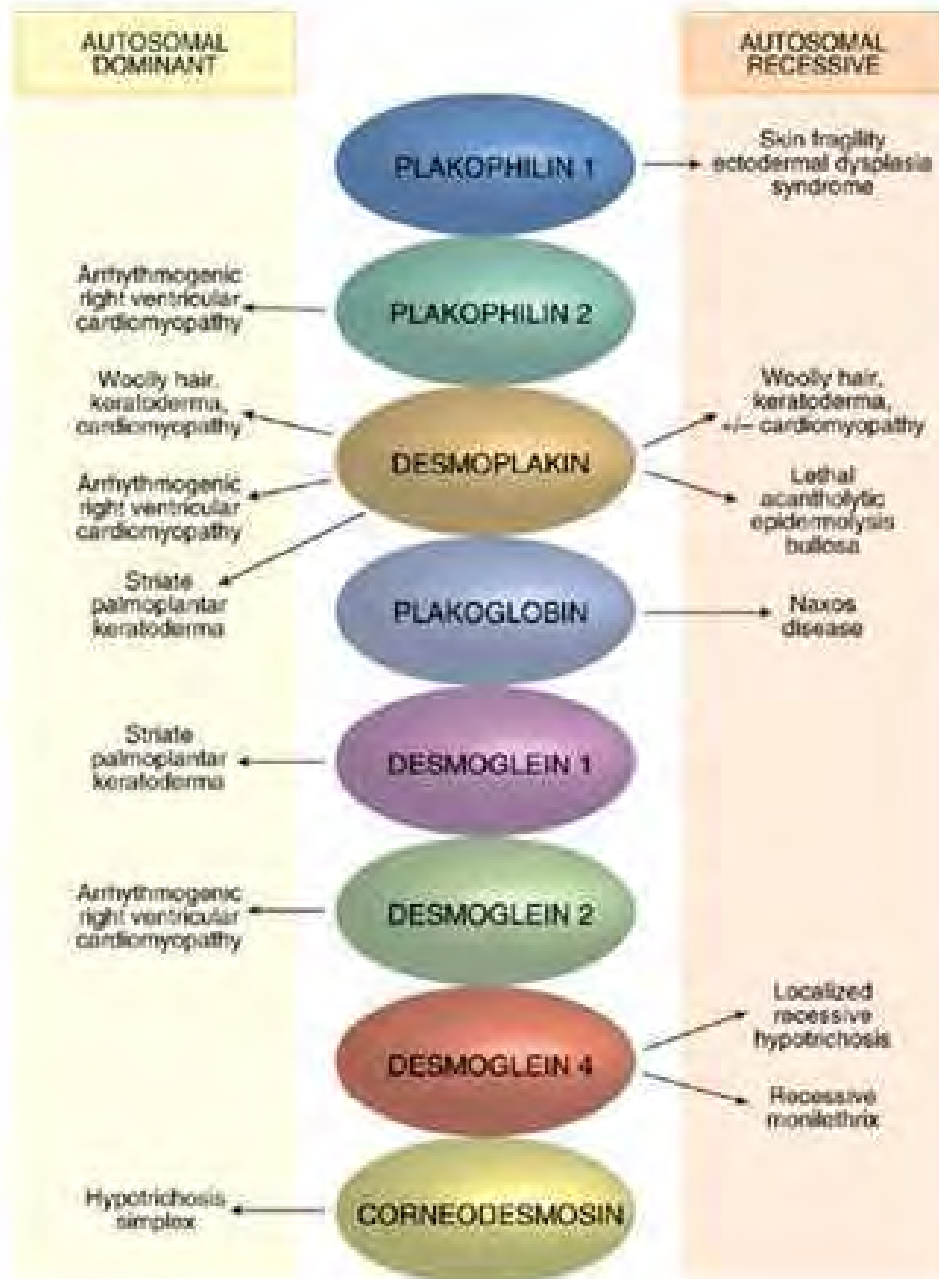
Les desmosomes sont des jonctions intercellulaires importantes retrouvées essentiellement dans l'épiderme et dans le cœur (30). Les desmosomes confèrent la résistance mécanique et la rigidité aux tissus. Dans l'épiderme, ils sont présents dans toutes les couches cellulaires. Au niveau de la lame basale ils prennent la forme d'hémidesmosomes. Les desmosomes des couches intermédiaires deviennent ensuite des cornéodesmosomes, dans la couche cornée. Ils sont composés de trois familles de protéines : les protéines armadillos (plakoglobine et certaines plakophilines), les cadhérines (trois desmocollines et quatre desmoglénines) et les plakines (desmoplakine, envoplakine,



**Figure 4- Structures d'adhésions présentes dans l'épiderme.**

Quatre types de structures d'adhésion intercellulaires sont retrouvés dans l'épiderme : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes. Ces jonctions cellule-cellule présentent un aspect ultrastructural caractéristique et reconnaissable par microscopie électronique à transmission.

(Modifié d'après <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/francais/epithel/epithel05.html> (schéma de gauche); Kobiela & Fuchs (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol*)



**Figure 5- Maladies génétiques causées par des mutations des gènes codants les protéines de structure des desmosomes.**

Des mutations des gènes codant la plakophiline 2, la desmoplakine, les desmoglénines 1 et 2 et la cornéodesmosine sont associées à des maladies dominantes (panel de gauche, jaune). Des mutations des gènes codant la plakophiline 1, la desmoplakine, la plakoglobine et la desmoglénine 4 sont associées à des maladies récessives (panel de droite, rouge).

(Modifié d'après Lai-Cheong (2007) *J Invest Dermatol*)

plectine, antigène 1 pemphigoïde bulleux, facteur de liaison des microtubules d'actine et cornéodesmosine) (29).

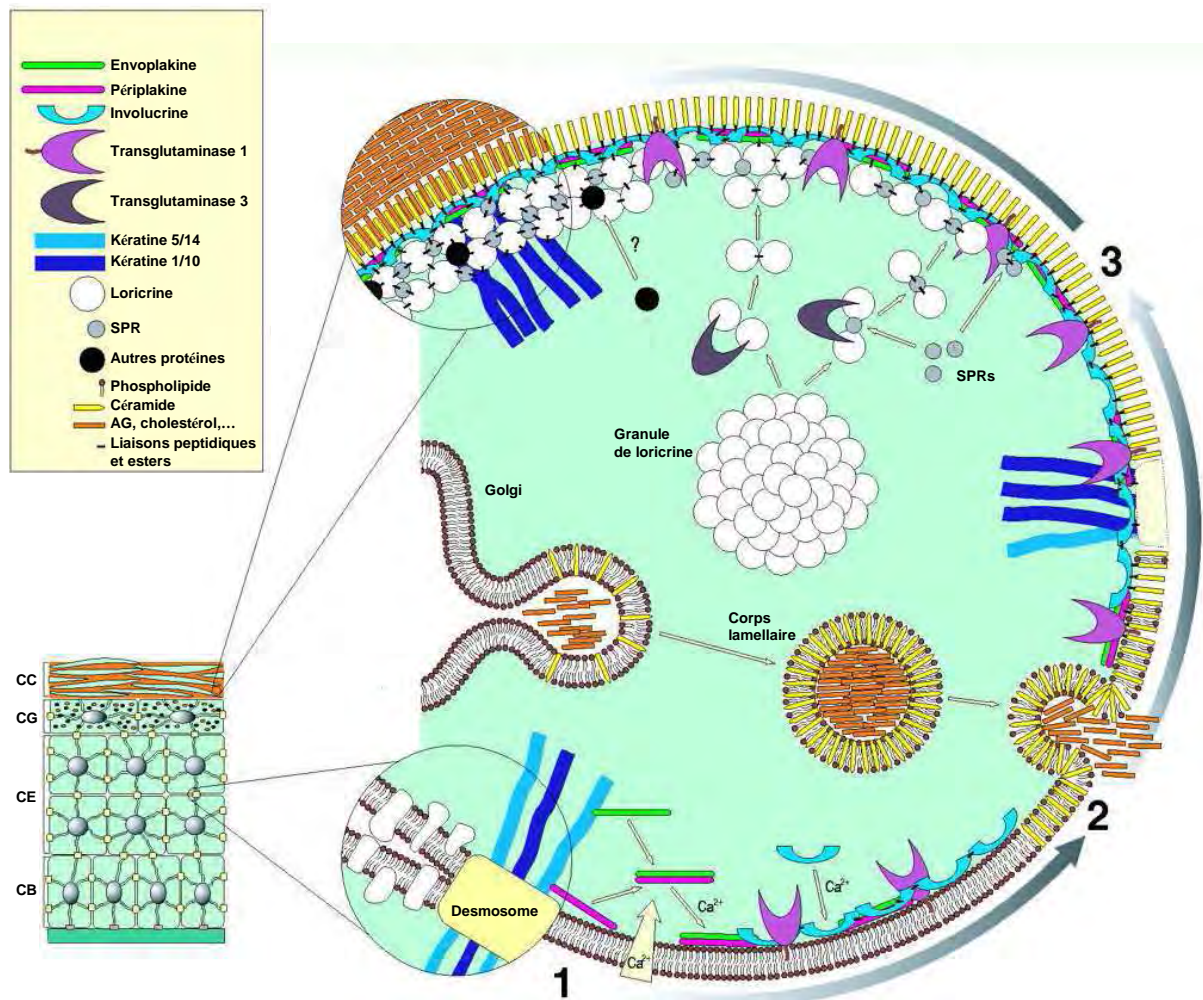
Au cours de la cornification, les desmosomes s'enrichissent en cornéodesmosine qui est insérée au niveau des cadhérines après sécrétion par les corps lamellaires. La cornéodesmosine renforce les desmosomes qui apparaissent plus dense en microscopie électronique entre les cornéocytes (31). Les molécules extracellulaires des cornéodesmosomes (desmogléine, desmocolline et cornéodesmosine) sont progressivement dégradées par les enzymes de la desquamation, afin d'éliminer les cornéocytes superficiels. Des mutations dans les gènes codant les protéines desmosomales chez l'homme démontrent l'importance de ces constituants dans la peau, les cheveux et le cœur (Figure 5) (29).

### **3-2- L'enveloppe cornée**

L'enveloppe cornée (EC) est formée sur la face interne de la membrane plasmique. Elle est retrouvée dans les cellules les plus différenciées des épithéliums stratifiés et squameux. L'EC consiste en une couche épaisse (10 nm) de protéines insolubles qui procure au tissu une barrière physique efficace. Dans le cas particulier des cornéocytes elle comprend, en plus d'une structure protéique, une monocouche de céramides liée de manière covalente aux protéines et servant d'ancrage aux lipides intercornéocytaires (Figure 6).

La structure protéique de l'enveloppe cornée résulte d'un assemblage covalent entre plusieurs précurseurs protéiques grâce à l'action des transglutaminases (TGases), des enzymes dépendantes du calcium qui catalysent la formation de liaisons covalentes entre les protéines. Dans l'épiderme, la TGase 1 exprimée au niveau de la couche granuleuse est la plus importante comme illustré par l'ichtyose lamellaire, une ichthyose sévère causée par des mutations du gène de la TGase 1, *TGM1* (32). L'assemblage de l'EC est un processus finement régulé par la concentration du calcium intracellulaire. Elle débute dans les couches épineuses supérieures et résulte de trois étapes successives.

- L'étape initiale est associée à l'augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules suprabasales. Pendant cette étape, la periplakine et l'envoplakine forment des hétérodimères stables auxquels se fixe de manière covalente l'involucrine grâce à l'action de la TGase1. Il en résulte une armature primaire particulièrement solide.



**Figure 6- Mise en place de l'enveloppe cornée.**

Dans la couche épineuse (CE), l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire induit l'expression de l'envoplakine, de la périplakine et de l'involucrine qui sont alors liées par l'action de la transglutaminase 1 sur la face interne de la membrane plasmique pour former l'armature primaire de l'enveloppe cornée (étape 1). En progressant vers la surface de l'épiderme, dans la couche granuleuse (CG), il y a formation de l'enveloppe lipidique issue de la fusion de corps lamellaires avec la membrane plasmique des kératinocytes (étape 2). En même temps, les protéines de renforcement (kératines, loricrine...) sont progressivement liées entre elles par la transglutaminase 3, puis viennent s'intégrer dans la structure primaire grâce à l'action de la transglutaminase 1 (étape 3). L'enveloppe cornée qui en résulte procure aux cornéocytes leur rigidité et une plateforme d'ancrage pour les lamelles lipidiques qui conféreront à la couche cornée (CC) sa fonction de barrière imperméable.

(Modifié d'après Kalinin (2001) *J Cell Science*.)

- La seconde étape commence au niveau de la couche granuleuse dans laquelle est mise en place l'enveloppe lipidique. Les corps lamellaires issus du Golgi fusionnent avec la membrane plasmique déversant leur contenu entre la couche granuleuse et la couche cornée. Les céramides à longue chaîne présentes dans les membranes fusionnées sont liées aux protéines déjà en place par transestérification grâce à la TGase1. L'alignement de la partie extracellulaire des céramides le long de la surface externe forme ainsi l'enveloppe lipidique.

- La troisième étape correspond à l'étape de renforcement de l'enveloppe cornée. Elle se produit de manière concomitante à la formation de l'enveloppe lipidique. Durant cette étape, différentes protéines (loricrine, SPRs (small proline-rich proteins)) sont polymérisées et assemblées par la TGase3. Les polymères sont ensuite transférés en périphérie pour être liés à l'armature protéique primaire par la TGase1 (33-35).

Un autre composé de l'EC est le complexe filaggrine-kératine. La filaggrine est une protéine synthétisée sous forme d'un précurseur de haut poids moléculaire (500 kDa) et stockée dans les grains de kératohyaline de la couche granuleuse. La filaggrine est maturée par clivage protéolytique, qui libère des motifs monomériques (35 kDa) et un domaine N-terminale (36). Ce domaine peut être transloqué dans le noyau, suggérant son implication dans les événements nucléaires associés à la différenciation terminale (37, 38). La filaggrine permet l'agrégation des filaments de kératine parallèlement à la surface cutanée, entraînant un effondrement cellulaire à l'origine de l'aplatissement des cellules des couches granuleuse et cornée. Cet agrégat est en partie lié de manière covalente à l'EC. Lors des étapes finales de la cornification, la filaggrine se détache des filaments de kératine. Elle est alors complètement protéolysée en acides aminés hygroscopiques constituant le facteur naturel d'hydratation (39).

La filaggrine est un élément essentielle à la fonction de barrière cutanée comme le montre les modèles murins présentant des mutations dans le gène *FLG* (40, 41) et la découverte de son rôle en tant que gène causal de l'ichtyose vulgaire, une pathologie fréquente de la kératinisation (42).

L'enveloppe cornée contient d'autres protéines de diverses natures, telles que des inhibiteurs de protéases ou les protéines de la famille S100. L'ensemble de ces molécules contribue à la formation d'une coque rigide qui sert également de plate-



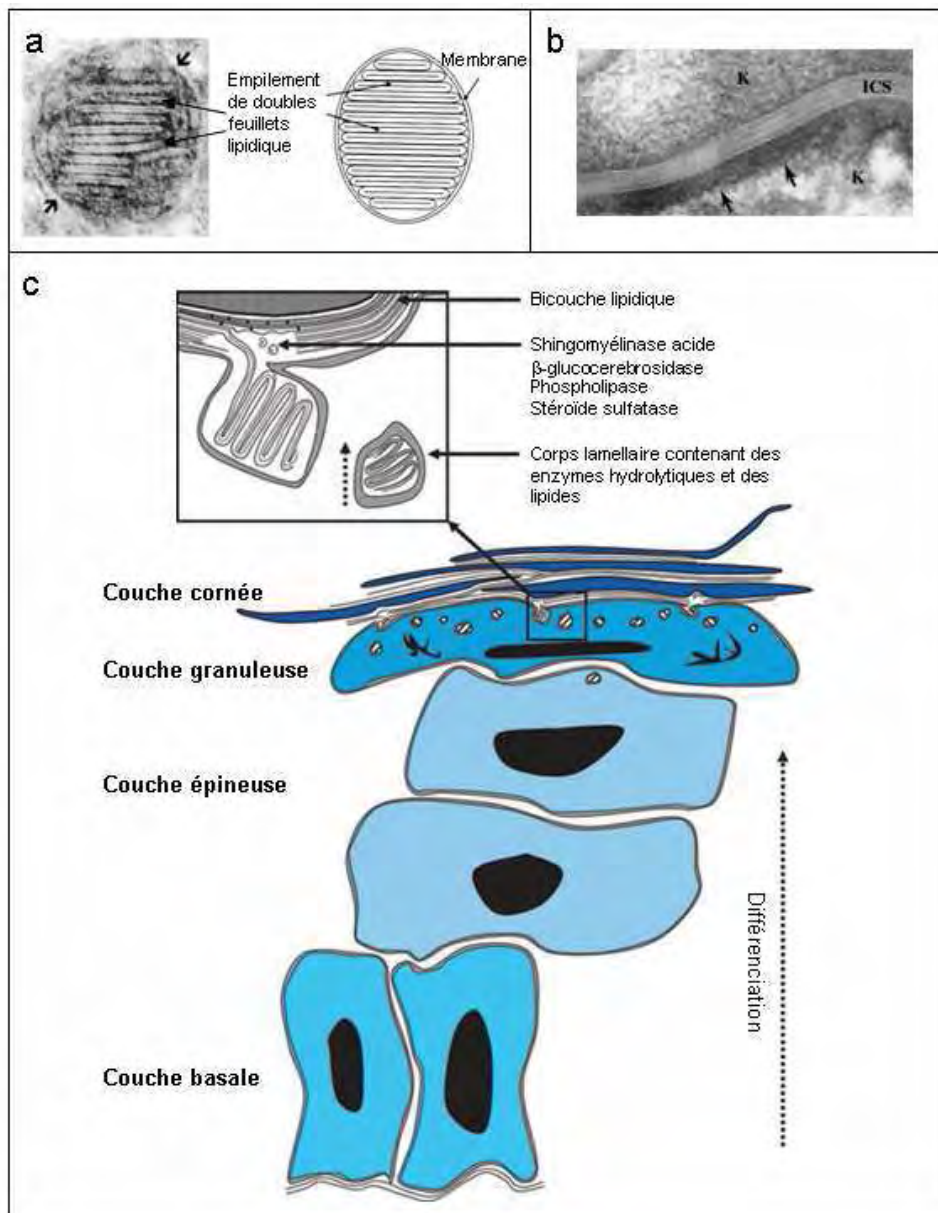
forme d'ancrage aux bicouches lipidiques extracellulaires spécifiques de la couche cornée, les lamelles lipidiques.

### **3-3- Les lamelles lipidiques intercornéocytaires**

Les cornéocytes sont enveloppés dans un « ciment » lipidique originale et spécifique dont la composition diffère profondément de celle des membranes biologique. Les lipides majoritaires de la couche cornée sont les céramides (45-50%), le cholestérol (25%) et les acides gras libres (10-15%) (43). Ils s'agencent de manière particulière en feuillet formant des lamelles lipidiques ou *lamellae* (18). La présence de ces lamelles lipidiques intercornéocytaires a été mise en évidence par la technique de microscopie électronique «cryofracture» (44, 45) et l'utilisation de la post-fixation au tétroxide de ruthénium, un agent préservant et contrastant les lipides (46).

Les lamelles lipidiques de la couche cornée sont issues du déversement des granules lamellaires à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée. Ces organites sont déjà présents dans les couches épineuses superficielles. Ils renferment les précurseurs lipidiques (glycosylcéramide, cholestérol et phospholipides) organisés en double-feuillet lipidique (47) et des enzymes cataboliques (48). Une fois dans l'espace intercellulaire, les précurseurs lipidiques subissent des transformations enzymatiques grâce au déversement simultané des enzymes de maturation. La  $\beta$ -glucocérébrosidase et la sphingomyélinase acide sont responsables de la formation des céramides alors que les phospholipides sont hydrolysés en acide gras libres par la phospholipase A2 (Figure 7). La composition lipidique particulière qui résulte de ces réactions enzymatiques est indispensable et peut expliquer l'organisation spatiale particulière des lamelles lipidiques (49). Un modèle propose que les lipides sont alignés parallèlement les uns aux autres, de façon perpendiculaire à la surface des cornéocytes. Les groupements polaires se retrouveraient sur la partie externe des lamelles alors que les groupements apolaires formeraient la partie interne (50).

La nature hydrophobe des lipides lamellaires permet de limiter les flux des solutions aqueuses à travers la couche cornée. Cette propriété est cruciale pour lutter contre la déshydratation et permet d'empêcher la pénétration de molécules exogènes hydrophiles.



**Figure 7- Les lamelles lipidiques intercornéocytaires.**

Les corps lamellaires de la couche granuleuse contiennent un empilement de feuillets lipidiques visibles en microscopie électronique après post-fixation au tétr oxyde de ruthénium (a). Les feuillets lipidiques sont déversés à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée avec les enzymes hydrolytiques responsables de leur maturation (c). Dans l'espace intercellulaire, les feuillets lipidiques fusionnent bout à bout pour former une enveloppe lipidique constituée d'un agencement particulier en bicouche lipidiques imperméables (c). Ces lipidiques intercornéocytaires sont observables (ICS) en microscopie électronique après post-fixation au tétr oxyde de ruthénium (b).

(Modifié d'après; Madison (2003) *J Invest Dermatol* (a, b) ; Proksch (2008) *Exp Dermatol* (c))

En plus de ces fonctions de barrière physique et chimique, conférées par les jonctions intercellulaires, l'enveloppe cornée et les lamelles lipidiques, l'épiderme assure une barrière protectrice immunologique qui sera exposé dans la partie D.



## **PARTIE B- Le syndrome de Netherton**

### **I. Les ichtyoses**

Les ichtyoses forment un groupe hétérogène de maladie de la peau résultant d'un défaut de la kératinisation (51). Ces désordres sont regroupés en raison de leur origine génétique et du fait qu'ils se caractérisent par la présence généralisée de squames qui affecte tous les tissus épithéliaux. Les désordres de kératinisation confinés à des parties restreintes du corps tel que le groupe de kératoses palmoplantaires en sont exclus.

Le terme ichtyose est dérivé du grecque «ichthys» qui signifie «poisson» et qui se réfère à l'apparence de la peau qui forme des squames semblables à des écailles. Les ichtyoses se manifestent dès la naissance ou plus tardivement au cours de la vie. Elles peuvent se limiter à une manifestation cutanée ou être associées à des anomalies systémiques affectant plusieurs organes.

L'identification des gènes responsables de ces ichtyoses a permis de mieux comprendre la physiopathologie de ces dermatoses et de mieux les diagnostiquer.

La différenciation épidermique est complexe et des défauts affectant les différentes étapes de ce processus peuvent rompre l'homéostasie épidermique et conduisent à une couche cornée anormale et l'apparition de squames. Les désordres sous-jacents peuvent être de différentes natures :

- un défaut des protéines de structure de l'épiderme telles que certaines kératines ou des protéines de l'enveloppe cornée ;
- un défaut des enzymes nécessaires à la cornification telle que la transglutaminase 1 ;
- un défaut affectant la cohésion intercellulaire : anomalies des protéines des jonctions intercellulaires, défaut de contrôle de l'activité des protéases épidermiques responsables du clivage anormale des structures d'adhésions ;
- un défaut de l'homéostasie lipidique secondaire aux anomalies des enzymes responsables de leur maturation ou de leur transport.

Ces exemples illustrent la complexité des mécanismes conduisant à la mise en place d'une couche cornée fonctionnelle et démontrent que diverses anomalies qui

s'échelonnent tout le long du processus de cornification peuvent résulter en un phénotype clinique similaire.

Ces désordres causent généralement un défaut de la fonction de barrière épidermique qui peut dans un second temps induire une inflammation et une hyperprolifération cutanée.

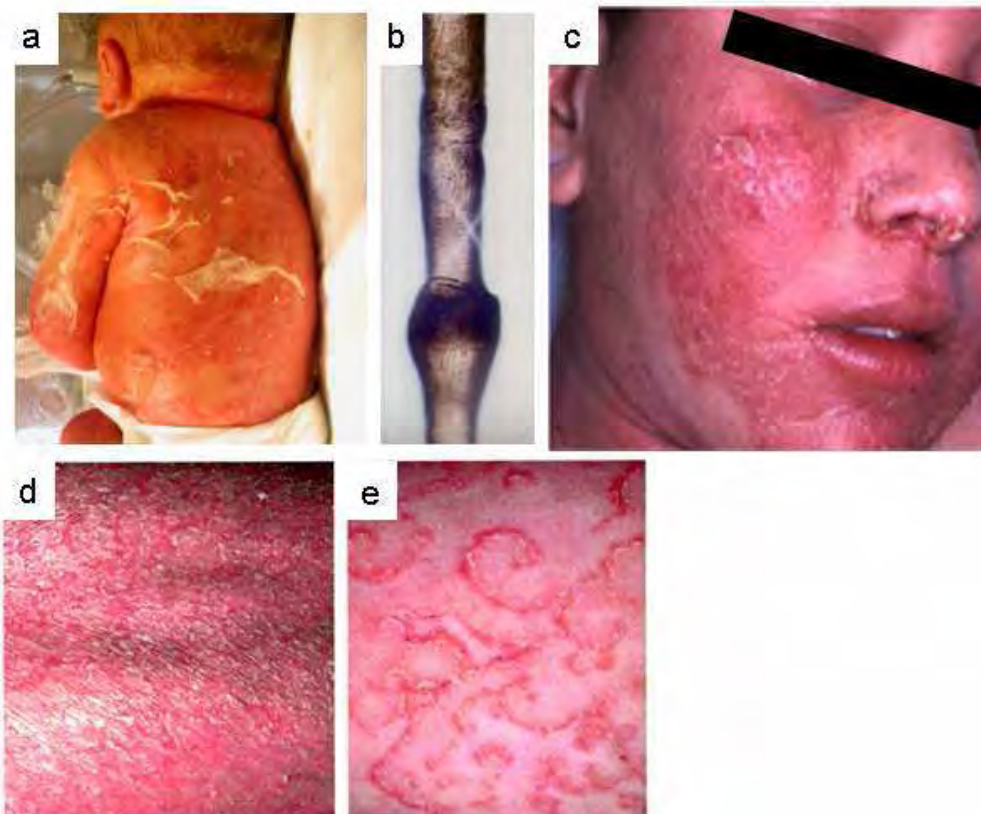
L'avancée des connaissances sur les mécanismes impliqués dans le développement de ces ichtyoses permet de clarifier les mécanismes physiopathologiques mais également physiologiques de l'homéostasie cutanée.

## II. Manifestations cliniques du syndrome de Netherton

Parmi les ichtyoses, on distingue le syndrome de Netherton (SN). Le syndrome de Netherton (OMIM 256500) est une génodermatose rare et sévère, transmise selon le mode autosomique récessif. Il s'agit d'une érythrodermie ichtyosiforme congénitale associée à une dysplasie pileuse spécifique (*trichorrexis invaginata*) et à la présence de manifestations atopiques constantes (52, 53) (Figure 8).

A la naissance ou en période périnatale, les enfants atteints du SN présentent une érythrodermie (rougeur généralisée) congénitale ichtyosiforme (ECI) de sévérité variable. L'érythrodermie congénitale est souvent accompagnée d'une exfoliation exacerbée à l'origine de larges squames fines et translucides qui se détachent par lambeaux de l'épithélium sous-jacent. Ces anomalies cutanées sont à l'origine d'un défaut sévère de la fonction de barrière cutanée entraînant des complications telles qu'une déshydratation hypernatrémique intense et des infections récurrentes qui peuvent menacer le pronostic vital en période néonatale (54).

L'érythrodermie desquamative semble être plus sévère durant la petite enfance et tend à s'améliorer avec l'âge (55). Elle peut perdurer tout le long de la vie dans les cas les plus sévères ou évoluer vers un phénotype moins sévère, l'ichtyose linéaire circonflexe (ILC). L'ILC est une condition particulière d'hyperkératose associée à la présence de plaques serpigineuses et érythémateuses bordées de squames en double collerette (56) (Figure 8). Ces lésions migrantes épisodiques se déplacent d'environ 0,5 mm par jour (57). En plus de ces lésions, les patients développent



**Figure 8- Manifestations cliniques du syndrome de Netherton.**

Le syndrome de Netherton (SN) est caractérisé par une triade clinique incluant une érythrodermie ichtyosiforme congénitale (a, EIC) (rougeur généralisée et desquamation intense), une anomalie pileuse spécifique (b, *trichorrhexis invaginata*) et des manifestations atopiques (c, dermatite atopique). L'EIC sévère à la naissance tend à s'améliorer avec l'âge. L'érythrodermie desquamative peut se maintenir sous une forme moins sévère (d) ou évoluer vers une ichtyose linéaire circonflexe (e, ILC). L'ILC forme des lésions serpigneuses bordées de squames en double collerette. (Modifiés d'après Sprecher (2001) *J Invest Dermatol* (d, e))

souvent une lichenification (épaississement de la peau) au niveau des zones de flexion associée à l'apparition de lésions de dermatite atopique (56).

La majorité des patients SN ont une dysplasie spécifique de la tige pileuse appelée *trichorrexia invaginata* (TI) (Figure 8). La forme particulière du TI, ou cheveux bambous, est due à l'invagination de la partie distale de la tige pileuse dans la partie proximale. Un défaut de cornification de la gaine épithéliale interne du follicule pileux est à l'origine de cette anomalie. Contrairement aux autres anomalies pileuses qui peuvent être retrouvées chez les patients SN, telles que le *trichorrexia nodosa* (ou trichorrexie noueuse) et le *pili torti* (tige pileuse tordue), le TI est une dysplasie spécifique de la maladie (58). Elle doit être recherchée méticuleusement puisque seulement 20 à 50% des poils peuvent être affectés, le plus souvent au niveau des sourcils.

Les patients SN souffrent également de manifestations atopiques constantes qui incluent une dermatite atopique, des rhinites allergiques et des allergies alimentaires fréquentes. Ces manifestations sont accompagnées d'une élévation significative du taux sérique d'immunoglobulines E (55, 59). (cf. paragraphe V)

### **III. Manifestations cutanées du syndrome de Netherton**

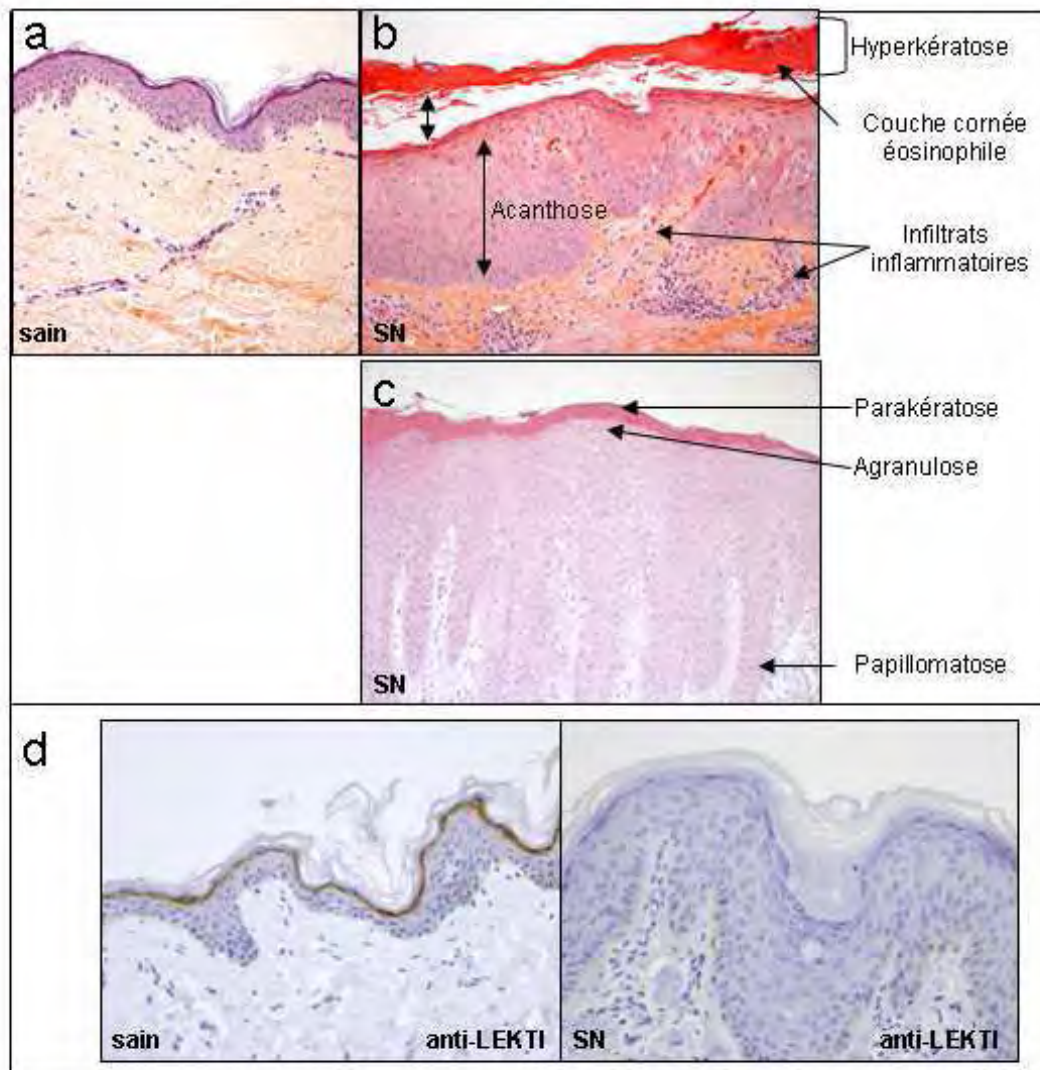
#### **1- Anomalies histologiques du syndrome de Netherton**

L'analyse histologique de la peau des patients atteint du SN révèle un grand nombre d'anomalies qui reflète des défauts de différenciation terminale et de prolifération au sein de l'épiderme. L'histopathologie du SN n'est pas spécifique de cette maladie puisqu'elle peut partager des caractéristiques retrouvées dans l'hyperkératose, le psoriasis et la dermatite atopique.

Après coloration avec de l'hématoxyline/éosine d'une coupe de peau, des anomalies des couches les plus profondes de l'épiderme jusqu'à la couche cornée sont notables. Bien que la sévérité du phénotype soit variable d'un patient à l'autre, certaines anomalies apparaissent récurrentes (Figure 9) :

- Une hyperplasie de l'épiderme qui correspond à une augmentation du nombre de couche de kératinocytes épineux (acanthose).





**Figure 9- Anomalies histologiques de la peau des patients SN.**

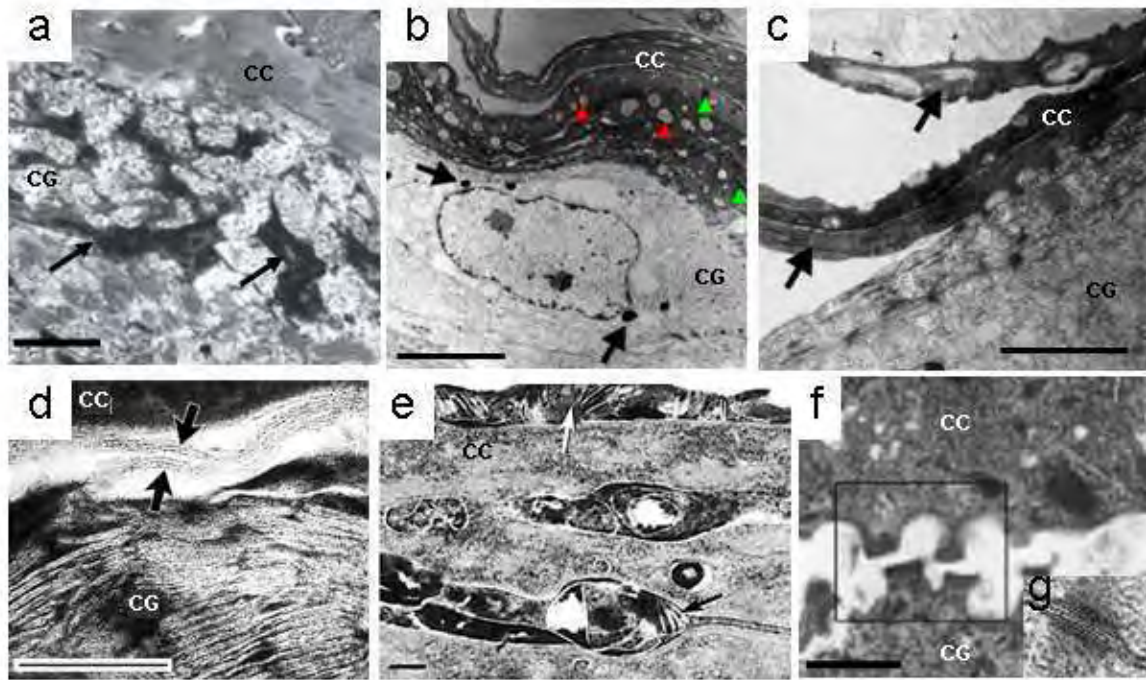
(a) Coupe de peau humaine saine colorée à l'hématoxyline et éosine (HE). (b, c) Coupes de peau de patients SN, colorées à l'HE, présentant de nombreuses anomalies : la couche cornée, décollée de l'épiderme sous-jacent, est épaissie (hyperkératose) et contient des amas éosinophiles de cellules inflammatoires. Dans certains cas, des noyaux persistent dans les cornéocytes (parakératose) et on note une agranulose focale (couche granuleuse absente) (c). L'épiderme NS comporte plus d'assise de kératinocytes (acanthose) et s'invagine dans le derme (papillomatose), qui contient des infiltrats inflammatoires (b et c). (d) Immunohistochimie sur coupe de peau, avec un anticorps dirigé contre la protéine LEKTI. Dans la peau saine, LEKTI est détectée dans la couche granuleuse alors que la protéine est absente dans la peau des patients SN.

(Modifié d'après Bitoun (2003) *Hum Mol Genet* (d))

- Une invagination de l'épiderme dans le derme (papillomatose) caractéristique des pathologies cutanées inflammatoires. Ainsi l'épiderme SN papillomatosisique est souvent qualifié d'épiderme psoriasiforme, bien que certains patients présentent une acanthose sans papillomatose.
- Une dilatation des espaces intercellulaires (spongiose) modérée dans les couches profondes de l'épiderme. La spongiose est souvent secondaire à l'infiltration de cellules inflammatoires dans l'épiderme et à la sécrétion de protéases qui dégradent les structures d'adhésion intercellulaire et la matrice extracellulaire.
- Lorsqu'elle est présente, la couche cornée des patients SN apparaît éosinophile (rouge) et très épaissie (hyperkératose). Selon les zones, on observe une hyperkératose orthokératosique (absence d'organelle dans les cornéocytes) ou parakératosique (persistance des organelles dans les cornéocytes). La parakératose focale est souvent associée à une agranulose des couches sous-jacente illustrant un défaut sévère de différenciation terminale.
- Le derme des patients SN est plus riche en cellules que celui d'un individu sain. L'augmentation de la taille des vaisseaux sanguins est associée à la présence d'un infiltrat inflammatoire hétérogène périvasculaire et sub-épidermique. Cette réaction inflammatoire est également associée, dans certaines zones de la couche cornée, à la présence d'amas de cellules inflammatoires entraînant la formation de micro-abcès qui rappellent les micro-abcès de Monroe retrouvés dans le psoriasis.

## **2- Analyse ultrastructurale de l'épiderme SN**

L'analyse ultrastructurale de l'épiderme SN, par microscopie électronique à transmission, révèle des altérations majeures de la cornification. Les cornéocytes apparaissent incomplètement cornifiés, parakératosiques et contiennent parfois des gouttelettes lipidiques (60). En plus des défauts de cornification, la couche cornée apparaît moins cohésive et on peut observer la présence de clivages anormaux des



**Figure 10- Anomalies ultrastructurales de l'épiderme des patients SN.**

(a) Epiderme normal présentant une couche cornée (CC) compacte adhérent à la couche granuleuse (CG) sous-jacente, dans laquelle sont visibles des grains de kératohyaline (flèches noires). (b, c) La couche cornée des patients SN apparaît anormale avec la présence de résidus d'organelles denses aux électrons et de gouttelettes lipidiques (b, têtes de flèche vertes et rouges, respectivement). Elle se détache en totalité ou partiellement de la CG (c, flèches noires). Dans la couche granuleuse, les grains de kératohyalines sont rares et de petite taille (b, flèches noires). (d) Dans un épiderme normal, les lipides déversés à l'interface entre les couches granuleuse et cornée s'organisent en bicouches lipidiques, alors qu'elles apparaissent non maturées et forment des pelotes dans les espaces intercornéocytaires de l'épiderme NS (e). Les microclivages entre les cornéocytes de la couche cornée des patients SN coïncident avec la rupture asymétrique des cornéodesmosomes (f). (g) Cornéodesmosome intact dans un épiderme normal.

CC : Couche cornée ; CG : Couche granuleuse

Echelle : a, e : 1  $\mu$ m ; b : 5  $\mu$ m ; c : 2  $\mu$ m ; d : 0,1  $\mu$ m ; f, g : 0,5  $\mu$ m

(Modifiés d'après Prost-Squarcioni (2006) *Med Science* (a) ; Muller (2002) *Br J Dermatol* (b, c) ; Fartash (1999) *Arch Dermatol* (d, e) ; Ishida-Yamamoto (2005) *J Invest Dermatol* (f))

cornéodesmosomes qui sont moins nombreux que chez un individu sain (60-62).

Après post-fixation au tétraxide de ruthénium, qui permet de conserver les structures lipidiques, les kératinosomes apparaissent désorganisés. De plus, leur contenu lipidique est prématurément secrété dans les espaces intercellulaires et la formation des lamelles lipidiques est perturbée. Ces dernières laissent place à des « pelotes » lipidiques associées à une dilatation des espaces intercellulaire (63).

Les cellules de la couche granuleuse sous-jacentes sont moins aplaties que celles d'un épiderme sain et contiennent moins de grains de kératohyaline et les filaments de kératine sont plus rares (60) (Figure 10).

### **3- Défaut de différenciation terminale**

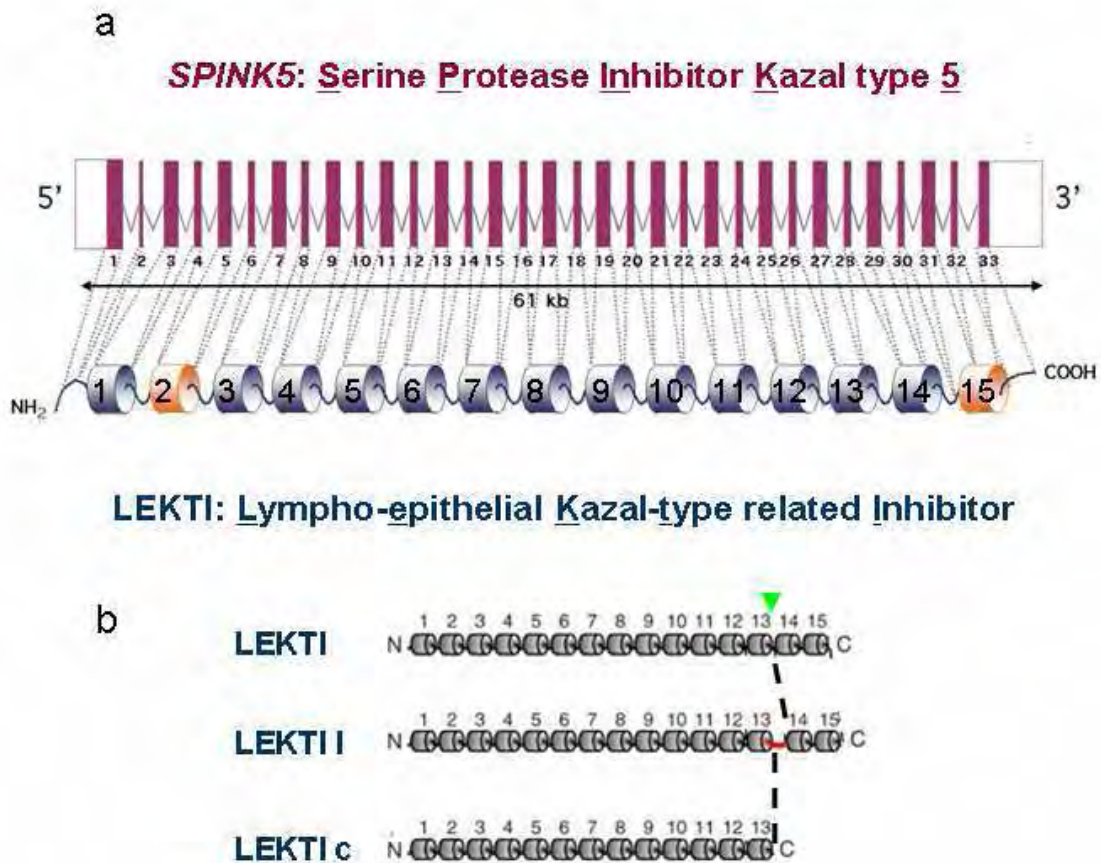
L'ensemble des défauts histologiques et ultrastructuraux observés dans l'épiderme SN concordent avec des altérations du processus de cornification.

Notre équipe a pu mettre en évidence une augmentation de la détection des protéines de l'enveloppe cornée, l'involucrine et la loricrine, dans l'épiderme de patient SN comparé à une peau saine. D'autre part, la filaggrine adopte un profile d'expression anormal et discontinu dans la couche cornée des patients (62). Il est probable que le défaut de barrière cutanée secondaire au détachement de la couche cornée résulte en la mise en place de mécanismes de compensation visant à rétablir l'homéostasie épidermique. Ceux-ci inclus une différenciation anormale et accélérée (coïncidant avec l'augmentation des marqueurs de la différenciation terminale), une hyperprolifération (concordant avec l'acanthose observée chez les patients) et une hyperkératose (64).

## **IV. Physiopathologie du syndrome de Netherton**

### **1- *SPINK5***

Le gène responsable du syndrome de Netherton a été identifié en 2000, par l'équipe du Pr Hovnanian (65, 66). Localisé en 5q32, il s'agit du gène *SPINK5* (Serine Protease INhibitor Kazal type 5) dont les mutations décrites conduisent à la formation de codons stop prématurés (67, 68). Ceci a pour conséquence une réduction significative de l'expression du transcrit correspondant (67).



**Figure 11- Schéma de l'organisation du gène *SPINK5* et de la protéine LEKTI.**

(a) Le gène *SPINK5* fait 61 kb et est composé de 33 exons (rectangles rouges). Il code la protéine LEKTI comportant 15 domaines potentiellement inhibiteurs de type Kazal (cylindres rouges et bleus). Les domaines sont codés par les exons impairs de *SPINK5* et leur linkers par les exons pairs. Les domaines 2 et 15 (cylindres rouges) sont des domaines Kazal classiques alors que les 13 autres domaines (cylindres bleus) sont des Kazal-like possédant un pont disulfure de moins. (b) Il existe 3 transcrits de *SPINK5* codant : la forme entière de LEKTI (LEKTI), LEKTI long (LEKTI I) et LEKTI court (LEKTIc). La forme longue de LEKTI diffère du transcrit «entier» par l'insertion de 90 pb en aval de l'exon 28, créant ainsi une région linker plus longue (rouge) entre les domaines D13 et D14. La forme courte de LEKTI est déletée des domaines D14 et D15 suite à la prise en charge d'un site de polyadénylation alternatif dans l'intron 28.

(Modifié d'après Tartaglia-Polcini (2006) *J Invest Dermatol* (b))

Le gène *SPINK5* s'étend sur 61 kb et comprend 33 exons chez l'homme (65). Il code l'inhibiteur de protéases à sérine LEKTI (Lympho-Epitheliale Kazal Type related Inhibitor) (69) (Figure 11).

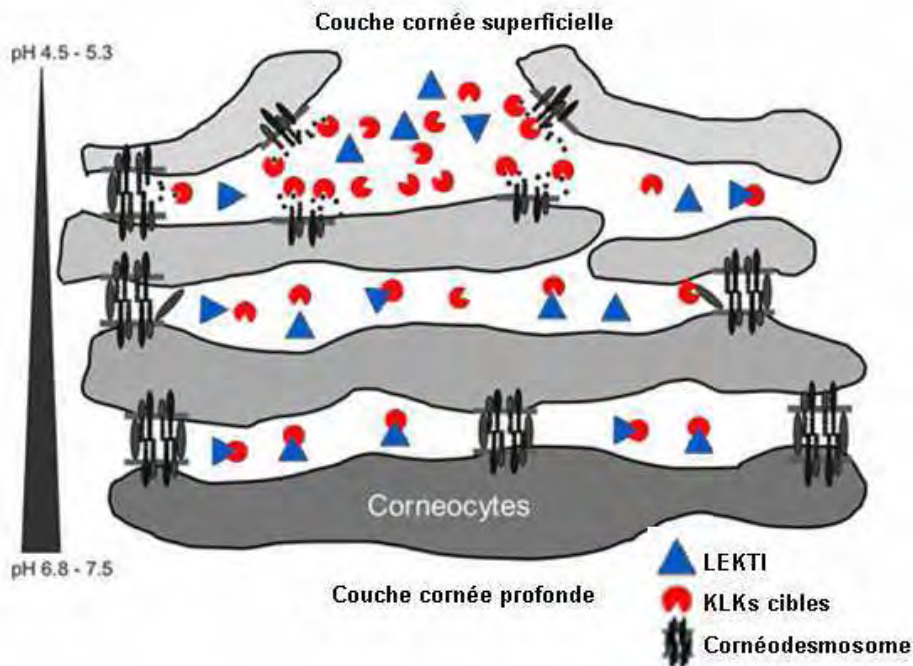
## 2- LEKTI

LEKTI est exprimée spécifiquement au niveau des couches de cellules vivantes les plus différenciées des épithéliums stratifiés tels que l'épiderme, les muqueuses orales et vaginales, la trachée, ainsi que dans les corpuscules de Hassal thymique, les amygdales et les glandes parathyroïdiennes. Dans l'épiderme interfolliculaire, LEKTI est majoritairement détectée dans la couche granuleuse. LEKTI est aussi exprimée dans la gaine épithéliale interne et les cellules matricielles des follicules pileux et le canal excréteur des glandes sébacées (70).

LEKTI appartient à la famille des inhibiteurs de protéases à sérine organisée en 15 domaines (D1 à D15) particulièrement conservés. Les domaines D2 et D15 présentent une forte identité de séquence avec le motif consensus d'un domaine Kazal dans lequel 6 résidus cystéines sont engagés dans la formation de trois ponts disulfures. Les 12 autres domaines, nommés «Kazal-like», n'ont que 4 des 6 résidus cystéines. Cependant, leur structure tridimensionnelle n'est pas différente de celle d'un domaine Kazal typique, avec notamment le maintien de la boucle inhibitrice. Seul le domaine D1 possède une structure différente suggérant une absence de fonction inhibitrice (69, 71).

Les domaines de LEKTI sont séparés par des régions linkers sensibles au clivage par les Subtilisin-like Proprotein convertase (SPC) (72). Le clivage des linkers par les SPC, plus particulièrement par la furine dans le cas de LEKTI (22), permet la libération de fragments mono- ou multimériques actifs de LEKTI (22, 70, 73-76). Il existe trois transcrits alternatif de *SPINK5*. La forme entière de LEKTI (LEKTI full-length), une forme longue de LEKTI (LEKTI long) et une forme courte (LEKTI short). La forme longue de LEKTI résulte d'une insertion de 90pb en aval de l'exon 28 créant un linker plus long entre les domaines D13 et D14. La forme courte de LEKTI est due à la prise en charge d'un site de polyadénylation alternatif au niveau de l'intron 28. Ceci résulte en une forme dépourvue pour les domaines D14 et D15 (Figure 11).

Chaque forme de LEKTI présente ses propres capacités inhibitrices. Les produits de maturation de LEKTI sont capables d'inhiber plus ou moins efficacement un vaste



**Figure 12- Schéma de la régulation du mécanisme de desquamation orchestrée par LEKTI.**

En condition physiologique, LEKTI et ses protéases cibles (kallikréines (KLKs) 5, 7 et 14) sont déversées à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée. Dans les couches profondes de la couche cornée le pH basique (6,8-7,5) permet une forte interaction entre les KLK et LEKTI qui préserve ainsi les structures d'adhésion : les cornéodesmosomes. En remontant vers la surface, le pH s'acidifie et l'interaction protéase/inhibiteur devient moins forte. Les KLKs sont alors disponibles pour dégrader progressivement les cornéodesmosomes conduisant à la libération des cornéocytes les plus superficiels qui se détachent de l'épiderme. Dans le cas du SN, en absence de LEKTI, les KLKs dégradent les cornéodesmosomes dès leur libération par les kératinocytes granuleux. Il en résulte un détachement en bloque de la couche cornée qui est un événement clé de la physiopathologie de la maladie.

(Modifié d'après Deraison (2007) *Mol Biol Cell*)

éventail de protéases telles que la trypsine, l'élastase du neutrophile, la subtilisine A, la cathepsine G et la chymotrypsine. De manière plus spécifique, certains fragments inhibent efficacement les kallikréines 5, 7 et 14, exprimées dans les couches les plus différenciées de l'épiderme (22, 74-77). Ces kallikréines sont des protéases à sérine les plus représentées dans l'épiderme. La KLK5 possède une activité de type tryptique, alors que la KLK7 est une protéase de type chymotrypsine. La KLK14 possède quant-à elle ces deux types d'activité.

Les fragments de LEKTI sont déversés dans l'espace intercellulaire entre la couche granuleuse et la couche cornée en même temps que ses protéases cibles, les KLK5 et KLK7 (61). L'interaction protéase/inhibiteur de protéase, régulée par le gradient de pH de la couche cornée, permet une desquamation contrôlée des cornéocytes les plus superficiels. En effet, à pH basique (6,8-7,5) dans les couches profondes du *stratum corneum*, l'interaction entre LEKTI et ses cibles est forte. Lorsque le pH s'acidifie, dans les couches supérieures du *stratum corneum*, cette force d'interaction diminue, ce qui a pour conséquence la libération des protéases qui peuvent alors dégrader les cornéodesmosomes les plus superficiels (22) (Figure 12).

Dans le cas du SN, en absence de LEKTI (70), les KLKs dégradent les cornéodesmosomes dès leur libération par les kératinocytes granuleux (20). Il en résulte un détachement en bloque de la couche cornée (Figure 9) qui est un événement clé de la physiopathologie de la maladie.

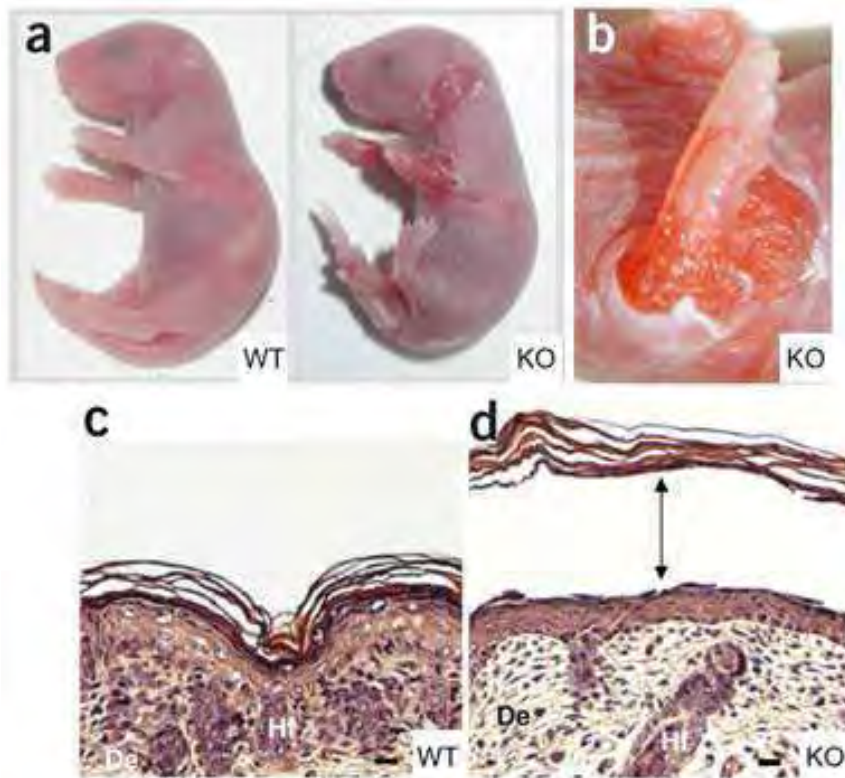
Par ces capacités inhibitrices et sa localisation tissulaire et cellulaire, LEKTI est un facteur essentiel à l'homéostasie épidermique. Son rôle dans la différenciation terminale et le maintien de la barrière cutanée est illustré par le syndrome de Netherton.

### **3- Modèle murin *Spink5*<sup>-/-</sup>**

Afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le SN, notre équipe a développé un modèle murin invalidé pour le gène *Spink5* (*Spink5*<sup>-/-</sup>) par recombinaison homologe (78).

Dès la naissance, les souris *Spink5*<sup>-/-</sup> reproduisent des caractéristiques phénotypiques de la maladie incluant une érosion cutanée essentiellement au niveau des zones de friction et une anomalie des vibrisses qui apparaissent peu nombreuses, mal orientées et recourbées (Figure 13).

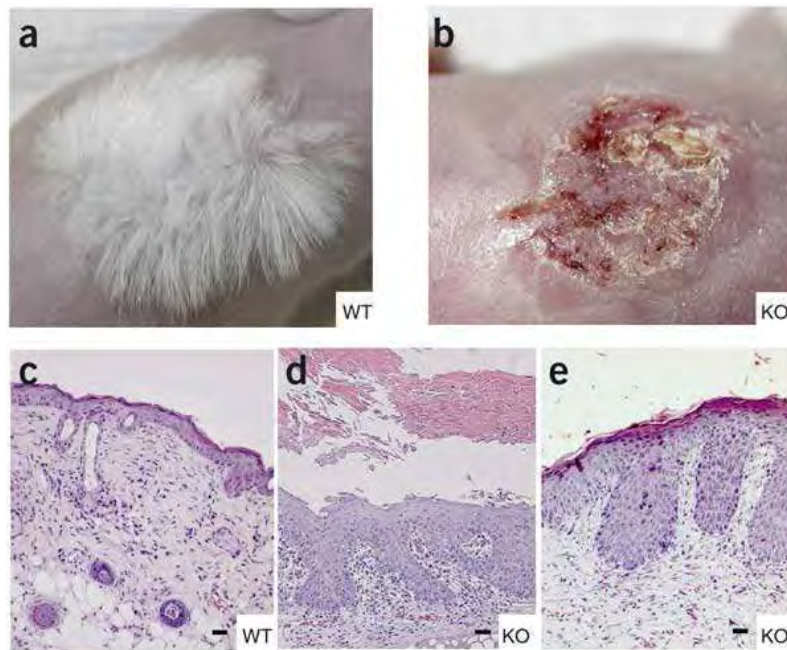




**Figure 13- Erosion cutanée des souriceaux déficients en LEKTI.**

Dès la naissance les souriceaux  $Spink5^{-/-}$  (KO) présentent une érosion cutanée au niveau des zones de frottement (a, b). L'analyse histologique de coupe de peau de souriceaux après coloration à l'hématoxyline/éosine (c, d), révèle le détachement en bloc de la couche cornée (d, double flèche).

(Modifié d'après Descargues (2005) *Nat Genet*)



**Figure 14- Les greffes de peau *Spink5*<sup>-/-</sup> reproduisent le phénotype histologique du syndrome de Netherton.**

La peau des souris sauvages (WT, a) ou *Spink5*<sup>-/-</sup> (KO, b) est greffée sur le dos d'une souris immunodéficente (nude). Les greffes KO apparaissent érythémateuses, recouvertes de squames épaisses et alopéciques (b). (c-e) L'analyse histologique de coupe de peau greffée après coloration à l'hématoxyline/éosine révèle que l'épiderme KO est hyperplasique et papillomatosique (d, e). La couche cornée hyperkératosique se détache par endroit en bloc de la couche granuleuse sous-jacente (d). Des infiltrats inflammatoires dermiques sont également visibles (e).

(Modifié d'après Descargues (2005) *Nat Genet*)

La peau de ces souris présente une légère acanthose. La couche cornée se détache en bloc de l'épiderme sous-jacent (Figure 13), entraînant un défaut sévère de la fonction de barrière cutanée et la mort rapide des nouveau-nés par déshydratation. Cet événement majeur de la physiopathologie du SN est dû au clivage asymétrique des desmosomes entre la couche granuleuse et la couche cornée. Ces anomalies sont similaires à celles observées chez les patients SN (61) et sont secondaires à la dégradation de la desmogléine 1, importante pour l'adhésion des desmosomes dans les couches supérieures de l'épiderme. Cette dégradation est la conséquence de l'augmentation de l'activité protéolytique de trois protéases. Parmi celles-ci les kallikréines (KLK) 5 et 7 sont capables de dégrader la desmogléine 1 *in vitro* (20). Les souris *Spink5*<sup>-/-</sup> présentent aussi des anomalies majeures de la différenciation terminale illustrées par un profil d'expression anormal des marqueurs de la différenciation, révélé par immunohistochimie (78). Le modèle de greffe de peau de nouveau-nés *Spink5*<sup>-/-</sup> sur des souris immunodéficientes a permis de mettre en évidence des anomalies secondaires à l'absence prolongée de LEKTI dans l'épiderme. L'épiderme des peaux *Spink5*<sup>-/-</sup> greffée montre une acanthose marquée associée à une hyperprolifération des cellules de la couche basale de l'épiderme (augmentation du nombre de cellules positives pour le BrdU). Les greffes de peau *Spink5*<sup>-/-</sup> apparaissent hyperkératosique lorsque la couche cornée n'est pas détachée. De plus, des infiltrats inflammatoires dermiques sont observés dans les greffes *Spink5*<sup>-/-</sup> (Figure 14). Ces lésions érythémateuses, squameuses et alopeciques, plus avancées que celles observées chez les nouveau-nés, reproduisent les symptômes cliniques du syndrome de Netherton (78).

## V. Inflammation et allergie dans le syndrome de Netherton

Les manifestations atopiques font parties de la triade clinique du syndrome de Netherton. Elles incluent de l'eczéma atopique (dermatite atopique), de l'asthme allergique, des rhinites allergiques, des allergies alimentaires (79) et un taux sérique élevé d'immunoglobulines E (55).

Au niveau histologique, un infiltrat inflammatoire périvasculaire composé de cellules mononuclées associé à une augmentation de la taille des vaisseaux est souvent

présent. Ces anomalies peuvent expliquer l'angio-œdème faciale observé chez les jeunes enfants atteints et l'érythème généralisé.

Au niveau systémique, l'hyper-éosinophilie sanguine et l'hyper-IgE sont les phénotypes le plus répandus. *Van Gysel et al.* ont analysé la production de cytokines par les lymphocytes T circulant chez trois jeunes patients SN. Cependant, cette étude a révélé une hétérogénéité entre ces individus. En effet, un des patients avait une production réduite de cytokine Th1 (IFN  $\gamma$ ) et Th2 (IL4, IL5 et IL13), alors que le second présentait une production accrue d'IL4 et d'IL5. Le troisième patient présentait quant à lui une diminution de la production d'IFN  $\gamma$  (80). Bien que l'augmentation de l'IL4 et de l'IL5, ou la diminution de l'IFN  $\gamma$  puissent favoriser l'activation des cellules de type Th2 et expliquer l'hyper-IgE sérique, elles ne permettent pas d'identifier un mécanisme spécifique responsable de l'atopie chez les patients SN.

L'ensemble de ces manifestations observées dans le SN évoque un désordre immunologique chez ces patients. Cependant, il n'existe à ce jour que très peu d'étude à ce sujet. D'autres arguments supplémentaires suggèrent également un désordre immunitaire. En effet, LEKTI est exprimé au niveau des tissus en contact avec l'environnement et dans les corpuscules de Hassal du thymus. De plus, le SN est une des rares ichtyoses avec un défaut de barrière cutanée présentant des manifestations atopiques constantes. Ceci suggère un rôle potentiel de LEKTI dans la régulation de la réponse l'immune. Cette hypothèse est également renforcée par des études qui ont mis en évidence une association entre des polymorphismes de *SPINK5* et l'atopie, la dermatite atopique et l'asthme allergique (81-85).

## VI. Traitement du SN

Les traitements actuels des ichtyoses ne sont que symptomatiques et visent à contrôler la perte en eau transépidermique en améliorant la fonction de barrière cutanée. L'application de solutions émoullientes sur la surface du corps permet, grâce à leur composition lipidique, de former un film protecteur qui se substitue à la barrière cutanée défectueuse. Leur utilisation améliore significativement l'aspect cutané et à ce jour aucuns effets secondaires indésirables ne surviennent après une utilisation prolongée. C'est le cas de la lotion émoulliente contenant 12 % de lactate

d'ammonium (Lac-Hydrin), utilisée avec succès dans plusieurs études indépendantes (86, 87).

D'autres stratégies thérapeutiques ont été testées chez les patients SN, avec une efficacité et des effets secondaires indésirables variables.

L'application topique de stéroïdes, en tant qu'anti-inflammatoires, au niveau des zones eczématiformes, a été peu efficace. De plus, le risque d'absorption systémique s'est avéré trop élevé chez les patients SN, conduisant à l'apparition d'un syndrome de cushing (œdème faciale) et à l'abandon de ce traitement dans le cas du SN (88).

L'administration locale ou systémique de rétinoïdes, qui agissent sur la différenciation épidermique, est limitée par le risque d'aggravation des lésions et d'augmentation de l'irritation cutanée. Cependant, il semblerait qu'une utilisation à faible dose, ajustée en fonction des lésions du patient, puisse avoir des effets bénéfiques (55, 89-92).

La photothérapie PUVA, correspondant à une irradiation aux UVA après application de methoxypsoralen (8-MOP), a été utilisée pour traiter une patiente SN de 22 ans. Deux à trois séances de photothérapie ont permis l'amélioration des lésions puis leur disparition à plus long terme. Cependant, le maintien de ce traitement est nécessaire pour éviter la réapparition de lésion. De plus, l'inconvénient de ce type de thérapie, comme toutes les expositions prolongées aux UV, réside dans l'augmentation du risque de carcinogénèse (93).

Le calcipotriol est un analogue synthétique de la vitamine D. Ces effets antiprolifératifs et favorisant la différenciation des kératinocytes a pu être démontré dans le traitement de désordres de la kératinisation et d'ichtyoses (94, 95). Le calcipotriol possède également des effets immunomodulateurs. L'application locale de calcipotriol sur un jeune patient SN présentant une ILC a significativement amélioré le phénotype cutané. Une amélioration de l'érythème et de la desquamation a dans un premier temps été constaté, suivi d'une rémission totale d'une durée d'un mois. Aucun effet secondaire nocif n'a été observé (96). Il est nécessaire de valider l'efficacité et l'innocuité de ce traitement sur un plus grand nombre de patient SN, d'autant plus que la vitamine D peut induire des irritations chez certains individus.

Le tacrolimus et le pimecrolimus sont des immunomodulateurs de la famille des inhibiteurs de la calcineurine. Ces molécules ont pour effet de bloquer l'activation des lymphocytes T, la production de cytokines pro-inflammatoires et également d'empêcher la dégranulation des mastocytes (97-99). Alors que le pimecrolimus a une action sélective sur les lymphocytes T et les mastocytes, le tacrolimus peut

également affecter les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans (97, 99-102). L'utilisation du tacrolimus s'est avéré efficace pour l'amélioration du phénotype clinique de 6 patients SN (103-105). Cependant dans une de ces études, une absorption trop importante du tacrolimus dans le sang de patients a remis en question l'utilisation de la molécule pour le traitement de cette maladie présentant un défaut majeur de la barrière cutanée (103). Le pimecrolimus, dérivé du tacrolimus, possède des propriétés lipophiles différentes le rendant moins susceptible à passer dans le sang que le tacrolimus (106). Son utilisation dans deux études indépendantes a conduit à une amélioration significative des lésions cutanées chez 5 patients SN, sans aucun effet toxique de la molécule (105, 107). L'efficacité du pimecrolimus a été démontrée dans d'autres pathologies inflammatoires cutanées telles que la dermatite atopique (97) et le psoriasis (108). Bien que le pimécrolimus offre également des perspectives thérapeutiques intéressantes, aucun traitement spécifique du SN n'existe à ce jour.





**Figure 15- Manifestations cliniques cutanées de la dermatite atopique.**

(a) Pendant la petite enfance, les lésions sont localisées essentiellement au niveau du visage et lésions forment des plaques érythémateuses avec la présence de papules (a, b). Avec l'âge, des plaques de lichenification apparaissent au niveau des zones de frictions (b, c).

(Modifié d'après Oyoshi (2009) *Adv Immunol*)



## **PARTIE C- La Dermatite Atopique**

La dermatite atopique (DA) est une des caractéristiques majeures du syndrome de Netherton, qui le distingue de la majorité des autres ichtyoses.

Il s'agit d'une maladie inflammatoire cutanée commune souvent associée à des antécédents allergiques familiaux ou individuels. La DA est une maladie multifactorielle avec une composante génétique et environnementale. La prévalence de la maladie est en augmentation en particulier dans les sociétés occidentales et industrialisées (109, 110). La DA commence généralement à l'enfance mais tend à s'améliorer et même parfois à disparaître avec l'âge. Cependant elle persiste à l'âge adulte dans 15% des cas. Les caractéristiques de la DA sont un défaut de la fonction de barrière cutanée associé à une peau sèche et irritée.

### **I. Aspects cliniques de la dermatite atopique**

#### **1- Définition et aspects cliniques**

La Dermatite atopique est une maladie inflammatoire chronique qui se développe communément durant la période périnatale et l'enfance. Le diagnostic de la DA repose sur des symptômes cliniques incluant des plaques érythémateuses, des papules et/ou une lichenification au niveau des jointures accompagnées d'un prurit intense (démangeaison) et d'une hypersensibilité cutanée (Figure 15). La DA fait partie des maladies atopiques avec l'asthme et la rhinite allergique. Il est fréquent que les patients présentent un taux d'IgE sérique élevé et une éosinophilie sanguine (présence anormale d'un grand nombre d'éosinophiles circulants). Ces patients ont une tendance élevée à développer de l'asthme ou des rhinites allergiques plus tard dans leur vie, un phénomène connu sous le nom de « marche atopique ».

On distingue deux groupes de DA basés sur la concentration sérique en IgE totaux et spécifiques :

- la forme dite «extrinsèque» (EAD) affecte 70 à 80% des patients. Elle est caractérisée par un taux élevé d'IgE totaux et spécifiques dans le sang et dans la peau ;
- la forme dite «intrinsèque» (IAD) affecte 20 à 30% des patients. Elle est associée à un taux d'IgE total normal et à l'absence d'IgE spécifiques (111).

## 2- Histologie

L'analyse histologique des lésions aiguës de la DA révèle une spongiose prononcée, une acanthose, une hyperkératose parakératosique, une acantholyse (séparation intra épidermique) et la présence de cellules inflammatoires en grand nombre. L'infiltration est composée de LT CD4<sup>+</sup>, de cellules présentatrices d'antigène (CPAs) telles que des cellules dendritiques inflammatoires épidermiques (IDECs) et des cellules de Langerhans. L'infiltrat comprend également d'autres cellules appartenant au système immunitaire inné telles que des macrophages et des mastocytes activés.

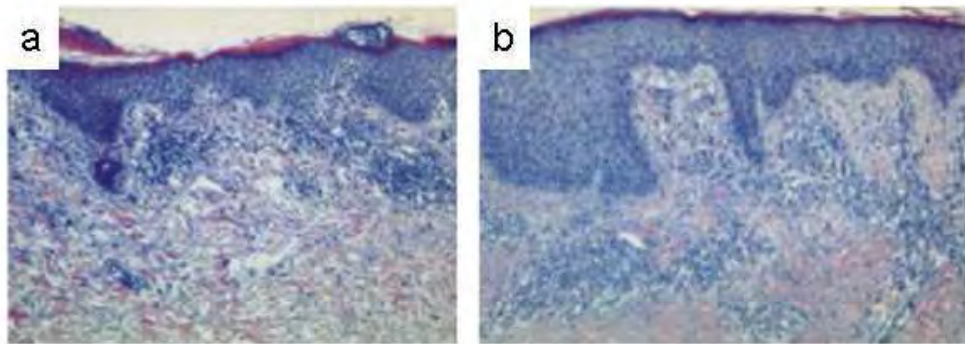
Les lésions chroniques de DA, correspondant à la phase de lichenification, présentent une hyperplasie épidermique plus marquée. Ces lésions présentent également une infiltration dermique de cellules mononucléées avec dominance de macrophages et une accumulation périvasculaire de lymphocytes moins nombreux que dans les lésions aiguës (109) (Figure 16).

Les infiltrats lymphocytaires dermiques sont équivalents dans l'EAD et l'IAD (112) mais les éosinophiles sont beaucoup plus nombreux dans la peau de l'EAD alors qu'il n'y pas de différences au niveau de l'éosinophilie sanguine (113, 114). Une autre différence notable entre les deux formes de DA concerne la production de cytokines. En effet, dans l'EAD l'expression cutanée des cytokines Th2, notamment l'IL4 et l'IL13 (induisant la synthèse d'IgE par les Lymphocytes B) et l'IL5 (recrutement et survie de éosinophiles), est supérieure à celle de l'IAD (112, 113).

Chez les patients DA les zones non lésées sont différentes d'une peau saine. En absence de lésion, la peau apparaît plus sensible aux agents chimiques et physiques. De plus, elle présente un petit infiltrat inflammatoire lymphocytaire périvasculaire jamais observé dans une peau saine (115, 116).

## II. Génétique

L'hérédité de la DA est complexe, puisque le développement de la maladie est influencé par une multitude de gènes et que l'expression phénotypique est modifiée par les facteurs environnementaux. Des études d'association génétique à grande échelle



**Figure 16- Phénotype histologique de la dermatite atopique.**

Coupe de peau au niveau des lésions de dermatite atopique aigüe (a) et chronique (b).

(Modifié d'après Leung & Bieber (2003) *Lancet*)

ont révélé plusieurs loci potentiellement associés à la DA dans les régions chromosomiques 3q21, 1q21, 17q25, 20q12 et 3p26 (117-120). De manière surprenante, ces loci ne coïncident généralement pas avec les régions liées à d'autres maladies allergiques partageant une réponse Th2 systémique anormale telle que l'asthme (121). En revanche, les loci de la DA présentent un plus grand degré d'association avec ceux du psoriasis (1q21, 3q21, 17q25 et 20p12) alors que ces deux maladies sont rarement liées et présentent une composante inflammatoire différente (121) (Figure 17).

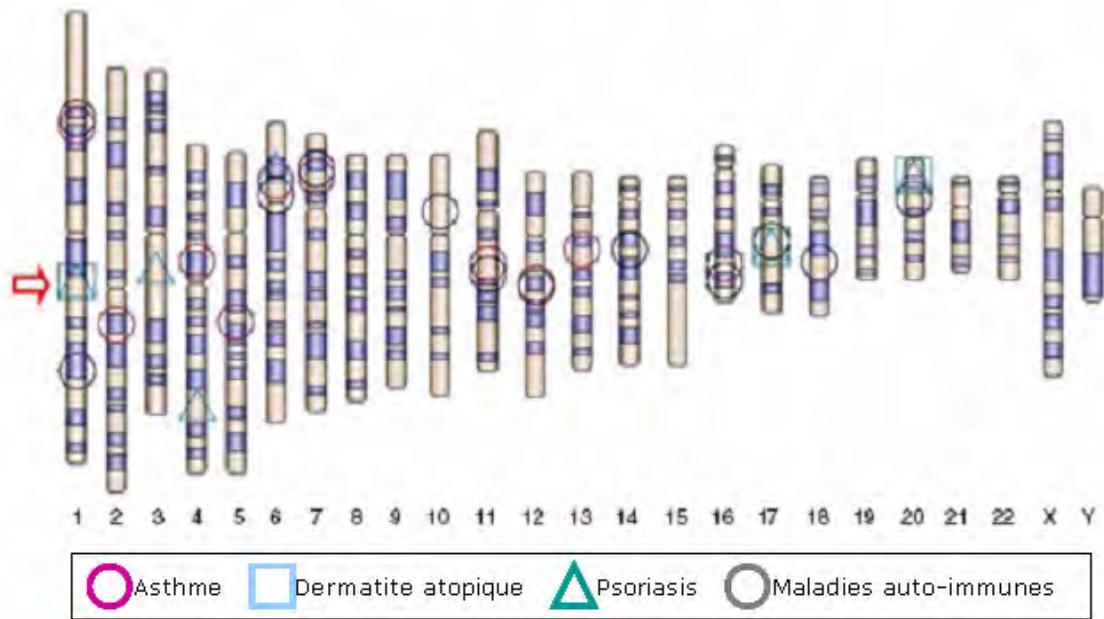
En plus de ces approches à grande échelle, des études de gènes candidats ont été réalisées. Elles sont basées sur des hypothèses issues des connaissances des fonctions biologiques et des mécanismes physiopathologiques préexistants. Cette approche est néanmoins limitée dans son potentiel à identifier de nouvelles voies biologiques, puisqu'elle ne prend en compte uniquement que des acteurs potentiels déjà connus. Actuellement plusieurs gènes candidats ont été identifiés dans la DA (122-124), qui peuvent être classés en deux catégories : les gènes impliqués dans la fonction de barrière cutanée et les gènes impliqués dans la réponse immunitaire.

## **1- Les gènes de la fonction de barrière cutanée**

La DA présente un fort lien génétique avec la région chromosomique 1q21 contenant l'EDC humain (Epidermal Differentiation Complex) qui renferme un grand nombre de gènes impliqués dans la différenciation épidermique (121).

Parmi ces gènes, on distingue celui de la filaggrine (*FLG*) dont les mutations ont été associées à la DA chez des patients d'origines ethniques différentes (125-129). *FLG*, localisé en 1q21.3, est le gène causal de l'ichtyose vulgaire (IV), un désordre commun de la kératinisation à transmission autosomique dominante, (42). L'IV est caractérisée par une hyperlinéarité palmo-plantaire, et la présence de fines squames essentiellement au niveau du tronc des bras et des jambes. La sévérité de la maladie corrèle avec la réduction des grains de kératohyalines dans la couche granuleuse qui reflète un défaut de synthèse de la filaggrine (130). 37 à 50% des patients atteints d'IV développent des maladies atopiques (131), suggérant un lien entre le défaut de filaggrine et l'atopie.

A ce jour, 20 mutations associées à la DA sont décrites dans les populations européennes et 17 dans les populations asiatiques (132, 133). Deux mutations perte



**Figure 17- Loci de susceptibilité à l’asthme, à la dermatite atopique et à d’autres désordres immunitaires.**

Seuls les loci avec une liaison significative sont représentés. Le locus de l’EDC (*Epidermal Differentiation Complexe*) est signalé par une flèche. On remarque que plusieurs régions sont communes à la dermatite atopique et au psoriasis, alors que peu de recoupement sont observés entre la dermatite atopique et l’asthme.

(Modifié d’après Cookson (2004), *Nat Rev Immunol*)

de fonction (R510X et 2282del4) sont les mutations les plus fréquemment retrouvées chez les patients DA d'origine européenne. Elles représentent un facteur de risque de l'asthme lié à la DA, mais pas de l'asthme seul (127, 129, 134).

En plus de ce gène, d'autres gènes impliqués dans la fonction de barrière cutanée pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de la DA. Ainsi, des mutations dans les gènes *KLK7* et *SPINK5* ont été identifiés en association avec la dermatite atopique. Le gène *KLK7* localisé en 19q13 présente une insertion dans son 3'UTR associé à l'IAD (135). Cependant, ces résultats n'ont jamais été reproduits.

Plusieurs équipes ont démontré une association entre des variants de *SPINK5* et la DA. Parmi ceux-ci, le SNP E420K semble être associé à l'atopie et à la DA dans des populations d'origines ethniques différentes (81-85, 136).

## 2- Les gènes de la réponse immune

De nombreux gènes impliqués dans la réponse immune présentent des mutations associées à l'atopie et la DA.

On peut distinguer 2 groupes de gènes (Tableau 1) :

- les gènes impliqués dans la réponse Th2 dont les mutations augmentent la production de cytokines pro-allergiques telles que l'IL4, l'IL13 et l'IL31
- les gènes impliqués dans la reconnaissance des pathogènes tels que les Toll Like Recepteur (TLR).

Ces données permettent de mettre en évidence l'importance de la balance Th1/Th2. Ainsi la prédisposition à l'atopie pourrait être la conséquence d'une réponse Th2 exacerbée, ou d'un défaut de la réponse Th1.

## III. Physiopathologie de la dermatite atopique

A ce jour, la contribution respective de la fonction de barrière cutanée et du système immunitaire dans le développement de la DA reste mal définie.

Un scénario proposé pour expliquer le développement de la DA est celui d'une peau perméable, sèche et irritée qui prédispose d'une part à la pénétration d'allergènes et de microbes et d'autre part au développement d'un microenvironnement local pro-allergique.

<b>Gène</b>	<b>Fonction</b>	<b>Association</b>	<b>Références</b>
<b>IL13</b>	cytokine Th2	IgE élevés	<i>van der Pouw Kraan, 1999</i> <i>Wang, 2003</i>
<b>IL4</b>	cytokine Th2	Dermatite atopique	<i>Kawashima, 1998</i>
<b>IL5</b>	cytokine Th2	Eosinophilie sanguine dans la Dermatite atopique	<i>Yamamoto, 2003</i>
<b>IL4RA</b>	IL4 récepteur	Dermatite atopique, atopie	<i>Callard, 2002</i> <i>Hosomi, 2004</i> <i>Novak, 2002</i> <i>Oiso, 2000</i> <i>Tanaka, 2001</i> <i>Hershey, 1997</i>
<b>IL18</b>	induit IL4 et IL13	Dermatite atopique	<i>Novak, 2005</i>
<b>IL10</b>	immunorégulateur	Dermatite atopique	<i>Sohn, 2007</i>
<b>FcERI</b>	récepteur aux IgE	Dermatite atopique et asthme	<i>Cox, 1998</i>
<b>IL31</b>	cytokine Th2	Dermatite atopique intrinsèque (IAD)	<i>Schulz, 2007</i>
<b>NOD2/CARD15</b>	reconnaissance microbienne	Dermatite atopique	<i>Kabesh, 2003</i> <i>Macaluso, 2007</i>
<b>NOD1/CARD4</b>	reconnaissance microbienne	Dermatite atopique	<i>Weidinger, 2005</i> <i>Macaluso, 2007</i>
<b>TLR2</b>	reconnaissance microbienne	Infection par <i>S. aureus</i> Dermatite atopique avec IgE très élevés	<i>Lorenz, 2000</i> <i>Ashmad-Nejad, 2004</i>
<b>TLR9</b>	reconnaissance microbienne	Dermatite atopique intrinsèque (IAD)	<i>Novak, 2007</i>
<b>NALP1</b>	Activation de la caspase1 (Inflammasome)	Dermatite atopique	<i>Macaluso, 2007</i>

**Tableau 1- Gènes de la réponse immunitaire dont les polymorphismes sont associés au développement de la dermatite atopique.**

La contribution respective du défaut de barrière cutanée et du désordre immunitaire est illustrée par des maladies qui présentent une inflammation cutanée allergique de type DA. Ces maladies représentent les deux extrêmes dans l'engagement de la peau face au système immunitaire dans la pathogenèse de la DA :

- Le syndrome de Netherton illustre le versant cutané de la maladie.
- Le syndrome IPEX (Immunodérégulation, Polyendocrinopathies, Entéropathie auto-immune liée au chromosome X) et le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) illustrent le versant immunologique. Dans l'IPEX et le WAS, des mutations dans les gènes *FOXP3* et *WASP* sont responsables d'un défaut du nombre et de la fonction des lymphocytes T régulateurs (137-139).

Ainsi les deux composantes (barrière cutanée et immunité) représentées par des maladies monogéniques, pourraient avoir un rôle équivalent dans l'émergence de la DA.

## **1- Défaut de barrière cutanée**

Un certain nombre d'évidences montre que la perte de la barrière cutanée est un facteur important dans le développement de la DA. En effet, les patients atteints de DA présentent un défaut de barrière cutanée avec une structure et une chimie anormale de la couche cornée aussi bien au niveau des zones lésionnelles que non lésionnelles. Le défaut de barrière conduit à une augmentation de la perte en eau trans-épidermique qui se traduit par une sécheresse de la peau (xérosis). La peau apparaît alors sèche, squameuse, rugueuse et un peu ridée (140, 141).

Parmi les défauts structurels cutanés, les anomalies lipidiques peuvent être impliquées dans la maladie. Dans la peau DA lésionnelle ou non lésionnelle, les céramides 1 et 3 sont réduites, alors que la quantité de cholestérol est augmentée comparée à celle d'un individu sain (142-144). De plus, l'analyse par microscopie électronique a révélé la rétention des corps lamellaires dans la couche cornée et l'absence de formation des lamelles lipidiques indispensables à l'imperméabilité de l'épiderme (145).

La sécheresse cutanée est responsable de l'apparition du prurit qui aggrave les lésions et favorise la pénétration d'allergène. Ils existent également des évidences expérimentales suggérant que le traumatisme mécanique infligé lors du grattage joue



un rôle dans la polarisation de la réponse immune contre des antigènes ayant pénétré à travers la peau. Ainsi, l'altération de la couche cornée par « tape-stripping » associée à la pénétration d'antigènes chez la souris induit une réponse inflammatoire allergique cutanée qui reproduit des caractéristiques de la DA. Ceci inclut une infiltration de lymphocytes TCD4<sup>+</sup> et d'éosinophiles et l'expression locale de cytokines Th2 (146, 147). La polarisation vers une réponse Th2 serait prise en charge par les cellules présentatrices d'antigènes de la peau (cellules dendritiques et cellules de Langerhans) qui après capture des antigènes, migrent dans les ganglions lymphatiques drainants, dans lesquelles elles rencontrent les LT naïfs.

Le défaut de barrière cutanée est donc une des composante du développement de la DA. La Figure 18 illustre un modèle proposé pour expliquer de quelle manière le défaut de barrière épidermique peut faciliter le développement de l'inflammation allergique dans le cas de cette maladie.

## **2- Immunopathologie**

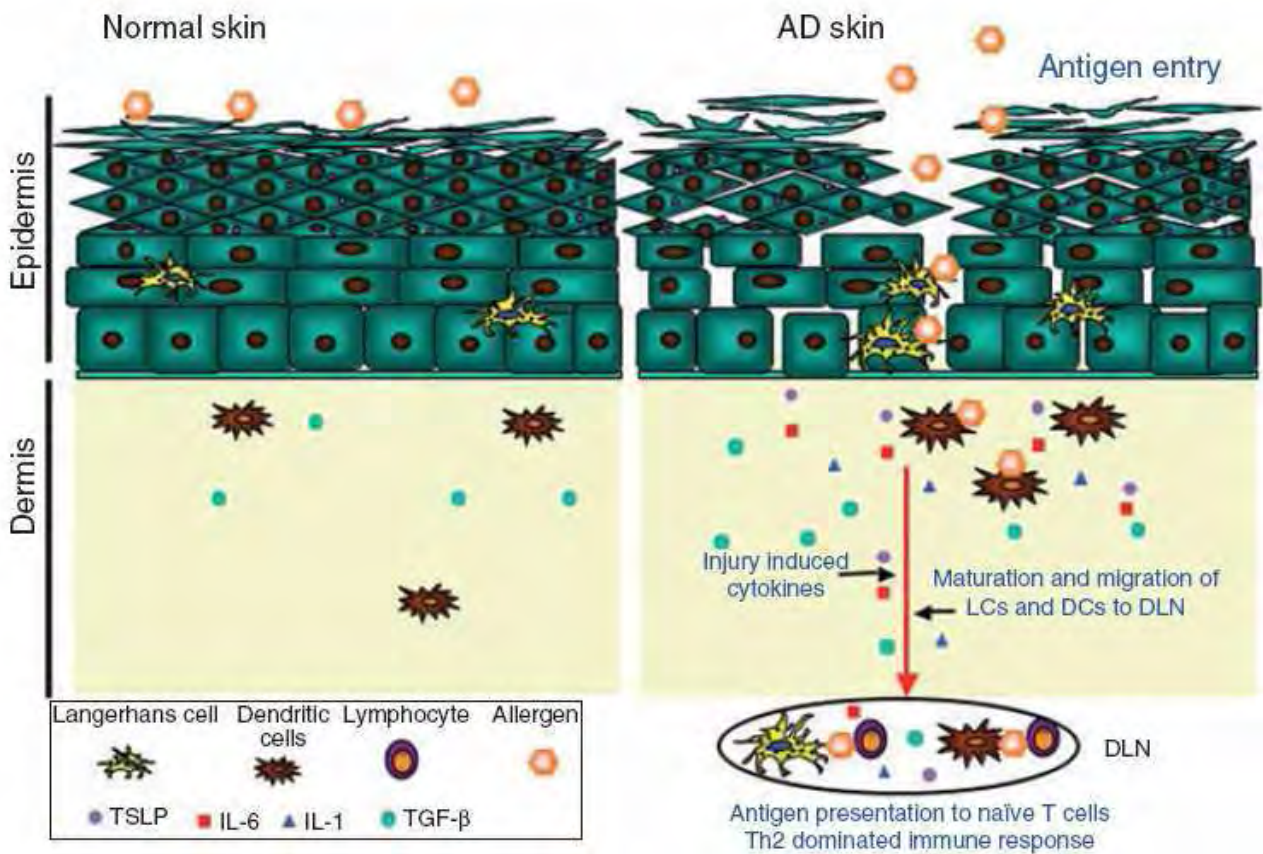
Les composantes innée et adaptative de l'immunité contribuent également à la physiopathologie de la dermatite atopique.

Les lésions de DA sont caractérisées par un infiltrat dermique composé de LT CD4<sup>+</sup> activés, de polynucléaires éosinophiles, de mastocytes, de cellules dendritiques et de macrophages (116, 148, 149).

### **2-1- Les Lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th2**

Les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires et effectrices jouent un rôle critique dans la DA. Chez un individu sain, on peut estimer à 20 milliards le nombre de LT résidents dans la peau et approximativement le double circulants. Chez l'homme, ces cellules sont essentiellement des LT portant le TCR  $\alpha\beta$ , alors que chez la souris les LT exprimant le TCR  $\gamma\delta$  ont une contribution importante.

L'instruction des LT par les les cellules de Langerhans (LC) et les cellules dendritiques (DC) de la peau à lieu dans les ganglions lymphatiques drainants. Ce mécanisme entraîne leur prolifération et leur différenciation en LT mémoires et effecteurs qui expriment alors les molécules de « homing » cutanée telles que le CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen) et les récepteurs aux chimiokines CCR4 et CCR10.



**Figure 18- Rôle de la fonction de barrière cutanée dans le développement de la dermatite atopique.**

Dans une peau saine, la barrière épidermique empêche l'entrée des pathogènes (schéma de gauche). Lorsque la fonction barrière est altérée les antigènes peuvent pénétrer dans l'épiderme et le derme (schéma de droite) où ils seront capturés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). Les antigènes vont également induire la production de cytokines par les kératinocytes telles que l'IL1, l'IL6, TSLP et le TGF. L'ensemble de ces mécanismes déclenche la maturation et la migration de CPAs vers les ganglions lymphatiques drainants (DLN) dans lesquelles elles présenteront l'antigène aux lymphocytes T naïfs conduisant à la mise en place d'une réponse immune à dominance Th2.

(Modifié d'après Oyoshi (2009), *Ad Immunol*)

Les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs issus de cette stimulation quittent alors les ganglions lymphatiques pour rejoindre la peau, grâce à leurs récepteurs spécifiques. Une fois dans le tissu, ils pourront être localement activés par des antigènes spécifiques, proliférer et sécréter des cytokines. Ce homing sélectif des LT CD4<sup>+</sup> vers la peau représente un évènement immunologique important dans le développement de l'allergie cutanée. Le CLA, un ligand de type P-Selectine, est absent de la surface des LT naïfs mais est exprimé par 30% des LT mémoires circulants et par près de 90% des LT infiltrés aux niveaux des sites inflammatoires (150). Les LT CLA<sup>+</sup> coexpriment CCR4, le récepteur aux chimiokines CCL17/TARC et CCL22/MDC, des chimiokines pro-Th2 sécrétées par les kératinocytes. Dans le sang des patients DA, la proportion de LT CLA<sup>+</sup> parmi les CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> est augmentée (151). De plus, les patients atteints de DA présentent un nombre plus important de LT CCR4<sup>+</sup> circulants et cutanés que des sujets sains ce qui souligne une augmentation de la réponse Th2 au niveau systémique et cutané (152).

Parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, on distingue les Th2 dont le rôle clé dans la DA est soutenu par la présence d'une éosinophilie sanguine et d'un taux sérique d'IgE élevé chez la majorité des patients souffrant de cette maladie.

Les lésions aiguës de DA présentent une inflammation à dominance Th2, caractérisée par un infiltrat dermique de T CD4<sup>+</sup> et d'éosinophiles, une augmentation de l'expression des cytokines Th2 (IL4, IL5 et IL13) et une faible expression d'IFN .

Hormis les cytokines Th2 classiques (IL4, IL5 et IL13), on distingue l'IL31, plus récemment découverte. Elle est préférentiellement exprimée par les lymphocytes Th2 et est surexprimée dans la peau DA lésionnelle et non lésionnelle alors qu'elle est absente dans les lésions psoriasiques (153-155). Les lymphocytes T CLA<sup>+</sup> infiltrés et circulants sont source d'IL31 (153) et il existe une corrélation entre la sévérité et sa concentration sérique (156). Les deux sous-unités du récepteur à l'IL31 sont exprimées à la surface des kératinocytes et la fixation avec son ligand induit la production des chimiokines TARC et MDC attractant les Th2 (155). Ainsi cette cytokine pourrait participer au maintien et à l'amplification de l'inflammation cutanée chez les patients DA. Enfin, il faut noter que l'entérotoxine du staphylocoque induit l'expression de l'IL31 par les LT chez les patients DA, suggérant que l'infection bactérienne peut entraîner une exacerbation du prurit et de la sévérité via cette cytokine (155).

Lorsque la chronicité de la maladie s'installe, l'expression de l'IFN $\gamma$ , de l'IL12 (cytokines Th1) et du GM-CSF augmente dans les lésions de DA (157). Le mécanisme qui permet l'évolution d'une réponse Th2 vers une réponse de type Th1 est encore mal connu. Il est probable que ce mécanisme soit associé aux produits microbiens traversant la barrière épidermique (158) ou à la production locale d'IL12 par les éosinophiles et/ou les cellules dendritiques inflammatoires épidermiques infiltrés (109).

## **2-2- Les lymphocytes T régulateurs (Treg)**

La réponse immunitaire doit être finement contrôlée afin d'éviter une inflammation en réponse à des antigènes inoffensifs tout en maintenant la capacité à combattre les agents pathogènes. Les lymphocytes Treg Foxp3<sup>+</sup> sont des régulateurs de la réponse immunitaire présents en grand nombre dans la peau humaine et murine. Il a été démontré le rôle des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans la suppression de la réponse T aux allergènes (159) ce qui pourrait coïncider avec la diminution de leur nombre dans les lésions de DA (160). Cependant, la quantité de ces cellules est augmentée dans le sang périphérique des patients DA, mais leur activité immunosuppressive est diminuée. Cette perte d'activité immunosuppressive pourrait être attribuée à la stimulation par l'enterotoxine B du staphylocoque doré (SEB) (161). Sachant que plus de 90% des patients DA ont une peau colonisée par le staphylocoque doré, on peut supposer que l'abrogation de l'activité immunorégulatrice des Treg dans la DA, pourrait avoir un rôle dans la progression de la maladie. De plus, *Reefer et al* ont démontré la présence d'un sous groupe de Treg circulants chez les patient DA avec un taux d'IgE sérique élevé (162). Ces Treg ont des propriétés pro-Th2 et SEB induit également la sécrétion de cytokine Th2 par ces dernières, accentuant ainsi encore un peu plus le biais Th2 (162). Ces résultats proposent un nouveau mécanisme par lequel les Treg pourraient contribuer au développement de la DA.

## **2-3- Les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPAs)**

Les cellules dendritiques (DCs) sont essentielles pour la génération d'une réponse immunitaire adaptative. Dans la peau saine, deux types de DCs immatures sont majoritairement représentés : les cellules de Langerhans (LC) de l'épiderme et les cellules dendritiques interstitielles (iDC) du derme. Suite à la capture d'un

antigène ou à la reconnaissance d'un signal d'alarme, les DCs acquièrent un phénotype de cellules présentatrices d'antigène (CPA). Elles expriment alors plus fortement le CMH II, réduisent leur capacité à capturer les antigènes et expriment les récepteurs aux chimiokines plus particulièrement CCR7. Ce récepteur a pour ligand les CCL19 et 21 exprimées dans les ganglions lymphatiques drainants. Une fois dans les ganglions, les CPAs présentent l'antigène aux LT naïfs. Dans le cas des CD4<sup>+</sup> elles pourront diriger la différenciation lymphocytaire vers des Th1, Th2 ou Th17 grâce à la sécrétion de cytokines et l'expression de molécules de costimulation. L'expression de ces facteurs est influencée par le microenvironnement cutané d'où proviennent les DCs. Ainsi les DCs jouent un rôle crucial dans la polarisation des T CD4<sup>+</sup>.

En plus des LCs et des iDCs présentes en abondance, la peau DA est caractérisée par la présence de cellules dendritiques épidermiques distinguables des LC par l'absence de granules de birbeck. Il s'agit des cellules dendritiques inflammatoires épidermiques (IDEC) (163). Dans la DA, les IDECs et LCs surexpriment le récepteur de haute affinité aux IgE, le Fc RI (164). Ceci favorise la capture des antigènes complexés aux IgE et leur présentation aux LT dans les organes lymphoïdes périphériques et dans la peau (165). La stimulation du Fc RI à la surface des IDECs entraîne une sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires qui contribuent à l'amplification de la réponse immunitaire allergique en agissant directement sur les LT (165). De plus la libération d'IL12 et d'IL18 oriente la balance vers des LT produisant de l'IFN (166). Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la progression de la phase aiguë, initialement Th2, vers la phase chronique plutôt Th1 de la DA. De manière concomitante, l'activation des Fc RI à la surface des DCs induit le relargage de chimiokines telles que l'IL16, MDC, TARC, et CCL2 qui contribuent au recrutement de précurseurs des IDECs et de LT notamment Th2 (167).

#### **2-4- Les polynucléaires éosinophiles**

Les polynucléaires éosinophiles sont étroitement liés à la pathogénèse des maladies allergiques, dont la dermatite atopique. L'éosinophilie sanguine et la concentration accrue en protéines issues des granules éosinophiles dans le sang apparaissent corrélées avec la sévérité de la maladie chez les patients DA (168). L'infiltration des éosinophiles dans les lésions de DA est souvent difficile à démontrer en raison de la fragilité de ces cellules chez l'homme. Cependant, des dépôts de

protéines issues des granules éosinophiles sont plus aisément détectés dans la majorité des biopsies issues de lésions aiguës et chroniques de DA et corrélerent également avec la sévérité de la maladie (169).

La surexpression du facteur de chimiotactisme des éosinophiles CCL11/éotaxine, et de l'IL5 (survie et activation des éosinophiles) dans le sang et la peau des patients DA (170-172) peut être responsable du recrutement de ces cellules dans la peau. *In situ* les éosinophiles activés, amorcent leur dégranulation et dégénèrent. Les produits qui en découlent peuvent promouvoir l'inflammation et les dommages tissulaires (173).

### **2-5- Les mastocytes**

Les mastocytes résident dans de nombreux tissus à l'interface avec l'environnement incluant la peau dans laquelle ils jouent un rôle aussi bien dans la réponse immune innée qu'adaptative.

Pendant le stade précoce de la DA, le nombre de mastocytes n'augmente pas, mais leur dégranulation est amorcée dans la peau affectée. Durant le stade plus tardif, leur nombre s'accroît mais pas le niveau de dégranulation (174).

L'activation du Fc RI à leur surface entraîne la dégranulation et le relargage de médiateurs tels que l'histamine, des écosanoïdes et des cytokines pro-inflammatoires. Les mastocytes peuvent aussi être activés par d'autres signaux comme les superantigènes, les TLRs ou encore certaines cytokines. Cette activation conduit à un relargage sélectif de médiateurs sans dégranulation. L'histamine, les protéases (tryptase et chymase) et les autres médiateurs inflammatoires produits par les mastocytes contribuent au développement du prurit et de l'inflammation dans la DA. Ils sont responsables de l'induction de cytokines pro-inflammatoires et de l'aggravation des dommages cutanés, notamment à travers le prurit. L'ensemble de ces phénomènes aboutit à l'altération de la fonction de barrière cutanée (175).

### **2-6- Les kératinocytes**

Les kératinocytes de l'épiderme jouent un rôle important dans la réponse immunitaire cutanée. Ils y participent activement par la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de peptides antimicrobiens en réponse à de multiples stimuli. Parmi toutes ces cytokines, l'IL18 stockée dans les kératinocytes sous sa forme inactive, peut être libérée et activée par la caspase 1. Les effets pro-inflammatoires les plus importants de l'IL18 impliquent sa capacité à induire la

production d'un grand nombre de molécules telles que l'IL1, le TNF et des chimiokines. Le rôle de l'IL18 dans la DA est suggéré par plusieurs observations. Par exemple, le taux sérique d'IL18 est augmenté chez les patients DA et s'accroît avec l'exacerbation de la maladie (176). Cependant son rôle reste encore controversé.

Une autre cytokine produite par les cellules épithéliales, TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), semble avoir un rôle majeur dans le développement de la DA et de l'asthme allergique en favorisant la polarisation de la réponse Th2. TSLP est exprimée focalement dans les lésions aiguës et chroniques de DA en fonction des zones ou sur la surface entière de l'épiderme. Le fait que cette cytokine ne soit pas exprimée dans la peau saine ou de DA non lésée supporte son rôle dans le développement des lésions de cette maladie (177). Son expression dans des explants cutanés peut être induite par des agents microbiens, des blessures physiques ou encore des cytokines pro-inflammatoires (IL1 et TNF) et Th2 (IL4 ou IL13) (178, 179). TSLP peut aussi bien agir sur les DCs de la peau pour polariser la différenciation Th2 (177, 180), mais aussi sur les TCD4<sup>+</sup> infiltrés (181) ou encore sur les mastocytes en synergie avec l'IL1 et TNF (178).

Les kératinocytes de patients DA surexpriment également beaucoup de chimiokines qui peuvent contribuer au recrutement et à l'activation de DCs, de LT et d'autres types de leucocytes afin d'amplifier et de maintenir l'inflammation cutanée (182). C'est le cas de la chimiokine CCL17/TARC qui est surexprimée par les kératinocytes et les DCs de la peau DA. Elle est importante pour le « homing » cutanée et son récepteur (CCR4) est exprimé préférentiellement à la surface des lymphocytes Th2 retrouvés dans les lésions de DA (183). Le taux sérique de CCL17/TARC est corrélé à la sévérité de la maladie chez les enfants atteints de DA extrinsèque (EAD) mais aussi de DA intrinsèque (IAD) (184).

Enfin les peptides antimicrobiens (AMPs) sécrétés par les kératinocytes semblent être impliqués de manière indirecte dans la physiopathologie de la maladie. En effet, les  $\alpha$ -défensines, HBD2, HBD3 et la cathelicidine (hCAP18/LL37) sont significativement diminués dans les lésions DA par rapport au psoriasis (185, 186). Il a été démontré que l'IL4 et l'IL13 inhibaient la production de HBD3 par les kératinocytes de patients DA suggérant que le microenvironnement Th2 présent dans cette pathologie pourrait réduire une partie de la défense contre les pathogènes (187). Ainsi, la diminution des AMPs dans la peau DA pourrait contribuer à la susceptibilité aux infections observées chez les patients.

Les acteurs cellulaires et moléculaires qui déclenchent, maintiennent ou influencent le développement de la dermatite atopique sont nombreux et les événements déclencheurs de cette maladie multifactorielle restent à élucider.

#### **IV. Les modèles murins de la dermatite atopique**

Afin d'identifier les acteurs moléculaires et cellulaires participant au déclenchement et à la progression de la maladie, de nombreux modèles murins ont été développés. Bien que d'autres espèces telles que le chien ou le cochon-dinde développent des lésions similaires à la DA, le modèle murin reste l'outil le plus facile à manipuler. Ces modèles murins peuvent être classés en trois groupes :

- les souris qui développent spontanément des lésions DA,
- les modèles murins génétiquement modifiés,
- les modèles induits par sensibilisation épicutanée.

##### **1- Les souris qui développent spontanément des lésions DA**

La première souris décrite pour développer de la DA est la souche Nc/Nga, établie en 1957 (188). Ces souris développent des lésions DA lorsqu'elles sont maintenues en conditions conventionnelles. L'apparition des lésions est accélérée lors de l'application d'antigènes sur la peau suggérant que l'exposition aux allergènes environnementaux est nécessaire au déclenchement de la maladie. Avec le temps, les lésions s'aggravent et des défauts de la fonction de barrière cutanée apparaissent (augmentation du TWEL, défaut du métabolisme des lipides) de façon secondaire à l'inflammation (189). L'analyse génétique des souris Nc/Nga a révélé la présence de mutations sur le chromosome 9 au niveau du locus *derm1*. Les gènes candidats de cette région sont *Thy1*, *CD3*, *CD3*, *CD3*, *IL10R*, *IL18* et *Csk*, qui peuvent tous être impliqués dans la réponse allergique à cause de leur rôle dans la fonction des lymphocytes T (190).

Il existe trois autres souches de souris développant spontanément des lésions de type DA (Tableau 2) :

- La *Ds-nonhair* (DS-Nh) dont l'hyper production d'IgE est régulée par la mutation Nh dans le gène *TRPV3* (Transient Receptor Potentiel cation



Modèle	Expression du gène	Age de développement	Histologie cutanée	Infiltrats cutanés	Cytokines/chimiokines cutanées	Reponse systémique	autre	References
Spontanée	Nc/Nga	6-8 semaines	Erythème Erosions Oedèmes Hyperkératose Parakératose Acanthose Spongirose Perte des poils	Eosinophiles Cellules mononucléées Mastocytes	CCL17/TARC CCL22/IMDC	Augmentation IgE (serum)	Développement des lésions en conditions conventionnelles	Matsuda 1997 Vertegaard, 1999 Aoi 2001 Hashimoto, 2004
	DS-Nh		Dermatite Infection S aureus	Mastocytes Eosinophiles LT CD4+	cytokines Th2	Augmentation IgE (serum)	Développement des lésions en conditions conventionnelles rarement en condition SPF	Watanabe, 2003 Hikita, 2002
	NOA		Puirt Ulcération Dermatite Défaut histologique majeur de la DA	Mastocytes pas de Lymphocytes		Augmentation IgE (serum)		Watanabe, 1999
	Flaky tail	(mutation dans FLG)	Acanthose modérée Hyperkératose	Lymphocytes Eosinophiles Cellules mononucléées		Augmentation IgE, IgG1, IgG2a (serum) IL4, IL5, IL13, IL10 allergène (OVA) IFN $\gamma$ , IL17 (rate)	Développement des lésions après exposition à un allergène (OVA)	Prestland, 2000 Fallon, 2009

Tableau 2- Souches murines développant spontanément des lésions de DA.

channel subfamily V member 3) (191) et qui présente un défaut de barrière cutanée secondaire à l'inflammation (192, 193).

- La Naruto Research Institute Otsuka (NOA) qui reproduit uniquement les défauts de l'inflammation cutanée de la DA associés à une augmentation de l'expression de l'homologue murin de la chimiokine humaine PF4 (Platelet Factor 4) (194).
- La flaky tail (ft), dont les mutations dans le gène de la *filaggrine* sont responsables du défaut de barrière cutanée et de l'hypersensibilité aux allergènes (40, 41).

## 2- Les modèles de souris génétiquement modifiées

Les modèles murins génétiquement modifiés reproduisant les lésions DA sont nombreux. Ils permettent de restreindre l'étude à des voies moins complexes que celles mises en jeu *in vivo* chez les patients DA.

Il apparaît que les phénotypes histologiques, les cellules immunitaires mises en jeu et la réponse systémique varient entre ces différents modèles animaux ainsi que le délai de développement de la maladie. Cependant, elles développent toute une dermatite inflammatoire qui reproduit tout ou en partie les caractéristiques des inflammations de type allergique. Il est intéressant de noter que ce phénotype peut être induit en modifiant l'expression de gènes du système immunitaire ou de gènes importants pour la fonction de barrière épidermique. Ainsi on distingue d'une part les animaux dont le système immunitaire a été modifié (Tableau 3, Tableau 4) :

- les souris transgéniques qui surexpriment des cytokines Th2 telles que l'IL4, l'IL13, l'IL31 et TSLP(154, 195-197) ;
- les souris transgéniques pour la cytokine pro-inflammatoire IL18 (198) ou pour l'enzyme qui permet son activation par clivage protéolytique, la caspase 1 (199) ;
- la souris KO pour la cathepsine E (200), une enzyme lysosomale essentielle à l'apprêtement des antigènes. Son invalidation semble favoriser la prise en charge des pathogènes par les DCs ainsi qu'une réponse Th2. De plus, son absence est associée à une diminution de l'expression des TLRs et à l'augmentation des infections, coïncidant avec les infections bactériennes retrouvées chez les patients DA ;

Modèle	Expression du gène	Age de développement	Histologie cutanée	Infiltrats cutanés	Cytokines/chimiokines cutanées	Réponse systémique	autre	References
Transgénique	IL4	Kératinocytes (promoteur K14)	4 mois	Acanthose Spongiose Hyperkératose Parakératose Xerosis Infection S aureus *	Eosinophiles Macrophages Mastocytes Lymphocytes T	IL4 CCL27	Augmentation IgE, IgG1 (serum) Diminution IgG2a (serum)	Développement des lésions en conditions SPF et conventionnelles Chan, 2001
	IL13	Kératinocytes (promoteur inducible Tet-K5)	6-8 semaines après ajout de doxycycline	Xerosis Prurit Perte des poils Erythème Lichenification Fibrose (bact pyoderma??)	LT CD4+ Mastocytes Eosinophiles Macrophages LCs	TSLP Eotaxin CCL17/TARC CCL27 MCP1 CCL22/MDC RANTES TGFβ1	Augmentation IgE, IgG1 IL4, IL13 (serum)	Hamid, 1996
	IL31	Lymphocytes (promoteur Eμ-Lck) Ubiquitaire (promoteur EF1α)	2 mois	Prurit Hyperkératose Parakératose Acanthose Perte des poils Epaississement	Mastocytes			Dillon, 2004
	Caspase 1	Kératinocytes (promoteur K14)	8 semaines	Prurit Erosions Acanthose Papillomatose Hyperkératose Parakératose Spongiose	Lymphocytes Neutrophiles Mastocytes	IL18 IL1β	Augmentation IgE, IgG1 IL18, IL1β Histamine (serum) IL4, IL5 (rate)	Yamanaka, 2000
	IL18	Kératinocytes (promoteur K14)	6 mois (conditions stériles)	Similaire à Tg CASP1 + lichenification	Lymphocytes Neutrophiles Mastocytes		Augmentation IgE, IgG1 IL18, IL4, IL5 Histamine (serum) Tg-Caspase1	Déclenchement plus tardif des lésions que la Konishi, 2002
	TSLP	Kératinocytes (promoteur inducible Tet-K5)	2-3 semaines après ajout de doxycycline	Erythème Xerosis Croutes Erosions Hyperkératose Parakératose Acanthose Spongiose	LT CD4+, IL4+ Mastocytes Eosinophiles Macrophages Neutrophiles	IL4 IL5 TNFα	Augmentation IgE, IgG1 (serum) Diminution IgG2a (serum)	Lésions cutanées indépendantes des lymphocytes T Yoo, 2005
	KLK7	Promoteur SV40e	7-8 semaines	Acanthose Epaississement Hyperkératose Parakératose	Peu de Lymphocytes Mastocytes (pas constant)			Hansson, 2002 Ny, 2003
	APOC1	Foie et Peau (promoteur APOC1)	2 mois	Desquamation Spongiose Lichenification Prurit Perte des poils Hyperkératose Parakératose Acanthose	LT CD4+ Eosinophiles Mastocytes Macrophages Neutrophiles		Augmentation IgE Cholestérol, TG FFA (serum)	Jong, 1998 Nageikerken, 2008

Tableau 3- Modèles de souris transgéniques développant des lésions de DA.

Modèle	Expression du gène	Age de développement	Histologie cutanée	Infiltrats cutanés	Cytokines/chimiokines cutanées	Réponse systémique	autre	References
Knock out	<b>Cathepsine E</b>	14 semaines (conditions conventionnelles)	Prurit Erosions Erythème Croutes Alopécie Acanthose Infection S. aureus	Lymphocytes Eosinophiles Macrophages		Augmentation IgE IL18, IL1β (serum) IL4, IL5 (rate)		Tsukuba, 2003
	<b>RelB</b>	4-6 semaines	Acanthose Hyperkératose Parakératose Epaississement Perte des poils	LT CD4+ Eosinophiles Granulocytes Mastocytes Eosinophiles	IL4 IL5 IFNγ Eotaxine CCR3 TGFβ IL1β	Augmentation IgE (serum)	Lésions cutanées dépendantes des lymphocytes T	Weih, 1997  Barton, 2000
	<b>Foxp3</b>	2 semaines	Epaississement Erosion Perte des poils Desquamation	Lymphocytes T		Augmentation IgE, IgG1 IFNγ, TNF-α IL4, IL5, IL10 Diminution IgG2a (serum) Augmentation IL4, IL5, IL13 (rate)		Fontend, 2003  Lin, 2005
	<b>MAIL/IKBε</b>	4-8 semaines	Epaississement Alopécie Prurit Erosion Hyperkératose Parakératose Acanthose	Lymphocytes Melanophages Neutrophiles Mastocytes Eosinophiles		Augmentation IgE (serum)		Shina, 2004

Tableau 4- Modèle de souris invalidées pour un gène (knockout) développant des lésions de DA.

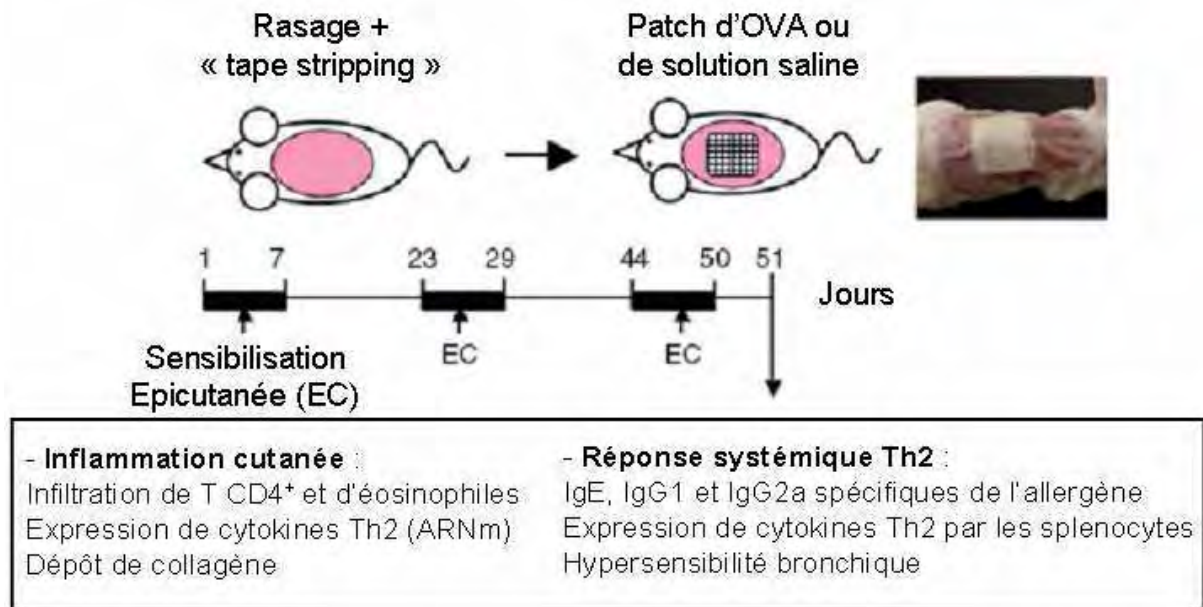
- les animaux avec un défaut de l'homéostasie lymphocytaire. C'est le cas de la souris déficiente pour le facteur de transcription RelB qui joue un rôle important dans la sélection négative des LT et empêche donc la production de cellules autoréactives (201, 202). La souris déficiente pour le facteur de transcription Foxp3 présentant un blocage de la différenciation des Treg fonctionnels qui entraîne un dysfonctionnement immunitaire et une réponse inflammatoire affectant plusieurs organes (203, 204).

D'autre part, il est possible d'induire des lésions de type DA en modulant l'expression de gènes de l'homéostasie épidermique :

- la souris transgénique pour la KLK7 (impliquée dans le processus de desquamation) (205, 206) ou la souris déficiente pour l'apolipoprotéine C1 (métabolisme des lipides) (207, 208), présente un défaut de la fonction de barrière cutanée qui semble favoriser la sensibilisation à travers la peau et le développement d'un phénotype eczématiforme.
- la souris KO pour l'inhibiteur de NF B , MAIL/I B . qui est normalement exprimée de manière constitutive par les kératinocytes, présente une production élevée de chimiokines par ces derniers (209).

### **3- Modèles de dermatite atopique induits par sensibilisation épicutanée**

Le rôle de la peau en tant que signal d'alarme déclencheur de la réaction allergique cutanée et systémique peut être démontré par le modèle murin de sensibilisation épicutanée. En 1998, *Spergel et al* ont développé un modèle murin de dermatite atopique induit par sensibilisation répétée à travers la peau. Pour cela, des souris ont subi une perturbation mécanique de la fonction barrière par « tape-stripping », permettant d'éliminer la couche cornée. Ces animaux ont ensuite été stimulés par un allergène (ovalbumine, OVA) appliqué directement sur la peau (147) (Figure 19). Ces souris ainsi sensibilisées développent un comportement de grattage et des lésions cutanées caractérisées par un épaissement de l'épiderme et du derme. Le derme est infiltré par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des éosinophiles. Une



**Figure 19- Modèle de sensibilisation épicutanée conduisant à une inflammation cutanée de type allergique.**

La souris, au préalable rasée, subit un stress mécanique répété par tape-stripping (élimination de la couche cornée à l'aide de bandes adhésives). L'animal reçoit ensuite un patch stérile contenant l'allergène (ici de l'ovalbumine) ou une solution contrôle pendant 1 semaine. Le même patch est à nouveau appliqué sur la même zone 2 fois une semaine espacée de 15 jours. Les souris développent une inflammation cutanée de type dermatite atopique avec la présence de cellules T CD4<sup>+</sup> et d'éosinophiles, associée à l'expression de cytokines Th2. Au niveau de la réponse systémique, les souris présentent une augmentation des immunoglobulines IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques de l'ovalbumine. Les splénocytes expriment des cytokines Th2 et les souris développent une hypersensibilité bronchique après inhalation d'ovalbumine.

(Modifié d'après Oyoshi (2009), *Adv Immunol*).

surexpression locale des cytokines Th2 (IL4, IL5 et IL13) avec peu ou pas de variation de la production d'IFN est également observée. Les chimiokines CCL11/éotaxine et CCL17/TARC, qui attirent respectivement les éosinophiles CCR3<sup>+</sup> et les T CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>, sont aussi surexprimées chez ces animaux sensibilisés.

La réponse systémique est caractérisée par une élévation du taux sérique des IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques de l'ovalbumine. De plus, les splénocytes produisent plus d'IL4, d'IL5, d'IL13 et d'IFN en réponse à une stimulation *ex vivo* à l'ovalbumine (147). Le fait que l'IFN soit produit par les cellules de la rate, mais ne soit pas détectable au niveau du site de sensibilisation cutanée, suggère que des facteurs produits localement au niveau de la peau induisent sélectivement l'activation des cellules Th2. De plus, ces souris développent une hypersensibilité bronchique exacerbée suite à l'inhalation d'OVA. Ce phénomène est également observé chez les patients asthmatiques avec ou ayant développés de la DA (147). Ce modèle illustre ce qui est décrit actuellement comme « la marche atopique » selon laquelle une sensibilisation allergique à travers la peau, peut entraîner une réponse systémique et une hypersensibilité généralisée souvent décrites chez les patients DA.

Le modèle de sensibilisation épicutanée combiné avec les modèles d'animaux génétiquement modifiés sont également très utiles pour mettre en évidence les acteurs essentiels de la réponse allergique. Par exemple, la déficience en cytokines pro-Th2 telles que l'IL4 ou l'IL5, diminue l'inflammation cutanée en réponse à la sensibilisation épicutanée (Tableau 5).

L'ensemble de ces modèles est important pour déterminer la contribution des compartiments immunitaire et cutané dans le développement de l'allergie. En effet, ils permettent également de définir des acteurs essentiels du système immunitaire qui interviennent suite à la perturbation de la barrière cutanée (sensibilisation épicutanée). Ces facteurs pourront être intégrées aux modèles proposés du développement de la DA.

## V. Traitement de la DA

Il n'existe pas de traitement curatif de la DA. Cependant, vers l'âge de 5 ans, les manifestations de la maladie cessent ou s'améliorent chez 85% des patients. Les

Souche	Inflammation Cutanée				Réponse systémique				Références
	EosinoP	LT CD4+	Epaisseur	Cytokines	Cytokines	IgE α-OVA	IgG1 α-OVA	IgG2a α-OVA	
WT	↑	↑	↑	IL-4 IL-5 IL-13	IL-4 IL-5 IL-13 IFN-γ	↑	↑	↑	Spergel et al. (1998)
C3aR <sup>-/-</sup>	↑	↔	n.a.	IL-4 ↔	IL-4↑ IL-5↑ IL-10↑	↔	↑	↔	Kawanoto et al. (2004)
COX2 <sup>-/-</sup>	↑	↑	n.a.	IL-4↑	IL-4↑ IFN-γ↓	↑	↑	↓	Laouini et al. (2005)
IL-4 <sup>-/-</sup>	↓	↑	↔	IL-4 n.d. IL-5↓ IL-2↑ IFN-γ↑	IL-4 n.d. IL-13↓ IFN-γ↑	↓	↓	↑	Spergel et al. (1999)
IL-5 <sup>-/-</sup>	↓	↔	↓	IL-5 n.d.	IL-5 n.d.	↔	↔	↔	Spergel et al. (1999)
IL-10 <sup>-/-</sup>	↓	↔	n.a.	IL-4↓ IL-5↓ Eotaxin↓ IFN-γ↑	IL-4↓ IFN-γ↑	↓	↓	↑	Laouini et al. (2003a)
IFN-γ <sup>-/-</sup>	↔	↔	↓	IL-4↑ IL-5 ↔ IL-2 ↔ IFN-γ n.d.	IL-4↑ IFN-γ n.d.	↑	↑	↓	Spergel et al. (1999)
IL-21R <sup>-/-</sup>	↓	↓	↓	IL-4↓ IL-13↓ Eotaxin↓ TARC↓	IL-4↓ IL-13↓ IFN-γ↓	↓	↓	↓	Jin et al. (2009b)
TSLPR <sup>-/-</sup>	↓	↔	↓	IL-4↓ IL-13↓	IL-4 ↔ IL13 ↔ IFN-γ ↔	↓	↓	↔	He et al. (2008)
CCR3 <sup>-/-</sup>	↓	↔	↓	IL-4 ↔	IL-4 ↔ IL5 ↔	↔	↔	↔	Ma et al. (2002)
C3 <sup>-/-</sup>	↓	↔	n.a.	IL-4↓ IL-5↓	IL-4↓ IL-5↓ IL13↓ IFN-γ↓	↓	↓	↓	Yalcindag et al. (2006)
TCRα <sup>-/-</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Woodward et al. (2001)
Rag 2 <sup>-/-</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Woodward et al. (2001)
IgH <sup>-/-</sup>	↔	↔	↔	IL-4 ↔	↔	n.d.	n.d.	n.d.	Woodward et al. (2001)
IgE <sup>-/-</sup>	↔	↔	↔	IL-4 ↔	↔	n.d.	↔	↔	Spergel et al. (1999)
TCRδ <sup>-/-</sup>	↔	↔	↔	IL-4 ↔	↔	↔	↔	↔	Woodward et al. (2001)
CD40 <sup>-/-</sup>	↔	↔	↔	IL-4 ↔	↔	↓	↓	↓	Woodward et al. (2001)
CD1d <sup>-/-</sup>	↔	↔	n.a.	IL-4 ↔ IL-13 ↔	↔	↔	↔	↔	EIKhal et al. (2006)
TLR2 <sup>-/-</sup>	↔	↔	↓	IL-4 ↔ IL-13 ↔ IFN-γ↓	IL-4 ↔ IL-13 ↔ IFN-γ↓	↔	↔	↓	Jin et al. (2009a)

↑  
inflammation

↓  
inflammation

↔  
inflammation

**Tableau 5- Implication de différents gènes du système immunitaire dans l'inflammation cutanée après sensibilisation épicutanée.**

Différents modèles murins KO sont comparés à une souris sauvage. Orange : aggravation de l'inflammation cutanée ; Bleu : amélioration de l'inflammation cutanée ; Jaune : pas d'effet sur l'inflammation cutanée.

n.a. : Pas de variation ; n.d. : données non disponibles



traitements actuels visent à rétablir la fonction de barrière cutanée ainsi qu'à inhiber la réponse inflammatoire cutanée et l'allergie systémique.

Le but de la restauration de la fonction de barrière cutanée est d'hydrater la peau, d'empêcher la perte en eau et de supprimer les démangeaisons qui conduisent au grattage et à la blessure de la peau. De plus, ce traitement, à l'aide d'émollients (tels que le Cetaphil et l'Aquaphor) réduit la pénétration des allergènes grâce à la formation d'un film lipidique protecteur à la surface de la peau. Il s'agit un traitement quotidien qui doit être appliqué sur tout le corps (210). A l'inverse, l'utilisation d'une thérapie anti-inflammatoire est nécessaire dès les toutes premières manifestations de la maladie et ce type de traitement est appliquée uniquement au niveau des zones cutanées lésées. Les anti-inflammatoires, notamment le picrolimus, améliorent les lésions de DA par plusieurs mécanismes tels que l'inhibition de l'activation des lymphocytes T, l'inhibition de la sécrétion de cytokines par les LT, les mastocytes et les autres cellules immunitaires. Il diminue également le nombre et l'activation des cellules de Langerhans (211). L'inhibition de l'inflammation peut avoir dans un second temps un bénéfice pour la restauration de la fonction de barrière cutanée brisant ainsi le cercle vicieux qui amplifie et aggrave le phénotype DA.

En combinaison avec le traitement visant à restaurer la fonction barrière et à réduire l'inflammation, des efforts doivent être menés pour éviter l'exposition aux irritants et aux infections bactériennes. Il existe de nombreuses évidences qui suggèrent que le traitement des « superinfections » bactériennes (survenue d'une nouvelle infection par une souche bactérienne différente pendant le traitement d'une première infection) a un bénéfice clinique chez les patients DA (109).

Ainsi, l'avancée des connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la DA est possible grâce aux modèles animaux et à l'étude des maladies monogéniques qui présentent des symptômes cliniques communs à la DA, tel que le syndrome de Netherton. Elle devrait faciliter le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblées de la maladie.

Cette maladie multifactorielle impliquant les compartiments immunitaire et cutané permet également de mettre en avant le rôle de l'épiderme dans le déclenchement et l'aggravation des pathologies inflammatoires. Elle souligne l'importance d'une approche visant à améliorer ces deux composantes qui sont étroitement liées.



## **PARTIE D- Immunité cutanée- Les kératinocytes : cellules du système immunitaire inné ?**

La peau contient un grand nombre de cellules immunitaires : des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), des mastocytes, des macrophages et des lymphocytes, qui sont associés aux réponses innée et adaptative. Pendant longtemps, le rôle des kératinocytes dans la défense immunitaire se limitait essentiellement à leur rôle crucial dans la fonction de barrière épidermique. Cependant, les kératinocytes pourraient être ajoutés au groupe des cellules du système immunitaire inné, grâce à leur capacité de « senseur » et de reconnaissance des pathogènes, de production de molécules antimicrobiennes et d'émission de signaux pro-inflammatoires.

### **I- Reconnaissance des pathogènes : les Toll-Like Receptors (TLR)**

Les Toll-like récepteurs (TLRs) sont impliqués dans la défense contre une grande variété de micro-organismes pathogènes via la reconnaissance de motifs conservés, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). L'engagement d'un TLR initie de nombreuses cascades de signalisation dont l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Celle-ci induit la production de molécules impliquées dans les réponses immunitaires innée et adaptative, telles que des cytokines, des chimiokines, des peptides antimicrobiens, des molécules de costimulation ou des molécules d'adhésion (212). Les TLRs sont exprimés par plusieurs types cellulaires dans la peau. Les kératinocytes expriment les TLRs 1 à 6, TLR9 et TLR10 (213). Plusieurs études ont pu établir que ces TLRs étaient fonctionnels et participaient à la réponse immunitaire cutanée (213-215). L'activation des différents TLRs, suite à la reconnaissance de motifs spécifiques à chacun, résultent en des réponses immunes distinctes (213). L'activation des TLRs 3, 4, 5 et 9 à la surface des kératinocytes induit la production de TNF $\alpha$ , d'IL8, de CCL2 (chimiokine attractant les monocytes et basophiles) et de CCL20 (chimiokine attractant les lymphocytes) (213). L'activation sélective des TLRs 3 et 9 conduit à la production de CXCL9 et CXCL10, qui sont importantes pour l'activation des lymphocytes T mémoire et qui induisent la production d'IFN de type I ( $\alpha$  /  $\beta$ ) (213). L'ensemble de ces données confirment que

les kératinocytes humains expriment des TLRs fonctionnels qui pourraient être important dans le déclenchement des mécanismes de défense contre les agents pathogènes.

## **II- PAR2**

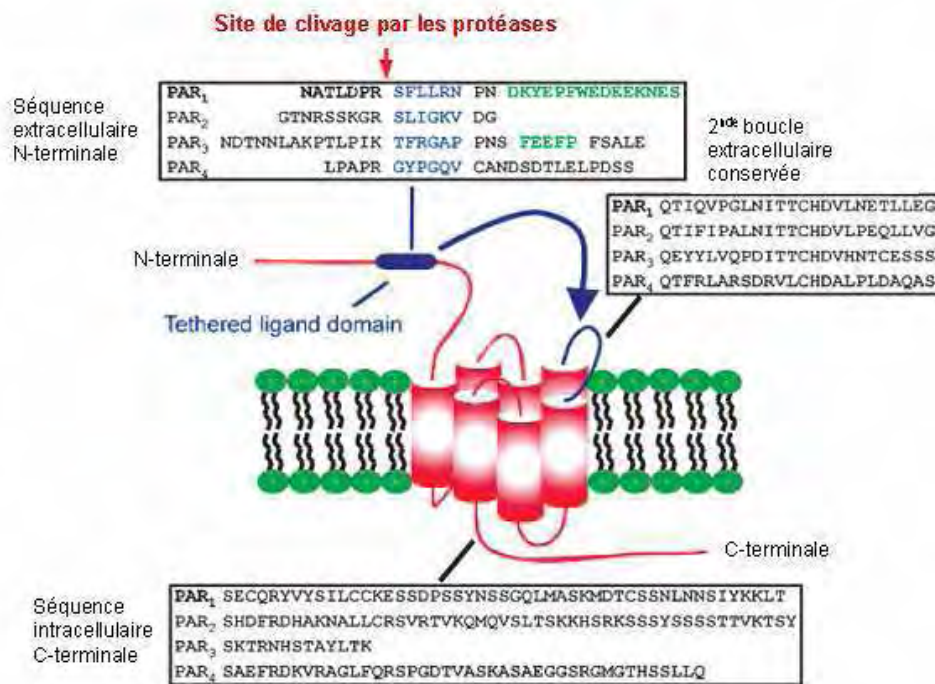
Les PARs (Proteinase Activated Receptors) appartiennent à une sous-famille des RCPG (Récepteur couplé aux protéines G), qui possèdent 7 domaines transmembranaires et qui sont activés par clivage protéolytique sous l'action des protéases à sérines.

On dénombre actuellement 4 membres dans la famille des PARs (PAR1, PAR2, PAR3 et PAR4) qui sont exprimés à la surface d'un grand nombre de type cellulaire.

Les PAR1, 3 et 4 peuvent être activés par la thrombine, la trypsine ou la cathepsine G. PAR2 contrairement aux autres est résistant au clivage par la thrombine mais peut être activé par de nombreuses protéases telles que la trypsine, la tryptase mastocytaire et les protéases dérivées des pathogènes. En plus de ces protéases, il a été récemment démontré que les kallikréines (KLK5, KLK14), dont celles retrouvées hyperactives dans le syndrome de Netherton, avaient un rôle dans l'émission de signaux en clivant les PARs (216-218).

Les PARs sont activés via un mécanisme original de clivage protéolytique au niveau d'une séquence spécifique (environ 6 acides aminés) du domaine N-terminale extracellulaire. Le clivage conduit à l'exposition d'une séquence ligand qui va alors interagir avec la boucle extracellulaire numéro 2 et d'autre domaine du récepteur clivé conduisant à son activation (219). Ce processus d'activation intramoléculaire est suivi du couplage avec des protéines G qui vont activer diverses voies de signalisation intracellulaires (Figure 20).

Parmi les PARs, PAR2 est exprimé au niveau du cerveau, des yeux, des voies respiratoires, du cœur, du pancréas, des reins, du foie, de la prostate et dans la peau. Le récepteur est exprimé par une grande diversité de types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires.



**Figure 20- Structures secondaires et mécanismes d'activation des récepteurs PARs.**

Les protéases à sérine clivent le récepteur PAR au niveau d'un site consensus de sa séquence extracellulaire N-terminale (flèche rouge). Une fois libéré le peptide ligand (séquence bleue) interagit avec la seconde boucle extracellulaire conservée et active ainsi le récepteur. La séquence intracellulaire C-terminale détermine la nature des voies de signalisation mises en jeu suite à l'activation du PAR.

(Modifié d'après Steinhoff (2005) *Endocr Rev*)

## 1- Signalisation intracellulaire induite par PAR2

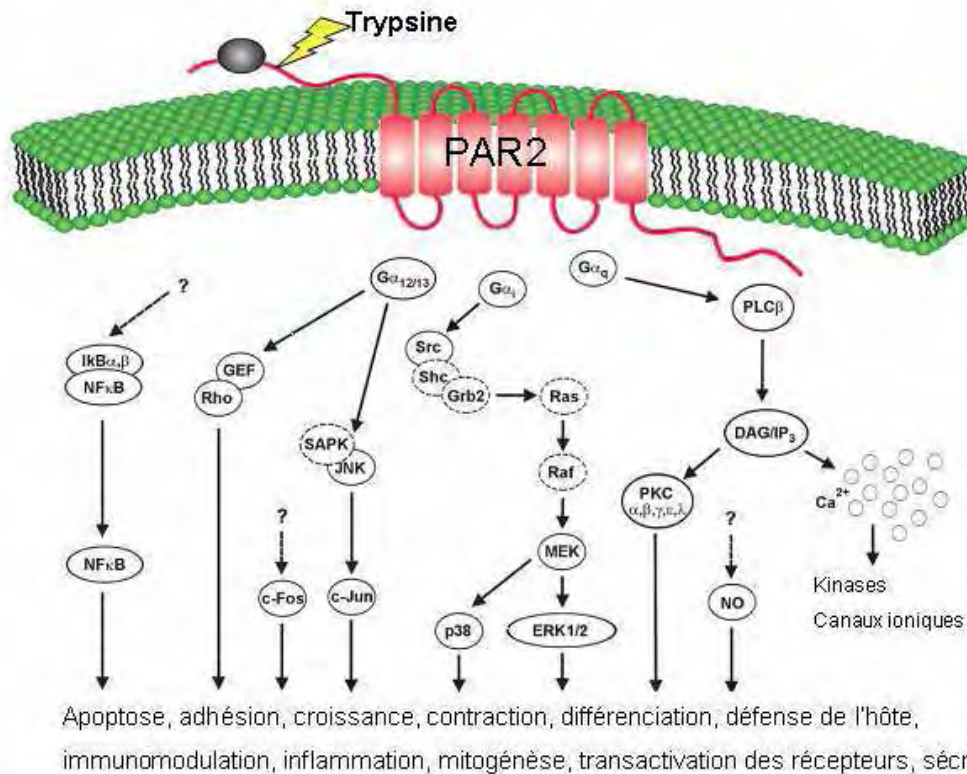
Contrairement aux nombreuses études concernant la signalisation intracellulaire en aval de PAR1, il y a relativement peu de données sur celle de PAR2. Actuellement, seules des données indirectes indiquent que PAR2 interagit avec les protéines Gq/G11 (activation de la signalisation calcique) et probablement G0/Gi (220).

L'interaction avec les protéines Gi et Gq suggère une activation secondaire des voies de signalisation de la phospholipase C (PLC), Protéine Kinase C (PKC) et des MAP Kinase (MAPK). Ainsi comme démontré pour les cellules neuronales et les cellules musculaires lisses, la stimulation par de la tryptase ou le peptide agoniste de PAR2 (PAR2-AP, séquence peptidique mimant celle ligand naturel) entraîne l'activation de la PLC et de la PKC (220, 221) alors que le PAR2-AP et la trypsine stimule JNK et p38MAPK dans une lignée de kératinocytes humains (NCTC2544) (222). De plus *Vouret-Craviari et al* ont décrit l'induction de RhoA secondaire à l'activation de PAR2 dans des HUVEC (223).

En aval de ces cascades, le clivage de PAR2 stimule l'activation des kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  et la fixation de NF- $\kappa$ B à l'ADN. L'effet de la stimulation de PAR2 sur l'induction de NF- $\kappa$ B et des IKK a pu être démontré dans plusieurs types cellulaires tels que les SMC, les cellules épithéliales bronchiques, les cellules endothéliales et les kératinocytes primaires humains (222, 224-228).

L'ensemble de ces cascades signalétiques influence un grand nombre de mécanismes cellulaires. Ainsi, l'activation de PAR2 régule la polarisation de la réponse des cellules neuronale, la prolifération et la division des cellules musculaires lisses, la prolifération et différenciation des kératinocytes et les modifications du cytosquelette des cellules endothéliales (221, 223, 229, 230) (Figure 21).

Enfin, des travaux plus récents sur des cellules endothéliales et des fibroblastes ont mis en évidence le rôle de PAR2 dans l'augmentation de la fixation du facteur de transcription CUX1 à l'ADN (231). Les gènes cibles de CUX1 sont impliqués dans le contrôle de nombreux mécanismes tels que la progression dans le cycle cellulaire, la communication intercellulaire, la mobilité et la détermination de l'identité cellulaire (232, 233). Dans cette étude, les auteurs ont pu montrer la régulation de l'IL1 $\beta$ , la MMP10 et COX2 en aval de la cascade PAR2-CUX1, dans des fibroblastes embryonnaires de souris.



**Figure 21- Principales voies de signalisation induites par les protéines G couplés à PAR2.**

Les voies de signalisation en aval de l'activation de PAR2 ne sont pas encore bien caractérisées. Les cercles en pointillés représentent les signaux ou les intermédiaires restant à démontrer. Les traits pleins représentent les cascades de signalisation conduisant aux différents effets cités dessous. Ces effets sont dépendants du tissu, du type cellulaire et de l'espèce.

(Modifié d'après Steinhoff (2005) *Endocr Rev*)

## 2- Régulation de PAR2

Il existe plusieurs mécanismes régulant la stimulation et l'arrêt des signaux initiés par les PARs :

- La disponibilité du récepteur à la surface de la cellule.

Cette disponibilité est régulée par le trafic des vésicules de stockage du récepteur, vers la surface de la cellule. Il a été démontré notamment pour PAR2 que suite à son activation, le récepteur est internalisé et adressé aux lysosomes, ce qui constitue un premier mécanisme de désensibilisation, via l'absence de disponibilité du récepteur en surface. La remise en place du récepteur après une simple stimulation est dépendante d'un pool préformé de la protéine stockée dans l'appareil de Golgi qui sera ré-adressée à la membrane plasmique. Cependant, une stimulation répétée des récepteurs conduit à la neosynthèse de la protéine (234).

- Le clivage non spécifique du récepteur, affectant la séquence du peptide ligand, est capable de le désarmer. Il devient alors insensible aux protéases spécifiques.

- La disponibilité des protéines G et des kinases associées aux protéines G nécessaires à la signalisation qui découle du clivage activateur des PARs. Ces protéines sont différentes en fonction du type cellulaire concerné.

- L'état de glycosylation du récepteur. La forme humaine de PAR2 est un récepteur possédant 2 à 3 sites potentiels de N-glycosylation qui varient selon l'état de la cellule et le type cellulaire. A l'aide de mutants ponctuels des sites potentiels de glycosylation, *Compton et al.* ont pu déterminer qu'au moins une de ces glycosylations était nécessaire à l'adressage du récepteur à la surface de la cellule. De plus, la sensibilité aux différentes protéases est affectée par la variation des sites glycosylés, probablement dû à la modification de l'accessibilité du peptide cible (235).

## 3- Expression cutanée de PAR2

A l'état basal, le récepteur PAR2 est présent à la surface de la majorité des types cellulaires de la peau incluant les cellules endothéliales, les cellules nerveuses, les cellules immunitaires résidentes et les kératinocytes.

Dans les kératinocytes de l'épiderme interfolliculaire, l'expression de PAR2 semble être dépendante de l'état de différenciation puisqu'il est fortement exprimé dans les



kératinocytes de la couche granuleuse et que son expression diminue dans les couches suprabasales. Dans la couche cornée et la couche basal de l'épiderme humain sain, PAR2 n'est pas détecté (236-238). *In vitro*, l'activation de PAR2 sur des kératinocytes primaires entraîne la mobilisation transitoire du calcium intracellulaire, des changements morphologiques (237, 239), et une inhibition de la prolifération et de la différenciation terminale *in vitro*.

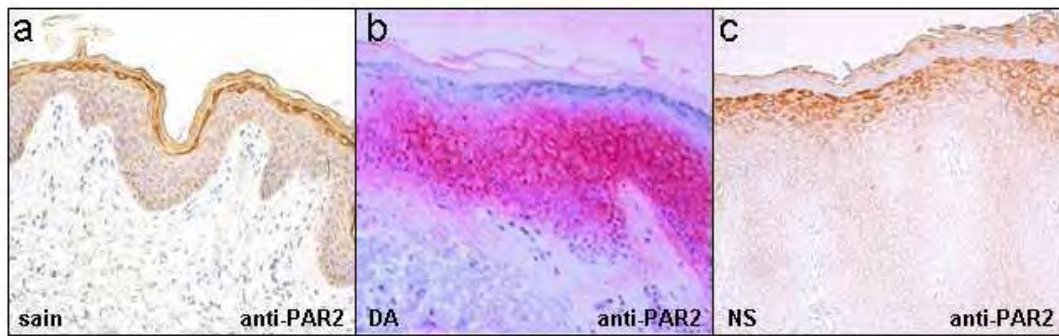
L'expression de PAR2 au niveau des cellules du derme est restreinte aux cellules endothéliales, aux cellules nerveuses sensorielles et aux cellules immunitaires résidentes telles que les mastocytes et les cellules dendritiques. L'expression de PAR2 au niveau des cellules immunitaires semble pouvoir être étendue aux granulocytes, aux macrophages et aux lymphocytes T, cependant ces données nécessitent d'être confirmées au niveau de la peau. Les fibroblastes dermique quant à eux n'expriment pas PAR2 en condition physiologiques (237, 238, 240-242), contrairement aux fibroblastes bronchiques. PAR2 n'est exprimé à la surface des fibroblastes dermiques que lors de la cicatrisation, dans les cas de fibrose ou encore dans un environnement tumoral. Ils sont alors qualifiés de fibroblastes prolifératifs.

L'expression de PAR2 par les kératinocytes est modifiée dans certaines conditions pathologiques. En effet le récepteur est surexprimé dans l'épiderme lésé des patients atteint de dermatite atopique (225) et dans l'épiderme des patients atteint du syndrome de Netherton (62) (Figure 22).

#### **4- Activation et inhibition de PAR2 dans la peau**

PAR2 est activé par clivage protéolytique libérant le peptide ligand SLIGKV chez l'homme et SLIGRL chez la souris. Une grande variété de protéases à sérine présentes dans la peau est capable d'activer PAR2. Parmi elles, on distingue les protéases exprimées par les kératinocytes, incluant la Matriptase-1 (243) et les kallikreines 5 et 14 (217). Ces dernières sont exprimées par les kératinocytes de la couche granuleuse. Elles sont hyperactives dans l'épiderme des patients SN et surexprimées dans la peau des patients atteints de DA et de psoriasis. De plus chez le SN et dans la peau des patients DA, les KLK5 et 14 colocalisent avec la surexpression de PAR2 suggérant leur rôle en temps qu'activateurs de la signalisation en aval de ce récepteur.

En plus des kératinocytes, le derme est également source d'enzymes activatrices et inhibitrices de PAR2. Durant l'inflammation, les mastocytes recrutés et activés



**Figure 22- Immunohistochimie de PAR2 sur coupe de peau humaine.**

(a) Dans une peau saine, PAR2 est essentiellement détecté au niveau des kératinocytes de la couche granuleuse. (b) Dans la peau lésée des patients atteints de dermatite atopique (DA), l'expression de PAR2 s'étend à plusieurs couches cellulaires, majoritairement suprabasales. (c) Dans l'épiderme des patients atteints du syndrome de Netherton (SN), l'expression de PAR2 est augmentée dans la couche granuleuse et sa détection s'étend aux couches épineuses supérieures.

(a et c: coloration au DiAminoBenzidine; b : coloration à la phosphatase alcaline)

(Modifié d'après Descargues (2006) *J Invest Dermatol* (a et c) ; Buddenkotte (2005) *J Invest Dermatol* (b))

secrètent de la tryptase capable d'induire une signalisation via PAR2 mais de manière moins efficace que la trypsine. L'activation de PAR2 à la surface des mastocytes induit la dégranulation et donc la production d'histamine par ces derniers. Alors que les mastocytes peuvent amplifier la réponse PAR2 grâce à l'action de la tryptase à leur propre surface mais aussi sur les cellules environnantes, les neutrophiles semblent avoir un rôle inverse. En effet, les neutrophiles produisent de l'élastase et de la cathepsine G qui peuvent être considérées comme des inhibiteurs potentiels de PAR2 puisque ces 2 enzymes désarment le récepteur *in vitro*. (244). Cependant ces deux enzymes ont été rapportées pour activer PAR2 à la surface des fibroblastes gingivaux (245). Ces observations contradictoires peuvent être dues à des différences de glycosylation du récepteur qui varie entre les différents types cellulaires (235, 246).

Lors d'un processus physiopathologique tels qu'un traumatisme des vaisseaux sanguins ou pendant la phase de progression tumorale, les facteurs tissulaires VIIa et Xa peuvent activer PAR2 (247). Leur action peut également s'étendre aux fibroblastes prolifératifs. Au contraire, la plasmine et les calpaïnes I et II désarment le récepteur (248).

PAR2 est aussi connu pour être activé par les protéases produites par les pathogènes tels que les acariens (Derp3), certaines bactéries (gingipaïne R, serralsine (249) et probablement certains parasites. Ces enzymes sont capables de pénétrer dans la peau lorsque la fonction de barrière épidermique est affectée. Ces données laissent supposer un rôle pour PAR2 en tant que senseur/sentinelle des agressions au niveau cutané.

## **5- Rôle de PAR2 dans l'inflammation cutanée**

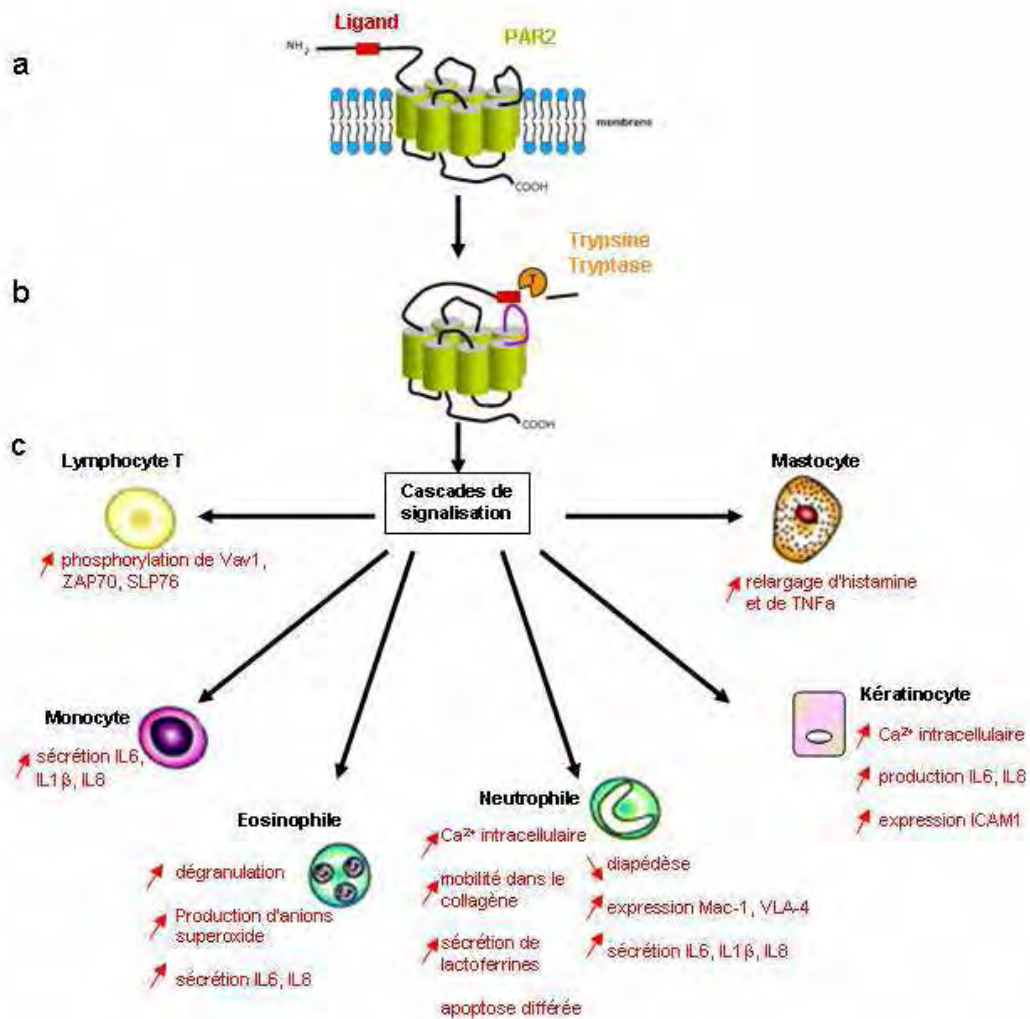
PAR2 est exprimé à la surface des kératinocytes, des cellules immunitaires résidentes et des cellules endothéliales. Par conséquent son activation peut influencer l'induction, l'entretien et l'amplification de la réponse inflammatoire. L'activation de PAR2 à la surface des kératinocytes de l'épiderme peut induire la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL6 et du GM-CSF, induisant maturation des cellules de Langerhans et l'activation des macrophages, et de la chimiokine IL8 (240, 250). De plus, *in vitro*, les kératinocytes primaires humains stimulés avec de la trypsine ou le peptide agoniste de PAR2 surexpriment la molécule d'adhésion ICAM1

(225) ce qui, *in vivo*, pourrait faciliter la pénétration des lymphocytes T dans l'épiderme.

Bien que les fibroblastes dermiques n'expriment pas PAR2 de manière constitutive, des études ont pu démontrer que dans des conditions particulières, les fibroblastes en prolifération pouvaient être activés par la tryptase ou le Facteur Xa. Cette activation dépendante de PAR2, alors présent à leur surface, est responsable de la sécrétion d'IL6 et de l'expression de la cyclo-oxygénase 2 (COX2) (251, 252).

Les protéases endogènes capables d'activer PAR2 à la surface des cellules endothéliales n'ont pas encore été identifiées. Cependant, il est probable que la tryptase sécrétée par les mastocytes intervienne lors de l'inflammation cutanée. Des travaux menés *in vitro* sur des lignées de cellules endothéliales ont démontrés que l'activation de PAR2 pouvaient conduire à la sécrétion d'IL6, d'IL8 (227), mais également à la production de COX2 et de prostacycline (253, 254) et encore à l'expression de la P-selectine (255). La P-selectine est essentielle à l'extravasation des leucocytes lors du processus inflammatoire. Ces observations *in vitro*, sont soutenues par des résultats *in vivo* obtenus chez les souris PAR2<sup>-/-</sup>. En effet, l'adhésion des leucocytes après blessure des vaisseaux est significativement diminuée chez ces animaux comparé à des souris sauvages (256).

En condition inflammatoire, la peau est infiltrée par un grand nombre de cellules de l'immunité innée qui répondent elles aussi à l'activation de PAR2. Parmi elles, les mastocytes qui sécrètent de la tryptase peuvent s'activer de manière autocrine. Ces cellules répondent à l'activation de PAR2 par la dégranulation (257), conduisant à la production d'histamine, de protéoglycanes et de protéases telles que la tryptase et la chymase. Les autres cellules de l'immunité innée concernées par l'activation de PAR2 à leur surface sont les neutrophiles et les éosinophiles. L'activation du récepteur à la surface des neutrophiles entraîne la sécrétion d'IL6 et d'IL1 (258) Cette activation induit la dégranulation des éosinophiles (259, 260) et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que l'IL6 et l'IL8 (261). Cependant, ces expériences ont été effectuées sur des neutrophiles et éosinophiles circulants et il n'est pas encore démontré si ces cellules expriment PAR2 *in vivo* dans la peau. De même, l'expression de PAR2 et l'induction de la signalisation en aval de son activation dans les cellules dendritiques et dans les macrophages de la peau reste à élucider *in vivo*.



**Figure 23- Rôle de PAR2 dans l'inflammation.**

(a) Sous sa forme inactive le ligand N-terminale (rectangle rouge) ne peut pas interagir avec la seconde boucle extracellulaire. (b) Les protéases à sérine endogènes et exogènes clivent le fragment N-terminal, libérant ainsi le ligand qui viens alors interagir avec la seconde boucle extracellulaire du récepteur et induire la signalisation intracellulaire. (c) L'activation de PAR2 à la surface des kératinocytes et des cellules immunitaires humaines induit une variété de réponses incluant la sécrétion de cytokines et chimiokines ainsi que l'expression de molécules d'adhésion.

(Modifié d'après Shpacovitch (2008) *J Leukoc Biol*)

Aux cellules de l'immunité innée, viennent s'ajouter les lignées humaines de lymphocytes T ainsi que les LT des tissus qui expriment PAR1, PAR2 et PAR3 (262-265). La stimulation polyclonale des lymphocytes périphériques humains augmente l'expression transcriptionnel de PAR2 (265). Les lymphocytes T murins expriment aussi PAR2 bien que son rôle biologique reste à clarifier (266). Il est intéressant de noter que la signalisation induite par PAR2 joue un rôle important dans la production de cytokines par les LT murins. En effet chez les animaux déficients pour PAR2, la sécrétion d'IL4 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spléniques est diminuée après stimulation à l'ovalbumine comparé à des souris sauvages alors que la production d'IFN est augmentée suggérant un rôle de PAR2 dans la polarisation de la réponse T en faveur d'une réponse Th2(266). L'ensemble des effets directs de l'activation de PAR2 sur les cellules intervenants dans la réponse inflammatoire est représenté Figure 23.

Enfin, le récepteur est responsable du développement de la réponse prurigène qui aggrave dans un second temps l'inflammation cutanée. En effet, l'activation de PAR2 au niveau des terminaisons nerveuses de la peau induit la sécrétion de neuropeptides et de la substance P responsables de la vasodilatation et de la dégranulation des mastocytes (267). D'une part la vasodilatation et l'augmentation du flux sanguin facilite l'entrée des neutrophiles et induit la formation d'œdèmes. D'autre part la dissémination d'histamine lors de la dégranulation des mastocytes entraîne des démangeaisons.

Le rôle de PAR2 dans les maladies inflammatoires aiguës ou chroniques de la peau telles que la dermatite de contact et la dermatite atopique (DA) a été démontré dans plusieurs études. Dans le modèle murin de dermatite de contact induit, PAR2 joue un rôle crucial dans le développement de l'inflammation de type allergique. En effet, dans ce modèle, l'infiltration de cellules immunitaires, l'adhésion des leucocytes aux vaisseaux sanguins et l'inflammation sont significativement inhibées chez les souris PAR2<sup>-/-</sup> comparées aux souris sauvages (268, 269). Dans la dermatite atopique PAR2 pourrait induire le prurit et « la triade de Lewis » (oedème, érythème et prurit). Ainsi PAR2 peut être considéré comme un composant majeur de la boucle d'amplification de l'inflammation et du prurit dans la DA (270-272).

PAR2 peut être considéré comme un récepteur clé sentinelle de l'organisme puisqu'il peut aussi bien répondre à une activation par les protéases endogènes que par les protéases exogènes produites par certains micro-organismes.

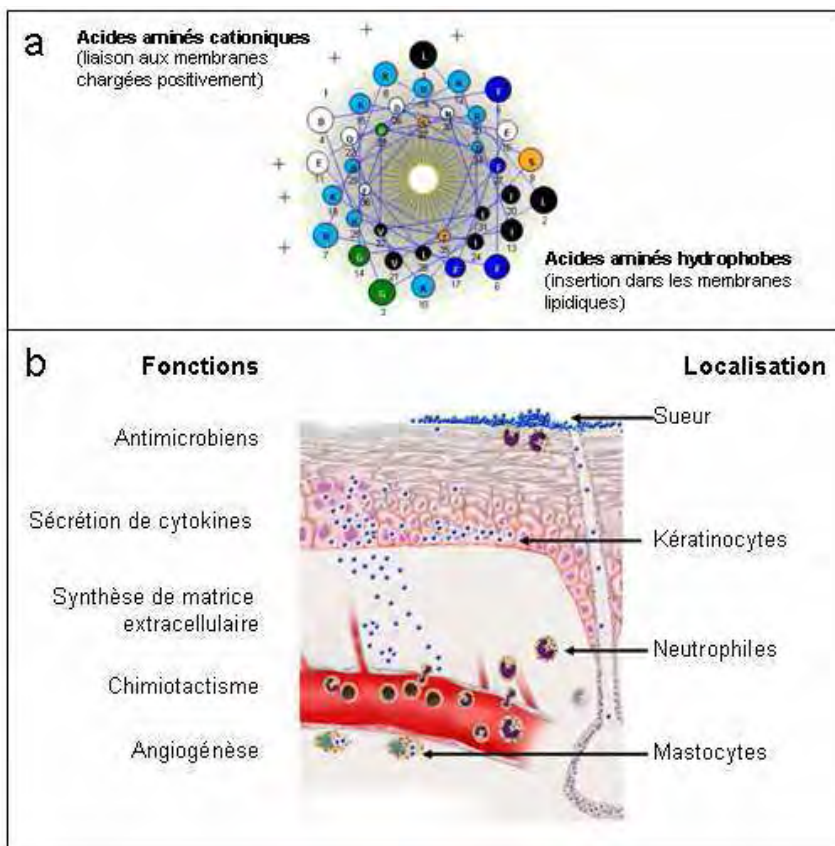
De plus, l'ensemble de ces données supporte l'idée selon laquelle l'activation de PAR2 jouerait un rôle déclencheur pendant le développement de l'inflammation cutanée et du prurit. Il pourrait influencer le recrutement de leucocytes au niveau des sites inflammatoires de la peau. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases et d'antagonistes de PAR2 semble être nécessaire pour élucider le rôle de PAR2 et des protéases exprimées par les cellules immunitaires dans le développement de l'inflammation cutanée.

### **III- Les peptides antimicrobiens**

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des composants de la réponse immune innée, qui protègent contre l'invasion des bactéries, des virus et des champignons. Des travaux récents ont étendu le répertoire d'actions des AMPs et mis en évidence leurs capacités immunostimulatrices et immunomodulatrices. Les AMPs peuvent induire des mécanismes secondaires de défense de l'hôte via l'induction de molécules pro-inflammatoires, le chimiotactisme et l'angiogénèse (Figure 24). Parmi les AMPs, il existe divers groupes de peptides répartis en différentes classes en fonction de leur structure secondaire. La majorité des classes d'AMPs partagent une structure commune au sein de laquelle les domaines hydrophobes et les acides aminés cationiques sont réarrangés dans l'espace en un motif amphiphile (Figure 24). Cette structure secondaire facilite leur interaction avec les membranes bactériennes (273, 274) et conduit à la déstabilisation et à la lyse du micro-organisme (275-277). Dans la peau, les cathélicidines et  $\alpha$ -défensines sont les AMPs les mieux caractérisés.

#### **1- Cathélicidines**

Les cathélicidines constituent le groupe le plus important des AMPs cutanés (278-280). La cathélicidine humaine est connue, sous le nom de son précurseur hCAP18 ou sous celui d'une de ses formes peptidiques active LL-37 (281). La maturation de hCAP18 est dépendante du clivage protéolytique par les protéases à sérine incluant les kallikréines 5 et 7 (282, 283). LL-37 peut à la fois agir directement sur les pathogènes en détruisant leur membranes (284) et en même temps déclencher une réponse de l'hôte. En effet, il peut interagir avec des récepteurs



**Figure 24- Les peptides antimicrobiens (AMPs) dans la peau.**

(a) Représentation schématique de l'AMP LL37. Les acides aminés chargés positivement (cationiques) sont positionnés à l'opposé des acides aminés hydrophobes. Cette organisation amphiphile, commune à de nombreux AMPs, leur permet de se lier aux membranes des pathogènes et d'y pénétrer. (b) Les AMPs sont produit par différents types cellulaires dans la peau : glandes sudoripares, les kératinocytes activés et les cellules immunitaires résidentes ou attirées (mastocytes et neutrophiles). En plus d'un rôle antibiotique, les fonctions attribuées aux AMPs sont multiples. Ils influencent la sécrétion de cytokines, la synthèse de composants de la matrice extracellulaire ou encore le chimiotactisme et l'angiogénèse.

(Modifiés d'après Izadpanah and Gallo (2005) *J Am Acad Dermatol*)



membranaires (285, 286) et influencer la signalisation des TLRs (287, 288). La cathelicidine peut aussi agir en synergie avec des médiateurs pro-inflammatoires tel que l'IL1 et induire la production de cytokines (IL6 et IL10) et de chimiokines (MCP-1 et 3 ; Monocyte Chemotactic Protein) (289).

Dans une peau humaine saine, hCAP18 est produite en faible quantité, mais les infections ou la perte de la fonction de barrière cutanée induisent l'augmentation de son expression (290-292). A cet égard, certaines pathologies inflammatoires cutanées sont souvent associées à un défaut de la fonction de barrière cutanée. Par exemple, dans la dermatite atopique le microenvironnement Th2 semble inhiber l'induction des AMPs (293) et corrèle avec la susceptibilité accrue de ces patients aux infections microbiennes (293, 294). A l'inverse, dans les lésions de psoriasis, l'expression de la cathelicidine est augmentée (186, 295), ce qui pourrait participer au développement et au maintien de l'inflammation cutanée (295).

## **2- -Défensines**

Les -défensines sont exprimées par les kératinocytes et les cellules épithéliales, ce qui leur confère un rôle de défense contre la colonisation des micro-organismes au même titre que les cathélicidines. Elles sont induites par des infections ou par l'inflammation. Le mode d'action des -défensines pour détruire les micro-organismes implique la perméabilisation des membranes (276). A ce jour, six -défensines humaines ont été clonées (HBD-1 à 6) à partir de cellules épithéliales et de cellules mononuclées périphériques (296-306).

HBD-1 est constitutivement exprimée par de nombreuses cellules épithéliales particulièrement dans la peau (kératinocytes) et les tissus urogénitaux (304, 307, 308). HBD-2 a été initialement identifié dans les lésions de psoriasis. Cet AMP est positivement régulé en présence de différents micro-organismes. L'activité antimicrobienne de HBD-2 est préférentiellement dirigée contre les bactéries Gram-négatives telles que *E.coli* et *P. aeruginosa* (302). Enfin, HBD-3 est surexprimé lors de dommage cutané en l'absence de microbes suggérant un rôle dans la prévention de la colonisation en cas de rupture de la barrière cutanée (309).

En plus de leur activité antimicrobienne, les -défensines, aux même titre que les cathélicidines, ont des fonctions diverses dans l'immunomodulation et l'inflammation. Par exemple, HBD-2 est capable d'induire la production de prostaglandine et la

sécrétion d'histamine par les mastocytes (310) et peut également chimioattirer les cellules dendritiques immatures et les LT mémoires en se fixant sur CCR6, le récepteur de MIP3 (285, 311). De plus, HBD-2, 3 et 4 sont capables de stimuler l'expression de nombreuses cytokines telles que le CXCL10, IL10 et MCP-1 (286). Ainsi les AMPs exprimés par les kératinocytes constituent une première ligne de défense de l'organisme via leur activité de destruction des pathogènes mais aussi leur grand spectre d'action immunomodulateur et inflammatoire.

#### **IV- Sécrétion de cytokines, chimiokines et molécules pro-inflammatoires par les kératinocytes**

Dans une peau saine à l'état basal les kératinocytes ne produisent que quelques médiateurs tels que les cytokines IL1, IL7, l'IL18 et le TGF. Les kératinocytes contiennent une grande quantité d'IL1 préformée et active et d'IL1 immature dans leur cytoplasme. Il semble que le rôle des réserves d'IL1 soit d'initier une réponse inflammatoire rapide et de déclencher les mécanismes de réparation après un dommage infligé à l'épiderme. L'IL7, quant à lui, est un facteur de croissance important pour les lymphocytes qui joue un rôle dans la survie et la prolifération des lymphocytes T cutanés. En plus de ces effets régulateurs sur la croissance des kératinocytes et des fibroblastes, le TGF est un modulateur de la réponse immunitaire et est important pour le développement des cellules de Langerhans.

Lorsque l'épiderme est exposé à des stimuli (hypoxie, blessure, radiation, haptènes, produits d'origine microbienne), la synthèse et la sécrétion d'un grand nombre de cytokines par les kératinocytes sont considérablement augmentées. Les conséquences biologiques sont multiples et incluent :

- l'initiation de l'inflammation (IL1, TNF, IL6 et d'autres chimiokines) ;
- la modulation du phénotype et de la fonction des cellules de Langerhans (IL1, GM-CSF, TNF, IL10, IL15) ;
- l'activation des lymphocytes T (IL15, IL18) et leur inhibition (IL10, TGF) ;
- la polarisation des lymphocytes Th1 (IL12, IL18), Th2 (TSLP), ou Th17 (IL23).
- Le homing cutané des lymphocytes. Sous l'action des chimiokines TARC/CCL17 et CTACK/CCL27 (cutaneous T cell-attracting chemokine)

sécrétés par les kératinocytes, les lymphocytes T qui expriment leurs récepteurs (CCR4 et CCR10) migrent vers la peau.

Lors d'événements pathologiques, les kératinocytes activés peuvent maintenir et amplifier l'inflammation cutanée via la sécrétion dérégulée de toutes ces molécules. En plus des cytokines et chimiokines, les kératinocytes sécrètent d'autres facteurs tels que des neuropeptides, des écosanoïdes et des espèces réactives oxygénées. Ces médiateurs possèdent de puissantes propriétés inflammatoires et immunomodulatrices et jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'inflammation cutanée, les maladies infectieuses et également le vieillissement.

## **V- Cas particulier d'une cytokine pro-allergique majeure : TSLP**

TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) est une cytokine dont plusieurs fonctions importantes ont été récemment identifiées, aussi bien chez l'homme que chez la souris. Elle est essentiellement produite par les cellules épithéliales, stromales et par un seul type de cellule hématopoïétique, les mastocytes. TSLP joue un rôle clé dans des processus physiologiques comme l'homéostasie lymphocytaire ou pathologique comme les réactions allergiques.

Initialement clonée chez la souris à la fin des années 1990 à partir d'une lignée stromale thymique (Z210R.1) dont le surnageant stimulait la lymphopoïèse B (312), TSLP est un analogue structural de l'IL7 et appartient à la famille des cytokines hématopoïétiques à chaîne courte (313). La forme humaine de TSLP a été clonée quelques années plus tard, du fait d'une faible similarité de séquence en acides aminés entre les deux orthologues (43%). C'est en fait son analogie structurale avec l'IL7 qui a permis sa découverte par bioinformatique (314, 315).

### **1- Signalisation TSLP/TSLPR**

#### **1-1- TSLP**

TSLP est une cytokine majoritairement produite par les cellules épithéliales des poumons, de la peau et des intestins (315). Chez la souris, il s'agit d'une cytokine à quatre hélices possédant trois sites asparagines potentiels pour l'addition de carbohydrate et sept résidus cystéines (313). La forme humaine de TSLP

possède également une structure à quatre hélices avec deux sites de N-glycosylation et six résidus cystéines. Bien que les formes humaine et murine de TSLP ne partagent que 43% d'identité au niveau de leur séquence en acides aminés, elles exercent des fonctions biologiques similaires (315).

L'ARN messager de TSLP est exprimé par :

- les cellules épithéliales bronchiques,
- les cellules musculaires lisses (viscères, vaisseaux sanguins),
- les fibroblastes pulmonaires (alors qu'elle est absente dans les fibroblastes dermiques),
- les kératinocytes de l'épiderme,
- les corpuscules de Hassal du thymus, composé de cellules kératinisées,
- les mastocytes activés par les immunoglobulines E. (177)

En conditions physiologiques, TSLP est faiblement détectable hormis dans les corpuscules de Hassal où elle semble avoir un rôle dans l'homéostasie lymphocytaire. L'expression de la protéine est restreinte à des conditions pathologiques particulières, souvent associées à un processus allergique. Ainsi TSLP est détectable dans l'épiderme des patients atteints de dermatite atopique, durant les phases aiguë et chronique (177) et son expression transcriptionnelle est augmentée dans les poumons des patients asthmatiques (316). De plus, plusieurs équipes ont pu démontrer la présence de TSLP circulant dans des modèles murins de dermatite atopique et d'hypersensibilité bronchique, suggérant un rôle systémique possible de la cytokine (317, 318).

## **1-2- TSLP-R**

Le récepteur de TSLP est un hétérodimère formé du récepteur alpha de l'IL7 (IL7R ) et d'un récepteur spécifique à TSLP (TSLPR, CRLF2).

Tout comme pour TSLP, le TSLPR ne partage que peu d'identité entre l'homme et la souris (39%). TSLPR est un récepteur aux cytokines de type 1 atypique avec une altération de plusieurs motifs caractéristiques de ces récepteurs. Par exemple, il ne possède pas le second des quatre domaines extracellulaires à résidus cystéines normalement conservés, suggérant que ce récepteur présente un repliement unique. Le récepteur à TSLP comprend une séquence box1 conservée des récepteurs aux

cytokines mais ne possède pas la séquence box2 qui régule la fixation des tyrosines kinase Janus (JAK). Enfin, contrairement aux autres récepteurs aux cytokines, il ne contient qu'un seul résidu tyrosine en dehors de son extrémité carboxy-terminale, qui n'est pas phosphorylé suite à la fixation du ligand. Ces variations suggèrent une signalisation intracellulaire unique à la formation du complexe TSLP/TSLPR (315, 319-322).

Les types cellulaires qui expriment le récepteur à TSLP et qui par conséquent sont directement influencés par TSLP sont variables entre l'homme et la souris. Il s'agit cependant de cellules hématopoïétiques dans les deux cas. Chez l'homme l'expression des deux sous-unités du récepteur est restreinte aux mastocytes (178), aux cellules dendritiques (315) et aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) spécifiques de l'épiderme, qui sont les cellules de Langerhans (180). Ces trois types cellulaires sont communs avec ceux de la souris. En plus de celles-ci, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs murins semblent exprimer chacune des chaînes du récepteur à TSLP (323). En effet, une fois isolés *in vitro*, ils répondent à TSLP en proliférant et en se différenciant en LT CD4<sup>+</sup> Th2 (324). Cependant, les DCs expriment également le CD4 et ont pu ainsi échapper à la sélection lors de la mise en culture des LT. Dès lors, leur contribution dans l'induction des Th2 *in vitro* n'est pas exclue et l'action directe de TSLP sur les LT CD4<sup>+</sup> naïfs reste encore à confirmer.

### 1-3- Signalisation intracellulaire

Bien que TSLP et l'IL7 aient en commun une chaîne de leur récepteur (IL7R ), la voie de signalisation intracellulaire qui découle de la fixation de la cytokine sur son récepteur n'est pas identique.

La combinaison de TSLPR/IL7R est nécessaire à la formation d'un complexe de forte affinité avec le ligand TSLP. Cette interaction récepteur/ligand a pour conséquence l'activation de STAT5 (315, 319, 320) et l'expression de ses gènes cibles (gènes CIS, Cytokine-Induced SH2 proteins) (325). Cependant une analyse plus détaillée a démontré que les récepteurs à TSLP et à l'IL7 utilisaient des mécanismes d'activation de STAT5 différents.

L'engagement de IL7R conduit à l'activation des JAK1 et 3, qui phosphorytent le résidu tyrosine 449 de la sous-unité IL7R induisant la fixation et l'activation de STAT5 (326), alors que le traitement par TSLP d'une lignée murine n'active pas ces

kinases (327). De plus, l'utilisation de dominants négatifs des JAK1 et JAK2 ne bloque pas l'activation de STAT5 induit par TSLP (325). Ces résultats suggèrent que les JAK kinases ne sont pas impliquées dans la signalisation secondaire à la fixation de TSLP sur son récepteur. Il reste donc à identifier les kinases responsables de l'activation de STAT5 en aval du récepteur à TSLP.

## **2- Induction d'une réponse lymphocytaire T pro-allergique**

L'inflammation allergique résulte d'une cascade immunologique complexe qui conduit à la dérégulation de la production de cytokines de type Th2 (IL4, IL5 et IL13), d'immunoglobuline E (IgE), à une hyper-éosinophilie sanguine et à la production de mucus (328-330). Des études ont démontré que les cellules dendritiques (DCs) pouvaient jouer un rôle important dans la polarisation de la réponse T. La capacité des DCs à induire une réponse de type Th1 ou Th2 apparaît être dépendante du type de signaux qu'elles reçoivent (331-333). Contrairement aux déterminants de la polarisation Th2, les mécanismes et signaux favorisant la réponse Th1 sont connus depuis de nombreuses années. Cette réponse est dépendante de la présence de molécules dérivées des micro-organismes, qui après fixation sur les TLRs à la surface des DCs, entraînent la production d'IL12. Cette cytokine est responsable de la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes Th1. Au contraire, l'activation des DCs par TSLP est un mécanisme original de maturation des DCs qui induit une réponse inflammatoire Th2, sans que la cellule présentatrice d'antigène (ici les DCs) n'ait rencontré le moindre agent pathogène exogène.

### **2-1- Mise en place d'un environnement pro-Th2 par les DC et les mastocytes activés par TSLP**

La fixation de TSLP sur son récepteur à la surface des DC humaines induit la surexpression du CMH de classe II et de cofacteurs CD54, CD80, CD83 et de DC-lamp, de façon identique à la fixation d'un ligand sur les TLRs ou CD40 (177). Cependant, contrairement à l'activation des TLRs et de CD40, TSLP n'induit pas la production de cytokines de la famille de l'IL12 ou de l'IFN $\gamma$ , nécessaire à la polarisation Th1. Elle ne stimule pas non plus la production des cytokines pro-inflammatoires TNF, IL1 et IL6 par les DCs (177). De manière intéressante la stimulation par TSLP entraîne la production d'une grande quantité des chimiokines

IL8 et éotaxine 2, attirant les neutrophiles et éosinophiles, mais également des chimiokines TARC and MDC impliquées dans le chimiotactisme des lymphocytes Th2 (315, 334).

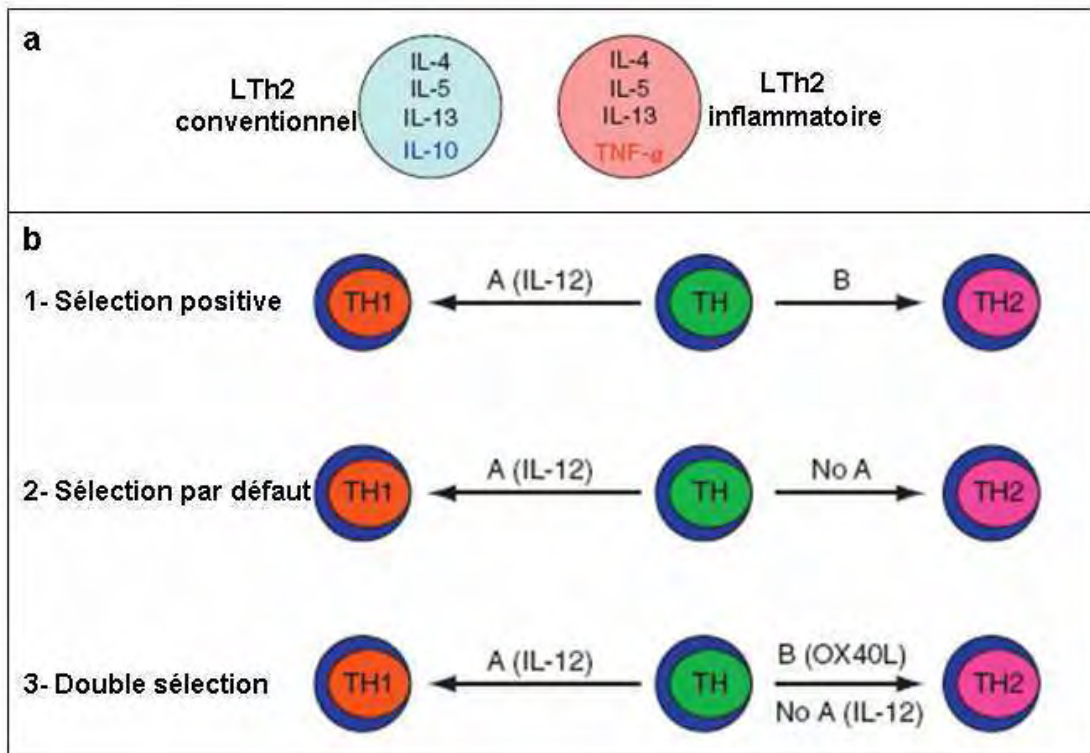
Le fait que TSLP n'induit pas la production de cytokine pro-Th1 par les DCs semble être un mécanisme clé qui permet à ces CPA de créer un microenvironnement pro-Th2. Ainsi, la voie de signalisation intracellulaire induite par TSLP pourrait être indépendante de NF- $\kappa$ B et MyD88, normalement requis pour une réponse Th1. Cette hypothèse est soutenue par l'activation en aval du récepteur à TSLP de STAT5 qui lui n'est pas activé par l'engagement des TLRs ou du CD40 (315, 325).

En plus des DCs, TSLP est capable d'activer les mastocytes en présence d'IL1 et de TNF. Cette activation résulte en la sécrétion par les mastocytes de cytokines pro-Th2 (IL5 et IL13) mais également de chimiokines (IL6 et IL8) (178).

Ces travaux suggèrent que la sécrétion de TSLP par les cellules épithéliales pourrait induire une réponse inflammatoire allergique grâce à la sécrétion de cytokines Th2, de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires par les cellules du système immunitaire innée.

## **2-2- Différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 sous l'action de TSLP**

Lorsque que des DCs activées par TSLP sont utilisées pour stimuler des LT CD4<sup>+</sup> naïfs *in vitro*, elles induisent un type unique de LTh2. Ces LTh2 produisent les cytokines Th2 classiques (IL4, IL5 et IL13) mais également une grande quantité de TNF alors qu'elles ne produisent plus d'IL10. L'IL10 initialement classifiée comme une cytokine Th2, est un immunomodulateur qui régule de façon négative la réponse Th2 au même titre que l'IFN (335). L'IL10 apparaît diminuée dans le liquide broncho-alvéolaire des patients atopiques par rapport à des sujets normaux (336). Elle semble prévenir l'hypersensibilité respiratoire après une exposition aux allergènes (337, 338). Le TNF n'est quant à lui pas considéré comme une cytokine Th2 classique. Cependant, il est présent en grande quantité dans les voies respiratoires de patients asthmatiques. De plus, les polymorphismes conduisant à une augmentation de la sécrétion de cette cytokine sont associés à un risque accru de développement de l'asthme (339), appuyant son rôle potentiel dans l'asthme et l'inflammation allergique.



**Figure 25- Différenciation des lymphocytes Th2 induite par TSLP.**

(a) Les cellules dendritiques activées par TSLP induisent la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocyte Th2 (LTh2) atypique. Ces cellules qualifiées de LTh2 inflammatoire, en opposition aux LTh2 conventionnels, produisent du TNF mais plus d'IL10. (b) Modèle de régulation de la différenciation en LTh1 et Th2.

1- Modèle de sélection positive : la différenciation en Th1 ou Th2 nécessite un message spécifique tel que l'IL12, polarisant les Th1 (A) ou les Th2 (B). 2- Modèle de sélection par défaut : en absence d'IL12 (No A) la différenciation en Th2 est favorisée.

3- Modèle unifié : la polarisation en Th1 ou Th2 nécessite un signal pro-Th1 (A) ou pro-Th2 (B). Cependant, le signal pro-Th1 est dominant sur le pro-Th2. La polarisation Th2 n'est donc possible qu'en présence du signal B (OX40L) et uniquement en absence de signal pro-Th1 (No A).

(Modifiés d'après Liu (2009) *Adv Immunol*)



Ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> présentant un profil cytokinique unique, de part leur expression de TNF et leur incapacité à sécréter l'IL10, sont qualifiées de cellules Th2 inflammatoires en opposition aux cellules Th2 conventionnelles (Figure 25). Il semble évident que les cellules impliquées dans les maladies allergiques soient plutôt des cellules Th2 inflammatoires plutôt que des conventionnelles.

Afin d'identifier le mécanisme moléculaire par lequel les DCs activées par TSLP sont capables d'induire l'expansion de cellules inflammatoires Th2, l'équipe de Liu a entrepris une analyse d'expression génique sur des DCs humaines immatures activées par TSLP ou par du Poly I:C ou par le CD40L qui activent la sécrétion d'IL12 par les DCs, favorisant une réponse Th1. De leur analyse est apparue que seul TSLP induisait l'expression, à la surface des DCs, de OX40L. Cette protéine de la superfamille du TNF est capable d'induire la maturation des lymphocytes en Th2 qui se mettent alors à produire les cytokines Th2 classiques et du TNF, mais plus d'IL10 (334). La signalisation via OX40/OX40L a également été montrée par une autre équipe comme induisant directement l'engagement des LTh0 dans le lignage Th2, en induisant NFATc1 qui déclenche la production d'IL4 suivi de l'expression du facteur de transcription pro-Th2, GATA3 (340). De plus, le blockage de OX40L *in vivo* (l'aide d'anticorps bloquants) inhibe l'asthme induit par TSLP dans un modèle murin (341). L'ensemble de ces résultats prouvent que la différenciation en lymphocyte inflammatoire Th2 est induite par la fixation de OX40L à son récepteur. Cependant, il apparaît que ce mécanisme est dépendant de l'absence d'IL12, puisque l'ajout de cette cytokine dans le milieu de culture abolit cette différenciation originale. Tout ceci permet de proposer un modèle de régulation de la différenciation en Th2. Historiquement deux modèles étaient proposés pour expliquer l'initiation du développement des Th2 (342-345) : une sélection positive par la présence d'un signal pro-Th2 ou une sélection par défaut d'IL12 (qui induit une différenciation Th1). Les travaux plus récents sur TSLP et OX40L suggèrent un troisième modèle qui n'exclut pas les deux premiers. Au contraire, l'ensemble des travaux suggèrent qu'il faut à la fois une sélection positive, qui correspond ici à OX40L et une sélection par défaut, c'est-à-dire l'absence d'IL12 (323, 346) (Figure 25).

En plus de ce mode d'action indirecte, TSLP semble être directement impliquée dans le développement et l'homéostasie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (324, 347). Dans un modèle *in vitro* d'activation des LT, TSLP peut directement polariser la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Th2, sans apport d'IL4 exogène. L'ajout d'anticorps bloquant

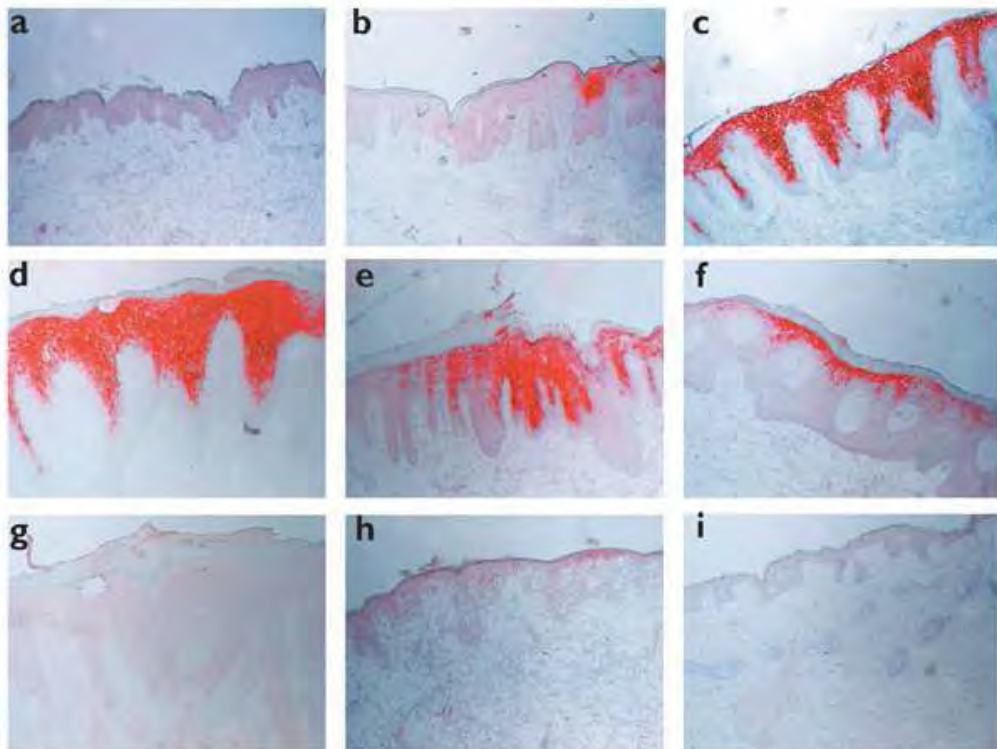
contre l'IL4 inhibe cette activation suggérant que TSLP induit la transcription de cette cytokine qui participe ensuite à la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> de type Th2. L'IL4 semble donc être un facteur essentiel qui agit séquentiellement avec TSLP. Elle pourrait ainsi promouvoir et maintenir une forte réponse Th2 (334).

Il apparaît qu'il existe deux mécanismes par lesquels TSLP pourrait induire la différenciation en Th2. L'un impliquerait l'activation des DCs et le second impliquerait la fixation directe de TSLP sur son récepteur à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs. Ce second mécanisme, qui pourrait ainsi distinguer l'homme de la souris, reste à confirmer étant donné le manque d'informations sur la présence des deux sous-unités du récepteur à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs.

### **2-3- TSLP dans la dermatite atopique et l'asthme allergique**

Comme décrit précédemment, TSLP est exprimée par les kératinocytes de l'épiderme, les cellules épithéliales, les fibroblastes bronchiques ou encore les cellules musculaires lisses. De manière intéressante, il s'avère que les seules cellules hématopoïétiques exprimant TSLP soient les mastocytes activés par la fixation d'IgE à leur surface (177). Cette activation est une étape clé de l'allergie puisqu'il entraîne la libération d'histamine. De plus, les mastocytes exprimant le récepteur à TSLP de façon constitutive, ils sont capables de s'auto-activer, induisant ainsi la production de cytokines Th2. Ceci suggérant un rôle potentiel dans l'amplification de la réponse inflammatoire de type allergique.

L'analyse immunohistochimique sur coupe de peau de patients atteints de dermatite atopique a révélé que TSLP était fortement exprimé par les kératinocytes les plus différenciés de la peau lésée et ce durant la phase aiguë et chronique de la maladie. En revanche, TSLP n'est pas détectable dans une peau saine ni dans une peau non lésée de patient DA. De plus TSLP est absente dans les pathologies cutanées avec une exacerbation de la réponse Th1 telles que la dermatite de contact induite par le nickel et le lupus érythémateux (177). Cette constatation renforce le lien entre TSLP et l'allergie *in vivo* (Figure 26). L'expression de TSLP dans la peau des patients atteints de dermatite atopique est associée à la diminution du nombre de cellules Langerine<sup>+</sup> dans l'épiderme et à l'augmentation du nombre de DC-lamp<sup>+</sup> dans le derme. Cette observation suggère l'activation et la migration des CPA spécialisées de l'épiderme, les cellules de Langerhans.



**Figure 26- Expression de TSLP dans la peau.**

TSLP n'est pas exprimée par les kératinocytes en zone non lésionnelle d'un patient atteint de dermatite atopique (a). En revanche, elle est fortement exprimée par les kératinocytes des couches supérieures de l'épiderme, de manière focale ou sur toute la zone, au niveau des lésions aiguës (b, c) et chroniques (d-f) de dermatite atopique. TSLP n'est pas détectée dans d'autres pathologies inflammatoires telles que la dermatite de contact induite au nickel (h) et le lupus erythematosus (i). (g) Isotype contrôle.

TSLP : coloration en rouge (phosphatase alcaline).

(D'après Soumelis (2002) *Nat Immunol*)

Ainsi, TSLP pourrait activer *in situ* leur migration vers les ganglions lymphatiques drainants, dans lesquels elles pourront induire la différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes inflammatoires Th2 (177).

Une étude plus récente a montré par hybridation *in situ* que l'expression de TSLP était augmentée dans les voies respiratoires de patients asthmatiques. Cette surexpression corrèle avec l'expression de chimiokines attirant les Th2 (TARC et MDC) et la sévérité de la maladie (316). Ces travaux fournissent le premier lien entre TSLP et l'asthme chez l'homme.

### **3- Rôle de TSLP *in vivo* : Modèles murins d'asthme allergique et de dermatite atopique**

L'analyse de modèles murins a également permis de mettre en évidence un rôle de cette cytokine dans le développement des lymphocytes Th2 et de pathologie de type allergique chez la souris. Il semble que TSLP soit nécessaire et suffisante pour induire une réponse de type allergique en présence ou non du système immunitaire adaptatif. Ces modèles permettent de préciser *in vivo* le rôle clé de cette cytokine, retrouvée surexprimée dans les pathologies allergiques humaine.

#### **3-1- TSLP est nécessaire au développement de la réaction inflammatoire de type allergique**

L'induction de l'asthme allergique par l'inhalation d'un allergène (ovalbumine) a été réalisée par deux équipes sur des souris déficientes pour la sous unité TSLPR. Ces animaux ne développent pas d'inflammation des voies respiratoires, contrairement aux souris sauvages. De plus, l'analyse des LT CD4<sup>+</sup> de leur rate révèle que la capacité de ces lymphocytes à produire de l'IL4 est dramatiquement diminuée (348, 349).

De la même manière, le ligand TSLP apparaît nécessaire au développement du phénotype de dermatite atopique chez la souris. La délétion de *Tslp* de façon constitutive ou tissu-spécifique (compartiment épidermique), rendent les souris résistantes à l'inflammation de type dermatite atopique induite par l'application de MC903 (analogue de la vitamine D3). Après ce traitement, les souris sauvages développent quant à elles des lésions cutanées sévères, infiltrées par un grand nombre de cellules immunitaires (LT CD4<sup>+</sup>, éosinophiles et mastocytes). Cet infiltrat

coïncide avec l'augmentation *in situ* de la production de cytokines telles que l'IL4, l'IL13 et l'IL31 (350).

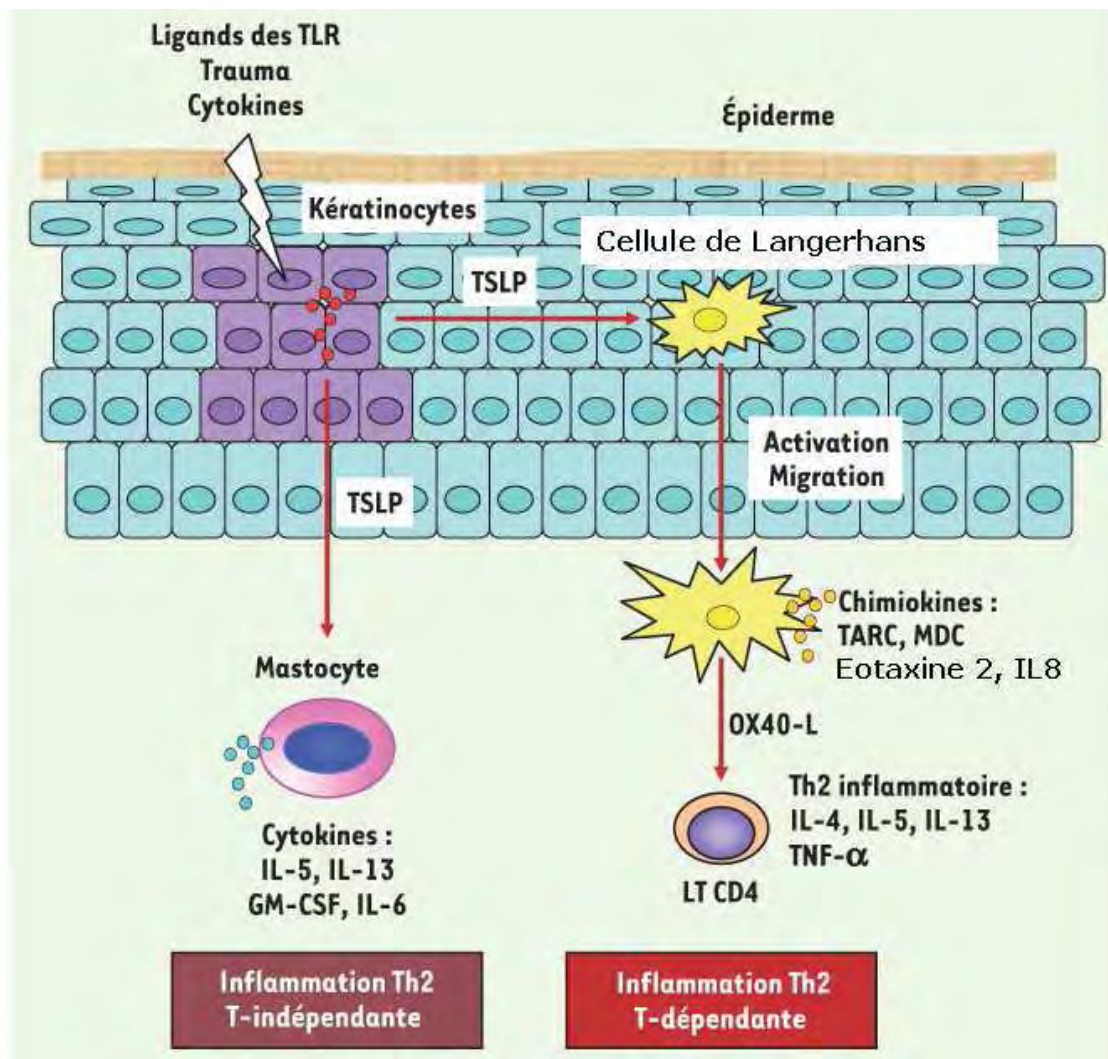
L'ensemble de ces travaux révèle que la signalisation induite par la fixation de TSLP sur son récepteur est indispensable au développement du phénotype allergique chez la souris.

### **3-2- TSLP est suffisant pour induire une réponse de type allergique**

La surexpression de TSLP de façon tissu-spécifique (peau ou poumons) induit des réponses allergiques de type dermatite atopique et asthme allergique (197, 349, 351, 352).

Dans le modèle de souris transgéniques pour *Tslp*, spécifique de l'épiderme (*Tslp* sous le contrôle du promoteur de la Kératine 5), les auteurs ont démontré que ces animaux développaient rapidement des lésions eczématiformes de type dermatite atopique. L'épiderme de ces souris est épaissi, spongieux et hyperkératosique. L'expression de cytokines pro-allergiques (IL4, IL5 et TNF ) et de chimiokines (CCL17/TARC) au niveau de la peau lésée est augmentée. Leur derme contient un infiltrat inflammatoire massif composé d'éosinophiles, de mastocytes, de macrophages et de lymphocytes. Au niveau systémique les lymphocytes Th2 sont plus nombreux et les souris présentent un taux d'IgE sérique élevé (197).

Il est important de noter que le croisement de ces animaux K5-TSLP avec des souris déficientes pour le récepteur TCR , ne possédant donc pas de LT fonctionnels, n'abolit pas la réponse inflammatoire cutanée. Bien qu'il n'y ait pas de lymphocytes Th2 circulant ni de production massive d'IgE chez ces animaux, la peau reste inflammée et infiltrée par des mastocytes et des éosinophiles (197). Ainsi TSLP est capable à elle seule de déclencher une inflammation cutanée de type allergique et ce indépendamment du système immunitaire adaptatif. Ceci peut s'expliquer par la présence de son récepteur à la surface des mastocytes (178), qui sont des cellules importantes dans le processus inflammatoires et allergiques (353, 354). L'ensemble des travaux effectués sur l'homme et la souris, permettent de proposer un mode d'action de TSLP dans l'initiation de l'inflammation cutanée de type allergique. TSLP peut induire le développement de lésions eczématiformes de manière T-indépendante et T-dépendante.



**Figure 27- Rôle de TSLP dans l'initiation de l'allergie cutanée.**

Sous l'influence de facteurs environnementaux ou de cytokines, TSLP est produite par les kératinocytes de l'épiderme. Elle peut alors activer les cellules de Langerhans, qui vont mûrir et migrer vers les ganglions lymphatiques drainant, où elles induiront la différenciation des cellules Th0 en Th2 par l'intermédiaire de OX40L exprimé à leur surface. Les cellules de Langerhans ainsi activées par TSLP participent à la mise en place de la réponse inflammatoire innée via la sécrétion de chimiokines. Cependant, TSLP peut également directement activer les mastocytes qui secrètent alors des molécules créant un microenvironnement pro-inflammatoire et pro-Th2.

(Modifié d'après Soumelis (2007) *Med Science*)

Dans le premier cas TSLP induit la sécrétion de molécules pro-inflammatoires et pro-Th2 par les mastocytes (T-indépendant). Dans le second cas, les cellules de Langerhans activées par TSLP sécrètent des chimiokines pro-allergiques et vont induire la différenciation de LTh0 en LTh2 au niveau des organes lymphoïdes secondaires (T-dépendant) (Figure 27).

Le rôle de TSLP dans l'initiation de l'asthme allergique a également été démontré *in vivo* par plusieurs équipes. *Zhou et al.* ont démontré que la surexpression spécifique de Ts dans les poumons (sous le contrôle du promoteur de la protéine de surfactant C (SPC) humaine), induisait une inflammation allergique des voies respiratoires. Cet asthme est caractérisé par une infiltration massive de leucocytes, incluant des lymphocytes Th2, une hyperplasie des cellules sécrétrices de mucus, une fibrose subépithéliale et également une élévation du taux sérique d'IgE (349).

Des travaux plus récents, ont également mis en évidence le rôle de TSLP produit par les kératinocytes dans l'aggravation de l'hypersensibilité bronchique (317, 318). Après induction de TSLP par application topique de MC903, les souris développent non seulement des lésions cutanées de type dermatite atopique mais également une aggravation de l'asthme allergique induit par la sensibilisation aérienne avec de l'ovalbumine. Ce phénomène est aboli lorsque l'expérience est réalisée sur des souris dont l'épiderme est déficient pour TSLP (318). Ces données procurent un premier lien entre la survenue de l'asthme allergique secondaire au développement des lésions cutanées eczématiformes. Ce processus pathologique, connu sous le nom de « marche atopique », est fréquemment observé chez les patients atteints de dermatite atopique.

## **4- Autres fonctions de TSLP**

### **4-1- TSLP et développement lymphocytaire chez la souris**

La forme murine de TSLP a été identifiée et clonée suite à la découverte de son activité biologique favorisant la croissance des progéniteurs B et T, dans une lignée de cellules épithéliales thymiques (312, 313, 327, 355). Cependant, les souris déficientes pour la sous unité TSLPR présentent un développement normal de leurs lymphocytes B et T (347). Ainsi, TSLP était considérée comme une cytokine de la famille de l'IL7 de faible intérêt. Cependant, il a été démontré que les cellules cibles de TSLP et de l'IL7 étaient différentes. Dans la moelle osseuse, l'IL7 agit

principalement sur les progéniteurs lymphoïdes précoces et les progéniteurs pré-pro-B, alors que TSLP agirait sur les progéniteurs B à un stade plus tardif. Ceci est soutenu par le fait que les cellules pro-B du foie foetal et non les pro-B dérivés de la moelle osseuse répondent à TSLP (356, 357).

#### **4-2- TSLP et homéostasie de T CD4<sup>+</sup> périphériques**

Il est aujourd'hui fortement suggéré que les cellules dendritiques jouent un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T en condition physiologiques. *Watanabe et al.* ont mis en évidence l'expression de TSLP par les cellules épithéliales des amygdales associée avec la présence de DC activées (DC-Lamp<sup>+</sup>) et ce en condition physiologique. Les DC activées par TSLP ont la capacité d'induire l'expansion massive des LT CD4<sup>+</sup> naïfs. Ceci suggère que chez l'homme, TSLP exprimée par les cellules épithéliales des tissus lymphoïdes périphériques associés aux muqueuses pourrait jouer un rôle dans la prolifération homéostatique des cellules T naïves et mémoires via l'induction des DCs. En effet, seules les DCs activées par TSLP peuvent induire et soutenir l'expansion des T CD4<sup>+</sup> naïfs en absence d'antigènes exogènes ou de cytokines (358).

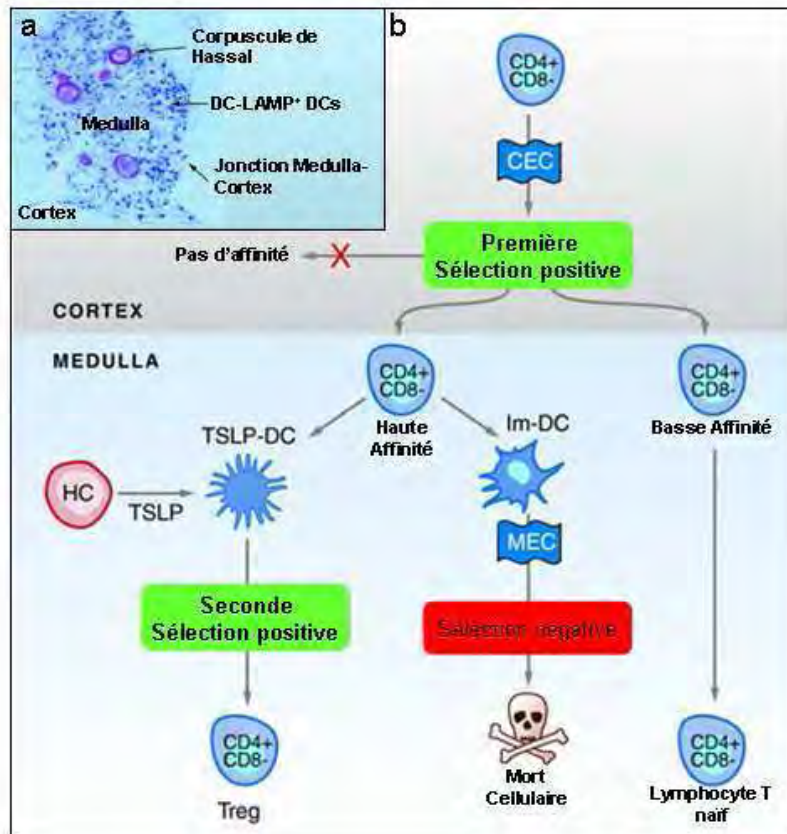
Il semblerait que la production de TSLP à un faible niveau basal par les épithéliums des muqueuses est important pour conditionner les DCs associées dans un phénotype non inflammatoire, non Th1 et maintenir l'homéostasie de ces tissus. En effet, chez les patients atteints de la maladie inflammatoire de Crohn (maladie Th1), le niveau basal d'expression de TSLP par les cellules épithéliales de l'intestin est diminué voire indétectable par rapport aux individus sains (359).

De plus, des expériences menées sur des souris déficientes pour le TSLPR rapportent également un rôle pour TSLP dans le maintien de l'homéostasie de T CD4<sup>+</sup> circulant *in vivo* (347).

#### **4-3- TSLP et développement des Treg dans le thymus**

TSLP est exprimée par les Corpuscules de Hassal du thymus (177). Le thymus n'est pas un organe lymphoïde périphérique exposé aux infections microbiennes ou aux réponses immunitaires. Il est donc légitime de penser que TSLP ou les cellules dendritiques activées par TSLP pourraient avoir une fonction physiologique dans le thymus. De plus, les DCs activées par TSLP induisent





**Figure 28- TSLP et développement des lymphocytes T régulateurs.**

(a) TSLP est exprimé dans les corpuscules de Hassal du thymus humain (rose), à proximité des cellules dendritiques (DC) activées DC-Lamp<sup>+</sup> (bleues). (b) Modèle proposé du rôle de TSLP dans le développement des lymphocytes T régulateurs (Treg). Après une première sélection positive par les cellules épithéliales du cortex (CEC), les thymocytes migrent dans la medulla. Les cellules autoréactives de faible affinité échappent à la sélection négative migrent vers la périphérie en tant que lymphocyte T naïfs CD4<sup>+</sup>. La majorité des thymocytes autoréactifs de haute affinité subissent une sélection négative en liant l'antigène présenté par les cellules épithéliales médullaires (MEC) ou les DCs immatures et meurent. Un faible nombre de thymocytes autoréactifs de haute affinité subit une seconde sélection positive en liant les antigènes présentés par les DCs thymiques activées par TSLP et vont devenir des lymphocytes T régulateurs.

(Modifiés d'après Liu (2007) *Annu Rev Immunol*)

l'expansion des thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> parmi lesquels 50% se différencieront en Treg FoxP3<sup>+</sup>. Dans le thymus, les Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> sont exclusivement localisés dans la medulla proche des DCs activées (DC-LAMP<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>) et des corpuscules de Hassal. Ceci suggère que ces Treg pourraient être générés dans cette zone du thymus. Ces DCs pourraient être activées par TSLP sécrétée par les cellules épithéliales des corpuscules de Hassals (360) (Figure 28).

Différentes études chez la souris ont montré que TSLP induisait la différenciation et l'expansion des Treg Foxp3<sup>+</sup> dans le thymus et en périphérie (361-364). Cependant les souris déficientes pour le TSLPR ne présentent pas de développement anormal des Treg. Ainsi le rôle précis de TSLP dans le développement des Treg reste à démontrer.

## **5- Régulation de l'expression de TSLP**

Des travaux effectués chez l'homme et chez la souris suggèrent que la production de TSLP par les cellules épithéliales représente un événement précoce déclencheur de l'inflammation allergique. Les fibroblastes bronchiques, les cellules musculaires lisses, les basophiles et les mastocytes semblent également impliqués grâce à leur capacité à produire TSLP (177). Cependant, l'induction de l'expression de TSLP par les cellules épithéliales et les autres types cellulaires reste mal connue.

### **5-1- RXR, Vitamine D et TSLP**

Plusieurs études ont démontré un lien entre les récepteurs nucléaires RXR, la vitamine D et la régulation de l'expression de TSLP. La délétion des RXR alpha et beta chez la souris conduit à la surexpression de TSLP par les kératinocytes de l'épiderme et entraîne une alopecie progressive associée à une inflammation cutanée de type dermatite atopique (351, 352).

De la même façon, l'application locale de vitamine D3 ou de son analogue (MC903), levant la fonction inhibitrice des RXR complexé aux VDR (Récepteur à la vitamine D), induit le même phénotype de dermatite atopique associé à une production accrue de TSLP par les kératinocytes chez la souris. La délétion du récepteur à la vitamine D3 abolit cet effet. Ces deux modèles murins d'induction de TSLP présentent une

hyperplasie épidermique associée à un infiltrat dermique composés d'éosinophiles, de granulocytes, de mastocytes et de lymphocytes essentiellement CD4<sup>+</sup> (351, 352). Ces résultats démontrent qu'en condition basale, les complexes RXR/RAR ou RXR/VDR, sont des répresseurs transcriptionnels de TSLP dans les kératinocytes.

### **5-2- NF- B et TSLP**

Grace à des expériences de gène rapporteur, le groupe de Ziegler a pu identifier et positionner un site NF- B sur le promoteur de *TSLP*. Ils ont également démontré une régulation positive par les cytokines pro-inflammatoires IL1 et TNF en amont de la voie NF- B (365).

Le rôle de NF- B dans la production de TSLP a été également démontré *in vivo*. En effet, des souris avec une délétion spécifique de IKK- (kinase activatrice de la voie NF- B) dans les cellules épithéliales de l'intestin, présentent un niveau d'expression de TSLP inférieure en condition normale et après infection par des parasites (366). Ceci suggère un rôle de la voie NF- B dans la régulation de l'expression de la cytokine aussi bien en condition physiologique que pathologique.

### **5-3- Autres voies de stimulation**

Un certain nombre de stimuli ont été démontrés pour induire l'expression de TSLP. Ainsi, la production de TSLP par les cellules épithéliales peut être induite par des cytokines Th2 telles que l'IL4 et l'IL13 (179, 367), entretenant ainsi l'inflammation allergique. De même, son expression est induite par la fixation de Poly I:C sur le TLR3 (à la surface des cellules épithéliales bronchiques humaines) (367) et même par les blessures cutanées (178).

Ainsi une variété de stimuli est décrite pour induire la production de TSLP. Cependant, le lien entre l'exposition aux allergènes et l'induction de TSLP reste inconnu. Il reste à identifier un récepteur de l'immunité innée qui pourrait potentiellement être un senseur de la pénétration d'allergènes et le lien avec la signalisation des RXR et NF- B. Son identification pourrait participer à la découverte du/des chaîn(s) manquant(s) conduisant à l'expression de TSLP dans le cas particulier de l'inflammation de type allergique.



## Objectifs de la thèse

Afin d'identifier les mécanismes physiopathologique du syndrome de Netherton (SN), notre équipe a développé un modèle murin déficient pour le gène *Spink5*. En absence de LEKTI, les protéases épidermiques (kallikréines 5 et 7) sont hyperactives et clivent de façon prématurée les structures inter-cornéocytaires conduisant au détachement en bloc de la couche cornée. Il en résulte un défaut sévère de la fonction de barrière cutanée entraînant la mort rapide des nouveaux nés par déshydratation. Afin d'étudier les effets prolongés de l'absence de LEKTI dans la peau, nous avons développé un modèle de greffe de peau sur souris nude. Les greffons *Spink5*<sup>-/-</sup> reproduisent le phénotype ichtyosiforme des patients SN et présentent un infiltrat inflammatoire dermique important. Ces observations suggèrent un rôle intrinsèque de l'épiderme déficient en LEKTI dans le déclenchement de signaux pro-inflammatoires. Cette cascade dérégulée en l'absence de LEKTI pourrait expliquer le phénotype des souris et le développement de lésions eczématiformes chez les patients SN.

### **Objectif 1 : Identification d'un mécanisme moléculaire responsable de l'inflammation cutanée de type allergique en absence de LEKTI**

Le premier objectif de ma thèse a été de caractériser les greffes de peau *Spink5*<sup>-/-</sup> (KO). Après 8 semaines, les greffons KO reproduisent la majorité des anomalies histologiques et ultrastructurales de la peau des patients atteints du syndrome de Netherton. De plus, ces animaux présentent un infiltrat inflammatoire composé de cellules polynucléaires éosinophiles et de mastocytes caractéristique des inflammations de type allergique. Ainsi, dans un premier temps, je me suis attachée à identifier les acteurs et les mécanismes moléculaires pouvant rendre compte de cette inflammation. Ce travail nous a permis d'identifier une nouvelle cascade de signalisation responsable de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires et pro-Th2 (TSLP) par les kératinocytes déficients en LEKTI (humains et murins). Cette voie met en jeu la kallikréine 5 (KLK5) hyperactive en l'absence de LEKTI et qui clive alors le récepteur PAR2 (Proteinase Activated Receptor 2) à la surface des kératinocytes conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. (Article 1)

## **Objectif 2 : Rôle de PAR2 dans le développement de l'inflammation secondaire à l'absence de LEKTI**

Cette voie de signalisation que j'ai identifiée implique le récepteur PAR2 connu pour son rôle dans l'inflammation cutanée. Nous avons pu démontrer *in vitro* qu'il était important pour l'induction de signaux pro-inflammatoires et pro-allergiques par les kératinocytes. Le deuxième objectif de ma thèse a donc été de déterminer l'importance *in vivo* de cette signalisation dans le développement des lésions inflammatoires. Pour cela nous avons croisé nos souris *Spink5*<sup>-/-</sup> avec des animaux *Par2*<sup>-/-</sup> afin d'obtenir des animaux double knockout (DKO). L'étude du phénotype de ces animaux DKO à l'état embryonnaire et adulte (greffes), nous a permis de démontrer le rôle majeur de PAR2 dans l'initiation de signaux pro-allergiques précoces. Cependant, l'absence de ce récepteur ne permet pas d'inhiber complètement l'inflammation à l'état adulte, reflétant ainsi l'importance du défaut de barrière cutané dans la progression des désordres immunologiques. (Article 2)

## **Objectif 3 : Etude de la réponse immunitaire chez les patients atteints du syndrome de Netherton**

Généralement le défaut de barrière épidermique est pointé du doigt comme étant un facteur favorisant la pénétration de pathogènes et d'allergènes conduisant à une inflammation cutanée. Cependant le syndrome de Netherton est une des rares ichtyoses présentant constamment des manifestations atopiques incluant de la dermatite atopique, de l'asthme allergique, des allergies alimentaires et un taux d'immunoglobuline E sérique élevé. Ces observations cliniques associées à l'expression de LEKTI par les corpuscules de Hassal du thymus et aux polymorphismes de *SPINK5* comme facteur prédisposant à la dermatite atopique et à l'asthme sont en faveur d'un rôle plus direct de LEKTI dans la régulation de la réponse immunitaire. Le troisième objectif de ma thèse porte la caractérisation de la réponse immunitaire chez une cohorte de patients atteints du SN. Cette étude inclue l'analyse de la polarisation des lymphocytes T, le profil d'expression des cytokines et la caractérisation de l'inflammation cutanée de cette maladie.

# RESULTATS





## **Partie 1 : Identification d'un mécanisme moléculaire responsable de l'inflammation cutanée de type allergique en absence de LEKTI**

### **Article 1 : *Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome.***

Cet article porte sur l'identification d'un mécanisme moléculaire original, responsable de la mise en place d'un microenvironnement pro-allergique dans la peau déficiente en LEKTI. Nous avons démontré qu'en absence de LEKTI, les kératinocytes épidermiques murins et humains surexpriment la cytokine pro-Th2 TSLP et les chimiokines TARC et MDC. Cet événement est secondaire à l'hyperactivité de la kallikréine 5 (KLK5) capable d'induire directement la signalisation en aval du récepteur PAR2 et d'activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Cette nouvelle voie de signalisation est directement responsable de la surexpression de TSLP mais aussi de molécules pro-inflammatoires (ICAM1, TNF et IL8) par les kératinocytes. A l'aide de kératinocytes primaires humains, nous avons démontré *in vitro* que l'activation de cette voie est indépendante du défaut de barrière cutanée causé par l'absence de LEKTI. En effet, TSLP, ICAM1, TNF et IL8 sont surexprimés en condition basale dans les kératinocytes de patients atteints du syndrome de Netherton (SN), sans aucun stimulus exogène. Ce mécanisme intrinsèque aux kératinocytes déficients en LEKTI est déjà mis en place dans l'épiderme des embryons de souris *Spink5*<sup>-/-</sup> au jour 19,5 du développement embryonnaire. Cette signalisation est responsable du développement d'un phénotype inflammatoire dans des greffes de peau *Spink5*<sup>-/-</sup>. Après 8 semaines, les greffes réalisées sur des souris immunodéficientes (nude), présentent un infiltrat inflammatoire composé d'un grand nombre de polynucléaires éosinophiles et de mastocytes activées, caractéristiques d'une inflammation de type allergique. Ainsi ces résultats démontrent qu'en plus de son rôle dans l'altération de la barrière cutanée, l'hyperactivité de la KLK5 dans la peau des patients SN peut induire des lésions de type dermatite atopique, indépendamment de l'environnement et du système immunitaire adaptatif. Ces travaux illustrent l'importance du contrôle de

l'activité protéasique aussi bien dans le maintien de la fonction de barrière cutanée que dans la régulation de l'inflammation.

# Kallikrein 5 induces atopic dermatitis–like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome

Anaïs Briot,<sup>1,2</sup> Céline Deraison,<sup>1,2,3</sup> Matthieu Lacroix,<sup>1,2</sup> Chrystelle Bonnard,<sup>1,2</sup> Aurélie Robin,<sup>1,2</sup> Céline Besson,<sup>1,2</sup> Pierre Dubus,<sup>4</sup> and Alain Hovnanian<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U563, Toulouse F-31300, France

<sup>2</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse F-31400, France

<sup>3</sup>Département de Génétique Médicale, Hôpital Purpan, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse F31000, France

<sup>4</sup>EA2406 Université Bordeaux 2 Victor Segalen, Bordeaux F-33076, France

Netherton syndrome (NS) is a severe genetic skin disease with constant atopic manifestations that is caused by mutations in the *serine protease inhibitor Kazal-type 5 (SPINK5)* gene, which encodes the protease inhibitor lymphoepithelial Kazal-type-related inhibitor (LEKTI). Lack of LEKTI causes stratum corneum detachment secondary to epidermal proteases hyperactivity. This skin barrier defect favors allergen absorption and is generally regarded as the underlying cause for atopy in NS. We show for the first time that the pro-Th2 cytokine thymic stromal lymphopoietin (TSLP), the thymus and activation-regulated chemokine, and the macrophage-derived chemokine are overexpressed in LEKTI-deficient epidermis. This is part of an original biological cascade in which unregulated kallikrein (KLK) 5 directly activates proteinase-activated receptor 2 and induces nuclear factor  $\kappa$ B-mediated overexpression of TSLP, intercellular adhesion molecule 1, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and IL8. This proinflammatory and proallergic pathway is independent of the primary epithelial failure and is activated under basal conditions in NS keratinocytes. This cell-autonomous process is already established in the epidermis of *Spink5*<sup>-/-</sup> embryos, and the resulting proinflammatory microenvironment leads to eosinophilic and mast cell infiltration in a skin graft model in nude mice. Collectively, these data establish that uncontrolled KLK5 activity in NS epidermis can trigger atopic dermatitis (AD)–like lesions, independently of the environment and the adaptive immune system. They illustrate the crucial role of protease signaling in skin inflammation and point to new therapeutic targets for NS as well as candidate genes for AD and atopy.

## CORRESPONDENCE

Alain Hovnanian:

alain.hovnanian@inserm.fr

Abbreviations used: AD, atopic dermatitis; GR, granular layer; HRP, horseradish peroxidase; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; KLK, kallikrein; LC, Langerhans cell; LEKTI, lymphoepithelial Kazal-type-related inhibitor; *Mdc*, macrophage-derived chemokine; NHK, normal human primary keratinocytes; NS, Netherton syndrome; PAR2, proteinase-activated receptor 2; SC, stratum corneum; *SPINK5*, *serine protease inhibitor Kazal-type 5*; *Tarc*, thymus and activation-regulated chemokine; TSLP, thymic stromal lymphopoietin.

The epidermis is a stratified epithelium providing a first line of defense against the harsh external environment. The skin also maintains the body's integrity by sequestering the internal milieu and impeding transcutaneous water loss through the formation of an impermeability barrier. This protective barrier is conferred by the outermost layer of the epidermis, the stratum corneum (SC), which results from a finely regulated terminal cell differentiation process from the basal layer of the epidermis to the granular layers (GRs), through the spinous compartment. The SC consists of dead and keratin-filled cells, corneocytes, which

are attached to each other by corneodesmosomes and embedded in a lipid matrix (1–3). Proteolytic degradation of corneodesmosomes by epidermal proteases leads to the shedding of the most superficial corneocytes (4). This desquamation process allows the regulation of the skin thickness. Alterations in these processes, as well as mutations in genes encoding proteins involved in terminal differentiation, can lead to abnormal stratification and keratinization, as seen in ichthyoses (5).

© 2009 Briot et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jem.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

A. Briot and C. Deraison contributed equally to this paper.

In this respect, the filament-aggregating protein FILAGGRIN is a key protein that plays an important role in the formation of the barrier function. Recent genetic studies have shown that loss-of-function mutations in the gene encoding FILAGGRIN underlie ichthyosis vulgaris (6), a very common genetic disorder of keratinization. The same *FILAGGRIN* mutations have also been identified as a major risk factor for atopic dermatitis (AD) and are strongly associated with asthma in AD patients (7, 8). These results linked for the first time a primary skin disease to systemic allergic manifestations, through defective skin barrier function.

AD is a chronic inflammatory skin disease characterized by eczema, pruritus, and cutaneous hyperreactivity to environmental factors that are innocuous to normal nonatopic individuals (9). AD has a complex etiology that results from interactions between environment and several susceptibility genes involved in skin barrier function and systemic and local immunological responses (10, 11). AD is often the initial step in the so-called “atopic march,” which leads to asthma and allergic rhinitis in the majority of afflicted patients (12–14). These conditions are all characterized by elevated serum IgE levels and peripheral eosinophilia (9). Clinically unaffected skin in AD manifests impaired skin barrier function that could favor the penetration of microbes and allergens (15), leading to the development of cutaneous and systemic allergies through activation of antigen-presenting cells such as Langerhans cells (LCs) (16). However, keratinocytes are immunologically active cells. Indeed, traumatic barrier disruption alone stimulates both keratinocyte proliferation and their cytokine and chemokine production (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and GM-CSF), characteristic features of skin inflammatory diseases (17, 18). Thus, the skin should be considered as an important organ of innate immunity. In fact, keratinocytes from lesional skin of AD patients express a proallergic cytokine, thymic stromal lymphopoietin (TSLP). Notably, the local increase of TSLP is directly associated with LC activation and migration to skin draining lymph node, where they trigger the differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells into proallergic CD4<sup>+</sup> Th2 cells (19, 20). TSLP overexpression is also sufficient in mouse skin to induce an inflammatory Th2 microenvironment and an AD-like skin phenotype (21). Keratinocytes are therefore important orchestrators of the innate immunity through the secretion of a wide range of proinflammatory and proallergic molecules inducing and supporting cutaneous acute and chronic inflammatory responses.

One of the most severe ichthyoses of children and young adults is Netherton syndrome (NS; Online Mendelian Inheritance of Man reference number 256500). NS is a rare (1 in 100,000 newborns) autosomal recessive skin disorder characterized by generalized exfoliative erythroderma, a specific hair shaft defect (trichorrhexis invaginata) and severe atopic manifestations, which distinguish NS from the other ichthyoses (22, 23). Indeed, NS patients suffer from recurrent AD with elevated serum IgE levels, asthma, and multiple food allergies (24, 25). Bacterial infection, hypernatraemic dehydration, hypothermia, and extreme weight loss are frequent complications during the neonatal period, resulting in high

postnatal mortality, and are probably favored by the severe alteration of the skin barrier function.

We previously identified *serine protease inhibitor Kazal-type 5* (*SPINK5*) as the defective gene in NS (26). *SPINK5* encodes the multidomain serine protease inhibitor lymphoepithelial Kazal-type-related inhibitor (LEKTI), whose tissue distribution pattern is restricted to the most differentiated viable layers of stratified epithelial tissues and the Hassall's corpuscles in the thymus (27). In the epidermis, LEKTI is mainly restricted to the GR. It is expressed as high molecular mass precursors, which are rapidly processed into several proteolytic fragments secreted in the intercellular space (27, 28). It has been shown that LEKTI fragments can efficiently and specifically inhibit the epidermal kallikrein (KLK) 5, KLK7, and KLK14 (28–30).

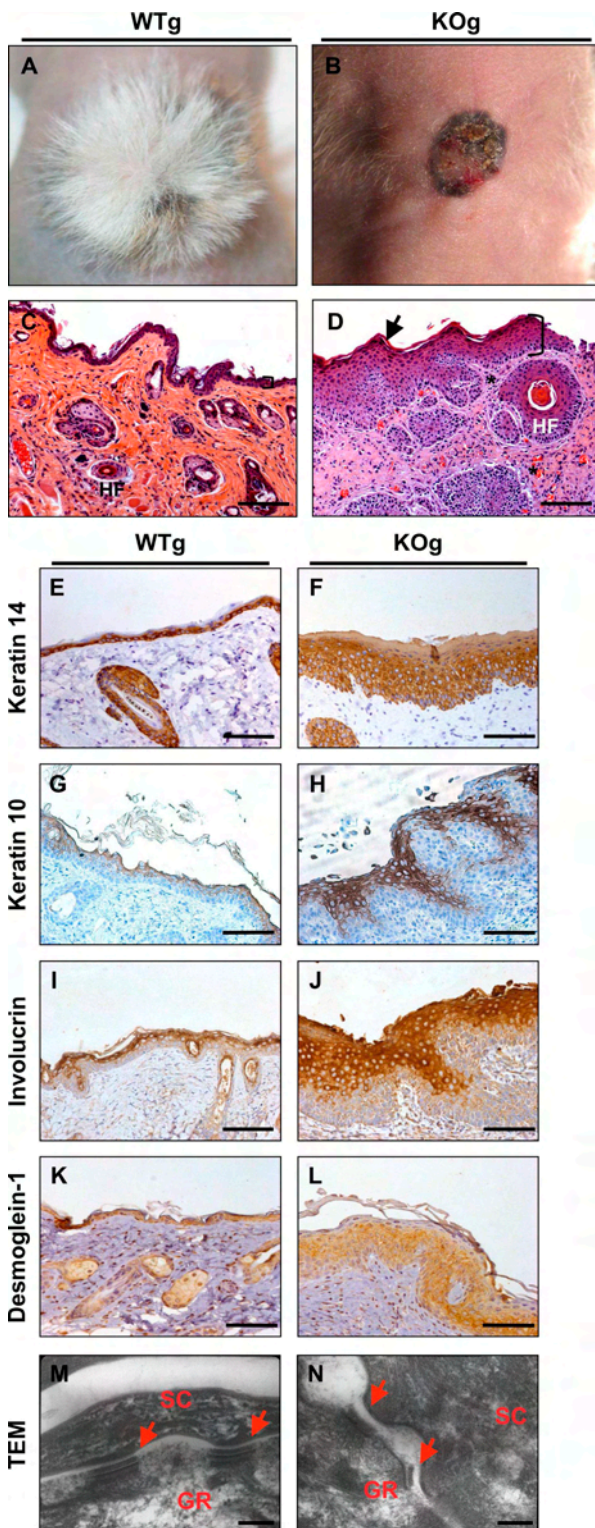
Using *Spink5* KO mice (*Spink5*<sup>-/-</sup>), which faithfully reproduce key features of NS (31–33), we deciphered the biological functions of LEKTI and identified cutaneous pathophysiological pathways of the disease. We showed that epidermal LEKTI deficiency results in KLK5 and KLK7 hyperactivity and dysregulation of a new epidermal protease, which is under characterization. These unrestricted protease activities lead to abnormal desmosome cleavage in the upper GR, resulting in accelerated SC shedding and consequent loss of skin barrier function. This work identified LEKTI as a key regulator of epidermal protease activity and skin barrier integrity (32).

Because NS patients suffer from severe atopic manifestations, such as AD, genetic association between *SPINK5* single nucleotide polymorphisms and severe AD has been tested by several groups (34–41). Positive association was found in several studies in patients with different ethnical background (34, 36). Although the skin barrier defect is considered to be the key event leading to skin inflammation and allergy (42), it is likely that more specific and intrinsic signals could be directly induced by *SPINK5*<sup>-/-</sup> keratinocytes. In this paper, we therefore explored the molecular mechanisms leading to the recruitment of inflammatory cells in NS skin. We show that in LEKTI-deficient keratinocytes, KLK5 hyperactivity activates proinflammatory signaling, leading to the recruitment of eosinophilic and mast cells, which is reminiscent of AD-like skin lesions in NS, independent from skin barrier defect, environmental stimuli, and the adaptive immune system.

## RESULTS

### *Spink5*<sup>-/-</sup> grafted skin reproduces the histological and ultrastructural anomalies of NS

As newborn *Spink5*<sup>-/-</sup> (KO) mice died a few hours after birth (32), total dorsal skin of embryonic day (E) 19.5 embryos was grafted on nude mice to analyze the consequences of *Spink5* inactivation in adult skin. 8 wk after grafting, WT skin (WTg) presented normal hair development (Fig. 1 A), whereas the KO graft was alopecic, scaly, and erythematous (Fig. 1 B). Histological analysis showed that WT grafted skin was similar to adult WT skin (Fig. 1 C). In contrast, the KO epidermis was hyperplastic (acanthosis), with epidermal invaginations in the dermis (papillomatosis), and nuclei were seen to persist in



**Figure 1. Ichthyosiform phenotype, abnormal differentiation, and asymmetrical desmosomal split in *Spink5*<sup>-/-</sup> grafted epidermis.** (A and B) Macroscopic observation of WT (WTg) or *Spink5* KO (KOg) mice skin 8 wk after grafting on nude recipient mice. (C and D) Hematoxylin/eosin staining of skin graft cross sections. The KOg epidermis shows hyper-

plasia with papillomatosis (bracket) and spongiosis, nuclei are seen in corneocytes (parakeratosis; arrow), and an inflammatory infiltrate is present in the dermis (asterisks). Pictures are representative of 14 WT and 17 KO independent grafts on nude mice, performed in five independent graft series. (E–J) Immunohistochemistry of epidermal differentiation markers performed on WTg and KOg grafted skin. (K and L) Desmoglein-1, detected by immunohistochemistry in the whole epidermis of WTg, is markedly decreased in the GR of KOg epidermis. (M and N) Desmosomes analyzed by transmission electron microscopy in the GR–SC intercellular space (red arrows). Asymmetrical split desmosomes were observed in KOg epidermis. Pictures are representative of two independent experiments, each including three WTg and three KOg. HF, hair follicle. Bars: (C and D) 29.4  $\mu$ m; (E–L) 23.5  $\mu$ m; (M and N) 0.1  $\mu$ m.

the SC (parakeratosis), which appeared focally detached from the GR. In addition, a massive inflammatory infiltrate was observed in the dermis and the epidermis associated with spongiosis in the basal layers (Fig. 1 D). The hair follicles were hyperplastic and cystic in KO graft, concordant with the alopecic phenotype (Fig. 1, B and D). Analysis of the differentiation program revealed that keratin 14 was only expressed in the basal layer of the WT graft epidermis, whereas all layers were stained in the KO epidermis (Fig. 1, E and F; and Fig. S5). Keratin 10 and involucrin, which are normally expressed in the suprabasal and GR of WT epidermis, respectively, extended to more profound spinous layers in the KO graft (Fig. 1, G–J; and Fig. S5). We previously demonstrated in newborn KO mice that premature desmosome cleavage leading to SC detachment was a key event of NS (32). As SC cohesion was also affected in KO graft, desmosomes were examined by electron microscopy. Well-structured desmosomes were seen at the interface between the GR and the SC (GR–SC) of the WT grafted epidermis, whereas asymmetrical split of desmosomes was observed in KO graft resulting in the loss of GR–SC cohesion and increase of intercellular space (Fig. 1, M and N). The desmosomal cadherin desmoglein-1 was not detected in these superficial layers of the KO epidermis (Fig. 1 L and Fig. S5), which is in agreement with its degradation as previously described in newborn KO mice and NS skin (32, 43). In summary, the abnormal differentiation pattern observed in KO graft, together with the desmosomal cleavage, confirmed that the KO grafted skin reproduces all major histological and ultrastructural anomalies seen in NS patients skin (43), thus providing a suitable model to understand the long-term effect of LEKTI deficiency in the skin.

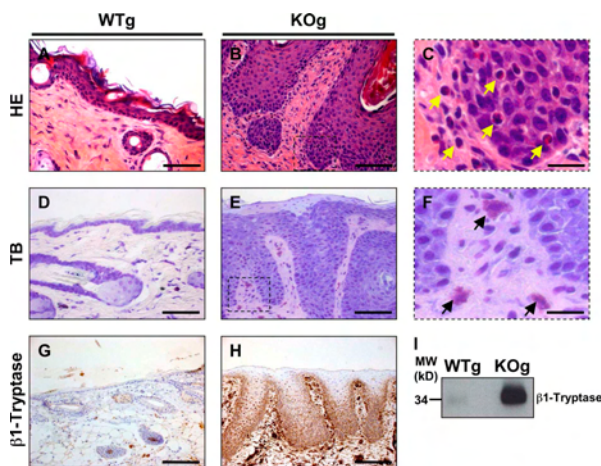
***Spink5*<sup>-/-</sup> grafted skin shows a marked inflammatory infiltrate** Skin inflammation is one of the major features of NS, and *Spink5*<sup>-/-</sup> skin grafts exhibited a strong inflammatory infiltrate. Polynuclear eosinophils were observed in the upper dermis and in the basal epidermal layer in KO skin graft (Fig. 2, A–C). Eosinophilic cells were six times more numerous in KO than in WT dermis (Fig. S1). Toluidine blue coloration revealed the presence of a high number of mast cells in the dermis of KO graft (fourfold increase) compared with WT (Fig. 2, D–F; and Fig. S1). Immunodetection of  $\beta$ 1-tryptase

plasia with papillomatosis (bracket) and spongiosis, nuclei are seen in corneocytes (parakeratosis; arrow), and an inflammatory infiltrate is present in the dermis (asterisks). Pictures are representative of 14 WT and 17 KO independent grafts on nude mice, performed in five independent graft series. (E–J) Immunohistochemistry of epidermal differentiation markers performed on WTg and KOg grafted skin. (K and L) Desmoglein-1, detected by immunohistochemistry in the whole epidermis of WTg, is markedly decreased in the GR of KOg epidermis. (M and N) Desmosomes analyzed by transmission electron microscopy in the GR–SC intercellular space (red arrows). Asymmetrical split desmosomes were observed in KOg epidermis. Pictures are representative of two independent experiments, each including three WTg and three KOg. HF, hair follicle. Bars: (C and D) 29.4  $\mu$ m; (E–L) 23.5  $\mu$ m; (M and N) 0.1  $\mu$ m.

showed that this proinflammatory protease was detected in mast cells in the dermis as well as in the basal and suprabasal layers of the KOg epidermis (Fig. 2 H and Fig. S5). Western blot analysis confirmed overproduction of 34-kD  $\beta$ 1-tryptase monomer in KO grafted skin relative to WT (Fig. 2 I). In addition to the protease hyperactivities at 20 and 30 kD, which has been previously described in embryos (32), casein gel zymography experiments showed a KO graft-specific activity migrating at 34 kD. This activity was inhibited by leupeptin, which is consistent with monomeric  $\beta$ 1-tryptase activity (Fig. S2, B and C). Collectively, these results support mast cells activation and secretion of  $\beta$ 1-tryptase in KO grafted skin contrary to WT. Our results show that KO grafted skin exhibits a massive skin inflammation in athymic nude recipient mice, providing evidence that lack of LEKTI in the epidermis alone is sufficient to induce cutaneous inflammation in the absence of mature T lymphocytes.

### *Spink5*<sup>-/-</sup> grafted epidermis overexpresses proinflammatory mediators

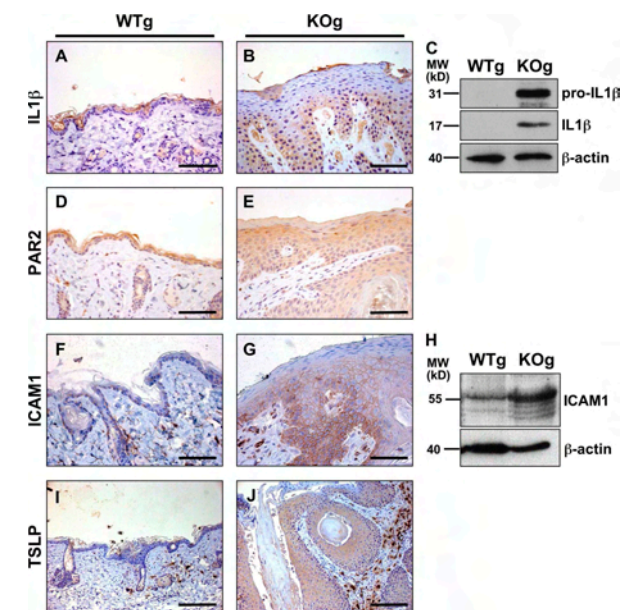
The proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  is known to be secreted by keratinocytes after SC cohesion disruption (18). IL-1 $\beta$  immunostaining was scant and localized at the GR-SC interface in WT epidermal grafts. In the KO epidermis, IL-1 $\beta$  staining was increased and extended to the basal and suprabasal layers (Fig. 3, A and B; and Fig. S5). Western blot analysis confirmed overexpression of the precursor (31 kD)



**Figure 2. Inflammatory cells infiltrate in *Spink5*<sup>-/-</sup> grafted skin.** (A–C) Hematoxylin/eosin (HE) staining shows a high number of polynuclear eosinophilic cells (yellow arrows) in the upper dermis and the basal layer of KO grafted epidermis (KOg). (D–F) Numerous mast cells are colored by Toluidine blue (TB) in KOg dermis (black arrows) contrary to WTg dermis. (G–I) Immunohistochemistry staining and Western blotting confirms increased production of the 34-kD  $\beta$ 1-tryptase monomer in KOg compared with WTg. Three independent stainings were performed on four WTg and four KOg. Western blotting is representative of two independent experiments, each including two WTg and two KOg. C and F are enlargements of B and E, respectively. Bars: (A and B) 9.4  $\mu$ m; (C) 2  $\mu$ m; (D and E) 11.75  $\mu$ m; (F) 2.5  $\mu$ m; (G and H) 23.5  $\mu$ m.

and active forms (17 kD) of IL-1 $\beta$ , which were detected in the KO sample only (Fig. 3 C).

Several studies have identified the proteinase-activated receptor 2 (PAR2) as a major effector of the cutaneous inflammatory response through its proteolytic activation by serine proteases (44–46). PAR2 is expressed in keratinocytes, and we therefore investigated its possible role in the development of the KO graft phenotype by immunohistochemistry analysis. In WT epidermis, PAR2 was restricted to the GR, whereas PAR2 staining was enhanced in the GR and extended to the suprabasal and basal layers in KO grafted epidermis (Fig. 3, D and E; and Fig. S5). The intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), which has been described as a direct target gene of PAR2 activation (47), was restricted to basal cells in the WT epidermis. In the KO grafted epidermis, ICAM1 plasma membrane staining was observed from the basal to the GR (Fig. 3, F and G; and Fig. S5), suggesting PAR2 activation. Increased expression of ICAM1 in KO grafted skin was confirmed by Western blot analysis (Fig. 3 H).



**Figure 3. Proinflammatory mediators in *Spink5*<sup>-/-</sup> graft.**

(A and B) IL-1 $\beta$  immunohistochemistry staining is increased in *Spink5*<sup>-/-</sup> grafted epidermis (KOg) compared with WTg. (C) Western blotting reveals the presence of high amounts of the proform (31 kD) and active form (17 kD) of IL-1 $\beta$  in KOg epidermis. (D–J) Immunohistochemistry experiments on skin graft cross sections. (D and E) In WTg epidermis, PAR2 is localized in the GR. In KOg, PAR2 staining is increased in the GR and is extended to the basal layer. (F and G) ICAM1 is restricted to the basal cells in the WTg epidermis, whereas in the KOg it is extended to the membrane of suprabasal and GR cells. (H) Western blotting confirms the increase of ICAM1 expression in KOg epidermis. (I and J) TSLP is expressed in all epidermal layers of KOg but is not detected in WTg epidermis. Immunostaining panels and Western blotting are representative of two independent experiments, each including three WTg and three KOg, and two WTg and two KOg, respectively. Bars: (A, B, and D–G) 11.5  $\mu$ m; (I and J) 23  $\mu$ m.

Recently, the major role of the epithelial cell-derived cytokine TSLP was highlighted in the induction of cutaneous allergic inflammation and in AD epidermis (19), a key feature of NS. We therefore analyzed the expression of this cytokine in the epidermis of grafted skin. TSLP was not detected in WT grafted epidermis, whereas it was highly expressed by KO keratinocytes throughout the entire epidermis (Fig. 3, I and J; and Fig. S5). Positive cells in the dermis of WTg and KOg skin could be unspecific but could also correspond to activated mast cells that are known to express the TSLP receptor (Fig. 2, B and C; and Figs. S1 and S5). These results illustrated that LEKTI-deficient keratinocytes, through the production of proinflammatory mediators and TSLP expression, play a central role in the activation of innate immunity.

#### *Spink5*<sup>-/-</sup> mice epidermis at E19.5 exhibits early proinflammatory signals

To investigate whether the inflammation in KO adult skin was the result of an intrinsic property of *Spink5*<sup>-/-</sup> epidermis and not secondary to environmental stimuli resulting from a skin barrier defect, we analyzed skin from KO mice at E19.5. Histological analysis of E19.5 KO skin cross section did not reveal any epidermal infiltrate of eosinophilic cells (not depicted), nor did it reveal  $\beta$ 1-tryptase activity in KO embryo (Fig. S2 B), thus excluding the presence of activated mast cells at this stage of development.

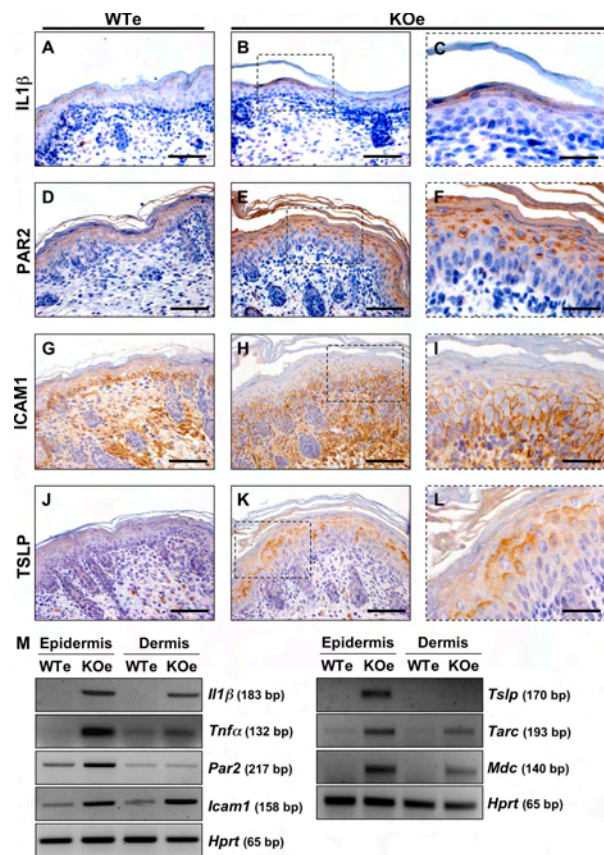
IL-1 $\beta$  immunostaining was faint and diffuse in the superior layers of the WT epidermis (Fig. 4 A and Fig. S5). In the KO epidermis, the staining was more intense and sharp in the area of SC detachment (Fig. 4, B and C; and Fig. S5). RT-PCR analysis confirmed that *Il-1 $\beta$*  mRNA expression was highly enhanced in the epidermis and the dermis of KO embryos compared with WT (Fig. 4 M).

In addition, we investigated the induction of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , which is also produced in response to cutaneous barrier disruption (17) and tightly associated with inflammatory deviation of the immune response, such as asthma and probably allergic inflammation (48, 49). Despite unsuccessful immunostaining of TNF- $\alpha$  on skin cross sections, we analyzed its transcriptional expression and showed that *Tnf- $\alpha$*  mRNA was strongly overexpressed in the KO epidermis and also slightly induced in the dermis of KO embryos compared with WT (Fig. 4 M).

To assess whether the PAR2 signaling pathway was activated at this stage of development, expression and localization of the receptor and the product of its target gene ICAM1 were studied by immunohistochemistry and RT-PCR analysis. PAR2 was detected in suprabasal layers of WT epidermis (Fig. 4 D and Fig. S5). In KO epidermis, PAR2 staining was increased and juxtannuclear. This subcellular localization is consistent with the presence of intracytoplasmic vesicles and/or Golgi pool-containing PAR2 because of its internalization and/or neosynthesis after its activation by epidermal proteases (50) (Fig. 4, E and F; and Fig. S5). RT-PCR analysis showed that *Par2* mRNA was slightly overexpressed in KO epidermis compared with

WT, whereas no variation was detected between WT and KO dermis (Fig. 4 M).

ICAM1 immunolocalization was restricted to the membrane of basal keratinocytes in WT epidermis, whereas in KO epidermis the protein was also expressed at the cell surface of suprabasal keratinocytes (Fig. 4, G–I; and Fig. S5). Increased immunostaining was also observed in the dermis of KO mice. These results were in accordance with the RT-PCR experiments showing *Icam1* mRNA overexpression in the epidermis and in the dermis of KO embryos (Fig. 4 M). ICAM1 overproduction in KO epidermis was confirmed by Western blotting analysis (Fig. S3).



**Figure 4. Early inflammatory events in *Spink5*<sup>-/-</sup> embryos.**

(A–L) Immunohistochemistry on E19.5 embryos skin cross sections. (A–C) IL-1 $\beta$  immunostaining is more intense and sharp in the GR of *Spink5* KO embryo epidermis (KOe) compared with WT embryo (WTe). (D–F) Compared with WTe, PAR2 staining in KOe is increased and juxtannuclear in suprabasal keratinocytes. (G–I) In WTe, ICAM1 is restricted to the basal keratinocytes and to the dermis, whereas it is extended to suprabasal layers in KOe epidermis. (J–L) Contrary to WTe, TSLP staining is detected in the suprabasal and GR of KOe epidermis. Immunostaining panels are representative of two independent experiments, each including three WTe and three KOe. (M) mRNA expression level of *Il-1 $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* , *Par2*, *Icam1*, *Tslp*, *Tarc*, *Mdc*, and *Hprt* were measured by quantitative RT-PCR from WTe and KOe epidermis and dermis. Data are representative of two independent experiments in which two WTe and two KOe were analyzed. C, F, I, and L are enlargements of B, E, H, and K, respectively. Bars: (A, B, D, E, G, H, J, and K) 11.5  $\mu$ m; (C, F, I, and L) 4.9  $\mu$ m.

Finally, TSLP was highly expressed in the KO embryonic epidermis compared with WT (Fig. 4, J–L; and Fig. S5). TSLP immunolocalization appeared to be cytoplasmic and extracellular, suggesting that it was secreted by KO keratinocytes. mRNA analysis confirmed the absence of *Tslp* transcripts in WT skin and a marked overexpression in the epidermis of E19.5 KO mice (Fig. 4 M).

We also analyzed the expression of two pro-Th2 chemokines, *thymus and activation-regulated chemokine* (*Tarc*; *Ccl17*), which was found to be up-regulated in *Tslp*-transgenic mice skin (21), and *macrophage-derived chemokine* (*Mdc*; *Ccl22*). These two chemokines are known to preferentially attract CCR4<sup>+</sup> Th2 cell (51). In the epidermis and the dermis of E19.5 KO mice, *Tarc* and *Mdc* were overexpressed at the transcriptional level (Fig. 4 M).

These results established that proinflammatory and Th2-polarizing mediators were overexpressed as early as E19.5 in the KO epidermis and could be secondary to PAR2 activation. These in utero events appear to be essential in explaining the inflammatory changes observed in the adult KO skin. These observations in *Spink5*<sup>-/-</sup> embryos support the notion that LEKTI-deficient epidermis has the intrinsic property of inducing a proinflammatory cascade, even in the absence of immune cell infiltrate and environmental stimuli.

#### The pro-Th2 cytokine TSLP is overexpressed in the skin of NS patients

TSLP immunodetection on skin cross sections from two healthy controls (healthy 1 and 2) and four NS patients (NS1–NS4) revealed that the pro-Th2 cytokine was overexpressed in the patient skin, in accordance with the result obtained in *Spink5*<sup>-/-</sup> mice epidermis (Fig. 5). In healthy control skin, no signal was detected in the epidermis (healthy 1 and 2). In NS patient epidermis, a cytoplasmic gradient of TSLP staining was observed from the granular to the spinous layer, the intensity of which was different between individuals (Fig. 5). Some patients also exhibited a dermal staining (NS1 and NS3) that could correspond to immune cell infiltrates (Fig. 5), possibly mast cells, or to unspecific staining of dermal structures as observed in mouse isotype control panel (Fig. S6 A). These results confirmed TSLP overproduction in LEKTI-deficient human skin and showed additional similarity with AD skin that could account for the recurrent atopic manifestations in NS.

#### KLK5 up-regulates TSLP and proinflammatory mediator expression through PAR2 and NF- $\kappa$ B signaling in human keratinocytes

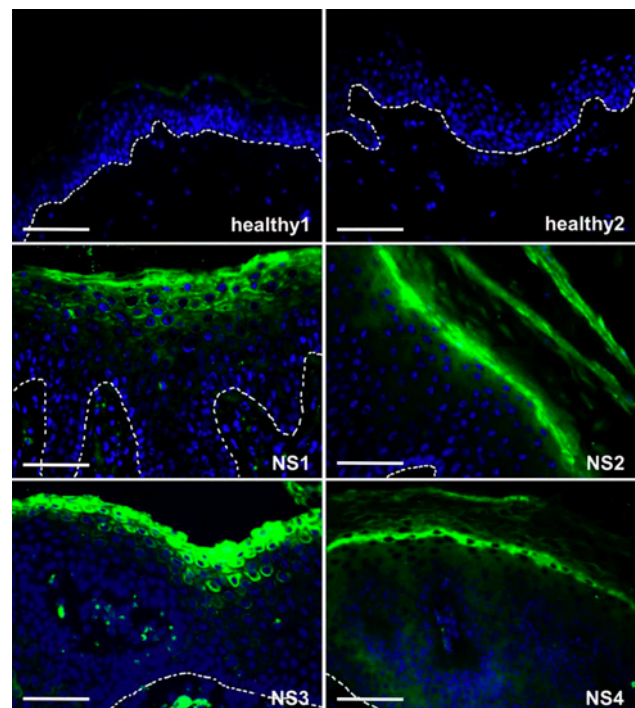
We next hypothesized that protease hyperactivity could lead to overexpression of proinflammatory mediators. Indeed, KLK5, but not KLK7, has previously been shown to cleave and activate PAR2 (52). Therefore, the unregulated KLK5 observed in NS and in *Spink5*<sup>-/-</sup> mice could induce a proinflammatory cascade independently of external stimuli.

We analyzed two target genes of PAR2 activation in cultured keratinocytes, *ICAM1* (47) and the chemokine *IL8* (53). In addition, we assessed whether IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and the pro-

Th2 cytokine TSLP and chemokines TARC and MDC, which we showed to be overexpressed in LEKTI-deficient epidermis, could be directly up-regulated by hyperactive KLK5.

Addition of recombinant human KLK5 in the conditioned medium of normal human primary keratinocytes (NHKs) led to an increase of *ICAM1* mRNA (mean of fivefold; Fig. 6 A), in accordance with previously published data, on NHK treated with trypsin (47), suggesting PAR2 cleavage and activation by KLK5 in our in vitro model. In KLK5-treated NHK, *TSLP* mRNA was significantly increased (mean of sevenfold; Fig. 6 A). TSLP overexpression was confirmed by immunocytofluorescence detection after KLK5 treatment and protein secretion blocking with brefeldin A (Fig. S4). Transcripts of the proinflammatory molecules *IL8* and *TNF- $\alpha$*  were increased as well, in contrast to *IL-1 $\beta$* , *TARC*, and *MDC* expression, which was not induced by KLK5 (Fig. 6 A). These data emphasized the role of KLK5 in cutaneous inflammation by regulating cytokine and chemokine expression in keratinocytes independently of environmental stimuli, inflammatory cells, and skin barrier defect.

To demonstrate a direct role of PAR2 signaling in up-regulation of these molecules, we knocked down *PAR2* mRNA



**Figure 5. Overexpression of TSLP in skin of NS patients.** Immunofluorescence experiments performed on skin cryosections using anti-TSLP antibody (green). TSLP expression is not detectable in two healthy control skins but, in contrast, this cytokine is strongly expressed in the skin of four NS patients (NS1–NS4). The signal is cytoplasmic in the granular keratinocytes and decreases through the spinous layers. The pictures are representative of two independent experiments in which two healthy and four NS patients were included. Dashed white lines represent epidermis/dermis junction. Blue staining (DAPI) indicates nuclei. Bars, 11.5  $\mu$ m.



using siRNA in NHK and applied a KLK5 on these cells. The *PAR2* mRNA knockdown was confirmed by quantitative RT-PCR (56% decreased; Fig. 6 B). In these conditions, *ICAM1* stimulation by KLK5 was significantly reduced (mean of 55% induction relative to control siRNA), confirming that the signaling pathway initiated by PAR2 cleavage was affected (Fig. 6 B). KLK5 was also considerably less efficient in inducing *TSLP* mRNA expression (mean of 48% induction relative to control siRNA) as well as *IL8* and *TNF- $\alpha$*  transcripts. Previous studies have shown that up-regulation of *ICAM1* by PAR2 signaling was mediated by NF- $\kappa$ B pathway (47). Moreover, a functional NF- $\kappa$ B binding site was previously identified in the *TSLP* promoter in airway epithelial cells (54, 55). We therefore assessed the involvement of NF- $\kappa$ B signaling in *TSLP*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$*  up-regulation by KLK5 using BAY11-7082, a specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B pathway. Pretreatment of NHK with BAY11-7082 decreased the effect of KLK5 on *ICAM1* mRNA expression (mean of 70% decreased; Fig. 6 C), which is in accordance with already published data

(47). Moreover, this treatment also strongly reduced KLK5 efficiency in inducing *TSLP*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$*  transcription (mean of 81, 59, and 40% decrease, respectively; Fig. 6 C). Collectively, these in vitro experiments showed that KLK5 can directly induce cutaneous inflammation through PAR2 and NF- $\kappa$ B pathway activation, leading to up-regulation of *TSLP*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$*  mRNAs.

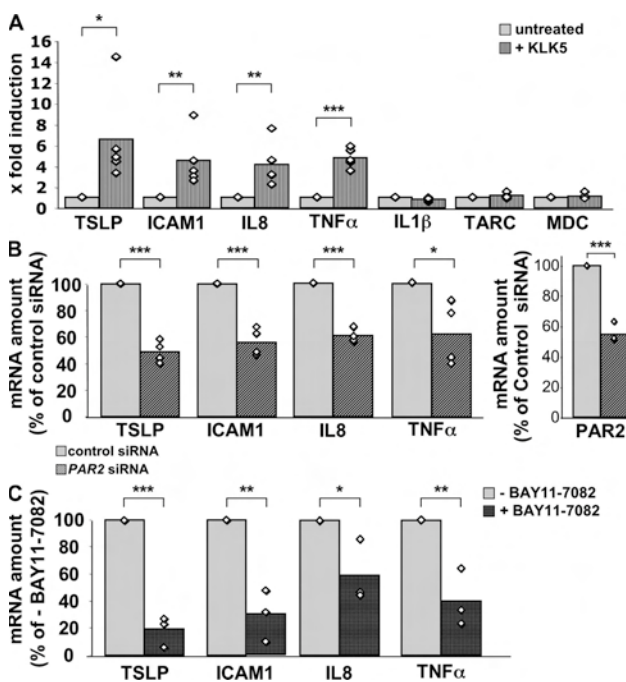
#### KLK5 hyperactivity induces TSLP overexpression in keratinocytes from NS patients

Positive staining of TSLP in NS skin (Fig. 5), together with in vitro data, supports the hypothesis that, in LEKTI-deficient keratinocytes, unregulated proteases can directly induce cytokine and chemokine secretion, including TSLP. To rule out indirect effects of epidermal barrier dysfunction and immune cells on TSLP expression, keratinocytes from three different NS patients (NSK) were cultivated under the same experimental conditions as NHK from three different healthy controls. *TSLP* mRNA quantification revealed that expression of this cytokine was significantly enhanced in NSK compared with NHK in baseline conditions in vitro (mean of fivefold; Fig. 7 A). *ICAM1*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$*  mRNAs were also increased in NSK in comparison to NHK, although no variation was observed for IL-1 $\beta$  (Fig. 7 A). Expression of *TARC* and *MDC* mRNAs was also enhanced in NSK compared with NHK (Fig. 7 A), even though these two genes encoding chemokines may not be direct target genes in the KLK5-PAR2 pathway (Fig. 6 A).

Except for *TSLP*, the other proinflammatory and pro-Th2 molecules were overexpressed in two out of three NSK compared with NHK (Fig. 7 A). This could reflect interindividual variations caused by multiple transcriptional regulations in a LEKTI-deficient context.

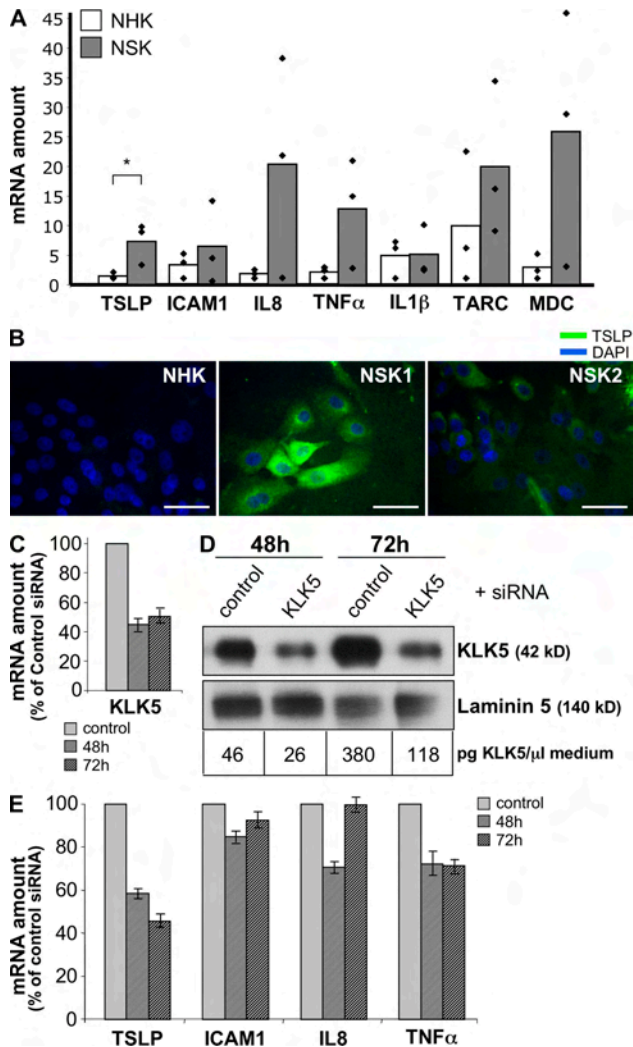
Immunofluorescence experiments on keratinocytes treated with brefeldin A confirmed that TSLP was produced at high level in NSK compared with NHK (Fig. 7 B). All these results confirm that production of TSLP arise from an intrinsic property of *SPINK5*<sup>-/-</sup> cells.

To confirm that unregulated KLK5 secreted by keratinocytes could be directly responsible for TSLP and proinflammatory molecule overexpression, NSKs were transfected with siRNA against KLK5. Down-expression of *KLK5* mRNA and decreased synthesis of the protein were verified by quantitative RT-PCR in NSK (Fig. 7 C) and Western blot analysis on the conditioned medium and were quantified by ELISA assay (Fig. 7 D). The amount of the protease in the conditioned medium of NSK transfected with KLK5 siRNA was significantly decreased compared with control siRNA at 48 h (26 vs. 46 pg/ $\mu$ l) and 72 h (118 vs. 382 pg/ $\mu$ l). Concomitantly, *TSLP* expression was reduced by 42 and 54% at 48 and 72 h after transfection, respectively (Fig. 7 E). However, down-regulation of KLK5 in NSK was associated with a less efficient decrease of *IL8* and *TNF- $\alpha$*  mRNAs and had little effect on *ICAM1* mRNA expression (Fig. 7 E). The residual amount of *TSLP* mRNA and the weak effect on *ICAM1*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$*  transcripts observed in NSK transfected with KLK5 siRNA could be the result of uncompleted knockdown



**Figure 6. KLK5 up-regulates *TSLP* and proinflammatory molecules in keratinocytes.** (A) NHKs were stimulated with 400 nM of recombinant KLK5 for 3 h. *TSLP*, *ICAM1*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$*  transcripts are increased by seven-, five-, four-, and fivefold, respectively. No difference was observed for *IL-1 $\beta$* , *TARC*, and *MDC* ( $n = 5$ ). (B) NHK transfected with 60 pmol *PAR2* siRNA and stimulated with KLK5 showed *PAR2* mRNA down-regulation (by 56%) 4 d after transfection. In *PAR2* siRNA-transfected cells, KLK5 is less efficient in inducing *TSLP*, *ICAM1*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$*  mRNA (48, 55, 60, and 62% of control, respectively;  $n = 4$ ). (C) In cells treated with 10  $\mu$ M NF- $\kappa$ B pathway inhibitor (BAY11-7082), KLK5 efficiency to up-regulate *TSLP*, *ICAM1*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$*  mRNA is decreased by 81, 70, 59, and 40%, respectively ( $n = 3$ ). For each experiment, the mRNAs of interest were measured by quantitative RT-PCR. Each point is the mean of triplicate amplification for at least three independent experiments ( $n$ ). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

of *KLK5* mRNA but could also be the result of the activation of PAR2 by other hyperactivated proteases, such as *KLK14* (52) and/or other signaling pathway induction.



**Figure 7. TSLP and proinflammatory molecules are induced by *KLK5* in keratinocytes of NS patients.** (A) Quantitative RT-PCR on cultured primary keratinocytes reveals that *TSLP* is significantly overexpressed by fivefold in three NS patients (NSK) compared with three healthy controls (NHK). *ICAM1*, *IL8*, *TNF- $\alpha$* , *TARC*, and *MDC* mRNA are overexpressed in two out of three NSKs but not *IL-1 $\beta$*  mRNA. Each point represents the mean of two independent experiments for each individual. \*,  $P < 0.05$ . (B) NHK and NSK were treated with 10  $\mu$ g/ml brefeldin A, and TSLP was detected by immunofluorescence (green). Blue staining is DAPI. Pictures are representative of two independent brefeldin A treatments, each realized on two NHKs and two NSKs. (C and D) NSKs were transfected with *KLK5* siRNA and its efficient down-regulation was confirmed by quantitative RT-PCR, Western blotting (laminin 5 used as loading control), and ELISA, 48 and 72 h after transfection. Results are representative of three independent experiments. (E) *KLK5* knockdown induces a decrease of *TSLP* measured by quantitative RT-PCR. *ICAM1*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$*  mRNAs were less efficiently reduced. Data are the mean  $\pm$  SD of one experiment, which is representative of three independent experiments. Bars, 49  $\mu$ m

These results highlight for the first time *KLK5*'s direct role in TSLP up-regulation in NSK, which is independent of external stimuli including environment, microorganism penetration, or immune cell activation. *KLK5* also induced the production of other inflammatory molecules that probably maintain and aggravate the proinflammatory microenvironment in the affected skin and favor a pro-Th2 microenvironment.

## DISCUSSION

The recurrent atopic manifestations, which are constantly associated with NS, are generally regarded as resulting from premature SC detachment facilitating allergen penetration and inducing stress signal on keratinocytes. In this paper, we provide evidence that the epidermis plays a major and direct role in the modulation of the immune response. We show that in baseline culture conditions, keratinocytes from NS patients secrete major proinflammatory (*ICAM1*, *IL8*, and *TNF- $\alpha$* ) and Th2-polarizing (*TSLP*, *TARC*, and *MDC*) mediators in the absence of any external stimulation, thus excluding any effect of skin barrier disruption and/or pathogen and allergen penetration. We demonstrate for the first time the direct role of *KLK5* hyperactivity in initiating a proallergic signaling cascade through PAR2 receptor cleavage and NF- $\kappa$ B pathway activation, which results in *ICAM1*, *IL8*, *TNF- $\alpha$* , and *TSLP* overexpression in keratinocytes (Fig. 8). This study disclosed a new role for *KLK5* in skin inflammation and in the induction of allergic inflammatory actors. Therefore, *KLK5* represents a major epidermal specific protagonist, which initiates TSLP overexpression without contribution of the adaptive immune system. In addition, the pro-Th2 mediators TARC and MDC were overexpressed in keratinocytes from NS patients independently of *KLK5* and PAR2 activation. This up-regulation could be promoted by other uncontrolled proteases, such as *KLK7* or *KLK14* and/or secreted factors in the medium, sustaining the induction of multiple signaling pathways in LEKTI-deficient skin. These results provide evidence that the activation of this biological cascade leading to cutaneous inflammation in NS is an intrinsic property of LEKTI-deficient keratinocytes, i.e., is a cell-autonomous process.

Analysis of *Spink5* KO epidermis in E19.5 embryos revealed that this *KLK5* biological cascade is an early event and, consequently, is relevant in vivo. In *Spink5*<sup>-/-</sup> skin, no inflammatory infiltrate could be observed in WT and KO epidermis, whereas the proinflammatory (*Icam1*, *Il-1 $\beta$* , and *Tnf- $\alpha$* ) and pro-Th2 (*Tslp*, *Mdc*, and *Tarc*) molecules were already overproduced (Fig. 4). In addition, these molecules were induced in embryos that had been delivered by caesarian from gestate females maintained in a pathogen-free environment. That supports a major and direct role of KO keratinocytes in sensing and promoting inflammatory signal rather than the absorption of allergen by epidermal LC precursors (56), which in this condition will probably not encounter foreign particles.

Interestingly, we showed that the intracellular pool of PAR2 was increased in the more differentiated layers of the E19.5 KO epidermis and colocalized with TSLP and hyperactive *KLK5* in the upper layers of the KO epidermis (28, 43).

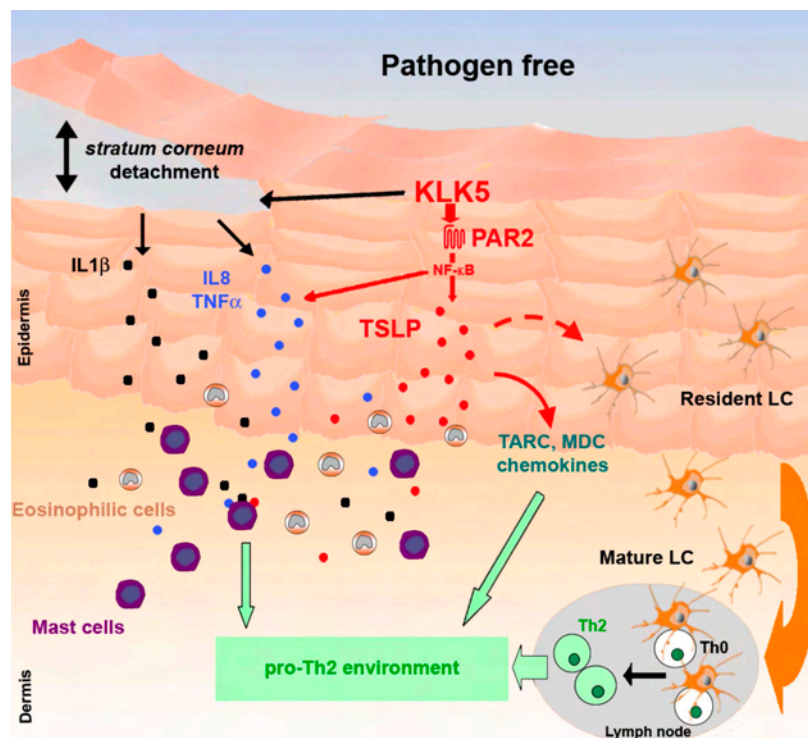
Therefore, these early events observed in utero confirmed that deregulated KLK5 in the upper GR layers initiates the proinflammatory response through PAR2 cleavage and TSLP production in vivo.

IL-1 $\beta$  was also increased in the epidermis of *Spink5*<sup>-/-</sup> embryos in contrast to primary keratinocytes from NS patients in culture. Nonetheless, IL-1 $\beta$  overexpression in *Spink5*<sup>-/-</sup> embryos epidermis is likely to be a consequence of SC detachment that is already present before birth (17). IL-1 $\beta$  can be proteolytically activated by KLK7 (57), which is hyperactivated in *Spink5*<sup>-/-</sup> skin (32). Thus, this protease could participate in the inflammatory process in our model as observed in KLK7 transgenic mice (58).

These proinflammatory mediators already in place at a late developmental stage (E19.5) in the epidermis of KO embryos could contribute to the amplification of the proallergic microenvironment. In a context of immunocompetent mice, TARC and MDC could lead to the recruitment of Th2 CCR4<sup>+</sup> cells at the site of inflammation (51). In addition, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  overexpression in *Spink5*<sup>-/-</sup> epidermis may induce TSLP expression in keratinocytes (19, 54) and attract innate immune cells. These processes could explain

worsening of the cutaneous phenotype observed in LEKTI-deficient adult skin.

The *Spink5*<sup>-/-</sup> skin grafts exhibit a marked inflammatory infiltrate in the absence of T cell-mediated immunity. This inflammatory infiltrate was essentially composed of polynuclear eosinophilic cells and activated mast cells that are usually present in allergic response. Interestingly, these features were associated neither with infection nor with the presence of mature T cells, as skin grafts were performed on athymic nude mice. It is of interest to note that elimination of T lymphocytes in *K5-Tslp* mice by crossing with TCR- $\beta$ -deficient mice does not affect eosinophilic and mast cell skin infiltration (21), as observed in *Spink5* KO grafted skin. These data support the notion that, in our model, TSLP-mediated skin inflammation mainly involves the innate immune system and that this cytokine may directly recruit and activate mast cells that express TSLP receptor (59). TSLP, synergistically with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , stimulates the production of pro-Th2 cytokines by activated mast cells (59). Massive production of active  $\beta$ 1-tryptase by activated mast cells in *Spink5*<sup>-/-</sup> grafted skin could also directly participate in the inflammatory response and favor a Th2-permissive microenvironment



**Figure 8. KLK5 triggers proinflammatory and proallergic microenvironment independently of external stimuli.** Lack of KLK5 inhibition by LEKTI initiates proinflammatory and proallergic cascades independently of environmental factors. In LEKTI-deficient keratinocytes, hyperactive KLK5 directly induces TSLP, IL8, and TNF- $\alpha$  overexpression through PAR2 and NF- $\kappa$ B pathway activation. Unregulated KLK5 also degrades desmosomes at the interface between the GR and the SC leading to defective SC adhesion and IL-1 $\beta$ , IL8, and TNF- $\alpha$  secretion by mechanically stressed keratinocytes. In addition, all these cytokines could induce TARC and MDC chemokines secretion by keratinocytes and dermal fibroblasts. These proinflammatory mediators trigger eosinophilic and mast cell recruitment and activation. TSLP has been reported to activate resident LCs, which migrate to draining lymph nodes and promote the differentiation of naive T cells (Th0) into Th2 cells. Collectively, activated keratinocytes together with eosinophilic and mast cells induce pro-Th2 microenvironment favoring the development of an AD-like phenotype.

through PAR2 activation on mast cells (60), dendritic cells (61), and eosinophils (62, 63). In addition, in an immune-competent system, TSLP has the potential to activate dendritic cells and epidermal LCs in particular, triggering the generation of proallergic CD4<sup>+</sup> Th2 cells (19, 20, 64).

Our present results established that *Spink5*<sup>-/-</sup> epidermis by itself induces a cutaneous inflammatory response and the synthesis of proallergic mediators. This new mechanism could account for atopic manifestations in NS patients and is concordant with TSLP overproduction in the epidermis of NS patients (Fig. 5) who display KLK5 and PAR2 deregulation (43). Thus, TSLP provides an important link between the absence of LEKTI protease inhibitor and the AD-like phenotype constantly seen in NS patients. This notion supports the possibility that *SPINK5* could play a role in atopic disease. Several studies have reported significant genetic association of *SPINK5* polymorphisms with AD in different populations (34–38), whereas other studies did not confirm these results (39–41). This suggests that *SPINK5* genetic variations may account, to some extent, for predisposition to AD in some patients, depending on other genetic and/or environmental factors.

Therefore, expression of TSLP, TARC, and MDC by LEKTI-deficient keratinocytes could initiate and amplify the skin atopic inflammation as well as the systemic allergic response of NS patients. The abundant and epidermally restricted TSLP secretion could induce an AD-like phenotype associated with elevated serum levels of IgE, as illustrated in *Tslp* skin-specific transgenic mice (21, 65). Thereby, the effect of LEKTI deficiency on triggering PAR2 signaling could be a primary event inducing atopic manifestations in NS before skin barrier defect. In parallel, as the result of protease hyperactivities, FIL-AGGRIN is also decreased (agranulosis) and the SC is often detached from the underlying cell layers in the epidermis of NS patients (43). Both anomalies impair skin barrier and favor allergen and pathogen penetration in NS epidermis, thus contributing to the aggravation of the atopic phenotype.

These results identify KLK5 as a major actor in NS because up-regulation of this protease has a direct effect on pro-inflammatory signaling and on skin barrier disruption, both of which contribute to the development of atopic manifestations in NS. KLK5 and all the highlighted actors in this study constitute attractive candidates for therapeutic intervention, which are upstream from the IgE response and independent of allergen exposure. These new approaches based on blocking this biological cascade initiated in the epidermis could improve not only the allergic manifestations but also the skin barrier defect of NS patients. In addition, the results point out the importance of the control of protease/protease inhibitor balance in skin barrier function and in immune response orientation.

An emerging hypothesis regarding asthma and AD is that they are epithelial diseases initiated by the epithelial cells themselves through the production of TSLP (66). In the present study, we have identified a mechanism leading to the production of the major pro-Th2 cytokine TSLP by skin epithelial cells, despite the absence of microbe products or physical in-

jury. This new physiological pathway could also explain why the eczematous skin lesions in infants often start in the absence of specific IgE antibodies, indicating that IgE sensitization may occur secondary to eczema. This new mechanism, which is based on the control of epidermal serine protease activity, could be considered to be additional genetic regulation involved in AD.

## MATERIALS AND METHODS

**Skin sample and dermis/epidermis separation technique.** This work was approved by the Commission de Génie Génétique (23 November 2003, agreement number 3987) and by the Local Ethical Committee (DEC 04005). All experiments were done in accordance with the relevant guidelines and regulations. Mice embryos were delivered by caesarean at E19.5.

For RNA analysis, dermis/epidermis separation was performed by incubating total dorsal skin into phosphate buffer saline containing 2.4 mg/ml dispase II (Roche) overnight at 4°C. For protein analysis, skin was incubated in PBS at 56°C for 45 min.

**Skin grafting.** Total dorsal skin from E19.5 mice was transplanted onto nude mice using the skin flap technique (67) and analyzed after 8 wk.

**Histological and immunohistochemical analysis.** Skin samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin or directly frozen at -80°C in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura). 4- $\mu$ m sagittal sections were stained with hematoxylin/eosin or Toluidine blue for histological examination.

For antigen retrieval, paraffin-embedded cross sections were boiled in 1 mM of citrate buffer, pH 6, for 20 min or treated with S1700 solution (Dako) for 45 min for Desmoglein-1 immunodetection. Skin cryosections were fixed with acetone for 10 min. Immunodetection was performed using appropriate horseradish peroxidase (HRP; diaminobenzidine)-conjugated polymers (EnVision system; Dako) or Alexa Fluor 488-coupled secondary antibody (Invitrogen).

Each NS patient was a homozygote or a compound heterozygote for *SPINK5* mutations, leading to the absence of detectable LEKTI on immunohistochemical analysis of skin sections as previously described (27). Informed consent was obtained from the patients. This study was approved by the medical ethical committee of the Purpan Hospital in Toulouse. The study was conducted in compliance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki.

**Transmission electron microscopy analysis.** WT and *Spink5*<sup>-/-</sup> grafted skin samples were prepared as described previously (32).

**Western blotting.** Epidermises were crushed in protein extraction buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 8, 5 mM EDTA, pH 8, 0.1% Nonidet-P40, and protease inhibitor cocktail tablets [Complete; Roche]) with Ultra-Turrax. Equal amounts of soluble protein were added to Laemmli buffer (62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.002% bromophenol blue). Samples were separated by SDS-PAGE and transferred onto Hybond-C extra membrane (GE Healthcare). For mouse  $\beta$ 1-tryptase detection, samples in acetic acid buffer were used. Total amount of protein was quantified by Bradford assay before gel migration and then by coomassie blue staining of SDS-PAGE gel and measurement of the intensity of every band with Image software (version 1.63; National Institutes of Health; Fig. S2). To quantify secreted KLK5 and Laminin 5, 20  $\mu$ l of keratinocyte conditioned medium was used.

**Quantitative real-time PCR.** Total RNA from mouse dermis and epidermis and human keratinocytes, were isolated using the RNeasy mini kit (QIAGEN). Complementary DNA synthesis from 2–3  $\mu$ g of total RNA was performed using SuperScript III First-Strand Synthesis system (Invitrogen).

Quantitative real-time PCR was realized on an ABI prism 7000 Sequence Detection system (Applied Biosystems) using qPCR MasterMix Plus SYBR

Green I kit (Eurogentec). Results were normalized with the *HPRT* (human or mouse) gene and analyzed using Sequence Detection System version 1.2 (Applied Biosystems). P-values were calculated using the Student–Fischer test.

**Human keratinocyte culture and siRNA transfection.** NHKs were seeded on 6-well plates and grown in half EpiLife 0.06 mM CaCl<sub>2</sub> (Invitrogen) and half Green medium (68) until confluency. NHK were treated with 400 nM KLK5 (1 U trypsin-like equivalent) in serum-free Green medium for 3 h. For the NF-κB pathway inhibition test, cells were treated 1 h before activation with 10 μM (E) 3-[(4-methylphenyl) sulfonyl]-2-propenenitrile (BAY11-7082; EMD). For siRNA transfection, NHK or primary keratinocytes from NS patients (NSK) were grown until 60% confluency. Cells were transfected with 60 pmol of human *PAR2* siRNA or 20 pmol of human *KLK5* siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) using the transfection reagent jetSI-ENDO (Ozyme) in serum-free and antibiotic-free EpiLife. Control siRNA fluorescein conjugate (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) was used as described by the manufacturer. 5 d after human *PAR2* siRNA transfection, NHKs were treated with KLK5.

**Immunocytofluorescence.** NHK and NSK were seeded on 400-mm<sup>2</sup> slides. Cells were incubated with 10 μg/ml brefeldin A (eBioscience) for 3 h, fixed in 4% formaldehyde solution, and incubated overnight with human TSLP antibody at 4°C. Signal was detected with an FITC-conjugated secondary antibody (Dako) and nuclei were stained with DAPI (Vector Laboratories). Fluorescence signal was visualized with an inverted high-end microscope (Axiovert 200; Carl Zeiss, Inc.).

**Immunofluorometric assay (ELISA) for human KLK5.** MaxiSorp 96-well plates (Thermo Fisher Scientific) were coated with 1 μg per well of Fc fragment-specific goat polyclonal anti-mouse IgG (Interchim). Saturation was performed with a solution containing 5% BSA and 5% sucrose. Mouse monoclonal anti-human KLK5 antibody (R&D systems) in 1% BSA, 0.05% Tween 20, and PBS was added to each well and incubated overnight at 4°C. 50 μl of undiluted or diluted cell-conditioned medium were incubated for 2 h at room temperature. KLK5 detection was performed using a biotinylated polyclonal goat anti-human KLK5 antibody (BAF1108; R&D systems). Signal was revealed using HRP-coupled streptavidin (N-100; Endogen; Interchim) and UptiLight HS ELISA HRP substrate (Interchim). Luminescence was recorded with Mithras (Berthold Technologies). Recombinant human KLK5 (R&D system) was used as standard range.

**Online supplemental material.** Table S1 provides information about primary antibodies and control antibodies used. Table S2 indicates primer sequences for mouse and human complementary DNA PCR amplification. Fig. S1 is a graphic representation of the increased number of eosinophilic and mast cells in the dermis of KO grafted skin. Fig. S2 shows a loading control for β1-tryptase Western blotting, β1-tryptase hyperactivity, and its inhibition by leupeptin in KO grafted skin by casein gel zymography. Fig. S3 shows increased expression of ICAM1 protein in E19.5 KO epidermis by Western blot analysis. Fig. S4 confirms by immunocytofluorescence that KLK5 treatment induces TSLP protein expression in NHK. Fig. S5 shows negative staining with rabbit and goat control antibodies on mouse skin sections. Fig. S6 shows negative staining with mouse isotype control and rabbit control antibody on human skin sections and cultured keratinocytes. A supplemental materials and methods is also provided for the casein gel zymography experiment. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20082242/DC1>.

We thank Sophie Allart from the imagery platform (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale [INSERM], Institut Claude de Prével, IFR30, Imagerie cellulaire, Toulouse, F-31300 France), Talal Al Saati, Florence Capilla, and Delphine Lestrade from the experimental histopathology platform of IFR30 (INSERM, Institut Claude de Prével, IFR30, Histopathologie expérimentale, Toulouse, F-31300 France), and Isabelle Fourquaux from the electron microscopy platform (IFR31-Toulouse) for their technical assistance. We are grateful to the staff of mouse facilities for animal care (INSERM, Institut Claude de Prével, IFR30 Toulouse, F-31300 France).

We are indebted to Nathalie Vergnolles, Gilbert Fournié, Lucette Pelletier, and José Mejía (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U563-Toulouse) for helpful discussion and critical readings.

This work was supported by grants from the national agency for research (Netherlink: ANR-05-MRAR-009-01), the French Ministry of Research and Technology, the Foundation for Medical Research in France, the European GENESKIN coordination action project, the Association Athina Ichtyose Monaco, and the Reference Centre of Rare Skin Diseases (CHU Toulouse).

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 7 October 2008

Accepted: 7 April 2009

## REFERENCES

- Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:328–340.
- Swartzendruber, D.C., P.W. Wertz, D.J. Kitko, K.C. Madison, and D.T. Downing. 1989. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 92:251–257.
- Green, K.J., and C.L. Simpson. 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest. Dermatol.* 127:2499–2515.
- Egelrud, T. 2000. Desquamation in the stratum corneum. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh.)*. 208:44–45.
- Elias, P.M., M.L. Williams, W.M. Holleran, Y.J. Jiang, and M. Schmuth. 2008. Pathogenesis of permeability barrier abnormalities in the ichthyoses: Inherited disorders of lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 49:697–714.
- Smith, F.J., A.D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, A. Sandilands, L.E. Campbell, Y. Zhao, H. Liao, A.T. Evans, D.R. Goudie, S. Lewis-Jones, et al. 2006. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat. Genet.* 38:337–342.
- Palmer, C.N., T. Ismail, S.P. Lee, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, F.J. Smith, W.H. McLean, and S. Mukhopadhyay. 2007. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120:64–68.
- Morar, N., W.O. Cookson, J.I. Harper, and M.F. Moffatt. 2007. Filaggrin mutations in children with severe atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 127:1667–1672.
- Leung, D.Y., and T. Bieber. 2003. Atopic dermatitis. *Lancet.* 361:151–160.
- Cork, M.J., D.A. Robinson, Y. Vasilopoulos, A. Ferguson, M. Moustafa, A. MacGowan, G.W. Duff, S.J. Ward, and R. Tazi-Ahniini. 2006. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:3–21 (quiz 22–23).
- Homey, B., M. Steinhoff, T. Ruzicka, and D.Y. Leung. 2006. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:178–189.
- Spergel, J.M., E. Mizoguchi, J.P. Brewer, T.R. Martin, A.K. Bhan, and R.S. Geha. 1998. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J. Clin. Invest.* 101:1614–1622.
- Spergel, J.M., and A.S. Paller. 2003. Atopic dermatitis and the atopic march. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:S118–S127.
- Spergel, J.M. 2005. Atopic march: link to upper airways. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5:17–21.
- Werner, Y., and M. Lindberg. 1985. Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* 65:102–105.
- Allam, J.P., and N. Novak. 2006. The pathophysiology of atopic eczema. *Clin. Exp. Dermatol.* 31:89–93.
- Nickoloff, B.J., and Y. Naidu. 1994. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 30:535–546.
- Wood, L.C., S.M. Jackson, P.M. Elias, C. Grunfeld, and K.R. Feingold. 1992. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J. Clin. Invest.* 90:482–487.
- Soumelis, V., P.A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerman, et al. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* 3:673–680.

20. Ebner, S., V.A. Nguyen, M. Forstner, Y.H. Wang, D. Wolfram, Y.J. Liu, and N. Romani. 2007. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:982–990.
21. Yoo, J., M. Omori, D. Gyarmati, B. Zhou, T. Aye, A. Brewer, M.R. Comeau, D.J. Campbell, and S.F. Ziegler. 2005. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J. Exp. Med.* 202:541–549.
22. Comel, M. 1949. Ichthyosis Linearis circumflexa. *Dermatologica.* 98:133–136.
23. Netherton, E.W. 1958. A unique case of trichorrhhexis nodosa; bamboo hairs. *AMA Arch. Derm.* 78:483–487.
24. Traupe, H. 1989. The ichthyosis. A guide to clinical diagnosis, genetic counselling, and therapy. Springer-Verlag, Berlin. 253 pp.
25. Judge, M.R., G. Morgan, and J.I. Harper. 1994. A clinical and immunological study of Netherton's syndrome. *Br. J. Dermatol.* 131:615–621.
26. Chavanas, S., C. Bodemer, A. Rochat, D. Hamel-Teillac, M. Ali, A.D. Irvine, J.L. Bonafe, J. Wilkinson, A. Taieb, Y. Barrandon, et al. 2000. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat. Genet.* 25:141–142.
27. Bitoun, E., A. Micheloni, L. Lamant, C. Bonnart, A. Tartaglia-Polcini, C. Cobbold, T. Al Saati, F. Mariotti, J. Mazereeuw-Hautier, F. Boralevi, et al. 2003. LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 12:2417–2430.
28. Deraison, C., C. Bonnart, F. Lopez, C. Besson, R. Robinson, A. Jayakumar, F. Wagberg, M. Brattsand, J.P. Hachem, G. Leonardsson, and A. Hovnanian. 2007. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol. Biol. Cell.* 18:3607–3619.
29. Egelrud, T., M. Brattsand, P. Kreutzmann, M. Walden, K. Vitzithum, U.C. Marx, W.G. Forssmann, and H.J. Magert. 2005. hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *Br. J. Dermatol.* 153:1200–1203.
30. Schechter, N.M., E.J. Choi, Z.M. Wang, Y. Hanakawa, J.R. Stanley, Y. Kang, G.L. Clayman, and A. Jayakumar. 2005. Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biol. Chem.* 386:1173–1184.
31. Yang, T., D. Liang, P.J. Koch, D. Hohlf, F. Kheradmand, and P.A. Overbeek. 2004. Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and destabilization of corneodesmosin in Spink5<sup>-/-</sup> mice. *Genes Dev.* 18:2354–2358.
32. Descargues, P., C. Deraison, C. Bonnart, M. Kreft, M. Kishibe, A. Ishida-Yamamoto, P. Elias, Y. Barrandon, G. Zambruno, A. Sonnenberg, and A. Hovnanian. 2005. Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat. Genet.* 37:56–65.
33. Hewett, D.R., A.L. Simons, N.E. Mangan, H.E. Jolin, S.M. Green, P.G. Fallon, and A.N. McKenzie. 2005. Lethal, neonatal ichthyosis with increased proteolytic processing of filaggrin in a mouse model of Netherton syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 14:335–346.
34. Walley, A.J., S. Chavanas, M.F. Moffatt, R.M. Esnouf, B. Ubhi, R. Lawrence, K. Wong, G.R. Abecasis, E.Y. Jones, J.I. Harper, et al. 2001. Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat. Genet.* 29:175–178.
35. Kato, A., K. Fukai, N. Oiso, N. Hosomi, T. Murakami, and M. Ishii. 2003. Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br. J. Dermatol.* 148:665–669.
36. Nishio, Y., E. Noguchi, M. Shibasaki, M. Kamioka, E. Ichikawa, K. Ichikawa, Y. Umehayashi, F. Otsuka, and T. Arinami. 2003. Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese. *Genes Immun.* 4:515–517.
37. Kabesch, M., D. Carr, S.K. Weiland, and E. von Mutius. 2004. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin. Exp. Allergy.* 34:340–345.
38. Moffatt, M.F. 2004. SPINK5: a gene for atopic dermatitis and asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 34:325–327.
39. Folster-Holst, R., M. Stoll, W.A. Koch, J. Hampe, E. Christophers, and S. Schreiber. 2005. Lack of association of SPINK5 polymorphisms with nonsyndromic atopic dermatitis in the population of Northern Germany. *Br. J. Dermatol.* 152:1365–1367.
40. Jongepier, H., G.H. Koppelman, I.M. Nolte, M. Bruinenberg, E.R. Bleeker, D.A. Meyers, G.J. te Meerman, and D.S. Postma. 2005. Polymorphisms in SPINK5 are not associated with asthma in a Dutch population. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115:486–492.
41. Hubiche, T., C. Ged, A. Benard, C. Leaute-Labreze, K. McElreavey, H. de Vermeuil, A. Taieb, and F. Boralevi. 2007. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort. *Acta Derm. Venereol.* 87:499–505.
42. Strid, J., and S. Strobel. 2005. Skin barrier dysfunction and systemic sensitization to allergens through the skin. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 4:531–541.
43. Descargues, P., C. Deraison, C. Prost, S. Fraitag, J. Mazereeuw-Hautier, M. D'Alessio, A. Ishida-Yamamoto, C. Bodemer, G. Zambruno, and A. Hovnanian. 2006. Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *J. Invest. Dermatol.* 126:1622–1632.
44. Dery, O., C.U. Corvera, M. Steinhoff, and N.W. Bunnett. 1998. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* 274:C1429–C1452.
45. Coughlin, S.R., and E. Camerer. 2003. PARticipation in inflammation. *J. Clin. Invest.* 111:25–27.
46. Seeliger, S., C.K. Derian, N. Vergnolle, N.W. Bunnett, R. Nawroth, M. Schmelz, P.Y. Von Der Weid, J. Buddenkotte, C. Sunderkotter, D. Metzke, et al. 2003. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. *FASEB J.* 17:1871–1885.
47. Buddenkotte, J., C. Stroh, I.H. Engels, C. Moormann, V.M. Shpacovitch, S. Seeliger, N. Vergnolle, D. Vestweber, T.A. Luger, K. Schulze-Osthoff, and M. Steinhoff. 2005. Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J. Invest. Dermatol.* 124:38–45.
48. Moffatt, M.F., and W.O. Cookson. 1997. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum. Mol. Genet.* 6:551–554.
49. van Overveld, F.J., P.G. Jorens, M. Rampart, W. de Backer, and P.A. Vermeire. 1991. Tumour necrosis factor stimulates human skin mast cells to release histamine and tryptase. *Clin. Exp. Allergy.* 21:711–714.
50. Bohm, S.K., L.M. Khitin, E.F. Grady, G. Aponte, D.G. Payan, and N.W. Bunnett. 1996. Mechanisms of desensitization and re-sensitization of proteinase-activated receptor-2. *J. Biol. Chem.* 271:22003–22016.
51. Homey, B., and A. Zlotnik. 1999. Chemokines in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 11:626–634.
52. Oikonomopoulou, K., K.K. Hansen, M. Saifeddine, N. Vergnolle, I. Tea, M. Blaber, S.I. Blaber, I. Scarisbrick, E.P. Diamandis, and M.D. Hollenberg. 2006. Kallikrein-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). *Biol. Chem.* 387:817–824.
53. Hou, L., S. Kapas, A.T. Cruchley, M.G. Macey, P. Harriott, C. Chinni, S.R. Stone, and G.L. Howells. 1998. Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology.* 94:356–362.
54. Lee, H.C., and S.F. Ziegler. 2007. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:914–919.
55. Ziegler, S.F., and Y.J. Liu. 2006. Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat. Immunol.* 7:709–714.
56. Kobayashi, M., H. Asano, Y. Fujita, and T. Hoshino. 1987. Development of ATPase-positive, immature Langerhans cells in the fetal mouse epidermis and their maturation during the early postnatal period. *Cell Tissue Res.* 248:315–322.
57. Nylander-Lundqvist, E., and T. Egelrud. 1997. Formation of active IL-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. *Acta Derm. Venereol.* 77:203–206.
58. Ny, A., and T. Egelrud. 2003. Transgenic mice over-expressing a serine protease in the skin: evidence of interferon gamma-independent MHC II expression by epidermal keratinocytes. *Acta Derm. Venereol.* 83:322–327.

59. Allakhverdi, Z., M.R. Comeau, H.K. Jessup, B.R. Yoon, A. Brewer, S. Chartier, N. Paquette, S.F. Ziegler, M. Sarfati, and G. Delespese. 2007. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J. Exp. Med.* 204:253–258.
60. Moormann, C., M. Artuc, E. Pohl, G. Varga, J. Buddenkotte, N. Vergnolle, R. Brehler, B.M. Henz, S.W. Schneider, T.A. Luger, and M. Steinhoff. 2006. Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells. *J. Invest. Dermatol.* 126:746–755.
61. Fields, R.C., J.G. Schoenecker, J.P. Hart, M.R. Hoffman, S.V. Pizzo, and J.H. Lawson. 2003. Protease-activated receptor-2 signaling triggers dendritic cell development. *Am. J. Pathol.* 162:1817–1822.
62. Miike, S., A.S. McWilliam, and H. Kita. 2001. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J. Immunol.* 167:6615–6622.
63. Temkin, V., B. Kantor, V. Weg, M.L. Hartman, and F. Levi-Schaffer. 2002. Tryptase activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. *J. Immunol.* 169:2662–2669.
64. Reche, P.A., V. Soumelis, D.M. Gorman, T. Clifford, M. Liu, M. Travis, S.M. Zurawski, J. Johnston, Y.J. Liu, H. Spits, et al. 2001. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J. Immunol.* 167:336–343.
65. Demehri, S., Z. Liu, J. Lee, M.H. Lin, S.D. Crosby, C.J. Roberts, P.W. Grigsby, J.H. Miner, A.G. Farr, and R. Kopan. 2008. Notch-deficient skin induces a lethal systemic B-lymphoproliferative disorder by secreting TSLP, a sentinel for epidermal integrity. *PLoS Biol.* 6:e123.
66. Liu, Y.J. 2006. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 203:269–273.
67. Barrandon, Y., V. Li, and H. Green. 1988. New techniques for the grafting of cultured human epidermal cells onto athymic animals. *J. Invest. Dermatol.* 91:315–318.
68. Rheinwald, J.G., and H. Green. 1977. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature.* 265:421–424.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Briot et al., <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20082242/DC1>

## Supplemental materials and methods

## Casein gel zymography.

Epidermis from E19.5 embryos and grafted skin were crushed in 1 M of acetic acid. Protease extraction and casein gel zymography assay were performed as previously described (Hewett, D.R., A.L. Simons, N.E. Mangan, H.E. Jolin, S.M. Green, P.G. Fallon, and A.N. McKenzie. 2005. *Hum. Mol. Genet.* 14:335–346). 0.1 mM leupeptin (Euromedex) was added in the sample before and after electrophoresis.

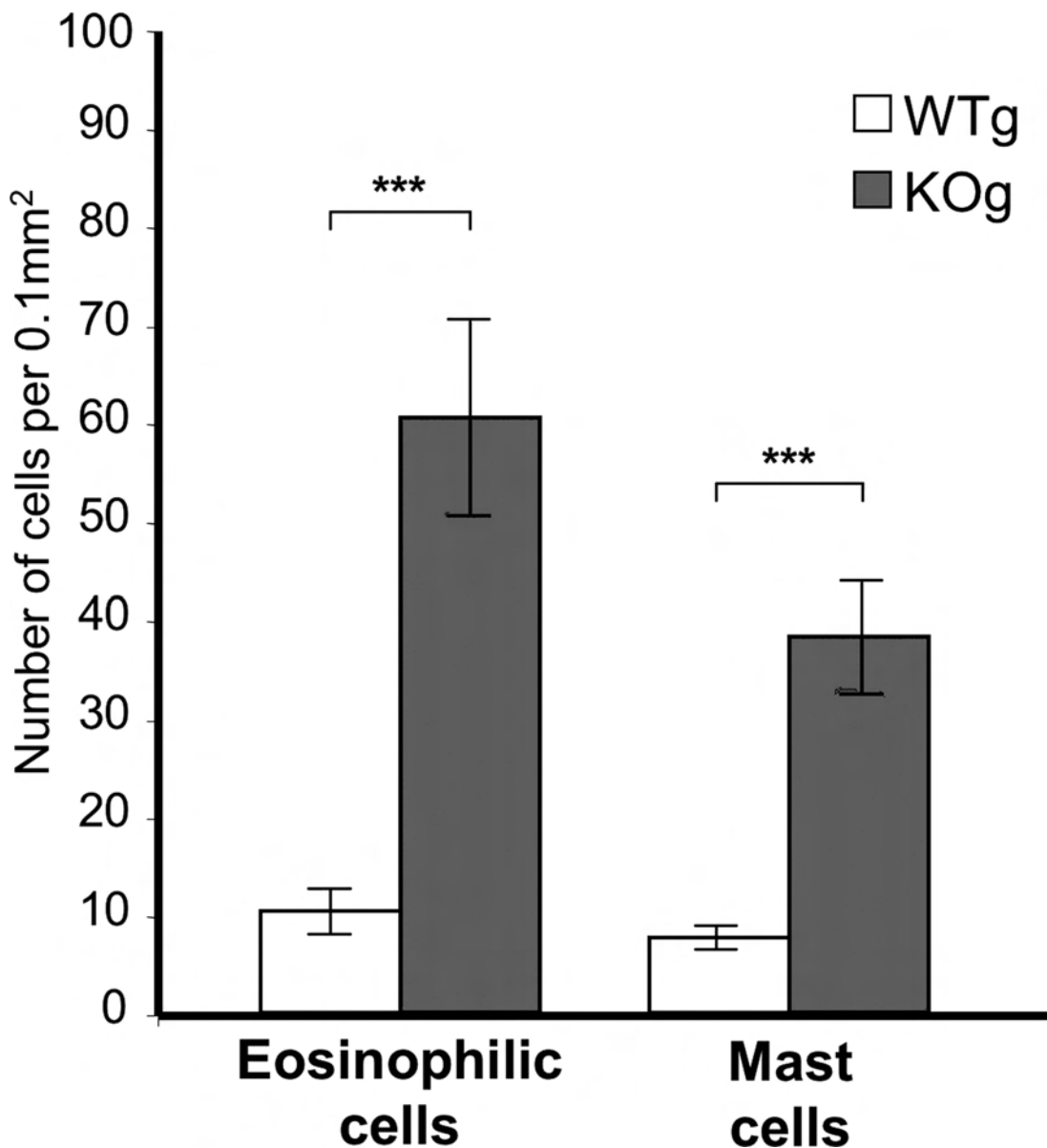


Figure S1. Inflammatory cells in *Spink5*<sup>-/-</sup> grafted skin. Eosinophilic cells and mast cells were counted per surface unit in WT (WTg) and *Spink5* KO (KOg) grafted dermis. Eosinophilic and mast cells were increased by six- and fourfold, respectively, in *Spink5*<sup>-/-</sup> skin compared with WT. For each animal, 10 microscopic fields were analyzed. Results represent means  $\pm$  SD. Data are representative of two independent experiments, each including two WT and two KO grafted skins. \*\*\*,  $P < 0.001$ .



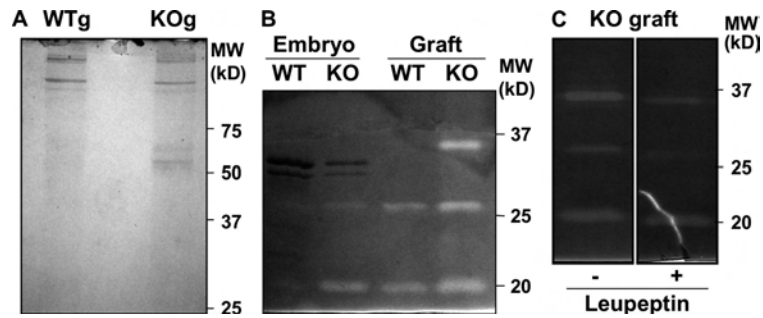


Figure S2.  $\beta$ 1-tryptase hyperactivity in *Spink5*<sup>-/-</sup> graft. (A) Loading control of  $\beta$ 1-tryptase Western blotting in WT (WTg) and *Spink5*<sup>-/-</sup> (KOg) grafted skin. Equal amounts of proteins extracted in acetic acid from WT and KO grafts were stained with Coomassie blue, and the intensity of detected bands was quantified by ImageJ software (version 1.63; National Institutes of Health). Western blotting is representative of three independent experiments, each including two WTg and two KOg. (B) Epidermal samples of WT and *Spink5*<sup>-/-</sup> embryos or grafted skin were analyzed on casein gel zymography at pH 8. Two major bands, at 20 kD, corresponding to KLK7, and around 30 kD, relative to the comigrated KLK5 and unknown protease activities, were detected in the WT graft. These activities were increased in the KO graft and an additional activity was detected at 34 kD. The results are representative of four independent experiments including at least two WTg and two KOg. (C) Inhibition test in the presence (+) of 0.1 mM leupeptin induces a decrease of the 30- and 34-kD band intensity. The data represent two independent experiments in which two WTg and two KOg were analyzed.

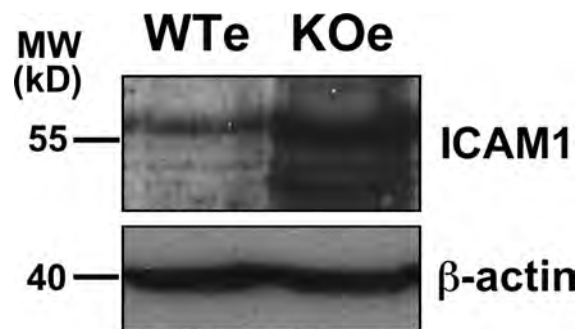


Figure S3. Early proinflammatory signals in *Spink5*<sup>-/-</sup> skin embryos. Western blot analysis on WT (WTe) and *Spink5*<sup>-/-</sup> (KOe) protein extracts confirms ICAM1 increase in *Spink5*<sup>-/-</sup> embryo skin.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Western blotting is representative of two independent experiments each including two WTe and two KOe.

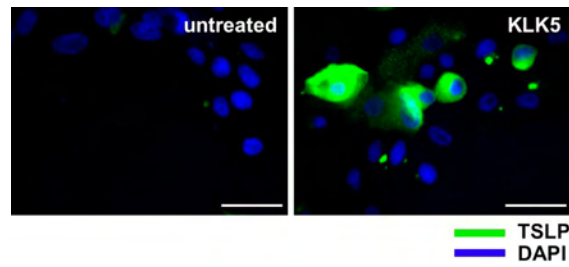


Figure S4. KLK5-induced TSLP overexpression in NHK. NHKs were treated with 400 nM of recombinant KLK5, and protein secretion was blocked using 10  $\mu\text{g/ml}$  brefeldin A. Cells were fixed and stained with anti-TSLP antibody (green). Blue staining (DAPI) indicates nuclei. The number of TSLP-positive cells and fluorescence intensity increased after KLK5 treatment compared with untreated cell (counted on six fields for each; 45 vs. 15% of stained cells), which is consistent with overexpression of TSLP at the protein level. The distinct patterns of cytoplasmic TSLP staining (punctuated vs. diffuse and intense) could result from differences in brefeldin A blockage, differentiation state, and/or PAR2 expression in keratinocytes. Pictures presented are representative of three independent experiments. Bars, 49  $\mu\text{m}$

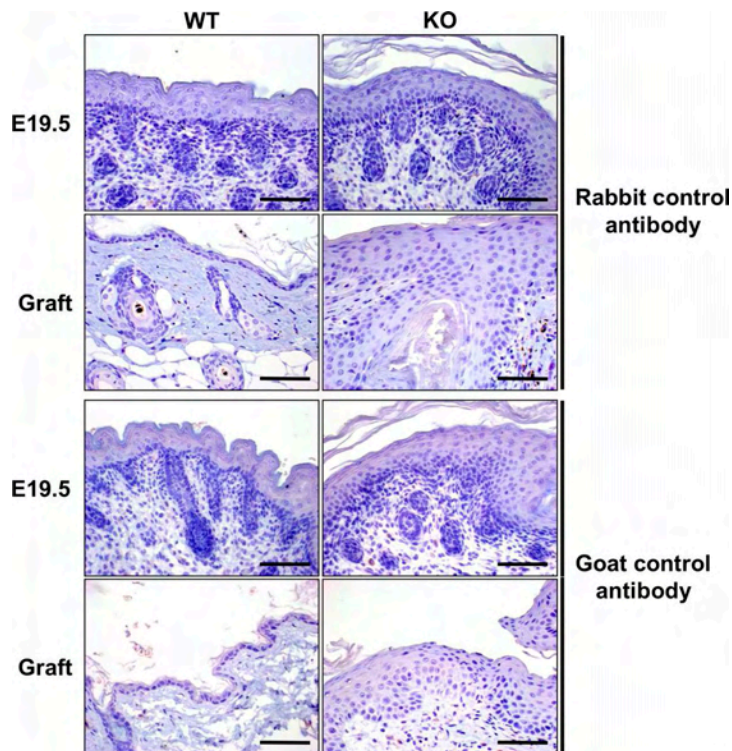


Figure S5. Control antibody for the immunohistochemistry experiments. Immunohistochemistry on skin cross sections from WT and *Spink5*<sup>-/-</sup> (KO) E19.5 embryo and grafts, using rabbit or goat control antibody. Each result is representative of three independent experiments including at least one WT and one KO graft or embryo. Bars, 11.5  $\mu\text{m}$ .

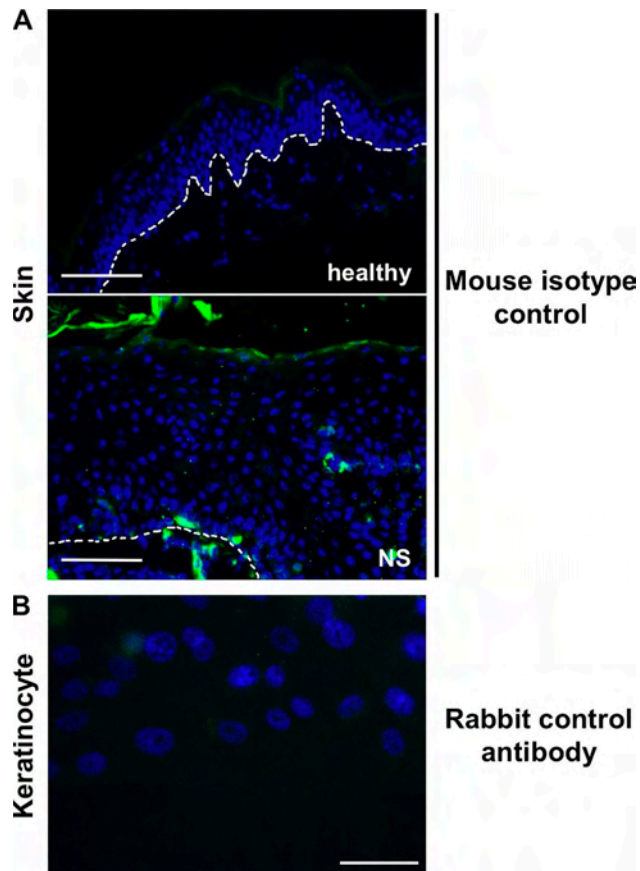


Figure S6. Control antibody for the immunofluorescence experiments. (A) Immunofluorescence experiment performed on skin cross sections from an NS patient and a healthy control (healthy), using mouse IgG2a isotype control antibody. Results are representative of two independent experiments in which two healthy and four NS skins were analyzed. Bars, 11.5  $\mu$ m. (B) Immunofluorescence experiment performed on keratinocytes from an NS patient using rabbit control antibody. Blue staining (DAPI) indicates nuclei. Immunostaining experiments with the rabbit control antibody were repeated in three independent experiments on NS keratinocytes. Bar, 49  $\mu$ m

Table S1. Primary antibodies

Target protein	Ig Type (clone)	Application	Purchased from
Mouse $\beta$ 1-tryptase	Goat IgG	WB and IHC	R&D Systems
Mouse ICAM1	Goat IgG	IHC	R&D Systems
Mouse TSLP	Goat IgG	IHC	R&D Systems
Human and mouse PAR2	Rabbit IgG	IHC	Novus Biologicals
Mouse IL-1 $\beta$	Goat IgG	WB and IHC	Abcam
Human KLK5	Rabbit IgG	WB	Abcam
Mouse KLK10	Rabbit IgG	IHC	Covance
Mouse KLK14	Rabbit IgG	IHC	Covance
Mouse involucrin	Goat IgG	IHC	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Mouse desmoglein 1	Rabbit IgG	IHC	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Human TSLP	Rabbit IgG	ICF	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Human TSLP	Mouse IgG2a (258136)	IF	R&D systems
Human laminin 5	Mouse IgG1 (P3H9-2)	WB	Millipore
Rabbit Ig control	Rabbit Ig	IHC and ICF	Invitrogen
Goat IgG control	Normal goat IgG	IHC	Invitrogen
Mouse isotype control	Mouse IgG2a and $\kappa$	IF	BD

WB, Western blotting; IHC, immunohistochemistry; ICF, Immunocytofluorescence; IF, immunofluorescence.

Table S2. Primer sequences for murine and human cDNA amplification

Target cDNA	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	Amplicon size <i>bp</i>
Mouse <i>Hprt</i>	CTGGTTAAGCAGTACAGCCCAA	CGAGAGGTCCTTTTACCAGC	65
Mouse <i>Il-1<math>\beta</math></i>	GGGCCTCAAAGGAAAGAATC	TACCAGTTGGGAAACTCTGC	183
Mouse <i>Tslp</i>	CGACAGCATGGTTCTTCTCA	CGATTGCTCGAACTTAGCC	170
Mouse <i>Icam1</i>	AGGGCTGGCATTGTTCTCTA	CTCAGAGGCAGGAAACAGG	158
Mouse <i>Par2</i>	TCTCTGCACCAATCACAAAGC	CTTAGCCTTCTGCCAGGTG	217
Mouse <i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	CCCCAAAGGGATGAGAAGTT	CACTTGGTGGTTTGTACGA	132
Mouse <i>Tarc</i>	AGTGGAGTGITCCAGGGATG	CTGGTCACAGGCCGTTTAT	193
Mouse <i>Mdc</i>	TTCTTGCTGGCAATTCAG	GCAGGATTTGAGGTCCAGA	140
Human <i>HPRT</i>	GCCCTGGCGTCGTGATTAGT	AGCAAGACGTTTCAGTCTGTC	136
Human <i>TSLP</i>	GAGTGGGACCAAAAGTACCG	TGGGCACCAGATAGCTAAGG	169
Human <i>PAR2</i>	TGATTACATGGCCAATCTG	ACCCAATACCTCTGCACACT	196
Human <i>ICAM1</i>	ACCGGAAGGTGTATGAACTG	AGCGTAGGTAAGGTTCTTG	180
Human <i>KLK5</i>	AGTCAGAAAGGTGCGAGGA	TAATCTCCCCAGGACACGAG	155
Human <i>IL-1<math>\beta</math></i>	GGACAAGCTGAGGAAGATGC	TCGTTATCCCATGTGTCGAA	120
Human <i>IL8</i>	AAGAAACCACCGAAGGAAC	ACTCCTTGGCAAACTGCAC	123
Human <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	TGAGGTACAGGCCCTCTGAT	134
Human <i>TARC</i>	AGCCATCCCTTAGAAAGC	CTGCCCTGCACAGTTACAAA	90
Human <i>MDC</i>	CGCGTGGTGAACACTTCTA	GCTTCTATTGGCTCAGCTT	146





## **Partie 2 : Rôle de PAR2 dans le développement de l'inflammation secondaire à l'absence de LEKTI**

### **Article 2: *PAR2, is as sensor of protease hyperactivity which induces early proallergic signal in Spink5-deficient mice.***

Dans cet article, nous avons étudié le rôle de PAR2 dans le développement du phénotype inflammatoire des souris *Spink5*<sup>-/-</sup>. Pour cela nous avons obtenu, par croisement, des souris double knockout *Spink5*<sup>-/-</sup>/*Par2*<sup>-/-</sup> (DKO). Dès la naissance les souris DKO reproduisent le phénotype cutané des souris *Spink5*<sup>-/-</sup>. Parmi ces anomalies, les DKO présentent une érosion cutanée semblable à celle observée chez les nouveau-nés *Spink5*<sup>-/-</sup>. Malgré la persistance du décollement de la couche cornée chez les DKO, TSLP n'est pas détectable dans leur épiderme au jour 19,5 du développement embryonnaire, confirmant le rôle de PAR2 dans l'induction de cette cytokine pro-Th2 *in vivo*. L'analyse transcriptionnelle des gènes cibles de la voie KLK5-PAR2 confirme la diminution de l'expression de *Tslp* et de *Tnf* dans les DKO par rapport aux *Spink5*<sup>-/-</sup>. L'expression de *Icam1* n'est quant à elle pas significativement différente entre ces 2 animaux suggérant la mise en jeu d'autres mécanismes secondaires à l'absence de LEKTI. Afin de déterminer si l'absence de PAR2 dans un contexte de déficience en LEKTI est suffisante pour reverser le phénotype inflammatoire de la peau adulte *Spink5*<sup>-/-</sup>, nous avons greffé la peau des DKO sur des souris immunodéficientes (nude). Après 6 semaines, les greffes DKO et *Spink5*<sup>-/-</sup> apparaissent identiques. Elles sont alopeciques, érythémateuses et recouvertes de squames épaisses. L'étude histologique révèle la présence d'un infiltrat inflammatoire composé de polynucléaires éosinophiles et de mastocytes dans les deux cas. Néanmoins, les mastocytes sont moins nombreux dans les greffes DKO comparés aux *Spink5*<sup>-/-</sup>. L'absence de PAR2 n'est cependant pas suffisante pour inhiber à long terme le phénotype inflammatoire en l'absence de LEKTI. Bien que la signalisation pro-allergique soit inhibée pendant les premiers jours de vie des DKO, le défaut de barrière cutanée persistant pourrait participer au développement de l'inflammation cutanée. Ainsi la voie KLK5-PAR2-TSLP pourrait être considérée comme un mécanisme précoce pouvant rendre compte du développement d'une dermatite atopique intrinsèque, sans exposition à un allergène. Le défaut de barrière

cutanée pourrait quant à lui favoriser le développement de lésion de type dermatite atopique extrinsèques.



***PAR2 is a sensor of protease hyperactivity which induces early proallergic signal in *Spink5*-deficient mice.***

The epidermis provides the first barrier protecting the body against penetration of harsh agents from the environment. Skin injury, danger signal and epidermal barrier dysfunction lead to complex mechanisms triggering activation of keratinocytes which express and secrete a wide range of proinflammatory molecules (Nickoloff *et al.* 1994). Loss of skin barrier function is thought to favor the development of atopic dermatitis (AD). A recent mouse model for this most common allergic disease support this notion. The mouse bearing mutation in *Filaggrin* gene, develops severe dermatitis lesions, following exposition to experimental allergen (Fallon *et al.* 2009). Although the primary defect of skin barrier function could facilitate the penetration of allergens, inducing severe skin inflammatory reaction and hyper-immunoglobulinemia E as observed in Netherton syndrome (NS, OMIM 256500) (Comel 1949; Netherton 1958), other ichthyosis with skin barrier defect do not exhibit constant atopic manifestations. This observation suggests most specific mechanisms which could induce allergic response. NS is a rare and severe genodermatosis due to mutation in *SPINK5* gene, encoding the protease inhibitor LEKTI (Chavanas *et al.* 2000). LEKTI-deficiency causes epidermal serine proteases hyperactivity. Among them, kallikreins (KLK) 5 and 7 degrade desmosomes, leading to premature detachment of the *stratum corneum* and impairment of epidermal barrier function (Descargues *et al.* 2005). We recently demonstrated that hyperactive KLK5 could also directly induce the expression of proinflammatory (TNF , ICAM1) and proallergic (TSLP) molecules through Proteinase Activated Receptor 2 (PAR2) activation (Briot *et al.* 2009). The pro-Th2 cytokine TSLP (Thymic Stromal LymphoPoietin) is a major actor of allergic inflammation, overexpressed in AD lesional skin (Soumelis *et al.* 2002). TSLP is necessary and sufficient to induce eczematous lesions and systemic Th2 response, in the absence of exogenous allergen (Yoo *et al.* 2005). We have shown that NS keratinocytes overexpressed TSLP secondary to KLK5 hyperactivity (Briot *et al.* 2009). This signal, already present in *Spink5*<sup>-/-</sup> embryos, is a cell-autonomous process which is likely to play a role in the development of AD-like lesions in NS. To further explore the role of the KLK5-PAR2 pathway *in vivo* in the induction of TSLP

expression, we have generated double knockout mice for *Spink5* and *Par2* (DKO). We crossed C57Bl/6 *Spink5*<sup>+/+</sup> mice with *Par2*<sup>-/-</sup> mice (Lindner *et al.* 2000) and then intercrossed viable *Spink5*<sup>+/-</sup>/*Par2*<sup>-/-</sup> animals to obtain DKO mice. *Par2* deletion, in a *Spink5*<sup>-/-</sup> context, does not abrogate the severe cutaneous phenotype of newborn mice. Indeed, DKO newborn mice exhibit skin erosions and vibrissae abnormalities as seen in *Spink5*<sup>-/-</sup> mice and undergo rapid postnatal lethality due to severe skin barrier defect (Figure 1A). To disregard an indirect effect linking environmental injury and *stratum corneum* detachment to the expression of proinflammatory and proallergic molecules, we analysed skin from embryos delivered by caesarean at E19.5. Histological examination of skin cross-sections revealed *stratum corneum* detachment and moderate acanthosis in *Spink5*<sup>-/-</sup> and DKO embryos (Figure 1C, E). In contrast, *Par2*<sup>-/-</sup> skin appears similar to wild type (WT) skin (Figure 1D, B). This suggests that PAR2 signaling does not affect epidermal homeostasis in basal condition and that PAR2 absence does not abrogate hyperactivity of epidermal proteases leading to the *stratum corneum* detachment in the absence of LEKTI. To decipher whereas PAR2 could affect the expression of proinflammatory molecules, we performed immunohistochemistry experiments to detect TSLP and ICAM1, that we previously shown to be induced by KLK5-PAR2 signaling (Briot *et al.* 2009). We confirmed that TSLP was not detected in the WT epidermis nor in *Par2*<sup>-/-</sup> epidermis (Figure 1F, H), whereas it was strongly produced in the epidermis of *Spink5*<sup>-/-</sup> animals (Figure 1G). In DKO epidermis, TSLP staining was poorly detected (Figure 1I). ICAM1 staining was restricted to the basal layer of WT and *Par2*<sup>-/-</sup> skin (Figure 1J, L), and extended to suprabasal layers in *Spink5*<sup>-/-</sup> and DKO epidermis (Figure 1K, M). We then analyzed by quantitative RT-PCR, the transcriptional expression of previously identified target genes of KLK5-PAR2 signaling (*Tslp*, *Tnf* and *Icam1*) (Briot *et al.* 2009). At E19.5, *Tslp* was highly overexpressed in *Spink5*<sup>-/-</sup> skin, as previously observed and could be comparable to an ON/OFF induction relatively to WT mice skin. In DKO skin, despite an increased in *Tslp* mRNA, this induction only reached 10 percent of the one observed in *Spink5*<sup>-/-</sup> skin confirming the immunohistological observation. *Tnf* mRNA increase in DKO was 70 percent less important than in *Spink5*<sup>-/-</sup> (4.8 and 15.3 fold induced respectively, relative to WT). The expression of third target gene, *Icam1*, variably induced in *Spink5*<sup>-/-</sup> mice, was not significantly different from DKO mice (Figure 1N). Altogether these results demonstrate that *Tslp* and *Tnf* expression is highly dependent on the KLK5-PAR2

pathway, whereas *Icam1* expression may be affected by other signaling cascades secondary to LEKTI deficiency. These data were confirmed in newborn mice. Interestingly, *Par2* depletion in newborn mice amplifies the differences between *Spink5*<sup>-/-</sup> and DKO (Data not shown). This supports the possibility that these molecules are more dependent on PAR2 signaling, in a direct and indirect way, rather than the consequence of *stratum corneum* detachment in the first stage of life.

In order to determine whether inhibition of the KLK5-PAR2 signaling is sufficient to reverse the inflammatory phenotype previously observed in *Spink5*<sup>-/-</sup> adult skin (Briot *et al.* 2009), we grafted E19.5 skin on nude mice. Six weeks after grafting, WT and *Par2*<sup>-/-</sup> grafts were covered with normal hair, whereas *Spink5*<sup>-/-</sup> and DKO grafted skin appeared erythematous, scaly and alopecic (Figure 2A). Histological examination revealed that both *Spink5*<sup>-/-</sup> and DKO grafted skin exhibit acanthosis with papillomatosis. Their *stratum corneum* was hyperkeratotic and contained residual nuclei (parakeratosis) and accumulated cells that could correspond to infiltrate immune cells (Figure 2C, E). Toluidin blue staining revealed that, in *Spink5*<sup>-/-</sup> and DKO grafts (Figure 2G, I), mast cells were more numerous than in WT and *Par2*<sup>-/-</sup> grafts dermis (Figure 2F, H). Although DKO graft dermis was infiltrated by mast cells, they were fewer in number than in *Spink5*<sup>-/-</sup> graft dermis (3.9 and 7.5 fold increased respectively compared to WT) (Figure 2J). These data highlight the fact that *Par2* deletion is not sufficient to completely abolish inflammation in a LEKTI-deficiency context. This could be due to *stratum corneum* detachment and/or residual expression of proinflammatory and proallergic molecules, secondary to proteases hyperactivity. This work showed that several mechanisms trigger skin inflammation, including those resulting from skin barrier defect and other hyperactivated proteases (Descargues *et al.* 2005). To conclude we showed the role of KLK5-PAR2 signaling as an early inducer of proinflammatory and proallergic signals *in vivo*. It is likely that KLK5-PAR2-TSLP cascade is implicated in the development of intrinsic atopic dermatitis observed at birth as well as in young infants. In addition to this biological signaling, skin integrity is essential to protect against environmental stimuli that could trigger extrinsic atopy secondary to epidermal barrier defect. Thus, therapeutic development might consider the two side of the disease, including skin barrier impairment and immunological disorder. Indeed it appears that rescue one of them is not sufficient to significantly improve clinical phenotype.

## Figure Legends

### **Figure 1- In a *Spink5*<sup>-/-</sup> context, *Par2* deficiency does not rescue *stratum corneum* cohesion but inhibits TSLP and TNF expression in mice embryos.**

(A) At birth, *Spink5*<sup>-/-</sup> and double knockout (DKO) mice exhibit skin erosions (arrows, right enlargement) and vibrissae abnormalities (left enlargement). *Par2*<sup>-/-</sup> mice appear similar to wild type (WT) mice. (B-E) Hematoxylin/eosine staining of skin cross-sections from mice at embryonic day 19.5. *Par2*<sup>-/-</sup> skin (D) is similar to WT skin (B). *Spink5*<sup>-/-</sup> (C) and DKO epidermis show slight acanthosis and *stratum corneum* detachment from the underlying granular layer (E). (F-M) Immunohistochemistry experiment of E19.5 mice skin cross-sections. TSLP is not detected in WT and *Par2*<sup>-/-</sup> epidermis (F, H), is poorly detected in DKO epidermis (I), whereas it is strongly expressed in *Spink5*<sup>-/-</sup> epidermis (G). ICAM1 staining is restricted to the membrane of basal keratinocytes in WT and *Par2*<sup>-/-</sup> epidermis (J, L). In *Spink5*<sup>-/-</sup> and DKO epidermis, ICAM1 staining is extended to suprabasal keratinocytes (K, M). (N) Quantitative RT PCR analyses were performed on total RNA extracted from E19.5 skin. *Tslp*, *Tnf* and *Icam1* mRNA were quantified and expressed as relative fold increase compared to wild type mice (n=2).

Scale bare: (B-M): 9.2 μm

### **Figure 2- In a *Spink5*<sup>-/-</sup> context, *Par2* deficiency does not improve adult skin phenotype.**

Skin from E19.5 mice was grafted onto nude mice for 6 weeks. WT and *Par2*<sup>-/-</sup> grafted skin became covered with normal hair. *Spink5*<sup>-/-</sup> and DKO grafts developed scaly, erythematous and alopecic lesions (A). On histological examination after hematoxylin/eosin coloration, WT and *Par2*<sup>-/-</sup> grafted skin were similar to normal adult skin (B, D). In contrast, *Spink5*<sup>-/-</sup> and DKO grafted epidermis exhibited a severe phenotype with acanthosis, papillomatosis, loss of adhesion of the *stratum corneum*, which was hyperkeratotic and parakeratotic. Inflammatory infiltrates were present in the dermis and cell aggregates were observed in the *stratum corneum* (C, E). (F-I) Grafted skin cross-sections were colored by toluidin blue to detect mast cells colored in scarlet. In the dermis WT and *Par2*<sup>-/-</sup> grafts, mast cells are rare (F, H). In contrast, mast cells are increased in number, in the dermis *Spink5*<sup>-/-</sup> graft (G) and in a lesser extent in DKO graft (I). (J) Mast cells infiltrated in grafted skin were counted

per dermal surface unit. For each genotype, 10 microscopic fields were analyzed. The number of mast cell is similar in WT and *Par2*<sup>-/-</sup>. In *Spink5*<sup>-/-</sup> grafted skin, mast cell number was increased by 7.5 fold whereas it was increased by 3.9 fold in DKO relatively to WT.

Scale bare: (B-E): 36.8  $\mu$ m; (F-I): 9.2  $\mu$ m

FIGURE 1

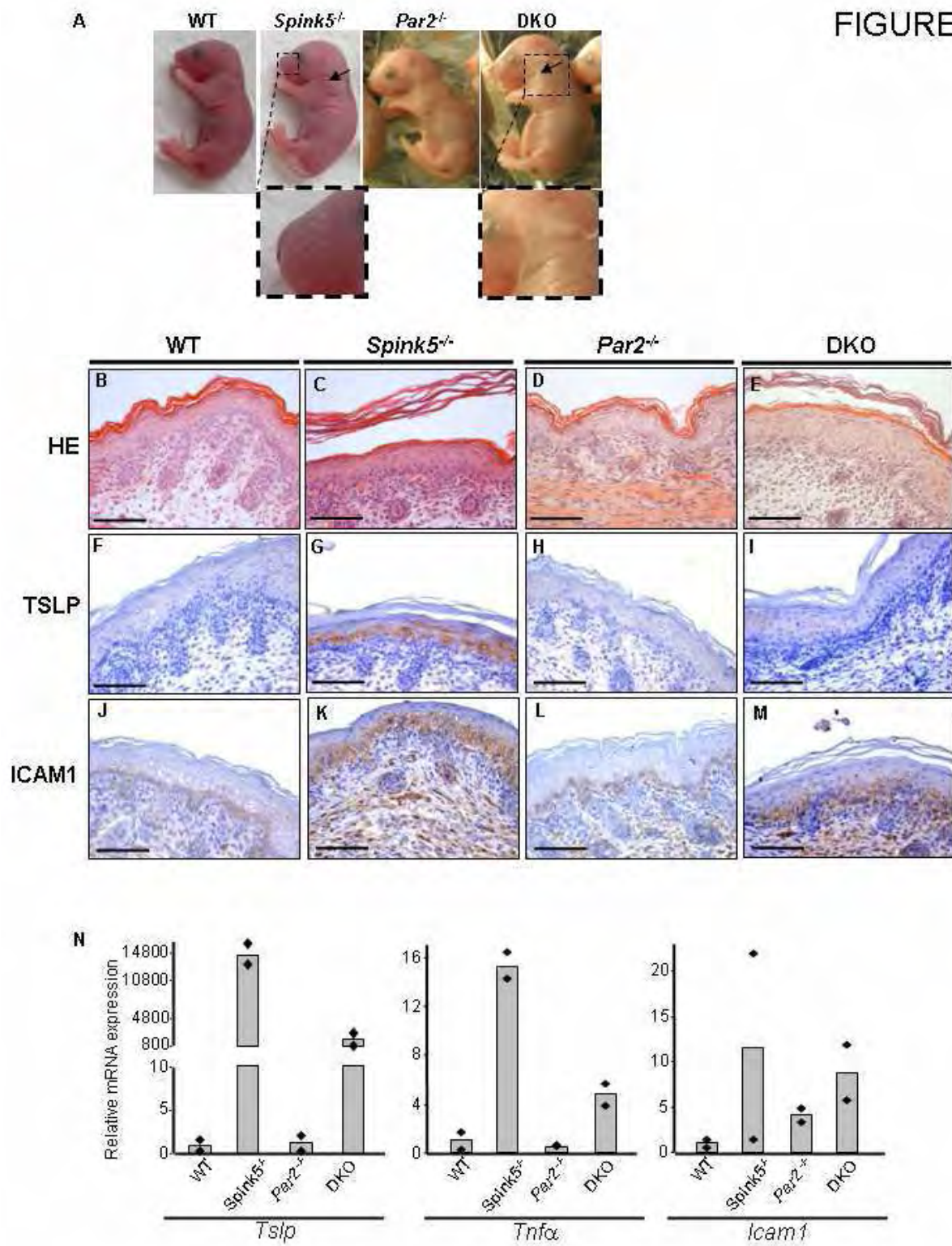
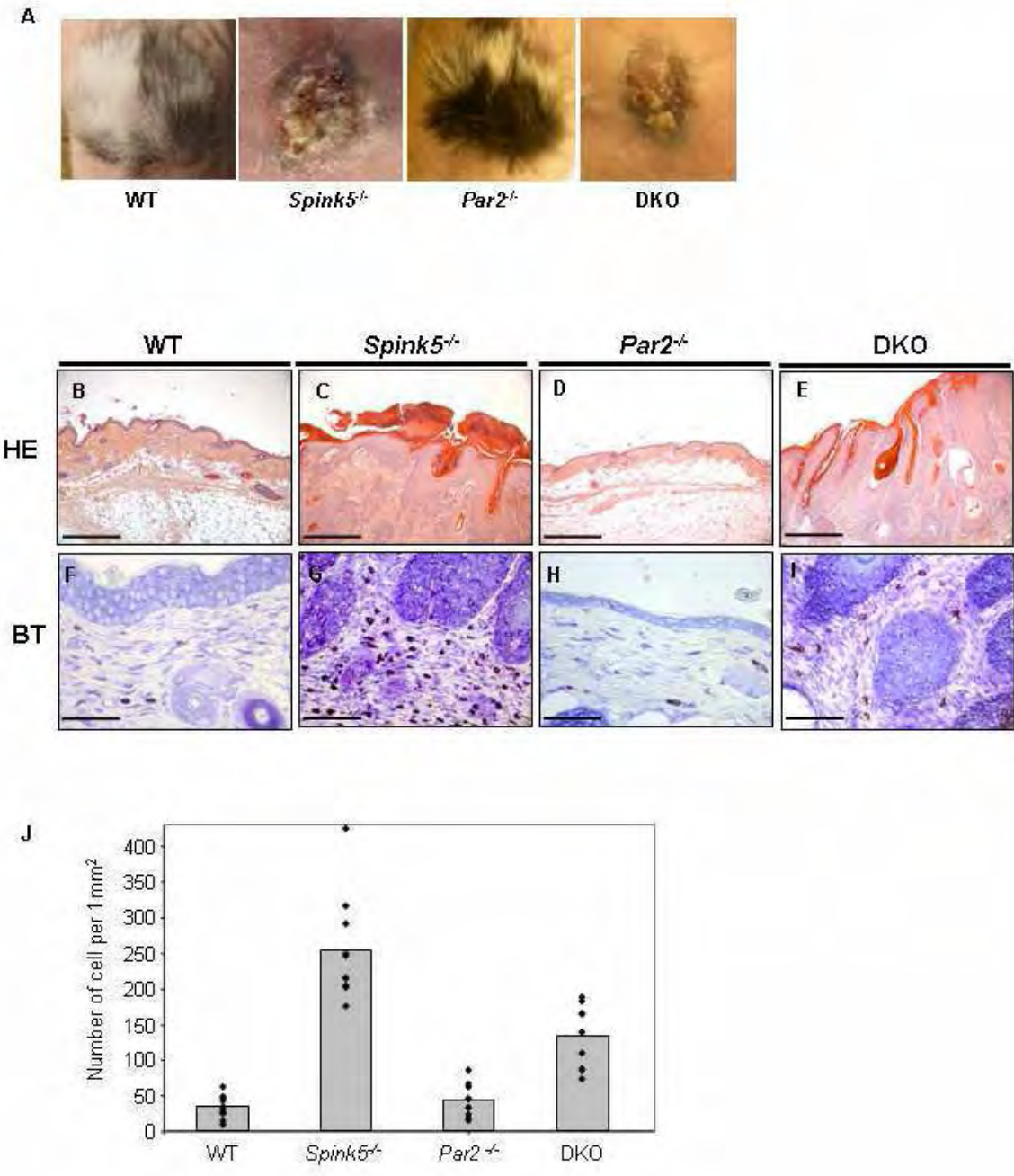


FIGURE 2



## References

- Briot, A., *et al.* (2009). "Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome." J Exp Med 206(5): 1135-47.
- Chavanas, S., *et al.* (2000). "Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome." Nat Genet 25(2): 141-2.
- Comel, M. (1949). "Ichtyosis Linearis circumflexa." Dermatologica 98: 133-136.
- Descargues, P., *et al.* (2005). "Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity." Nat Genet 37(1): 56-65.
- Fallon, P. G., *et al.* (2009). "A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming." Nat Genet 41(5): 602-8.
- Lindner, J. R., *et al.* (2000). "Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice." J Immunol 165(11): 6504-10.
- Netherton, E. W. (1958). "A unique case of Trichorrexia Invaginata." Arch. Dermatol. 78: 483-487.
- Nickoloff, B. J., *et al.* (1994). "Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin." J Am Acad Dermatol 30(4): 535-46.
- Soumelis, V., *et al.* (2002). "Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP." Nat Immunol 3(7): 673-80.
- Yoo, J., *et al.* (2005). "Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin." J Exp Med 202(4): 541-9.



## **Partie 3 : Etude de la réponse immunitaire chez les patients atteints du syndrome de Netherton**

### **Résumé :**

Ce projet vise à comprendre comment la perte d'expression de LEKTI conditionne la survenue d'allergies et vraisemblablement d'un biais de différenciation des lymphocytes T (LT) en faveur des LTh2. Bien que le défaut de barrière cutanée, résultant de la dégradation des structures d'adhésion inter-cornéocytaires par les protéases cibles de LEKTI puisse favoriser la pénétration d'allergènes et expliquer le développement de l'atopie, un rôle plus direct de LEKTI est envisagé. Cette hypothèse est renforcée par plusieurs observations. D'une part, le syndrome de Netherton est une des rares ichtyoses à présenter des manifestations allergiques constantes (55, 59). D'autre part, nos travaux récents, effectués chez la souris *Spink5*<sup>-/-</sup> et chez l'homme, ont permis de mettre en évidence une nouvelle cascade signalétique intrinsèque aux kératinocytes déficients pour LEKTI. Cette voie de signalisation, directement induite par la kallikréine 5 hyperactive, est responsable de l'expression de molécules pro-inflammatoires (TNF , ICAM1) et pro-Th2 (TSLP), indépendamment des stimuli environnementaux (368). Enfin, LEKTI est exprimée au niveau des corpuscules de Hassal du thymus (70) et il existe une association génétique de polymorphismes de *SPINK5* et le risque accru de développement de la dermatite atopique et de l'asthme allergique (85). L'ensemble de ces observations suggère un rôle de cet inhibiteur de protéases dans la régulation du système immunitaire.

Les données de la littérature concernant la réponse immunitaire des patients atteints du SN sont peu claires, anciennes et ne prennent en compte qu'un nombre très réduit de patients. L'objectif de ce projet est donc d'étudier les conséquences de l'absence de LEKTI sur le phénotype et les propriétés fonctionnelles des lymphocytes des patients atteints de cette maladie. Pour cela, nous étudierons le profil d'expression cytokinique des cellules mononucléées périphériques (PBMC) et des LT CD4<sup>+</sup> des patients. Nous chercherons à déterminer la proportion de cellules Th2 destinées à migrer vers la peau et également à caractériser l'inflammation cutanée présente chez les patients SN.



## Projet

Cette étude est réalisée dans le cadre d'un protocole clinique obtenu auprès du CCPPRB (Comité Consultatif de Protection des Personnes se prêtant à des Recherches Biomédicales) du CHU de Toulouse et de la CNIL (Commission Nationale de l'Information et des Libertés). Ce protocole nous permet la constitution d'une banque d'ADN, de biopsies cutanées et de leucocytes de patients. Il inclut également un dosage systématique des immunoglobulines E (IgE) totales et spécifiques réalisé dans le cadre d'une consultation médicale.

### **1- Polarisation de la réponse T : analyse transcriptionnelle et sécrétion de cytokines**

Les manifestations atopiques font partie de la triade clinique caractérisant le syndrome de Netherton (SN, OMIM 256500) (Comel 1949; Netherton 1958). Il n'est donc pas exclu que ces patients présentent une réponse Th2 exacerbée se traduisant par une augmentation de la proportion de cellules sanguines exprimant des cytokines de type Th2.

Dans un premier temps, nous étudierons le profil transcriptionnel des PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) de patients stimulés à la phytohémagglutinine (PHA ; un stimulus polyclonal qui court-circuite le TCR). Le niveau d'expression des cytokines Th2 (IL4 et IL5), de l'IFN (cytokine Th1) et de l'IL10 (cytokine immunomodulatrice) sera analysé par PCR quantitative. De même, celui des facteurs de transcription T-bet (Th1) et GATA3 (Th2) sera quantifié. Afin de normaliser nos données par rapport aux lymphocytes T présents en nombre variable parmi les PBMCs, nous utiliserons comme gène de ménage le CD3 et la chaîne constante du TCR. Ces résultats permettront d'obtenir un aperçu global du profil fonctionnel des cellules immunitaires des patients SN.

Le rôle des cellules Th2 dans le développement des pathologies allergiques est bien connu. Elles sont notamment responsables de la sécrétion des cytokines qui induisent la production d'IgE par les lymphocytes B. Ces données corréleront à l'hyper-

Cytokine	Source lymphocytaire	Quelques Cibles	Effets principaux
IL2	LT	LT LB	Croissance et activation des LT Division des LB
IL3	LT	Cellules souches	Prolifération et différenciation des cellules souches hémaopoiétiques et lymphoïdes
IL4	LTh2	LB	Activation et division Favorise la commutation vers IgG1 et IgE
IL5	LTh2	LB Eosinophiles	Développement et différenciation des LB Activation des éosinophiles
IL6	LTh2	LT LB	Croissance des lymphocytes Différenciation des LB
IL9	LT CD4	LT Mastocytes	Différenciation des LT Induit le développement des mastocytes Potentialise l'IL4 pour la production d'IgG1 et IgE
IL10	LTh2	LTh1 LB	Immunomodulateur Diminution de la production de cytokine Th1 Stimule la maturation et la production d'anticorps
IL13	LTh2	LB Macrophages	Division et différenciation, Sécrétion d'IgE Diminution de la production de cytokine
IL17	LTh17	fibroblastes, kératinocytes, cellules endothéliales, macrophages...	Proinflammatoire
IFN $\gamma$	LTh1	LTh2 Leucocytes	Inhibe l'activité Th2 Favorise l'adhésion et la migration des leucocytes
TNF $\alpha$	LT		Cytokines inflammatoire pleiotropique
TNF $\beta$	LT		Cytokines inflammatoire pleiotropique (moins efficace que le TNF $\alpha$ )

**Tableau 1– Cytokines analysées par la technologie Luminex.**

Le tableau présente les cytokines qui seront analysées dans les surnageants de culture de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Pour chaque cytokine, dans le cas particuliers de notre étude, sont précisés sa source, quelques unes de ses cibles et certains de ses effets biologiques.

IL : Interleukine ; IFN : Interféron ; TNF : Tumor Necrosis Factor ; LT : lymphocyte T ; LB : Lymphocyte B

IgE sérique souvent retrouvée chez les patients SN. Ainsi dans un second temps, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> purifiés à partir du sang des patients seront mis en culture puis stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD3/anti-CD28 afin de stimuler leur prolifération et déterminer leur production en cytokines. La quantification d'un nombre important de cytokines sera réalisée grâce à la technologie Luminex (Moalic *et al.* 2004). Cette technique permet de doser plusieurs analytes dans un volume réduit de surnageant de culture (Tableau 1). Ces résultats, apporteront un aperçu plus spécifique de l'engagement des cellules T CD4<sup>+</sup> vers une réponse Th1 ou Th2. Après stimulation polyclonale anti-CD3/anti-CD28, les lymphocytes T CD4 prolifèrent et produisent des cytokines. Afin de déterminer si les résultats obtenus après quantification des cytokines sont dus à un nombre plus important de LT ou à un même nombre de cellules produisant plus de cytokines, l'état de prolifération de ces cellules sera analysé par incorporation de thymidine tritiée.

Enfin, le plasma des patients sera conservé pour le dosage par ELISA d'autres molécules, notamment TSLP, qui n'est pas produit par les lymphocytes. Cette cytokine pro-Th2 joue un rôle clé dans le développement de la dermatite atopique et de l'asthme allergique, deux pathologies fréquemment développées par les patients SN.

## **2- « Homing » cutanée des LTh2**

La fréquence élevée du développement des lésions de type dermatite atopique chez les patients atteints du syndrome de Netherton laisse supposer un engagement important de lymphocytes essentiellement Th2 vers la peau. Les lymphocytes T ayant reçu un signal de recrutement vers la peau expriment le CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen).

Un autre marqueur, CRTH2 (Chemoattractant Receptor-2-homologous molecule expressed on Th2 cells), est exprimé par les LTh2 humains. Son expression corrèle dans 85% des cas avec la production d'au moins une des cytokines Th2 classiques (IL4, IL5, IL13) et une faible production d'IFN $\gamma$ , après stimulation polyclonale ou par un allergène (Cosmi *et al.* 2000; Nagata *et al.* 1999). Il s'agit d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G qui a pour ligand la prostaglandine D2 produite par les mastocytes activés. Il a été montré que CRTH2 est trouvé essentiellement au sein des populations de lymphocyte T<sub>cm</sub> (central

memory) et que son expression peut être induite par les cellules dendritiques activées par TSLP (Wang *et al.* 2006).

La fréquence des cellules CRTH2<sup>+</sup> représente 0,4 à 6,5 % des LT CD4<sup>+</sup> dans le sang de sujets sains (Nagata *et al.* 1999). Parmi les LT CD4<sup>+</sup> CRTH2<sup>+</sup>, 15 à 45% expriment le CLA et sont donc destinées à migrer vers la peau. Le pourcentage de cellules T CD4<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> est multiplié par un facteur 2 à 4 dans le sang des sujets atteints de dermatite atopique par rapport à un sujet sain (Teraki *et al.* 2000). Ceci suggère fortement que ces lymphocytes engagés dans la voie Th2 et ayant le marqueur de localisation cutanée CLA sont bien impliqués dans la pathologie. Il a de plus été montré que les LT CD4<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> sont en contact étroit avec les cellules dendritiques dans la peau de sujets atteints de dermatite atopique (Wang *et al.* 2006).

Ces lymphocytes pourraient également participer au développement des lésions de dermatite atopique observées chez les patients SN. C'est pourquoi la proportion de cellules périphériques positives pour le TCR, CD4, CRTH2 et CLA sera analysée par cytométrie en flux. Ainsi, nous pourrions déterminer si la fréquence des cellules Th2 destinées à migrer vers la peau est supérieure chez les patients SN par rapport à des sujets sains, révélant ainsi un mécanisme commun avec la dermatite atopique.

### **3- Caractérisation de l'infiltrat inflammatoire cutané**

Les patients atteints du syndrome de Netherton déclenchent fréquemment des lésions eczématiformes, de type dermatite atopique, et érythémateuses (rougeurs reflétant une dilatation des vaisseaux sanguins). De plus, la perte de fonction de barrière cutanée est un stimulus propice au développement de l'inflammation cutanée. Ainsi, nous chercherons à caractériser l'infiltrat inflammatoire des patients SN. Cette caractérisation sera réalisée grâce à des colorations spécifiques telles que l'hématoxyline/éosine qui permet de reconnaître les polynucléaires éosinophiles ou encore le bleu de toluidine qui colore les mastocytes. En parallèle, un ensemble d'anticorps dirigés contre des protéines membranaires des lymphocytes (CD4, CD8, CRTH2...) ou encore des cytokines (IL4, IFN ...) permettra de caractériser l'infiltrat lymphocytaire.

## **Matériel et Méthodes**

### **Protocole clinique**

Nous avons obtenu l'autorisation d'un protocole de recherche clinique par le CCPPRB du CHU de Toulouse délivré le 6 septembre 2007 (promoteur: INSERM, n°C06-51) et par la CNIL le 15 juin 2006. (Annexe 1 )

Les personnes recrutées sont des patients atteints du syndrome de Netherton. Les échantillons sanguins témoins sont obtenus auprès de l'EFS (Etablissement Français du Sang).

### **Purification des PBMCs totaux**

Le sang total de patients et de témoins est collecté sur tube hépariné de 6 ml. Après une première centrifugation à 3000 rpm (tours par minute) pendant 5 min, 1 ml de plasma est récupéré et congelé à -20°C pour l'analyse des cytokines ou chimiokines circulantes.

Les cellules sont resuspendues et le sang total est déposé sur un tube UniSep de 50 ml contenant du ficoll (U-10, Valbiotech). Le volume total est ajusté à 14 ml final avec du PBS (Phosphate Buffer Saline). Après 30 min de centrifugation à 2700 rpm du « Ficoll paque », l'anneau de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) et le plasma sont récupérés et lavés avec du PBS. Les PBMCs sont repris dans du PBS, contenant 5% SVF et comptés sur une cellule de Neubauer. Un million de cellules est isolé pour analyser le niveau d'expression des transcrits et le reste servira à la purification des lymphocytes T.

### **Purification de LT humains**

Les LT sont isolés du reste des PBMCs à l'aide du Kit « Pan T cell Isolation kit II human » (MACs, Miltenyi Biotec). Il s'agit d'une séparation des cellules par un marquage magnétique. Grâce à ce kit, les lymphocytes T sont isolés par appauvrissement en cellules « non-T » (sélection négative) c'est-à-dire : les lymphocytes B, les Natural Killer, les cellules dendritiques, les monocytes, les granulocytes et les cellules érythroïdes.

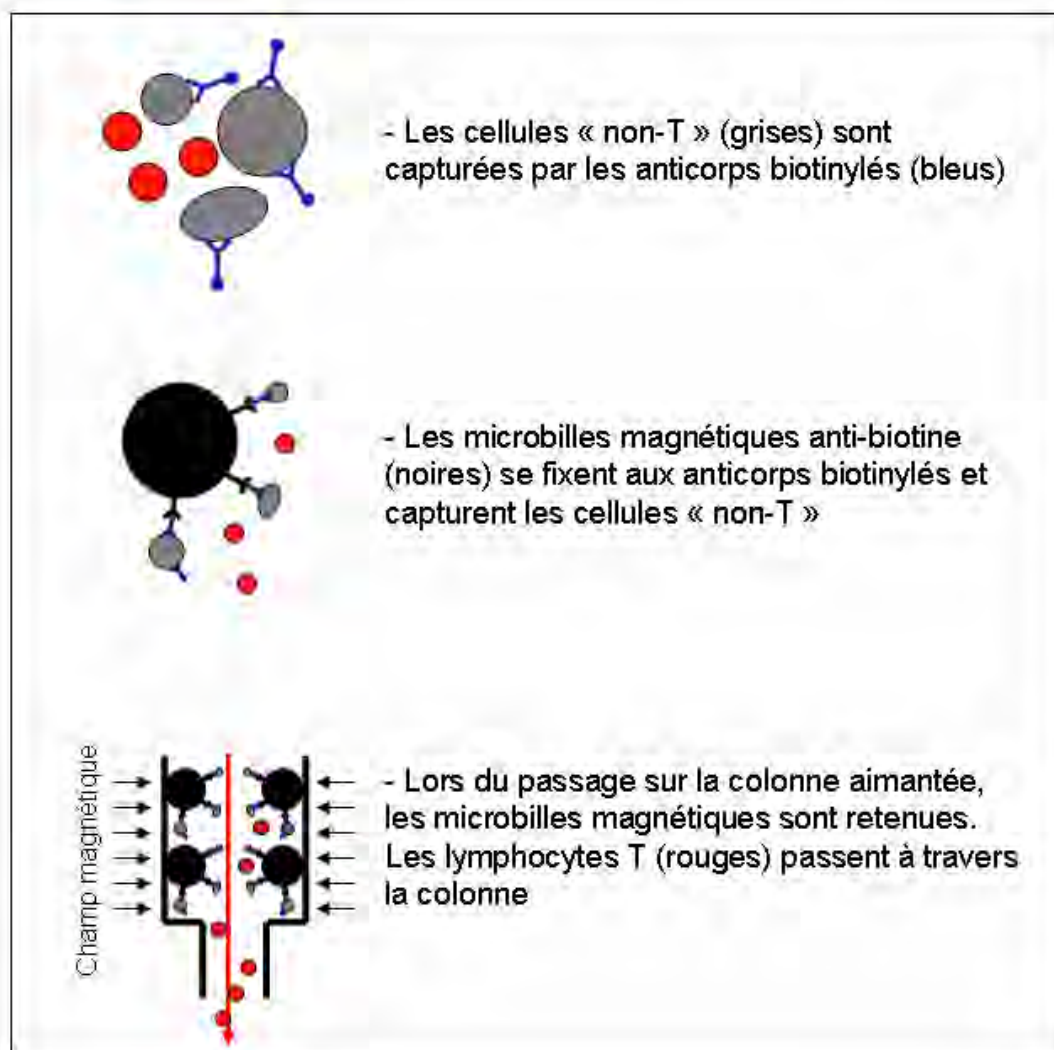


Figure 1- Principe de purification négative des lymphocytes T.



Les PBMCs sont repris dans du PBS contenant 0,5% de BSA (Bovine Serum Albumine) et 2mM d'EDTA. Ils sont alors incubés avec un cocktail d'anticorps biotinylés, pendant 10 min à 4°C. Ces anticorps sont dirigés contre les marqueurs membranaires des cellules « non-T ». Après lavage, des microbilles magnétiques anti-biotine sont ajoutées et l'ensemble est incubé 15 min à 4°C. La purification des lymphocytes T est ensuite réalisée par séparation magnétique. Les suspensions cellulaires, contenant les PBMCs et les anticorps biotinylés complexés aux microbilles, sont déposées sur une colonne aimantée. Seules les cellules non marquées, dans notre cas les lymphocytes T, vont passer à travers la colonne, alors que les autres seront retenues (Figure 1). Cette technique permet généralement de récupérer une population lymphocytaire pure à plus de 80%. Cependant, un excès de globules rouges dans la suspension initiale peut aboutir à une purification moins efficace.

### **Activation à la PHA et analyse des transcrits**

Les PBMC totaux sont préalablement activés avec de la PHA (Phytohémagglutinine). La PHA est une lectine qui a la propriété d'agglutiner les érythrocytes et les leucocytes en se fixant à la surface des cellules immunitaires. Cette fixation est assimilée à un stimulus polyclonal qui court-circuite le TCR et qui induit la prolifération et l'activation des leucocytes.

Pour cela, 500 000 cellules sont cultivées dans 1ml de milieu RPMI contenant 2mM de L-glutamine, 1mM d'acides aminés non essentiels, 5% de SVF, 1mM d'HEPES, 10mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol et des antibiotiques, en présence ou non de PHA (1 g/ml final). Après une incubation de 18 à 20 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, les cellules activées forment des agrégats qui sont récupérés pour l'extraction des ARNs totaux. Ces ARNs totaux sont extraits à l'aide du kit « RNeasy mini kit » (QIAGEN) et traités à la DNase I, pour éliminer l'ADN génomique, selon les instructions du fournisseur. La synthèse de l'ADN complémentaire est réalisée à partir de 50 à 200 ng d'ARNs en présence d'hexamères universels et à l'aide de l'enzyme de transcription réverse, SuperScript III (SuperScript III First-Strand synthesis system ; Invitrogen).

Les transcrits sont ensuite analysés par PCR quantitative sur l'appareil « ABI prism 7000 Sequence Detection system » (Applied Biosystems). L'amplification est réalisée dans le tampon SYBR Green (MasterMix Plus SYBR Green I kit ; Euromedex) en présence des amorces d'intérêt à 600nM final (Tableau 2). Le programme du

thermocycleur est le suivant : 50°C-2 min, 95°C-10 min, 40 cycles de 95°C-15 sec puis 60°C- 1 min, enfin un cycle de dissociation : 95°C-15 sec, 60°C-20sec, 95°C-15 sec.

Les résultats sont normalisés à l'aide des gènes de ménage *CD3* et la chaîne constante du *TCR* (*TCR C*) et analysés à l'aide du logiciel « Sequence Detection System version 1.2 » (Applied Biosystems).

### **Tri des LT CD4 et CD8 et analyse des marqueurs du « homing » cutané**

Le tri des LT CD4 et CD8 réalisé par cytométrie en flux nécessite l'utilisation de trois anticorps dirigés contre : le TCR, le CD4 et le CD8. Les cellules double positives TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> seront récupérées dans un tube, et les TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dans un autre. Toutes les cellules négatives, simple positives ou double positives CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> seront éliminées.

La faible fréquence des LT CD4<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> parmi les PBMCs nous a conduit à analyser l'ensemble des marqueurs sur la population de LT purifiés, en même temps que le tri des TCD4 /TCD8 par cytométrie en flux.

L'analyse du homing cutané est donc réalisée sur la même population lymphocytaire à l'aide d'anticorps dirigés contre le CRTH2 et le CLA. Une fois que le nombre souhaité de LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> a été récupéré, le reste des cellules est analysé pour les 5 marqueurs (TCR, CD4, CD8, CRTH2, CLA) (Tableau 3).

Une fois purifiés, les LTs sont resuspendus dans du PBS avec 5% de SVF à 4°C. Les 5 anticorps sont ajoutés (1/20<sup>e</sup>) dans un volume de réaction final de 200  $\mu$ l. Après une incubation de 15 min à 4°C, les cellules sont lavées avec du PBS, 5% SVF. Le culot est ensuite repris dans 400  $\mu$ l total de PBS, 5%SVF.

Le contrôle négatif est réalisé à l'aide de PBMCs non marqués, à raison d'environ 500 000 cellules dans 400  $\mu$ l final de PBS, 5% SVF.

Le contrôle de compensation de chaque anticorps est réalisé à l'aide de « Compbeads » (BD Bioscience) dirigées contre l'espèce dans laquelle l'anticorps a été produit.

Gène cible	Séquence F	Séquence R	amplicon (pb)
<b>CD3ε</b>	GATGCAGTCGGGCACTCACT	CATTACCATCTTGCCCCCAA	77
<b>TCRβC</b>	CAGGATAGGGCCAAACC	CACGAGGGCACTGACCAG	170
<b>Interleukine 4</b>	TTGAACAGCCTCACAGAGCA	GCAGCGAGTGCCTTTCAT	156
<b>Interleukine 5</b>	TCTTTCAGGGAATAGGCACAC	TCTCCGTCTTCTCTCCACA	134
<b>Interleukine 10</b>	TGTATGCCCAAGCTGAGA	CACGGCCTTGCTCTTGTTTT	138
<b>Interferon γ</b>	TGGAGACCATCAAGGAAGACA	CAGTTCAGCCATCACTTGGA	152
<b>T-bet</b>	CCGTGACTGCCTACCAGAAT	ATCTCCCCAAGGAATTGAC	158
<b>Gata 3</b>	ACAAAATGAACGGACAGAAC	CTTTTGGATTGCTAGACA	212

**Tableau 2- Amorces utilisées pour la PCR quantitative**

(F : séquence sens ; R : séquence antisens)

Antigène	source	clone	fluorochrome	fournisseur
<b>TCR</b>	souris	BW242/412	APC	Miltenyi Biotec
<b>CD4</b>	souris	RPA-T4	Alexa 700	BD Bioscience
<b>CD8</b>	souris	RPA-T8	Pacific Blue	BD Bioscience
<b>CRTH2</b>	rat	BM16	PE	Miltenyi Biotec
<b>CLA</b>	rat	HECA-452	FITC	Miltenyi Biotec

**Tableau 3– Anticorps utilisés pour le tri cellulaire et l'analyse du homing cutané.**

Les LT CD4 et CD8 des patients et des individus sains sont triés sur le cytomètre « FACS Aria II cell sorter » (BD Bioscience) et récupérés dans des tubes contenant 1ml de SVF.

### **Activation Anti-CD3/anti-CD28**

La stimulation anti-CD3/anti-CD28 permet l'activation et l'expansion des cellules T en l'absence de cellules présentatrices d'antigènes ou d'antigènes. Après leur tri, les cellules T CD4 sont reprises dans du milieu de culture à raison de 1000 cellules/  $\mu$ l. Les cellules sont ensuiteensemencées à 100 000 cellules/puits (plaque 96 puits) en présence ou non de Dynabeads anti-CD3/anti-CD28 (Dynabeads Human T-Expander CD3/CD28 ; Invitrogen) dans un volume final de 200  $\mu$ l. Après 24h et 48h d'incubation à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100  $\mu$ l de surnageant est prélevé et congelés à -20°C pour l'analyse par Luminescence.

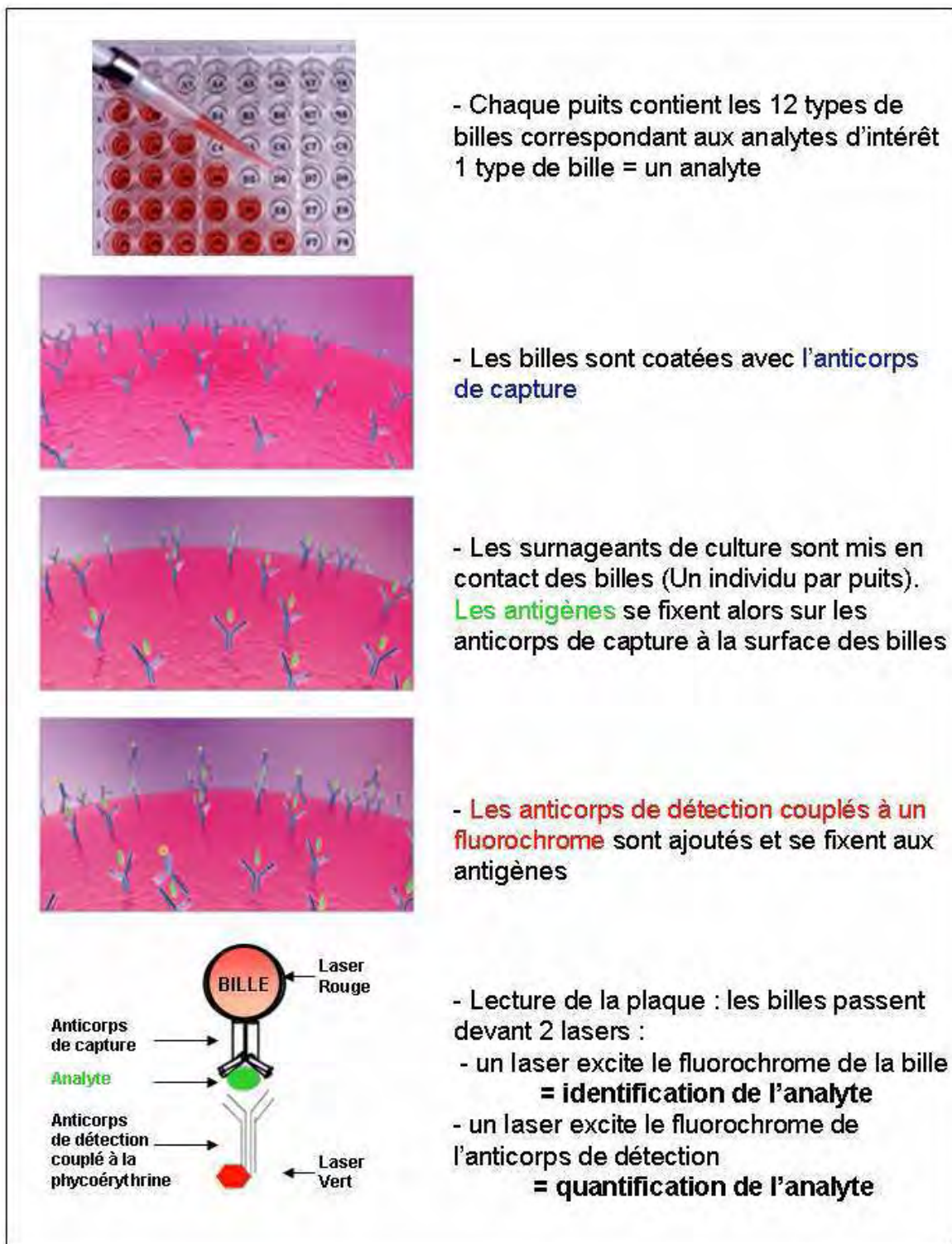
### **Prolifération des Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Après stimulation polyclonale anti-CD3/anti-CD28, l'état de prolifération des lymphocytes T CD4 sera analysé par l'incorporation de thymidine tritiée. Pour cela, les cellules sont mises en culture en présence de thymidine tritiée, un analogue radioactif de la thymidine, qui s'incorpore dans l'ADN lors de la division cellulaire. Après prélèvement de 100  $\mu$ l de surnageant de culture pour l'analyse cytokinique, 100  $\mu$ l du même milieu RPMI contenant 1 Ci de thymidine tritiée sont ajoutés dans le puits. Après une incubation de 24h les plaques sont congelées à -20°C, ce qui aura pour effet de bloquer les cellules et de les lyser. La lecture de la radioactivité sera ensuite réalisée.

### **La technologie Luminex** (Figure 2)

Afin de quantifier un panel de cytokines, les surnageant de culture des LT CD4<sup>+</sup> seront analysés grâce à la technologie Luminex.

Cette technologie est fondée sur le principe de la cytométrie en flux, alliée à l'utilisation de microsphères fluorescentes et à une double lecture après excitation par deux lasers. Il s'agit d'un système multianalytique puissant, puisque jusqu'à 100 microbilles différentes par puits peuvent être incluses dans la plaque analytique. Les billes servent de support solide aux anticorps dirigés contre les molécules d'intérêt. Chaque bille correspond à un analyte (ici une cytokine) et sera identifiée par une



**Figure 2– Principe de la technologie Luminex, dans le cas de la quantification d'un antigène.**

(Modifié d'après <http://www.millipore.com/drugdiscovery/dd3/luminex?langchange=true> (schéma 2, 3 et 4) ; Moalic (2004) *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* (schéma 5))

intensité de fluorescence propre. Ainsi plusieurs billes spécifiques de plusieurs cytokines pourront être mélangées dans un même puits.

Les surnageants de culture sont mis en contact avec ces billes afin de permettre la fixation des cytokines à leur surface. Des anticorps de détection, pour chaque analyte, seront ensuite ajoutés. Ces anticorps sont couplés à un fluorochrome.

La lecture de plaque repose sur deux lasers :

- un laser excitera les billes :  
intensité de fluorescence = identification de la cytokine
- le second excitera le fluorochrome couplé à l'anticorps de détection :  
intensité de fluorescence = quantité de la cytokine

Sur la base d'une gamme d'étalonnage, la lecture ainsi réalisée nous permettra de déterminer la concentration de chacune des molécules d'intérêt dans le surnageant de culture de chaque individu.

Les cytokines analysées seront les suivantes : IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13, IL17, IFN , TNF et TNF (Milliplex Human Cytokine Multiplex Immunoassay Kit)

### **ELISA anti-TSLP**

La quantification de TSLP circulante dans le plasma des patients SN sera analysée par ELISA. L'analyse est réalisée grâce au kit « Quantikine Human TSLP Immunoassay » (R&D systems).

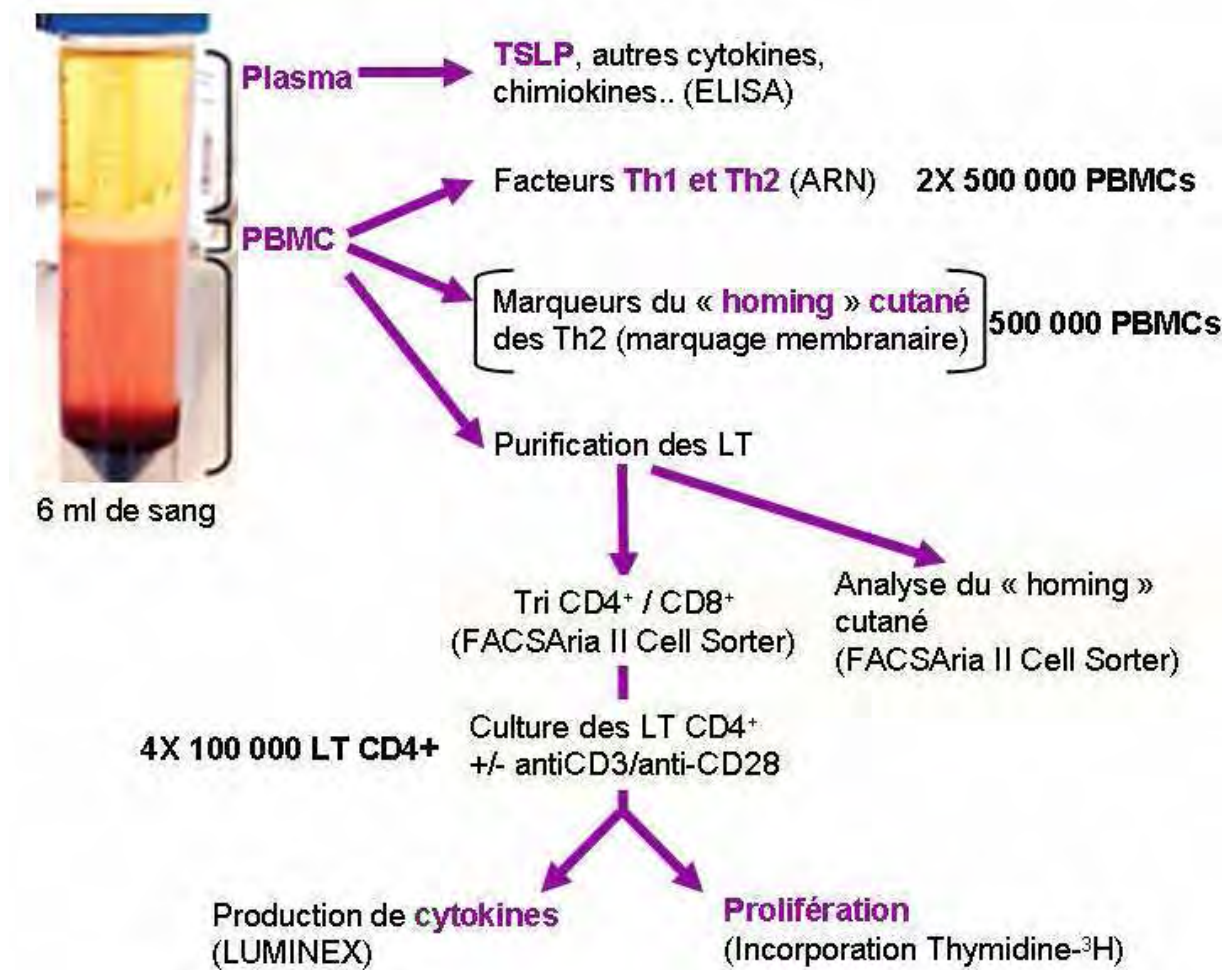
Une dilution en série des échantillons sera déposée dans une plaque coâtée avec un anticorps dirigé contre TSLP. Un second anticorps anti-TSLP couplé à la peroxydase (HRP, HorseRadish Peroxidase) sera ensuite ajouté. La réaction enzymatique est réalisée à l'aide du substrat TMB (Tetramethylbenzidine) et la lecture de densité optique se fait à une longueur d'onde de 450 nm.

La concentration de la protéine sera déterminée par rapport à une gamme étalon de TSLP humaine recombinante.

### **Analyses histologiques et immunohistochimiques**

Les biopsies cutanées prélevées en zone lésée seront coupées en deux. Une partie sera fixée dans du formol et incluse en paraffine et la seconde sera cryocongelée dans du « Tissue Tek » OCT (Sakura). Les analyses histologiques et immunohistochimiques seront ensuite réalisées sur des coupes paraffinées ou congelées de 4 µm d'épaisseur.





**Figure 3- Analyses réalisées sur le sang des patients SN.** Un prélèvement sanguin de 6 ml sera utilisé pour doser les cytokines et chimiokines circulantes, déterminer l'expression des facteurs Th1 et Th2, analyser le « homing » cutané, quantifier les cytokines produites par les TCD4<sup>+</sup> et estimer le niveau de prolifération des TCD4<sup>+</sup>.



## Résultats préliminaires

### 1- Un maximum d'analyses pour un minimum de cellules : Mises au point nécessaires.

L'ensemble des analyses que nous souhaitons effectuer sur le sang (6 ml) des patients atteints du syndrome de Netherton sont représentées sur la figure 3.

Le nombre total de PBMC isolé après Ficoll (de 3 à 10 millions) ainsi que la proportion de LT parmi ceux-ci est très variable d'un individu à l'autre. Nous avons donc évalué dans un premier temps, un nombre minimum de PBMCs ou de LT pour chacune des expériences à partir d'individus sains.

L'utilisation de 500 000 PBMCs pour l'analyse des transcrits ne nous permet d'extraire qu'une faible quantité d'ARN total (de 500 ng à 1,5 µg). Cependant, cette quantité est suffisante pour étudier quelques gènes représentatifs de la réponse Th1 et Th2 par PCR quantitative.

L'analyse du « homing » cutané a dans un premier temps été réalisée sur 500 000 PBMCs par individu. Pour cela, les PBMCs ont été marqués à l'aide de 5 anticorps couplés à des fluorochromes compatibles pour leur discrimination par cytométrie en flux. Les événements recherchés, les LT CD4<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>, représentent une faible proportion des PBMCs. Les cellules T CD4<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> ne représentent en moyenne que 50 événements sur nos 500 000 PBMCs, ce qui est insuffisant pour mettre en évidence une variation d'un facteur 2 à 4 comme chez les patients DA soutenue par une analyse statistique prenant en compte que 10 patients SN. Ces résultats nous ont donc conduit à analyser ces marqueurs sur la population de LT purifiés, plutôt que sur les PBMCs, en même temps que le tri des TCD4 /TCD8.

Le tri des LTCD4 /TCD8 a été réalisé sur les LT purifiés. Après avoir récolté un minimum de 400 000 LT CD4<sup>+</sup>, les LTs restants sont analysés pour les marqueurs du « homing » cutané. Le nombre d'événements acquis reste faible et variable (environ 500) mais est cependant plus représentatif que ceux acquis sur les PBMCs.

Le nombre de LT CD4<sup>+</sup> nécessaire et le stimulus approprié pour l'étude des cytokines produites ont ensuite été évalués. Deux types de stimulation anti-CD3/anti-CD28 ont été testés :

Patient	sexe	âge	Mutation de <i>SPINK5</i>	LEKTI	ED	ILC	Prurit	Lichen.	Alopecie /TI	IgE (KUI/L)	Allergies ou Atopie
1	M	21	238insG	-	+	-	+	+	+/-	nd	+
2	F	28	del ex1-ex16 (homoz)	-	+	-	+	-	+/-	1169	-
3	M	13	2240+1G>A/81+5G>A	nd	+	-	-	-	+/+	nd	+
4	F	14	153delT (homoz)	nd	+	-	+	+	+/-	nd	+
5	F	39	2471_2475delAAGAGinsT (homoz)	-	+	+	-	+	+/+	7883	+++
6	M	34	283-2A>T/2468_2469insA	-	+	-	+	+	+/-	21225	+++
7	F	25	2313G>A (homoz)	-	+	+	+	-	+/+	nd	+
8	M	20	153delT (homoz)	nd	+	+	-	-	+/+	nd	+
9	M	10	55+1G>A/2474_2475delAG	nd	+	+	-	-	+/+	nd	+
10	F	38	283-2A>T/2468_2469insA	-	+	+	+	-	+/-	nd	+++

**Tableau 4- Caractéristiques cliniques et moléculaires des patients atteints du syndrome de Netherton inclus dans l'étude.**

L'ensemble des patients SN inclus dans l'étude sont représentés. Les caractéristiques cliniques correspondent à celles relevées le jour du prélèvement sanguin et de la biopsie cutanée. La présence d'allergies est référencée en fonction des réponses apportées par le patient lors de la consultation clinique.

La taux de référence normal d'IgE sérique est de 100-150 KUI/L.

Certaines analyses en cours de réalisation sont notées « nd » (non déterminé)

ED : Erythrodermie Desquamative ; ILC ; Ichthyose Linéaire Circonflexe ; Lichen. : Lichenification ; TI : *Trichorrhexis Invaginata*.

- La première consistait à coater des puits de culture avec des anticorps dirigés contre le CD3 et de rajouter un anticorps anti-CD28 dans le milieu.

- La seconde stratégie consistait à utiliser des billes sur lesquelles sont fixés les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Dynabeads).

Après stimulation, nous avons testé l'efficacité de l'activation par ELISA dirigé contre l'IL4 et l'IFN . L'induction significative de ces cytokines a été détectée dans les surnageants de culture après 24 et 48h de stimulation de 100 000 LT CD4<sup>+</sup> avec les Dynabeads. Nous avons donc choisi la technique d'activation à l'aide de Dynabeads anti-CD3/anti-CD28.

## **2- Cohorte de patients SN**

Dans un premier temps, nous avons recrutés dix patients SN avérés, dont la détection de LEKTI au niveau de l'épiderme est négative et/ou les mutations de *SPINK5* étaient connues. Les caractéristiques cliniques de ces patients correspondent à celles observées pendant la consultation médicale effectuée le jour de la biopsie cutanée et du prélèvement sanguin (Tableau 4).

Tous les patients SN présentent une érythrodermie desquamative associée ou non au développement de lésions d'ichthyose linéaire circonflexe. 6 patients SN déclarent souffrir de démangeaison cutanée (prurit). L'apparition de plaques de lichenification caractéristiques des lésions tardives de dermatite atopique est retrouvée chez 4 patients SN. Bien que la sévérité du phénotype de ces patients soit variable, 9 souffrent d'allergies essentiellement alimentaires ou de manifestations atopiques. Le patient 2 ne déclare pas souffrir d'allergie, mais présente une hyper-IgE sérique. Bien qu'il y ait une variabilité importante entre la concentration en IgE chez les 3 patients SN analysés, il apparaît qu'ils sont augmentés de 10 à 200 fois suggérant une hyper-IgE significative pour ces 3 individus.

Notre étude inclus actuellement des jeunes adolescents et des adultes. Ainsi, l'inclusion de nourrissons et de jeunes enfants atteints du syndrome de Netherton permettrait d'obtenir des informations complémentaires. En effet, les lésions eczématiformes aigües prédominent pendant les premières années de la vie des patients. De plus, comme pour la dermatite atopique, chez l'adulte SN les lésions pourraient devenir chroniques et la balance s'inverser progressivement vers un phénotype Th1. Nous envisageons également d'inclure dans notre étude des patients atteints d'autres ichtyoses. Ceci nous permettra de déterminer si les

résultats obtenus pour les SN sont spécifiques de l'absence de LEKTI et non pas uniquement secondaires au défaut de barrière cutanée.

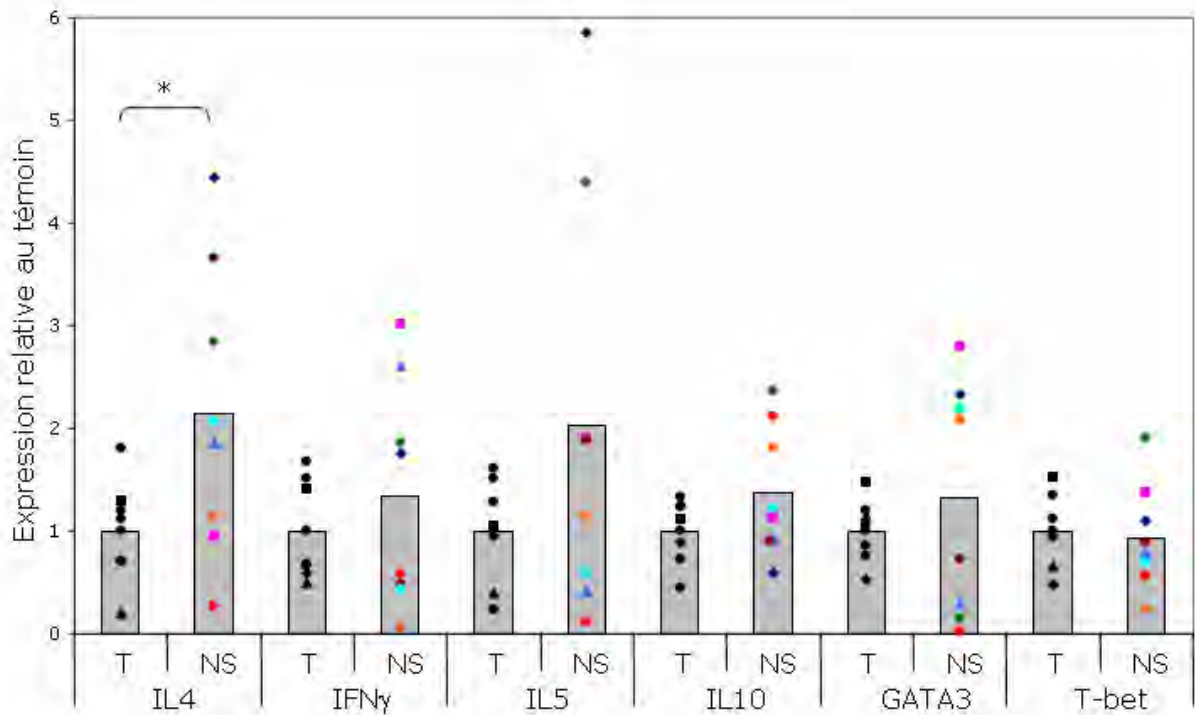
### **3- Analyse du homing cutané**

Afin de déterminer si le nombre de cellules CD4<sup>+</sup> Th2 engagées vers une action cutanée est augmenté chez les patients SN, nous avons analysé l'expression simultanée du récepteur CRTH2 et du CLA à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par cytométrie en flux. Il faut noter dans un premier temps, que la proportion de LT CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> chez les patients SN est comparable à celle des individus sains (respectivement environ 60% et 15% des lymphocytes T totaux).

La faible fréquence initiale des LT CD4<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> CRTH2<sup>+</sup> (inférieure à 1%) et la variabilité inter-individuelle observées chez les sujets sains ne nous ont pas permis d'observer d'augmentations significatives chez les patients SN. Seul un patient présente un pourcentage supérieur à 1 (1,2%) ce qui ne permet pas de conclure. L'absence de détection du CRTH2 à la surface des cellules des individus (sains et SN) analysés pourrait être due au fait que dans le sang, la majorité des LT sont quiescents et ne produisent pas de cytokines, alors que l'expression du récepteur a été rapportée pour coïncider avec la sécrétion de cytokines pro-Th2. Cet argument est renforcé par le fait que l'analyse des transcrits des PBMCs non stimulés (sains et SN) a mis en évidence un niveau d'expression inférieur au seuil significatif de détection (résultats non présentés).

### **4- Analyse des transcrits**

Après stimulation à la PHA, les PBMCs de 8 témoins et de 8 patients SN ont été analysés par PCR quantitative. Les résultats représentent l'expression relative des ARNm (pour *IL4*, *IFN*, *IL5*, *IL10*, *GATA3* et *T-bet*) rapportée aux témoins traités et analysés le même jour. On observe une variabilité inter-individu aussi bien chez les témoins que chez les patients SN. Cependant, il ressort de cette analyse une tendance à la surexpression plus ou moins importante de chacune des cytokines chez les patients SN par rapport aux contrôles. L'utilisation du test statistique de Mann & Whitney révèle que seule la surexpression d'*IL4* est significative (risque d'égalité inférieur à 5%) (Figure 4). Ces résultats sont en faveur d'une production accrue d'IL4 qui pourrait être attribuée à une augmentation du nombre des cellules engagées dans la voie Th2.



**Figure 4- Analyse transcriptionnelle des facteurs Th1 et Th2 exprimés par les PBMCs de patients atteints du syndrome de Netherton.**

Les transcrits *IL4*, *IFN* , *IL5*, *IL10*, *GATA3* et *T-bet* ont été analysés par PCR quantitative à partir d'ARN extraits de PBMCs traités à la PHA. 8 témoins et 8 patients SN ont été analysés. Les valeurs représentées sont relatives aux témoins traités et analysés le même jour que chaque patient. Il apparaît qu'en moyenne les PBMCs de patients SN répondent d'avantage au traitement en exprimant plus de cytokines que les témoins. Seul le facteur de transcription *T-bet* ne varie pas. Cependant, après analyse par le test de Mann & Whitney (au risque de 5%), seule la surexpression de l'*IL4* est significative. L'expression de chaque transcrit est normalisée par rapport au TCR (chaîne constante du TCR et CD3 ). (\* seuil = 5%)

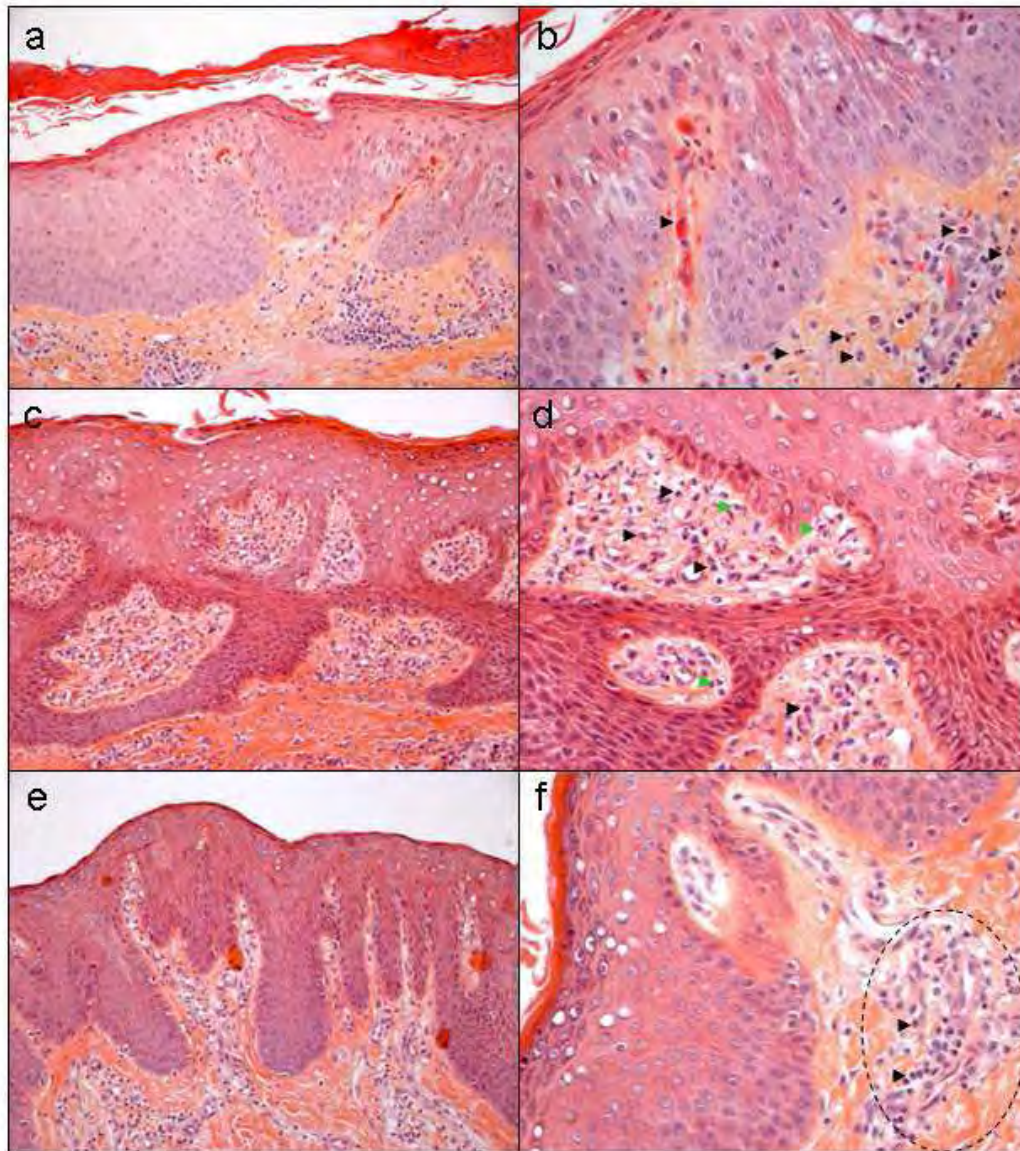
Cependant, d'autres gènes des réponses Th1 et Th2 devront être analysés pour confirmer cette hypothèse. De plus, bien que la quantification des ARNm soit normalisée sur l'expression du TCR, il n'est pas exclu que la production de cytokines soit attribuable à d'autres types cellulaires. Ainsi, l'analyse du profil cytokinique des LT CD4<sup>+</sup> isolés permettra de répondre à cette question.

Ces résultats seront ensuite comparés au dosage des IgE sériques afin de déterminer s'il existe une corrélation entre ce paramètre et l'expression de facteurs Th2.

## **5- Infiltrat inflammatoire dermique chez les patients atteints du syndrome de Netherton**

Nous avons dans un premier temps observé les infiltrats inflammatoires par coloration des coupes de peau à l'hématoxyline/éosine (Figure 5). Les infiltrats sont plus ou moins importants en fonction des patients. On observe un élargissement des vaisseaux sanguins qui sont remplis de cellules immunitaires. Dans certains cas, les cellules inflammatoires gagnent le derme supérieur et viennent se loger à proximité de l'épiderme. Ces infiltrats sont composés de plusieurs types cellulaires. En effet chez certains patients, les cellules polynucléaires éosinophiles sont très nombreuses à l'extérieur et à l'intérieur des vaisseaux sanguins (Figure 5b et 5f). Ces cellules sont reconnaissables à la présence d'un noyau polylobé et d'un cytoplasme rouge/orangé. Des cellules d'aspect granuleux mais non éosinophiles (Figure 5d) sont aussi présentes. Chez certains patients, les cellules immunitaires qui restent localisées dans les vaisseaux sanguins sont essentiellement des cellules mononuclées (Figure 5f). L'utilisation d'anticorps dirigés contre des molécules spécifiques de ces différents types cellulaires nous permettra de caractériser ces infiltrats.

Dans un second temps, les coupes de peau de patients SN ont été colorées au bleu de toluidine afin de détecter les granules des mastocytes (coloration en rouge bordeaux). Dans une peau saine, les mastocytes sont présents en faible nombre. Ils se localisent essentiellement dans le derme profond et dans les vaisseaux sanguins. Chez les patients SN, le nombre de ces cellules peut être augmenté de manière significative.



**Figure 5- Infiltrat de cellules immunitaires dans le derme des patients SN.**

Les coupes de peau de patients SN sont colorées à l'hématoxyline/éosine. Les vaisseaux sanguins sont de taille importante et sont remplis de cellules immunitaires (a, c, e). Les cellules infiltrent également le derme supérieur. Parmi ces cellules, on distingue des polynucléaires éosinophiles (têtes de flèches noires ; b-f), des cellules granuleuses (têtes de flèches vertes ; d) et des cellules mononuclées (cercle pointillé ; f). Selon les patients SN, la composition cellulaire apparaît différente et l'infiltration plus ou moins massive.

(b, d et f, sont des grossissements de a, c et e respectivement).

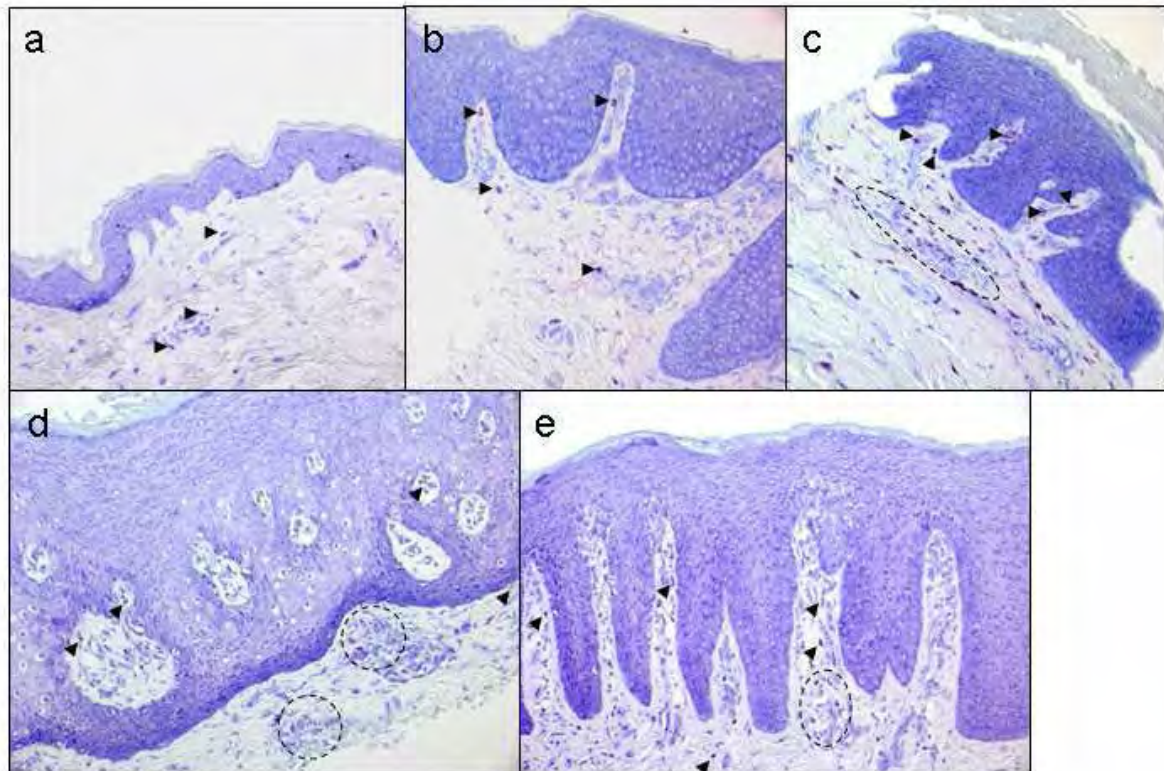
Les mastocytes sont retrouvés dans les vaisseaux sanguins mais surtout dans le derme supérieur et à proximité de l'épiderme probablement en réponse à la sécrétion de molécules chimioattractantes par les kératinocytes (Figure 6). La présence d'un grand nombre de mastocytes dans la peau des patients SN coïncide probablement avec le développement de lésions eczématiformes.

*Soumelis et al.* ont mis en évidence que l'expression de TSLP par les kératinocyte coïncidait avec la diminution du nombre de cellules Langérine<sup>+</sup> (cellules de Langerhans) dans l'épiderme des patients atteints de dermatite atopique. Ceci serait dû à leur activation par TSLP et leur migration vers les ganglions lymphatiques drainant la peau (*Soumelis et al.* 2002). Afin de déterminer si ce mécanisme est également retrouvé dans le SN, nous avons réalisé des expériences d'immunohistochimies dirigées contre la langérine sur des coupes de peau de patients SN, qui surexpriment TSLP (*Briot et al.* 2009) (Figure 7). Dans l'épiderme des patients SN le nombre de cellules Langérine<sup>+</sup> est diminué de 80% (Figure 7b et c) par rapport aux individus sains (Figure 7a et c). Ces résultats sont en faveur de leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires dans lesquels ils pourront induire la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocyte Th2. L'utilisation du marquage DC-Lamp<sup>+</sup> (cellules de Langerhans activées) nous permettra de confirmer leur état d'activation dans la peau des patients SN.

L'ensemble de ces résultats préliminaires permet de révéler : (1) la surexpression d'IL4 par les PBMCs SN, (2) l'infiltration de polynucléaires éosinophiles et de mastocytes dans la peau SN, (3) la diminution du nombre de cellules Langérine<sup>+</sup> associée à l'expression de TSLP dans l'épiderme SN, corrélient avec une réponse immunitaire de type allergique.

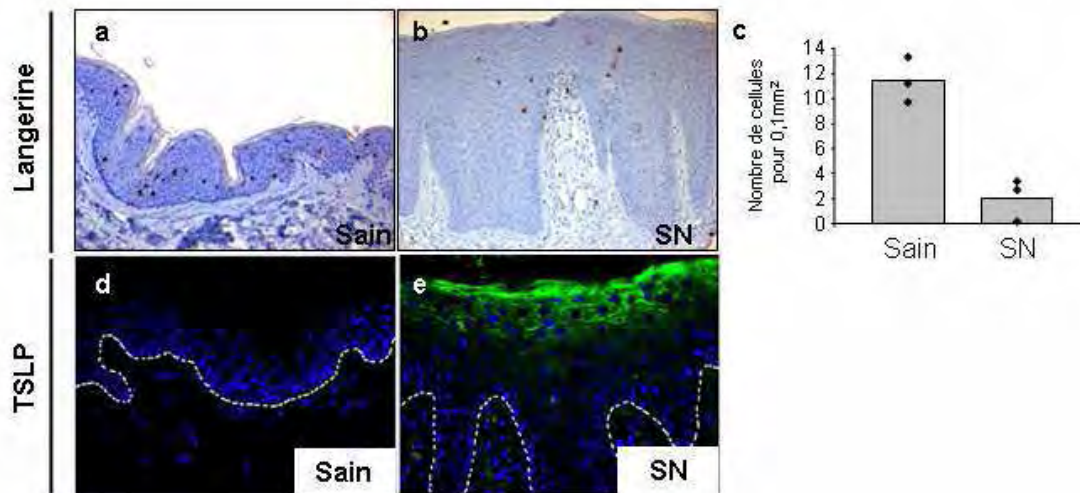
Cependant les analyses histologiques et transcriptionnelles doivent être complétées ainsi que reliées la production d'IgE et au questionnaire clinique des patients SN. Cette étude réunissant dans un premier temps 10 patients SN apportera une documentation complète des désordres immunitaires récurrents présents dans cette maladie.





**Figure 6- Infiltration de mastocytes dans le derme des patients SN.**

Coupes de peau saine et de patients SN colorées au bleu de toluidine. Dans une peau saine, les mastocytes (têtes de flèches noires, a) peu nombreux restent dans le derme profond. Chez les patients SN (b-e), les mastocytes apparaissent plus nombreux et se localisent dans les vaisseaux sanguins (cercles pointillés, c-e) mais également au niveau du derme supérieur, à proximité de l'épiderme (têtes flèches noires, b-e).



**Figure 7- Diminution du nombre de cellules Langerine<sup>+</sup> dans l'épiderme des patients atteints du syndrome de Netherton surexprimant TSLP.**

Immunomarquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la langérine (a, b ; marqueur des cellules de Langerhans) ou contre TSLP (d, e) sur des coupes de peau de patient atteint du syndrome de Netherton (SN). (c) Les cellules positives ont été comptées et rapportées à la surface d'épiderme pris en compte. 3 individus sains ou atteints du SN ont été analysés. Dans l'épiderme SN (b, c) le nombre de cellules positives pour la langérine est diminué par rapport à celui d'un individu sain (a, c). Dans la peau saine TSLP n'est pas détectée (d) alors qu'elle est produite dans les couches supérieures de l'épiderme de patient SN (e).

(D'après Briot et al. (2009) *J Exp Med* (d et e))

## Références Bibliographiques

- Bitoun, E., *et al.* (2003). "LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome." Hum Mol Genet 12(19): 2417-30.
- Briot, A., *et al.* (2009). "Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome." J Exp Med 206(5): 1135-47.
- Comel, M. (1949). "Ichthyosis Linearis circumflexa." Dermatologica 98: 133-136.
- Cosmi, L., *et al.* (2000). "CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease." Eur J Immunol 30(10): 2972-9.
- Judge, M. R., *et al.* (1994). "A clinical and immunological study of Netherton's syndrome." Br J Dermatol 131(5): 615-21.
- Moalic, V., *et al.* (2004). "Technologie Luminex : principe, applications et perspectives." immuno-analyse & Biologie spécialisée 19: 181-7.
- Nagata, K., *et al.* (1999). "Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo." J Immunol 162(3): 1278-86.
- Netherton, E. W. (1958). "A unique case of Trichorrexia Invaginata." Arch. Dermatol. 78: 483-487.
- Smith, D. L., *et al.* (1995). "Netherton's syndrome: a syndrome of elevated IgE and characteristic skin and hair findings." J Allergy Clin Immunol 95(1 Pt 1): 116-23.
- Soumelis, V., *et al.* (2002). "Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP." Nat Immunol 3(7): 673-80.
- Teraki, Y., *et al.* (2000). "Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)+ type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis." Br J Dermatol 143(2): 373-8.
- Walley, A. J., *et al.* (2001). "Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease." Nat Genet 29(2): 175-8.
- Wang, Y. H., *et al.* (2006). "Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells." Immunity 24(6): 827-38.



# DISCUSSION GENERALE



## **Partie A- Rôle de LEKTI dans le contrôle des signaux cutanés pro-inflammatoires et pro-allergiques**

### **I- Signalisation KLK5-PAR2-TSLP : une propriété intrinsèque aux kératinocytes *SPINK5*<sup>-/-</sup>**

L'absence de LEKTI dans l'épiderme conduit à la dérégulation de plusieurs protéases épidermiques. Parmi celles-ci, la kallikréine 5 (KLK5) est hyperactive dans la peau des animaux déficients en *Spink5* (KO) (78) ainsi que dans celle des patients atteints du syndrome de Netherton (SN) (62). En plus de son rôle dans la dégradation des structures d'adhésions intercellulaires, la KLK5 est un inducteur majeur de l'inflammation allergique cutanée (368).

Nous avons mis en évidence un rôle direct de la KLK5 dans l'initiation d'une nouvelle cascade pro-allergique *via* le clivage du récepteur PAR2 et l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Cette cascade signalétique conduit à la surexpression par les kératinocytes d'ICAM1, d'IL8, de TNF et de TSLP, une cytokine pro-allergique qui est nécessaire et suffisante pour induire des lésions de type dermatite atopique (article1, figure 6).

Cette cascade signalétique est activée dans les kératinocytes de patients SN en culture, en absence de stimulation exogène (article 1, figure 7). De plus, l'analyse des animaux *Spink5*<sup>-/-</sup> (KO) au jour 19,5 du développement embryonnaire montre que cette cascade biologique est un événement précoce relevant *in vivo* (article 1, figure 4) qui entraîne à l'âge adulte une inflammation cutanée de type allergique sans participation du système immunitaire adaptatif. En effet, les greffes de peau KO sont infiltrées par un grand nombre de polynucléaires éosinophiles et de mastocytes activés (article1, figure 2). L'ensemble de ces résultats montrent que l'activation de la cascade KLK5-PAR2-TSLP est un événement intrinsèque aux kératinocytes déficients pour *SPINK5*, indépendant du défaut de barrière cutanée, des stimuli exogènes et du système immunitaire adaptatif. Cette voie de signalisation pourrait être responsable du développement précoce de lésions eczématiformes dans le syndrome de Netherton.

Ce mécanisme semble être spécifique de l'absence de LEKTI dans l'épiderme, cependant il n'est pas exclu qu'il puisse participer au développement de lésions

cutanée allergique dans d'autres pathologies comme la dermatite atopique (DA), une des caractéristiques cliniques du SN. Cette maladie multifactorielle plus répandue intègre une composante génétique et environnementale dont la physiopathologie n'est pas encore élucidée. Le fait qu'elle apparaisse souvent très tôt dans l'enfance et que 20 à 30% des patients ne présentent pas d'hyper-IgE sérique suggèrent un mécanisme intrinsèque indépendant de la pénétration d'allergènes à travers la peau. *Komatsu et al* ont montré que l'expression de la KLK5 était augmentée dans la couche cornée des patients DA mais que cet événement ne coïncidait pas avec une augmentation de l'activité de type trypsique. Les auteurs attribuent ce résultat au fait que dans la dermatite atopique la présence de LEKTI puisse contrebalancer la surexpression de la KLK5 (369). Une étude similaire plus récente a montré qu'au contraire, l'activité de type trypsique, attribuée à la KLK5, était augmentée dans la couche cornée dans les lésions de DA (370). Ces 2 résultats contradictoires pourraient être attribués aux zones cutanées étudiées. En effet, dans la première étude l'analyse des KLKs a été réalisée au niveau de lésions de lichenification de sévérité moyenne alors que dans la seconde seules des lésions aiguës associées à une inflammation importante ont été prises en compte. L'hyperactivité trypsique retrouvée dans les lésions de dermatite atopique pourrait également être secondaire à une diminution de l'expression de LEKTI. Cette hypothèse est renforcée par le marquage focal de la protéine dans la peau des patients DA (70, 371) et par des travaux qui ont mis en évidence une diminution transcriptionnelle de l'inhibiteur de protéase dans les kératinocytes primaires des patients DA (372). Ainsi, dans la peau DA, la diminution d'expression de LEKTI, associée avec une augmentation de l'expression de la KLK5 pourrait conduire à une activité accrue de la protéase dans certaines zones. Cet événement intrinsèque au kératinocytes pourrait favoriser l'activation de la cascade biologique que nous avons identifiée. Ainsi, la voie KLK5-PAR2-TSLP pourrait avoir une relevance dans la dermatite atopique dans laquelle TSLP et PAR2 sont également surexprimés (177, 225). De plus, ces acteurs pourraient être ajoutés aux gènes de prédisposition de cette maladie. Ainsi cette voie de signalisation conduisant à la sécrétion de TSLP, pourrait être spécifique des maladies cutanées avec une exacerbation de la réponse Th2.

Néanmoins, il existe d'autres pathologies cutanées dans lesquelles la KLK5 semble hyperactive sans pour autant que les patients développent de l'atopie. C'est le cas du psoriasis, qui est une maladie cutané inflammatoire de type Th1 et de la rosacée



dont le phénotype cutané reste limité au visage. Dans les lésions de psoriasis, l'expression de la KLK5 est augmentée et corrèle avec une augmentation de l'activité de type trypsique dans la couche cornée (373). De même dans la rosacée, l'expression et l'activité de la KLK5 semble augmentée (374). Ainsi, on s'attendrait à retrouver TSLP surexprimée dans la peau de ces malades. Or ceci n'a encore jamais été montré. La différence entre ces pathologies et le syndrome de Netherton viendrait du fait que l'expression de LEKTI n'est pas affectée. En effet dans le psoriasis l'expression de LEKTI est intense dans les couches supérieures de l'épiderme (70, 371). Ainsi l'hyperactivité de la KLK5 pourrait être modulée par son inhibiteur naturel et serait insuffisante pour induire la signalisation en aval de PAR2. De plus, la différence du phénotype inflammatoire pourrait être due à l'expression de LEKTI dans d'autres organes soutenant un rôle intrinsèque de l'inhibiteur de protéase dans le développement de la réponse Th2.

L'ensemble de nos travaux ainsi que ces données de la littérature soulignent l'importance du contrôle de la balance protéase/inhibiteur de protéase dans le développement de la réponse allergique.

## **II- Autres mécanismes pro-allergiques et pro-inflammatoires qui pourraient être régulés par LEKTI**

En plus des molécules directement induites par la voie KLK5-PAR2, les kératinocytes primaires de patients SN et ceux de l'épiderme des embryons *Spink5*<sup>-/-</sup> surexpriment d'autres molécules pro-Th2 telles que CCL17/TARC et CCL22/MDC (article 1, figures 7 et 4). TARC et MDC sont des chimiokines qui attirent préférentiellement les lymphocytes Th2 exprimant le récepteur CCR4 à leur surface (375). L'expression de TARC est augmentée dans la peau des souris transgéniques qui surexpriment TSLP dans la peau (*K5-Tslp*) (197) et dans celles des patients atteints de dermatite atopique (DA) (183). De plus, le taux sérique de TARC corrèle avec la sévérité de la maladie (184). Ces arguments sont en faveur d'un rôle de ces chimiokines dans la mise en place d'un environnement pro-allergique cutané.

La surexpression de TARC et MDC par les kératinocytes SN n'est pas une conséquence directe de l'hyperactivité de la KLK5 (article 1, figure 6). *Soumelis et al*, ont pu démontrer que TSLP pouvait activer l'expression de ces chimiokines par les cellules dendritiques (177). Cependant dans notre modèle, ces chimiokines sont

produites par les kératinocytes alors qu'ils n'expriment pas le récepteur à TSLP. Ceci suggère que l'expression de ces molécules, qui est une propriété intrinsèque aux kératinocytes déficients pour LEKTI, pourrait être secondaire à l'activité d'autres protéases épidermiques ou au microenvironnement instauré par la voie KLK5-PAR2. Ainsi en l'absence de LEKTI, il existerait plusieurs mécanismes moléculaires intrinsèques aux kératinocytes impliqués dans l'induction de molécules pro-inflammatoires et pro-Th2.

En effet, LEKTI possède un large spectre d'inhibition de protéases à sérine. Bien que la signalisation induite par la KLK5 semble être un mécanisme précoce et intrinsèque aux kératinocytes, d'autres protéases peuvent intervenir dans la mise en place de l'inflammation, mais surtout dans l'amplification du mécanisme. Il pourrait s'agir de protéases épidermiques ou de protéases sécrétées par les cellules inflammatoires.

La KLK7, exprimée dans la couche granuleuse de l'épiderme, est une protéase à sérine de type chymotrypsique. De la même façon que la KLK5, elle est hyperactive en l'absence de LEKTI (78, 62). Sa surexpression dans un modèle murin conduit au développement d'un phénotype inflammatoire cutané accompagné du recrutement de mastocytes (205). Contrairement à la KLK5, la KLK7 n'active pas le récepteur PAR2, ce qui exclut un rôle redondant pour ces deux protéases. Le rôle de la KLK7 dans la signalisation pro-inflammatoire pourrait être dépendant de sa capacité à activer la cytokine IL1. En effet, l'IL1 est produite de manière constitutive par les kératinocytes et stockée sous la forme d'un précurseur inactif. Sa sécrétion est stimulée par le détachement de la couche cornée. Il a été démontré que la KLK7 pouvait activer cette cytokine pro-inflammatoire par clivage protéolytique (376). De cette manière, la KLK7 participerait au développement du microenvironnement pro-inflammatoire puisque l'IL1 est surexprimée et sécrétée dans la peau *Spink5*<sup>-/-</sup> suite au détachement de la couche cornée (article 1, figures 3 et 4) et indépendamment de la voie KLK5-PAR2 (article 1, figure 6).

La KLK14 est également exprimée par les kératinocytes granuleux et possède à la fois une activité trypsique et chymotrypsique. Bien que représentée de manière minoritaire dans l'épiderme interfolliculaire, elle est également régulée par LEKTI et pourrait donc jouer un rôle dans le développement de la pathologie. Cette hypothèse est renforcée par sa capacité à activer le récepteur PAR2 (217) au même titre que la KLK5. Des expériences préliminaires effectuées au laboratoire ont montré que l'activation de kératinocytes primaires humains à l'aide de la KLK14 pouvait induire

l'expression de TSLP. Cependant, cette induction est dix fois moins efficace que celle induite par la KLK5. Ainsi l'inhibition partielle de la surexpression de TSLP, TNF et ICAM1 suite à l'inhibition de l'expression de la KLK5 par un siRNA spécifique (article 1, figure 7) pourrait être due en partie à l'activité de la KLK14.

La peau déficiente en LEKTI est infiltrée par un grand nombre de cellules inflammatoires capables de sécréter des protéases. Parmi celles-ci, les neutrophiles sécrètent des protéases pro-inflammatoires telles que la cathepsine G et l'élastase. Cependant les fragments de LEKTI physiologiques testés ne sont pas capables d'inhiber ces protéases (22). Ainsi, ces protéases pourraient aggraver le phénotype cutané par la dégradation de la matrice extracellulaire ou encore la maturation de chimiokines et de cytokines. De plus, il a été montré que ces deux protéases désarmaient le récepteur PAR2 (244). Or les neutrophiles semblent être minoritaires dans l'infiltrat inflammatoire de nos souris *Spink5<sup>-/-</sup>* et ils ne sont pas observés au niveau des couches supérieures de l'épiderme dans lesquelles est normalement exprimé et activé PAR2. Ainsi en l'absence de LEKTI, l'hyperactivité de la cathepsine G et de l'élastase du neutrophile ne semblent pas jouer un rôle direct dans l'inflammation allergique. Ceci suggère que ces cellules pourraient participer à l'amplification de l'inflammation et non pas au maintien ou à la mise en place de la réponse Th2.

Par contre, une autre protéase la tryptase produite par les cellules inflammatoire pourrait participer au développement du phénotype. Elle est produite de manière massive dans les greffes de peau *Spink5<sup>-/-</sup>* et diffuse dans l'épiderme déficient en LEKTI (article1, figure 3). Ainsi elle pourrait atteindre et activer le récepteur PAR2 au niveau des kératinocytes suprabasaux, amplifiant ainsi la signalisation pro-allergique. Cette protéase, qui ne fait pas partie des cibles de LEKTI (22, 377) est produite par les cellules inflammatoires et non par les kératinocytes. Ceci suggère qu'elle participe à l'amplification du phénotype plutôt qu'à l'initiation du processus pro-allergique.

### **III- Rôle de LEKTI dans le développement de lésions eczématiformes secondaires au défaut de barrière cutanée**

## 1- Rôle intrinsèque des kératinocytes *SPINK5*<sup>-/-</sup> versus détachement de la couche cornée dans le développement d'un phénotype eczématiforme

Le modèle murin invalidé pour le gène *Spink5* nous a permis de mettre en évidence un événement clé de la physiopathologie du syndrome de Netherton. En absence de LEKTI, les protéases épidermiques, KLK5 et KLK7 sont responsables du clivage anormal des cornéodesmosomes entraînant la perte de cohésion de la couche cornée (78) et un défaut sévère de barrière cutanée (62). Ce défaut primaire de barrière épidermique peut favoriser la pénétration d'agents exogènes et le développement de manifestations atopiques chez les patients. Cependant, nous avons identifié une cascade signalétique impliquée précocement, à l'état embryonnaire, qui laisse supposer un rôle plus spécifique de LEKTI dans le contrôle de l'inflammation allergique cutanée et ceci indépendamment du défaut de barrière. La voie KLK5-PAR2-TSLP est en effet un événement intrinsèque aux kératinocytes déficients pour LEKTI qui semble promouvoir la mise en place d'un microenvironnement cutané pro-Th2. Ainsi, le blocage de cette cascade pourrait permettre d'inhiber la formation de ce micro-environnement et d'améliorer le phénotype des patients SN.

Afin de déterminer si l'inhibition de cette cascade suffit à reverser le phénotype eczématiforme dans une peau *Spink5*<sup>-/-</sup>, nous avons généré des souris déficientes à la fois pour *Spink5* et pour *Par2* (DKO). A l'état embryonnaire et chez les nouveaux nés DKO, l'absence de PAR2 dans un contexte de déficience en LEKTI inhibe de manière significative la production de TSLP et de TNF dans l'épiderme (article 2, figure 1). Ainsi la voie KLK5-PAR2-TSLP semble favoriser la mise en place d'un microenvironnement pro-Th2 et ceci avant toute sensibilisation exogène. Cependant, les animaux DKO souffrent d'un décollement de la couche cornée similaire à celui observé chez les *Spink5*<sup>-/-</sup> et meurent rapidement après la naissance (article 2, figure 1). Pour étudier une peau adulte DKO, nous avons eu recours au modèle de greffe sur souris nude. Dans les greffes DKO, le défaut de cohésion de la couche cornée persiste et les greffons développent une inflammation cutanée composée de polynucléaires éosinophiles et de mastocytes (article 2, figure 2). Il apparaît cependant que le nombre de mastocytes est inférieur dans les greffes DKO par rapport aux greffes *Spink5*<sup>-/-</sup>. Bien que l'absence de PAR2 ne permette pas d'inhiber complètement l'inflammation cutanée, elle pourrait réduire l'allergie et

modifier ainsi la nature de la réponse immune. Ainsi, l'analyse de l'expression des molécules pro-Th2 (TSLP, MDC et TARC) dans les greffes DKO permettra de déterminer si cette inflammation est toujours de type allergique. De plus, il serait intéressant d'étudier des greffes DKO prélevées à différents temps afin de déterminer si l'absence de PAR2, normalement impliqué dans la signalisation précoce, permet de retarder l'apparition des lésions inflammatoires. Ainsi, bien que nous ayons identifié une voie intrinsèque qui pourrait expliquer le développement de lésions de type dermatite atopique précoces et indépendantes des stimuli environnementaux, l'anomalie de barrière épidermique participe à la progression du versant inflammatoire de la maladie.

La persistance de l'inflammation cutanée dans les greffes DKO pourrait être attribuée à une expression résiduelle des molécules pro-inflammatoires et pro-Th2 dépendant de LEKTI mais indépendantes de PAR2, comme l'IL1 , TARC et MDC. Il apparaît également que le défaut de barrière cutané persistant et le stress mécanique infligé par la dégradation des structures d'adhésions participent au développement de l'inflammation cutanée. Néanmoins, cette inflammation secondaire au détachement de la couche cornée après dégradation de la desmogléine 1 par les KLK5 et 7 ne semblent pas impliquée dans l'orientation de l'inflammation vers une réponse Th2. Cette hypothèse est soutenue par une maladie auto-immune, le pemphigus foliacé (PF), due à la présence d'auto-anticorps dirigés contre la desmogléine 1 qui entraînent l'apparition de bulle (378). Le clivage se produit à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée et génère une fracture asymétrique des desmosomes comme le montre l'histologie des souris ayant reçu par injection l'anticorps du PF (379). Cette anomalie est similaire à celle observée dans la peau déficiente en LEKTI (78, 62). Or à ce jour il n'y a pas d'évidences de l'association constante de manifestations atopiques avec le PF. Ainsi le défaut d'adhésion des structures desmosomales au niveau des couches granuleuse et cornée ne semble pas être directement responsable du développement de lésions eczématiformes chez les patients SN.

## **2- Défaut de maturation de la filaggrine : un facteur de risque aujourd'hui en première ligne**

Parmi les gènes de susceptibilité à la DA, on distingue celui de la filaggrine (*FLG*) dont les mutations présentent une forte association avec l'eczéma atopique,

l'asthme et les allergies dans des populations d'origines ethniques différentes (132, 133). *FLG* est le gène causal d'un désordre de kératinisation commun à transmission autosomique semi-dominante, l'ichtyose vulgaire (42). Les patients qui souffrent de cette maladie présentent parfois une prédisposition à l'eczéma et à l'asthme associé (de 37 à 50%) (131). Les polymorphismes de *FLG* dont ceux retrouvés dans la DA (les plus fréquent étant les mutations perte de fonction R510X et 2284del4) interfèrent avec la maturation ou la synthèse de la protéine et sont associés à un défaut de barrière cutanée favorisant la pénétration de pathogènes à travers l'épiderme (42). De plus, chez les patients DA présentant ou non des mutations dans *FLG*, l'expression de la filaggrine est diminuée. Dans le cas de patient exempts de mutations, la diminution de la filaggrine est probablement secondaire à l'expression locale de cytokines Th2 (IL4 et IL13) qui diminuent l'expression de la protéine dans les kératinocytes (380, 381).

Le défaut en filaggrine est illustré par les souris *flaky tail (ft/ft)*, portant une délétion (5303delA) dans le gène *FLG* conduisant à la synthèse d'une forme tronquée de la profilaggrine. L'absence de maturation du précurseur qui en résulte, conduit à l'absence de détection de filaggrine dans la peau des animaux *ft/ft*. En condition SPF (Specific Pathogen Free), les souris *ft/ft* adultes ne développent pas d'inflammation cutanée majeure. En revanche, après sensibilisation épicutanée sans perturbation préalable de couche cornée (tape stripping), ces animaux développent une inflammation cutanée, alors qu'aucun effet n'est observé chez des souris WT. Au niveau systémique, la réponse est mixte (Th1, Th2 et Th17) mais il y a cependant une augmentation du taux sérique d'IgE spécifiques. Les animaux ainsi sensibilisés ne développent pas d'hyper-réactivité bronchique après inhalation du même allergène (40).

Dans la peau de nos animaux *Spink5<sup>-/-</sup>* et chez les patient SN, le nombre de grains de kératohyaline est diminuée (agranulose) (62, 78). Chez les patients SN, ceci coïncide avec un profil d'expression immunohistochimique anormale de la filaggrine qui pourrait être secondaire à l'inhibition de son expression par les cytokines Th2. De plus, chez les souris *Spink5<sup>-/-</sup>* l'équipe a mis en évidence un défaut dans le processus de maturation de la profilaggrine (78). Des travaux réalisés dans le laboratoire ont mis en évidence le rôle de l'élastase 2, une nouvelle protéase épidermique, dans ce processus. En effet, cette protéase hyperactive dans la peau déficiente pour LEKTI, est capable de dégrader la profilaggrine *in vitro*. De plus, les

animaux transgéniques pour cette protéase présentent également une agranulose. Il n'est donc pas exclu que dans notre modèle, des anomalies de maturation de la filaggrine participent au défaut de barrière cutanée et à la progression du phénotype inflammatoire.

Il apparaît évident que la filaggrine joue un rôle majeur dans le développement de l'eczéma. Cependant, son rôle ne se restreint pas au défaut de barrière cutanée, puisque cette anomalie n'est pas toujours associée au développement d'un phénotype atopique, comme observé dans l'ichtyose vulgaire dont seul 37 à 50% des patients développent des maladies allergiques (131). On pourrait donc proposer un rôle plus direct de la filaggrine. Après maturation de la profilaggrine, sa partie N-terminale a la capacité d'être transloquée dans le noyau où elle participerait au programme de différenciation terminale et notamment à la dénucléation des cornéocytes (37). Ce fragment N-terminale possédant une séquence d'adressage au noyau est un peptide proche des protéines S100 qui lient leurs protéines cibles de manière dépendante du calcium. Il serait intéressant d'analyser si ce peptide possède d'autres fonctions plus directement associées à la régulation de signaux pro-allergiques en liant par exemple des facteurs impliqués dans l'inhibition de l'expression de gènes de l'inflammation.

### **3- Le syndrome de Netherton et la dermatite atopique**

La DA fait partie des maladies atopiques et partage des caractéristiques cliniques avec le SN incluant, des lésions eczématiformes (ou lésion de type dermatite atopique ; hyperplasie épidermique, hyperkératose et spongieuse, associé à un infiltrat inflammatoire dermique essentiellement composé de LT et de mastocytes activés), un taux d'IgE sérique élevé, une hyper-éosinophilie sanguine. Comme les patients SN, les patients DA ont une tendance élevée à développer de l'asthme ou des rhinites allergiques plus tard dans leur vie, un phénomène connu sous le nom de « marche atopique ».

Deux hypothèses sont actuellement proposées pour expliquer la physiopathologie de la DA. La première implique une anomalie primaire intrinsèque aux cellules épithéliales de la peau qui entraînerait un défaut de barrière cutanée. Cette anomalie conduirait dans un second temps à une réponse immunitaire exacerbée envers les antigènes pénétrant à travers la peau. La seconde hypothèse attribue un rôle primaire au système immunitaire qui favoriserait une réponse de type Th2 et une

hyper-IgE entraînant des défauts cutanés secondaires au grattage suivant l'hypersensibilité du patient.

Concernant la première hypothèse, nos travaux réalisés sur les patients SN et les animaux *Spink5<sup>-/-</sup>* ont permis de mettre en évidence le rôle du défaut de la fonction de barrière cutanée dans le développement de l'inflammation. Ce défaut pourrait favoriser les stimuli environnementaux et une sensibilisation répétée à travers la peau conduisant à l'exacerbation d'une réponse de type Th2. En effet, les pathogènes et les allergènes seraient alors plus accessibles aux cellules « sentinelles » que sont les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques. Après migration vers les organes lymphoïdes secondaires elles pourraient induire la différenciation des lymphocytes T et stimuler l'expression des molécules de localisation cutanée (comme le CLA).

En plus d'être capturés par les cellules présentatrices d'antigènes, les agents exogènes peuvent avoir une action plus directe. En effet, certaines protéases dérivées des acariens (comme Derp3) ont la capacité d'activer le récepteur PAR2. Ainsi les protéases des allergènes pourraient activer la voie PAR2-TSLP. Ce lien entre le défaut de barrière cutanée et l'induction d'un microenvironnement pro-allergique, fournirait une relevance pour la voie que nous avons identifiée dans le développement de la DA. Elle pourrait dans ce cas être induite secondairement au défaut de barrière.

La théorie du défaut primaire de la fonction de barrière cutanée semble soutenue par la dermatite « extrinsèque » (EAD) qui concerne 70 à 80 % des patients DA. Chez ces patients, la sévérité de la maladie coïncide avec l'hyper-IgE sérique. Ceci pourrait donc être secondaire à une sensibilisation répétée à travers la peau.

Cependant, cette hypothèse est modulée par toutes les pathologies avec un défaut de barrière cutanée qui ne présentent pas de manifestations atopiques, telles que le psoriasis ou l'ichtyose lamellaire. De plus, ce scénario ne permet pas d'expliquer le développement précoce des allergies avant sensibilisation par des allergènes environnementaux. En effet, il est difficile d'expliquer la survenue de DA dite « intrinsèque » (IAD) qui concerne 20 à 30% des patients DA et qui serait indépendante de la réponse IgE et donc de la pénétration d'allergènes. L'absence de l'hyper-IgE laisse supposer une réaction inflammatoire sans reconnaissance ni capture de facteurs antigéniques. Ceci sous-entend donc une réponse due à un désordre intrinsèque du système immunitaire ou des cellules épithéliales de la peau



tel que l'activation de la voie KLK5-PAR2-TSLP induisant directement un microenvironnement pro-Th2 et ce indépendamment de la production d'IgE. Ceci est renforcé par les souris à la fois transgéniques pour *Ts/p* et déficiente pour le TCR, dont la surexpression épidermique de TSLP est suffisante pour induire une réponse inflammatoire sans intervention des lymphocytes T, et sans production d'IgE (197).

Néanmoins, les patients souffrant d'IAD sont minoritaires par rapport à l'EAD. Il est possible que parmi les patients EAD, il y ait des IAD aggravé par le défaut de barrière. En effet, un patient souffrant d'IAD développe des lésions de DA. Ces lésions infiltrées par des cellules immunitaires conduisent au développement du prurit et à plus long terme à l'altération de la fonction barrière par le comportement de grattage, la dégradation des matrices par les protéases de l'inflammation ou encore, la diminution de l'expression de la filaggrine induite par les cytokines Th2.

La seconde hypothèse du défaut intrinsèque du système immunitaire est illustrée par les maladies de l'IPEX (Immunodérégulation, Polyendocrinopathies, Entéropathie auto-immune liée au chromosome X) (137) et le syndrome de WAS (Wiskott-Aldrich) (139). Ces maladies d'origine immunitaire présentent un défaut du nombre et de la fonction des lymphocytes T régulateurs responsable dans un second temps du développement de lésions de type dermatite atopique. Une telle anomalie du système immunitaire pourrait également jouer un rôle dans le SN. En effet, LEKTI pourrait avoir un rôle direct dans l'homéostasie du système immunitaire comme le suggère son expression dans les corpuscules de Hassal du thymus.

Ainsi, il apparaît difficile de déterminer quel est l'événement déclencheur des lésions de DA. Les deux composantes épidermique et immunitaire semblent s'associer pour aggraver le phénotype clinique.

L'ensemble de nos travaux et les données de la littérature confirment qu'un défaut intrinsèque, cutané ou immunitaire pourrait conduire au développement de lésions eczématiformes précoces. En revanche, le maintien de l'intégrité de l'épiderme est essentiel pour limiter la propagation et l'aggravation de la maladie selon une cinétique plus tardive.



## Partie B : Rôle de LEKTI dans l'inflammation allergique systémique

### I- Polymorphismes de *SPINK5* associés à l'atopie

En 2001, *Walley et al.* ont mis en évidence l'association d'un polymorphisme fonctionnel de *SPINK5*, G1258A, avec la dermatite atopique (DA), l'hyper-IgE sanguine et l'asthme (85). Cette a été par la suite reproduite dans d'autres études réalisées sur des populations d'origines ethniques différentes association (81, 83, 84, 367). Le polymorphisme G1258A, conduit à l'apparition d'un résidu lysine (Glu420Lys) dans la région linker entre les domaines D6 et D7 de la protéine (85). La présence de cet acide aminé crée un motif plus affin pour les convertases et pourrait être associée à la formation d'un nouveau site de clivage dans le précurseur de LEKTI. Ceci entrainerait la disparition de fragments fonctionnels de LEKTI. Etant donné que les différents fragments mono ou multimériques de LEKTI ont des capacités inhibitrices différentes, il est possible que le Glu420Lys conduise à la perte de fragments efficaces et à la diminution de l'activité inhibitrice envers des protéases endogènes et/ou exogènes favorisant ainsi le défaut de barrière cutanée et/ou l'inflammation. Cependant, l'association entre Glu420Lys et la DA ou l'asthme n'est pas retrouvée dans toutes les études (382-384). Ces résultats discordants sont le reflet de la variabilité génétique et environnementale existant entre ces différentes populations et de la complexité multifactorielle de la maladie qui intègre ces deux composantes.

De plus, une étude plus récente réalisée sur une population d'origine chinoise a révélé la présence, dans le promoteur de LEKTI, d'un autre polymorphisme associé à l'asthme. Cette variation allélique (-206G>A) semble affecter l'activité du promoteur de LEKTI et diminuer l'expression de la protéine (385).

Ainsi, l'ensemble de ces données viennent renforcer l'hypothèse selon laquelle LEKTI jouerait un rôle dans le contrôle de la réponse allergique au niveau cutané et systémique.

## **II- Rôle direct de LEKTI sur la mise en place d'un biais Th2 dans le syndrome de Netherton**

Nos résultats ont démontré que l'épiderme déficient pour LEKTI jouait un rôle intrinsèque clé dans le développement de l'inflammation cutanée de type allergique et ce en absence de lymphocytes. Néanmoins, ces observations n'excluent pas le rôle du système immunitaire adaptatif dans la progression de la maladie. En effet, les patients SN développent de nombreuses manifestations allergiques (eczéma atopique, rhinite allergique et asthme allergique) accompagnées d'un taux élevé d'IgE sériques, ce qui suggère une réponse immunitaire de type Th2 exacerbée.

Nous avons ainsi entrepris l'étude de la polarisation de la réponse T chez une cohorte de 10 patients atteints du SN. Nos résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence une surexpression transcriptionnelle, de la cytokine Th2 IL4, par les PBMCs (Résultats, Partie 3). Ces résultats seront complétés par une étude du profil de sécrétion cytokinique des lymphocytes CD4<sup>+</sup> isolés et activés par un stimulus non spécifique (anti-CD3/anti-CD28). Néanmoins, ces données suggèrent que l'absence de LEKTI pourrait favoriser le biais Th2 de manière plus ou moins direct. D'une part, il pourrait s'agir d'une anomalie secondaire à la réponse allergique cutanée, encore appelé « marche atopique ». Cette notion suggère qu'une sensibilisation répétée à travers la peau favoriserait le développement d'une hypersensibilité au niveau d'autres organes notamment les poumons. D'autre part, le biais Th2 et l'hypersensibilité systémique pourrait être une conséquence plus directe de l'effet de l'absence de LEKTI sur le système immunitaire.

LEKTI est essentiellement exprimée au niveau des tissus en contact avec l'environnement tels que la peau et les muqueuses. En plus de cette localisation qui semble évidente au regard de son rôle dans le maintien de la fonction de barrière et la régulation des signaux pro-inflammatoires, LEKTI est exprimé par les corpuscules de Hassal du thymus (HCs) (70). Il s'agit d'une structure kératinisée qui exprime un ensemble de gènes communs aux kératinocytes de l'épiderme, tel que des kallikréines (386) ou des cytokératines (387). Le thymus n'est pourtant pas un organe destiné à rencontrer des agents exogènes, ni un organe soumis à des réactions inflammatoires. Le rôle de LEKTI au niveau de cette structure particulière reste donc à élucider.

Cependant, de manière intéressante, nous avons pu observer que PAR2 était exprimé par les HCs thymique, de même que TSLP (360). De plus, il semblerait que les KLK5 et KLK14 soient également exprimées dans le thymus (388). Ces protéases sont des cibles de LEKTI (22, 389) et ont la capacité d'activer le récepteur PAR2 (217). La présence de tous ces acteurs dans les corpuscules de Hassal suggère que la cascade moléculaire que nous avons identifiée pourrait donc être également mis en jeu dans cet organes.

En condition physiologique, TSLP exprimée par les HCs aurait un rôle dans le développement des lymphocytes T régulateurs (Treg) des cellules essentielles au contrôle de la réponse immunitaire. Ces cellules sont notamment capables de moduler la réponse T aux allergènes. TSLP active les cellules dendritiques proches des HCs qui vont ensuite induire la différenciation des Treg Foxp3<sup>+</sup> (360). Peut-on imaginer qu'une production incontrôlée de TSLP puisse affecter le mécanisme de différenciation de Treg Foxp3<sup>+</sup> ?

Une anomalie de la fonction ou du nombre des Treg Foxp3<sup>+</sup> dans le SN coïnciderait avec celles observées dans la dermatite atopique. En effet, bien que le nombre de ces cellules circulantes soit augmenté chez les patients DA (161), le nombre des Treg Foxp3<sup>+</sup> est diminué dans les lésions de DA (160). De plus, une étude récente a montré que chez les patients DA présentant un taux d'IgE élevé, il existe une population de Treg circulant possédant des propriétés pro-Th2 (162). Ces cellules normalement destinées à moduler la réponse immunitaire joueraient alors un rôle inverse à leur fonction initiale en sécrétant des molécules favorisant la réponse allergique. Il serait ainsi intéressant de déterminer si cette population particulière de Treg est également présente chez les patients SN et participe au développement du phénotype atopique. La génération d'une telle population de Treg pourrait être un défaut intrinsèque au SN, indépendant des stimuli environnementaux. On pourrait donc proposer un rôle de LEKTI dans la régulation de l'homéostasie thymique et des lymphocytes Treg.

Un autre scénario pourrait être envisagé. Dans la medulla thymique, les cellules dendritiques (DCs) en contact avec les HCs produisant TSLP pourraient acquérir les mêmes propriétés que les DCs activées par TSLP dans un autre tissu. Est-ce qu'une fois en contact avec les thymocytes, ces DCs activées pourraient induire une prédisposition vers une différenciation Th2 ? Cette hypothèse suppose que LEKTI puisse réguler l'expression de OX40L à la surface des DCs thymique via l'induction

de TSLP de la même manière que dans la peau. Ainsi la formation du complexe OX40/OX40L prédisposerait les thymocytes à se différencier en Th2.

Enfin, le rôle de LEKTI dans le thymus pourrait également être indépendant de TSLP. Son rôle dans l'homéostasie du système immunitaire pourrait dépendre de l'inhibition d'autres protéases. D'autres protéases pourraient jouer un rôle équivalent de celui de la KLK5 et être exprimées dans les corpuscules de Hassal telles que les KLK6 (386) et 14, ou de protéases à sérine thymique comme TSSP (Thymus-Specific Serine Protease) (390). Cependant la TSSP est une protéase exprimée au niveau des cellules épithéliales du cortex (390). LEKTI étant exprimé par les HC localisés dans la medulla, la rencontre de l'inhibiteur avec cette protéase suppose une diffusion de ces deux partenaires potentiels. Ainsi d'autres cibles potentielles de LEKTI dans le thymus restent à identifier.

L'action de LEKTI dans le thymus reste à élucider, car jusqu'à présent nous ne savons pas si le microenvironnement Th2 mis en place au niveau de la peau est suffisant pour induire un désordre systémique. Ainsi, il sera nécessaire de déterminer si le thymus *SPINK5*<sup>-/-</sup> participe au développement de la réponse inflammatoire. Ceci nous permettra d'évaluer la contribution respective de la peau et du thymus dans le développement des maladies allergiques récurrentes du SN.

Pour répondre à cette question, deux modèles devront être développés : des greffes de peau *Spink5*<sup>-/-</sup> sur des souris de même fond génétique et immunocompétentes et des greffes de thymus *Spink5*<sup>-/-</sup> sur des souris nude athymiques. Que ce soit les souris ayant reçu une greffe de peau ou celles ayant reçu une greffe de thymus, les études réalisées seront les mêmes :

- Mesure de la concentration sérique en IgE ;
- Polarisation de la réponse T ;
- Etude du phénotype cutané ;
- Test de la sensibilité bronchique.

De cette façon, nous déterminerons si la peau et/ou le thymus sont responsables du développement de l'allergie au niveau systémique.

Ces résultats permettront une meilleure compréhension de la physiopathologie du SN mais également de la dermatite atopique dont la contribution des deux aspects, cutané et immunologique, reste encore à éclaircir.

### III- Rôle de TSLP dans la propagation de la réponse Th2

Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, l'absence de LEKTI dans l'épiderme est associée à la surexpression par les kératinocytes de la cytokine pro-Th2, TSLP. Dans la peau, les cellules de Langerhans activées par TSLP entreprennent une migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette migration coïncide avec la diminution du nombre de cellules Langérine<sup>+</sup> dans l'épiderme des patients DA (177) et des patients SN qui surexpriment TSLP (Résultats Partie 3, Figure 7). Une fois dans les ganglions drainants la peau, les cellules de Langerhans induisent la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th2.

Des études récentes suggèrent qu'en plus d'être nécessaire et suffisante pour induire des lésions eczématiformes, TSLP participerait à la progression du phénotype atopique. En effet, les souris surexprimant TSLP dans l'épiderme développent une hypersensibilité bronchique après inhalation d'allergènes et ce en absence de sensibilisation épicutanée. De manière intéressante, l'inactivation génétique de TSLP ou de son récepteur, abolit ce processus (317, 350). Ce phénotype d'hypersensibilité bronchique pourrait être dû à l'augmentation du taux sanguin de la cytokine secondaire à sa production massive par les kératinocytes (317, 350). TSLP pourrait alors diffuser jusqu'aux poumons et activer les cellules dendritiques associées à l'épithélium. De plus, son action à distance pourrait être supportée par les cellules impliquée dans le développement de l'asthme et qui expriment son récepteur, comme les mastocytes ou les cellules dendritiques (DCs). Après leur activation par TSLP les mastocytes sécrètent des cytokines pro-Th2 (178) et les DCs produisent des chimiokines attractant les LTh2 telles que TARC et MDC (177). Ces cellules activées par TSLP au niveau d'autres tissus, comme les poumons, ou dans la circulation sanguine pourraient alors favoriser le développement d'une réponse allergique systémique. Ainsi, TSLP serait un acteur clé qui permettrait la progression des lésions eczématiformes vers le développement de l'asthme allergique.

Nos travaux réalisés sur des souris immunodéficientes (greffes sur souris nude) ne nous ont pas permis d'étudier ce mécanisme. Le développement d'un KO conditionnel inductible viable à l'âge adulte ou la réalisation de greffes de peau KO

sur des souris immunocompétentes fourniront des éléments de réponse à cette question. Ces modèles nous permettront d'étudier le taux sérique de TSLP et leur réponse à la sensibilisation bronchique par un allergène.

De plus nous analyserons la concentration de TSLP dans le sérum des patients SN. La diffusion de TSLP dans le sérum et l'activation des cellules circulantes ou résidentes dans d'autre tissus, pourrait expliquer la survenu de complications allergiques chez ces patients. La spécificité de ce mécanisme induit par TSLP devra être confirmée grâce à la quantification de TSLP dans le sérum de patients atteints d'ichtyose mais ne présentant pas de manifestation atopiques constantes. C'est le cas par exemple de l'ichtyose lamellaire de type 1 (OMIM, 242100) due à des mutations dans le gène *TGM1* (Transglutaminase 1). Cette ichtyose congénitale présente des caractéristiques cliniques proches de celles du SN, telle que l'érythrodermie desquamative (32). L'absence de la TGM1 entraine un défaut de formation de l'enveloppe cornée et est associée à l'altération de la composition lipidique conduisant à une organisation anormale des lamelles lipidiques intercornéocytaires. Ce plus cette anomalie semble affecter l'assemblage des cornéodesmosomes (391). Ces désordres affectant la formation de l'enveloppe cornée et l'adhésion intercornéocytaire participent à l'augmentation de la perméabilité épidermique. Cependant, la littérature ne rapporte pas de manifestations atopiques constantes chez les patients atteints d'ichtyoses lamellaires. L'absence de surexpression de TSLP dans l'épiderme de ces patients, pourrait expliquer la différence entre l'ichtyose lamellaire et le syndrome de Netherton. Ainsi en absence d'atopie systémique, TSLP ne devrait pas être détectée dans le sérum des patients atteints d'ichtyose lamellaire.



## **Partie C : Perspectives thérapeutiques du syndrome de Netherton**

Bien que certains essais de thérapie comme le picrolimus offrent des perspectives positives pour l'amélioration de la condition des patients atteint du syndrome de Netherton, il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique de la maladie.

L'avancée des connaissances des mécanismes physiopathologiques du SN met en évidence la nécessité de traiter les deux versants de la maladie : le défaut de barrière cutanée et l'inflammation allergique.

### **I- Inhibition de l'inflammation allergique**

De même que pour la DA, la composante inflammatoire du SN doit être maîtrisée pour améliorer le phénotype clinique des patients. En effet, lors de l'inflammation un certain nombre de molécules telles que les protéases sécrétées par les cellules immunitaires ou encore les cytokines Th2 qui régulent négativement l'expression de la filaggrine, contribuent au maintien et à l'aggravation du phénotype cutané. De plus, les médiateurs tels que l'histamine ou encore l'activation de PAR2 au niveau des cellules nerveuses sensorielles sont responsables du déclenchement de démangeaisons entraînant le grattage et le stress mécanique de l'épiderme qui exacerbe la réponse inflammatoire.

Il existe déjà un certain nombre de traitements pour bloquer l'inflammation, mais il s'agit essentiellement de traitements immunosuppresseurs visant les lymphocytes T. A long terme, ces traitements pourraient favoriser le développement d'infections récurrentes. Il apparaît donc nécessaire d'identifier des cibles plus spécifiques de l'allergie. Parmi celles-ci, on pourrait envisager un traitement bloquant TSLP, par l'administration systémique d'anticorps. Cette hypothèse est renforcée par les modèles murins dont un acteur de la voie de TSLP a été inhibé en invalidant TSLP ou son récepteur (317, 350). Ces animaux ne développent plus de lésion eczématiformes et deviennent insensibles à l'inhalation d'allergènes spécifiques.

Une autre approche pourrait viser à inhiber la signalisation en aval du récepteur PAR2, dont le rôle dans la mise en place de signaux pro-allergiques a été démontré

(368). Ce type d'approche a été testé par différentes équipes dans des modèles animaux de maladies inflammatoires. C'est le cas d'un modèle d'arthrite rhumatoïde dans lequel l'administration d'anticorps bloquant, d'un siRNA dirigé contre PAR2 ou d'un peptide antagoniste a permis d'atténuer l'inflammation (392). Des résultats encourageants ont également été obtenus dans un modèle de thrombose glomérulaire rénale chez le rat. L'administration d'un peptide bloquant de PAR2 a permis d'inhiber la surexpression du TNF (393). Comme chez nos souris DKO, le blocage de la signalisation induite par PAR2 permet la diminution des signaux proinflammatoires mais ne reverse pas entièrement le phénotype. Ainsi le blocage de cette voie spécifique pourrait être utilisé pour ralentir l'inflammation, en complément d'autres traitements visant par exemple à rétablir la fonction de barrière épidermique. L'utilisation d'inhibiteur de protéases pourrait inhiber indirectement la signalisation de PAR2. Cette stratégie qui permettrait également d'inhiber le clivage des cornéodesmosomes dans le cas du SN, pourrait être pertinente.

## **II- Inhibition de la kallikréine 5 : identification d'inhibiteurs efficaces et spécifiques**

Nous avons pu mettre en évidence la dualité du rôle de la kallikréine 5 dans la progression des deux versants de la maladie. Ainsi, la KLK5 est une cible de choix pour inhiber à la fois le défaut primaire de barrière cutanée et la mise en place d'un environnement pro-allergique au niveau de la peau. De plus, la KLK5 semble être au sommet de la cascade protéasique dérégulée dans l'épiderme *SPINK5*<sup>-/-</sup>. En effet, elle est capable de s'auto-activer mais également d'activer la KLK7. De plus, des expériences menées au laboratoire ont mis en évidence la capacité de la KLK5 à activer l'Elastase 2 *in vitro*.

### **1- Identification d'inhibiteurs potentiels de la KLK5**

L'identification d'inhibiteurs spécifiques et efficaces de la KLK5 peut être réalisée de plusieurs manières :

- le criblage à haut débit (High Throughput Screening, HTS) d'une chimiothèque (banque de molécules chimiques ou naturelles). Lorsque la protéase d'intérêt est mise en présence et son substrat synthétique le clivage protéolytique est révélé par une réaction chromogène ou une

émission de fluorescence. Le criblage consiste à mettre en évidence une molécule qui empêche le clivage du substrat par la protéase ;

- la modélisation *in silico* permet de prédire la structure moléculaire optimale d'un inhibiteur pour une protéase d'intérêt. Pour cela, le site actif de l'enzyme est modélisé grâce aux données cristallographiques de la littérature. La prédiction d'un inhibiteur optimal est basée sur l'interaction maximale de sa structure avec la poche catalytique de l'enzyme (Docking).

Ces deux technologies sont complémentaires pour identifier le meilleur inhibiteur puisqu'après identification d'une molécule par HTS, le squelette moléculaire pourra être intégré *in silico* afin d'améliorer la relation structure/fonction.

Cependant, l'identification de molécules par ces deux techniques ne garantit pas leur efficacité thérapeutique. Il est donc nécessaire de réaliser des étapes de validation *in vivo*.

## **2- Validation des inhibiteurs *ex vivo* et *in vivo***

Nous possédons au laboratoire des modèles cellulaires et murins qui aideront à la validation des molécules inhibitrices sélectionnées.

Dans un premier temps, les inhibiteurs pourront être testés *ex vivo* pour leur capacité à inhiber la voie KLK5-PAR2 dans les cellules de patients SN. Après ajout de la molécule dans le milieu de culture, l'efficacité d'inhibition sera évaluée par l'analyse transcriptionnelle des gènes cibles de cette voie (*TSLP*, *ICAM1*, *TNF*, *IL8*).

Dans un second temps, nous disposons de plusieurs modèles murins qui permettront de juger de l'efficacité des molécules pour la réversion du phénotype clinique :

- les greffes de peau *Spink5*<sup>-/-</sup> ;
- les souris transgéniques pour la KLK5 qui reproduisent également les anomalies majeures du SN (Annexe 2) ;
- un modèle de souris KO conditionnel inductible pour *Spink5* développé en collaboration avec la clinique de la souris de Strasbourg.

La particularité du SN vient du fait que l'anomalie primaire, l'hyperactivité des protéases épidermiques, est un événement déclenché dans les couches les plus différenciées de l'épiderme et donc les plus accessibles. De plus, la KLK5 est sécrétée à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée ce qui ne

nécessite pas la pénétration de la molécule à l'intérieur de la cellule. Ainsi, le choix d'une application topique des inhibiteurs semble judicieux.

Il y a cependant des contraintes à cette approche. On ne peut pas administrer une molécule de trop haut poids moléculaire à travers la couche cornée. En effet, la taille maximale des molécules préconisées pour l'application topique est de 400 Da environ. Cependant, chez nos animaux *Spink5*<sup>-/-</sup> et chez les patients SN, la couche cornée est souvent détachée de l'épiderme sous-jacent, ce qui procure une meilleure accessibilité à la couche granuleuse. Malheureusement, ce décollement est cyclique et alterne avec la présence d'une couche cornée parfois très épaisse (hyperkératose). Ainsi, la nature de l'excipient devra être choisie avec précaution pour permettre la diffusion de la molécule à travers la couche cornée.

Lors de ces tests précliniques, la réversion du phénotype cutané et l'absence d'effet secondaire ou toxique de la molécule permettra d'envisager le développement de tests cliniques chez l'homme.

A ce jour, les traitements développés pour la DA, sont souvent utilisés pour améliorer la condition clinique des patients SN. Ces deux pathologies partagent en effet un certain nombre de similitudes qui permettent d'étendre les avancées de la compréhension des voies physiopathologiques à l'une ou à l'autre. Il n'est donc pas exclu que les traitements développés pour le SN puissent être appliqués à des patients atteints de dermatite atopique et que l'inhibition des protéases épidermiques puissent également améliorer le phénotype des patients atteints de DA.

Ainsi la compréhension et les avancées thérapeutiques réalisées au bénéfice d'une maladie orpheline monogénique, le syndrome de Netherton, pourraient profiter à un plus grand nombre de patients atteints de cette maladie plus commune qu'est la dermatite atopique.



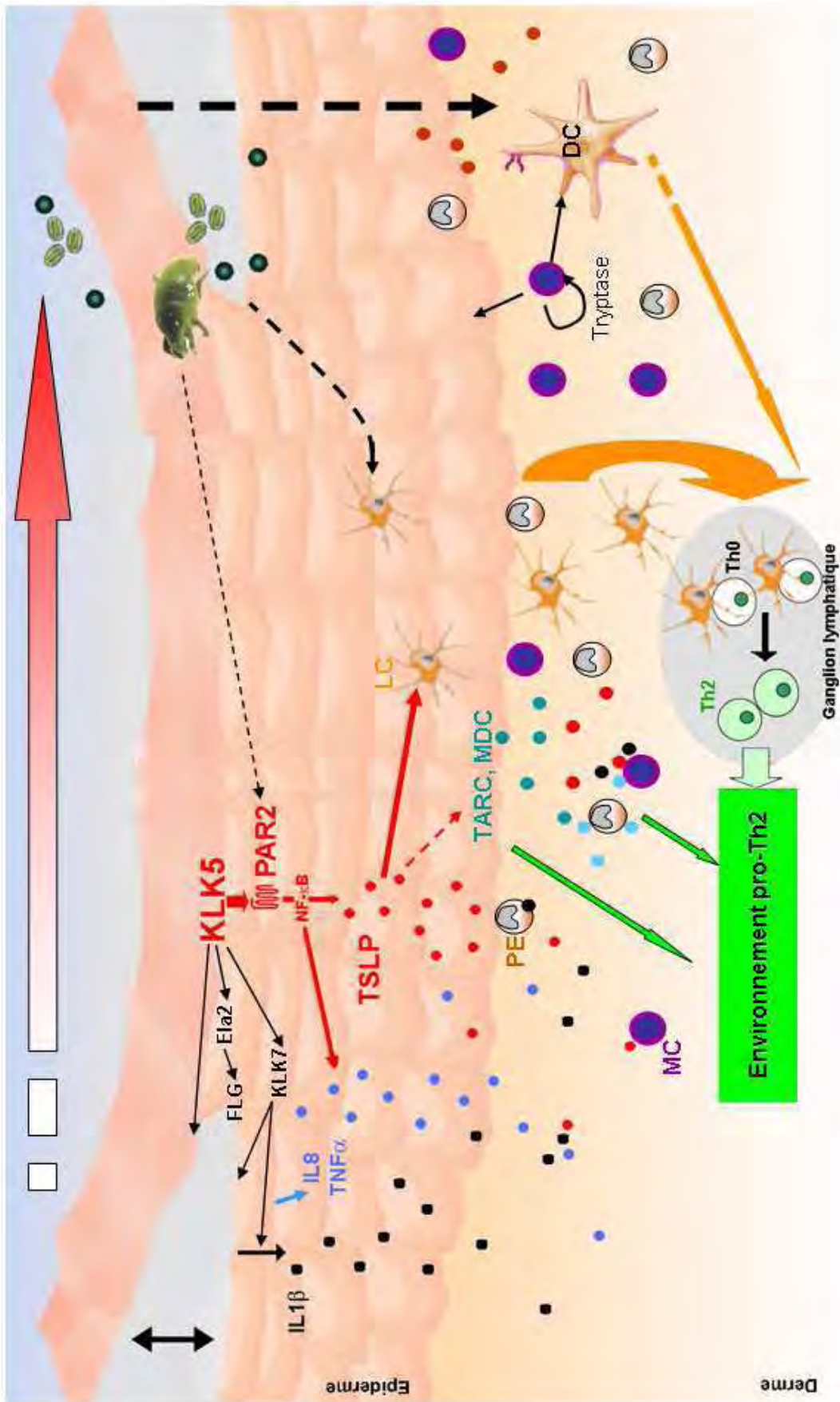


Figure 29- Schéma récapitulatif du rôle de l'épiderme *SPINK5*<sup>-/-</sup> dans le développement de lésions eczématiformes.

**Figure 29- Schéma récapitulatif du rôle de l'épiderme *SPINK5*<sup>-/-</sup> dans le développement de lésions eczématiformes.**

En l'absence de LEKTI, la kallikréine 5 (KLK5) hyperactive joue un rôle dans le défaut de barrière cutanée et le déclenchement de signaux pro-inflammatoires et pro-allergiques.

*In utero* la KLK5 clive le récepteur PAR2 qui active NF- $\kappa$ B et induit directement l'expression de TSLP, IL8 et TNF par les kératinocytes. La KLK5 est également directement ou *via* l'activation de la KLK7, responsable de la dégradation des desmosomes à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée. Ceci entraîne le détachement de la couche cornée et la sécrétion de d'IL1, IL8 et TNF par les kératinocytes stressés mécaniquement. La proforme de l'IL1 peut alors être activée par la KLK7. De plus, ces signaux peuvent induire la sécrétion des chimiokines pro-Th2, TARC et MDC. L'ensemble de ces médiateurs induit le recrutement et l'activation des polynucléaires éosinophiles (PE) et des mastocytes (MC) dans le derme. Parallèlement à ces mécanismes indépendants du système immunitaire adaptatif, TSLP est connu pour activer les cellules de Langerhans (LC) qui migrent alors vers les ganglions lymphatiques dans lesquels elles induiront la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th2. Ainsi les kératinocytes activés, les polynucléaires éosinophiles et les mastocytes participent à la mise en place d'un microenvironnement pro-allergique en absence de stimuli exogènes.

Après la naissance le défaut de barrière cutanée, consécutif à la dégradation des desmosomes par les KLK5 et 7 ainsi qu'au défaut de maturation de la filaggrine (Flg) secondaire à l'hyperactivité de l'élastase 2 (Ela2), favorise la pénétration d'agents exogènes. Ces pathogènes et allergènes peuvent déclencher la sécrétion de cytokines et chimiokines par les kératinocytes après reconnaissance par les toll-like récepteurs. De plus les agents pénétrant la peau pourront être pris en charge par les LCs et les cellules dendritiques (DC) et les présenter aux lymphocytes dans les organes lymphoïdes périphériques. Les acariens sécrétant des protéases (telle que Derp3) peuvent également activer PAR2 et déclencher la voie pro-allergique. L'ensemble de ces événements viendront s'ajouter à ceux mis en place précocement pour favoriser le développement de lésions eczématiformes dans la peau déficiente en LEKTI et probablement favoriser le développement d'une réponse allergique systémique.





## CONCLUSION GENERALE

Le syndrome de Netherton (SN) est une ichtyose congénitale rare et sévère à transmission autosomique récessive et caractérisée par un défaut de barrière cutanée et par le développement de maladies allergiques. Le SN est dû à la perte d'expression du gène *SPINK5* codant l'inhibiteur de protéase LEKTI, exprimé principalement dans la couche granuleuse de l'épiderme, dans les muqueuses et dans les corpuscules de Hassall du thymus. L'absence de LEKTI dans l'épiderme entraîne l'hyperactivité des protéases KLK5 et 7 qui dégradent les structures d'adhésion intercornéocytaires entraînant le détachement en bloc de la couche cornée. Nous avons identifié une nouvelle cascade signalétique impliquant le clivage, par la KLK5, de PAR2 à la surface des kératinocytes qui active le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et induit l'expression de molécules pro-inflammatoires (ICAM1, TNF et IL8) et pro-Th2 (TSLP) (Figure 29). La voie KLK5-PAR2-TSLP est une propriété intrinsèque aux kératinocytes *SPINK5*<sup>-/-</sup>, indépendante du défaut de barrière cutanée et du système immunitaire adaptatif. Cette cascade biologique activée à l'état embryonnaire peut expliquer l'apparition de lésions eczématiformes chez les patients SN et ce dès la naissance. L'étude d'animaux déficients à la fois pour *Spink5* et pour *Par2* a confirmé l'importance de cette cascade dans l'induction des messages pro-allergiques précoces. Cependant, le contrôle de cette voie ne rétablit pas la fonction de barrière cutanée et ne reverse que partiellement le phénotype inflammatoire dans une peau adulte. L'ensemble de ces travaux ainsi que le phénotype atopique des patients SN qui le distingue des autres ichtyoses, laisse supposer une exacerbation de la réponse Th2. Ainsi, l'analyse fonctionnelle et la caractérisation des cellules immunitaires circulantes et infiltrées dans la peau des patients est nécessaire pour mieux comprendre le versant immunologique de la maladie. L'ensemble de nos résultats soulignent l'importance du contrôle de l'inflammation mais aussi du maintien de la fonction de barrière épidermique pour l'amélioration des symptômes cliniques du SN. La dualité de la KLK5, qui induit à la fois le défaut de barrière cutané et les signaux pro-allergiques (Figure 29) en fait une cible de choix pour le développement d'une thérapie ciblée du SN. L'avancée des connaissances physiopathologiques et des traitements du SN pourront être étendues à une maladie plus commune multifactorielle, la dermatite atopique, qui partage des caractéristiques cliniques avec cette maladie monogénique.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Katz, S.I., K. Tamaki, and D.H. Sachs. 1979. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282:324-326.
2. Romani, N., and G. Schuler. 1989. Structural and functional relationships between epidermal Langerhans cells and dendritic cells. *Res Immunol* 140:895-898; discussion 918-826.
3. Birbeck, M., A. Breathnach, and J. Everall. 1961. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37:51-64.
4. Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque, and S. Saeland. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12:71-81.
5. Prost-Squarcioni, C. 2006. [Histology of skin and hair follicle]. *Med Sci (Paris)* 22:131-137.
6. Lin, J.Y., and D.E. Fisher. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445:843-850.
7. Lucarz, A., and G. Brand. 2007. Current considerations about Merkel cells. *Eur J Cell Biol* 86:243-251.
8. Sidhu, G.S., P. Chandra, and N.D. Cassai. 2005. Merkel cells, normal and neoplastic: an update. *Ultrastruct Pathol* 29:287-294.
9. Tachibana, T. 1995. The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* 58:379-396.
10. Hardman, M.J., P. Sisi, D.N. Banbury, and C. Byrne. 1998. Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* 125:1541-1552.
11. M'Boneko, V., and H.J. Merker. 1988. Development and morphology of the periderm of mouse embryos (days 9-12 of gestation). *Acta Anat (Basel)* 133:325-336.
12. Menon, G.K., S. Grayson, and P.M. Elias. 1985. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 84:508-512.
13. Bikle, D.D., D. Ng, C.L. Tu, Y. Oda, and Z. Xie. 2001. Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 177:161-171.
14. Yuspa, S.H., A.E. Kilkeny, P.M. Steinert, and D.R. Roop. 1989. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol* 109:1207-1217.
15. Fuchs, E. 2007. Scratching the surface of skin development. *Nature* 445:834-842.
16. Lechler, T., and E. Fuchs. 2005. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437:275-280.
17. Fuchs, E., and H. Green. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19:1033-1042.
18. Madison, K.C. 2003. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121:231-241.
19. Bernard, D., B. Mehul, A. Thomas-Collignon, L. Simonetti, V. Remy, M.A. Bernard, and R. Schmidt. 2003. Analysis of proteins with caseinolytic activity in a human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cysteine protease and identified the so-called "stratum corneum thiol protease" as cathepsin 12. *J Invest Dermatol* 120:592-600.

20. Caubet, C., N. Jonca, M. Brattsand, M. Guerrin, D. Bernard, R. Schmidt, T. Egelrud, M. Simon, and G. Serre. 2004. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* 122:1235-1244.
21. Igarashi, S., T. Takizawa, Y. Yasuda, H. Uchiwa, S. Hayashi, H. Brysk, J.M. Robinson, K. Yamamoto, M.M. Brysk, and T. Horikoshi. 2004. Cathepsin D, but not cathepsin E, degrades desmosomes during epidermal desquamation. *Br J Dermatol* 151:355-361.
22. Deraison, C., C. Bonnart, F. Lopez, C. Besson, R. Robinson, A. Jayakumar, F. Wagberg, M. Brattsand, J.P. Hachem, G. Leonardsson, and A. Hovnanian. 2007. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell* 18:3607-3619.
23. Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099-1111.
24. Mese, G., G. Richard, and T.W. White. 2007. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127:2516-2524.
25. Djalilian, A.R., D. McGaughey, S. Patel, E.Y. Seo, C. Yang, J. Cheng, M. Tomic, S. Sinha, A. Ishida-Yamamoto, and J.A. Segre. 2006. Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. *J Clin Invest* 116:1243-1253.
26. Richard, G., F. Rouan, C.E. Willoughby, N. Brown, P. Chung, M. Ryyanen, E.W. Jabs, S.J. Bale, J.J. DiGiovanna, J. Uitto, and L. Russell. 2002. Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Am J Hum Genet* 70:1341-1348.
27. Ishiko, A., Y. Matsunaga, T. Masunaga, S. Aiso, T. Nishikawa, and H. Shimizu. 2003. Immunomolecular mapping of adherens junction and desmosomal components in normal human epidermis. *Exp Dermatol* 12:747-754.
28. Vasioukhin, V., E. Bowers, C. Bauer, L. Degenstein, and E. Fuchs. 2001. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* 3:1076-1085.
29. Lai-Cheong, J.E., L. Liu, G. Sethuraman, R. Kumar, V.K. Sharma, S.R. Reddy, A. Vahlquist, S. Pather, K. Arita, V. Wessagowit, and J.A. McGrath. 2007. Five new homozygous mutations in the KIND1 gene in Kindler syndrome. *J Invest Dermatol* 127:2268-2270.
30. Green, K.J., and C.A. Gaudry. 2000. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:208-216.
31. Simon, M., N. Jonca, M. Guerrin, M. Haftek, D. Bernard, C. Caubet, T. Egelrud, R. Schmidt, and G. Serre. 2001. Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. *J Biol Chem* 276:20292-20299.
32. Huber, M., I. Rettler, K. Bernasconi, E. Frenk, S.P. Lavrijsen, M. Ponc, A. Bon, S. Lautenschlager, D.F. Schorderet, and D. Hohl. 1995. Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 267:525-528.
33. Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:328-340.
34. Kalinin, A., L.N. Marekov, and P.M. Steinert. 2001. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci* 114:3069-3070.
35. Kalinin, A.E., A.V. Kajava, and P.M. Steinert. 2002. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 24:789-800.

36. Resing, K.A., K.A. Walsh, and B.A. Dale. 1984. Identification of two intermediates during processing of profilaggrin to filaggrin in neonatal mouse epidermis. *J Cell Biol* 99:1372-1378.
37. Ishida-Yamamoto, A., H. Takahashi, R.B. Presland, B.A. Dale, and H. Iizuka. 1998. Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Lab Invest* 78:1245-1253.
38. Presland, R.B., J.R. Kimball, M.B. Kautsky, S.P. Lewis, C.Y. Lo, and B.A. Dale. 1997. Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 108:170-178.
39. Rawlings, A.V., I.R. Scott, C.R. Harding, and P.A. Bowser. 1994. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 103:731-741.
40. Fallon, P.G., T. Sasaki, A. Sandilands, L.E. Campbell, S.P. Saunders, N.E. Mangan, J.J. Callanan, H. Kawasaki, A. Shiohama, A. Kubo, J.P. Sundberg, R.B. Presland, P. Fleckman, N. Shimizu, J. Kudoh, A.D. Irvine, M. Amagai, and W.H. McLean. 2009. A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet* 41:602-608.
41. Presland, R.B., D. Boggess, S.P. Lewis, C. Hull, P. Fleckman, and J.P. Sundberg. 2000. Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol* 115:1072-1081.
42. Smith, F.J., A.D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, A. Sandilands, L.E. Campbell, Y. Zhao, H. Liao, A.T. Evans, D.R. Goudie, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, C.S. Munro, A. Sergeant, G. O'Regan, S.J. Bale, J.G. Compton, J.J. DiGiovanna, R.B. Presland, P. Fleckman, and W.H. McLean. 2006. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 38:337-342.
43. Yardley, H.J., and R. Summerly. 1981. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacol Ther* 13:357-383.
44. Breathnach, A.S. 1973. Application of the freeze-fracture replication technique to investigative dermatology. *Br J Dermatol* 88:563-574.
45. Elias, P.M., and D.S. Friend. 1975. The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol* 65:180-191.
46. Madison, K.C., D.C. Swartzendruber, P.W. Wertz, and D.T. Downing. 1987. Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 88:714-718.
47. Freinkel, R.K., and T.N. Traczyk. 1985. Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol* 85:295-298.
48. Menon, G.K., S. Grayson, and P.M. Elias. 1986. Cytochemical and biochemical localization of lipase and sphingomyelinase activity in mammalian epidermis. *J Invest Dermatol* 86:591-597.
49. de Jager, M.W., G.S. Gooris, I.P. Dolbnya, W. Bras, M. Ponc, and J.A. Bouwstra. 2004. Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. *J Lipid Res* 45:923-932.
50. Swartzendruber, D.C., P.W. Wertz, D.J. Kitko, K.C. Madison, and D.T. Downing. 1989. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol* 92:251-257.
51. Schnyder, U.W. 1970. Inherited ichthyoses. *Arch Dermatol* 102:240-252.
52. Comel, M. 1949. Ichthyosis Linearis circumflexa. *Dermatologica* 98:133-136.
53. Netherton, E.W. 1958. A unique case of Trichorrexes Invaginata. *Arch. Dermatol.* 78:483-487.

54. Hausser, I., and I. Anton-Lamprecht. 1996. Severe congenital generalized exfoliative erythroderma in newborns and infants: a possible sign of Netherton syndrome. *Pediatr Dermatol* 13:183-199.
55. Judge, M.R., G. Morgan, and J.I. Harper. 1994. A clinical and immunological study of Netherton's syndrome. *Br J Dermatol* 131:615-621.
56. Traupe, H. 1989. The ichthyosis. A guide to clinical diagnosis, genetic counselling, and therapy. Springer-Verlag Ed., Berlin Heidelberg.
57. Altman, J., and J. Stroud. 1969. Netherton's syndrome and ichthyosis linearis circumflexa. *Arch Dermatol* 100:550-558.
58. Stevanovic, D.V. 1969. Multiple defects of the hair shaft in Netherton's disease. Association with ichthyosis linearis circumflexa. *Br J Dermatol* 81:851-857.
59. Smith, D.L., J.G. Smith, S.W. Wong, and R.D. deShazo. 1995. Netherton's syndrome: a syndrome of elevated IgE and characteristic skin and hair findings. *J Allergy Clin Immunol* 95:116-123.
60. Muller, F.B., I. Hausser, D. Berg, C. Casper, R. Maiwald, A. Jung, H. Jung, and B.P. Korge. 2002. Genetic analysis of a severe case of Netherton syndrome and application for prenatal testing. *Br J Dermatol* 146:495-499.
61. Ishida-Yamamoto, A., C. Deraison, C. Bonnart, E. Bitoun, R. Robinson, T.J. O'Brien, K. Wakamatsu, S. Ohtsubo, H. Takahashi, Y. Hashimoto, P.J. Dopping-Hepenstal, J.A. McGrath, H. Iizuka, G. Richard, and A. Hovnanian. 2005. LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. *J Invest Dermatol* 124:360-366.
62. Descargues, P., C. Deraison, C. Prost, S. Freitag, J. Mazereeuw-Hautier, M. D'Alessio, A. Ishida-Yamamoto, C. Bodemer, G. Zambruno, and A. Hovnanian. 2006. Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol* 126:1622-1632.
63. Fartasch, M., M.L. Williams, and P.M. Elias. 1999. Altered lamellar body secretion and stratum corneum membrane structure in Netherton syndrome: differentiation from other infantile erythrodermas and pathogenic implications. *Arch Dermatol* 135:823-832.
64. Elias, P.M. 2005. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 125:183-200.
65. Chavanas, S., C. Bodemer, A. Rochat, D. Hamel-Teillac, M. Ali, A.D. Irvine, J.L. Bonafe, J. Wilkinson, A. Taieb, Y. Barrandon, J.I. Harper, Y. de Prost, and A. Hovnanian. 2000. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* 25:141-142.
66. Chavanas, S., C. Garner, C. Bodemer, M. Ali, D.H. Teillac, J. Wilkinson, J.L. Bonafe, M. Paradisi, D.P. Kelsell, S. Ansai, Y. Mitsuhashi, M. Larregue, I.M. Leigh, J.I. Harper, A. Taieb, Y. Prost, L.R. Cardon, and A. Hovnanian. 2000. Localization of the Netherton syndrome gene to chromosome 5q32, by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am J Hum Genet* 66:914-921.
67. Bitoun, E., S. Chavanas, A.D. Irvine, L. Lonie, C. Bodemer, M. Paradisi, D. Hamel-Teillac, S. Ansai, Y. Mitsuhashi, A. Taieb, Y. de Prost, G. Zambruno, J.I. Harper, and A. Hovnanian. 2002. Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *J Invest Dermatol* 118:352-361.
68. Sprecher, E., S. Chavanas, J.J. DiGiovanna, S. Amin, K. Nielsen, J.S. Prendiville, R. Silverman, N.B. Esterly, M.K. Spraker, E. Guelig, M.L. de Luna, M.L. Williams, B. Buehler, E.C. Siegfried, L. Van Maldergem, E. Pfendner, S.J. Bale, J. Uitto, A. Hovnanian, and G. Richard. 2001. The spectrum of pathogenic

- mutations in SPINK5 in 19 families with Netherton syndrome: implications for mutation detection and first case of prenatal diagnosis. *J Invest Dermatol* 117:179-187.
69. Magert, H.J., L. Standker, P. Kreutzmann, H.D. Zucht, M. Reinecke, C.P. Sommerhoff, H. Fritz, and W.G. Forssmann. 1999. LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 274:21499-21502.
  70. Bitoun, E., A. Micheloni, L. Lamant, C. Bonnart, A. Tartaglia-Polcini, C. Cobbold, T. Al Saati, F. Mariotti, J. Mazereeuw-Hautier, F. Boralevi, D. Hohl, J. Harper, C. Bodemer, M. D'Alessio, and A. Hovnanian. 2003. LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Hum Mol Genet* 12:2417-2430.
  71. Lauber, T., A. Schulz, K. Schweimer, K. Adermann, and U.C. Marx. 2003. Homologous proteins with different folds: the three-dimensional structures of domains 1 and 6 of the multiple Kazal-type inhibitor LEKTI. *J Mol Biol* 328:205-219.
  72. Seidah, N.G., and M. Chretien. 1999. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 848:45-62.
  73. Ahmed, A., P. Kandola, G. Ziada, and N. Parenteau. 2001. Purification and partial amino acid sequence of proteins from human epidermal keratinocyte conditioned medium. *J Protein Chem* 20:273-278.
  74. Egelrud, T., M. Brattsand, P. Kreutzmann, M. Walden, K. Vitzithum, U.C. Marx, W.G. Forssmann, and H.J. Magert. 2005. hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *Br J Dermatol* 153:1200-1203.
  75. Jayakumar, A., Y. Kang, K. Mitsudo, Y. Henderson, M.J. Frederick, M. Wang, A.K. El-Naggar, U.C. Marx, K. Briggs, and G.L. Clayman. 2004. Expression of LEKTI domains 6-9' in the baculovirus expression system: recombinant LEKTI domains 6-9' inhibit trypsin and subtilisin A. *Protein Expr Purif* 35:93-101.
  76. Schechter, N.M., E.J. Choi, Z.M. Wang, Y. Hanakawa, J.R. Stanley, Y. Kang, G.L. Clayman, and A. Jayakumar. 2005. Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biol Chem* 386:1173-1184.
  77. Mitsudo, K., A. Jayakumar, Y. Henderson, M.J. Frederick, Y. Kang, M. Wang, A.K. El-Naggar, and G.L. Clayman. 2003. Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, and elastase by LEKTI: a kinetic analysis. *Biochemistry* 42:3874-3881.
  78. Descargues, P., C. Deraison, C. Bonnart, M. Kreft, M. Kishibe, A. Ishida-Yamamoto, P. Elias, Y. Barrandon, G. Zambruno, A. Sonnenberg, and A. Hovnanian. 2005. Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat Genet* 37:56-65.
  79. Okkerse, A., A.P. Oranje, and P.C. de Laat. 1994. Comel-Netherton syndrome. *Br J Dermatol* 131:725-726.
  80. Van Gysel, D., H. Koning, M.R. Baert, H.F. Savelkoul, H.J. Neijens, and A.P. Oranje. 2001. Clinico-immunological heterogeneity in Comel-Netherton syndrome. *Dermatology* 202:99-107.
  81. Kabesch, M., D. Carr, S.K. Weiland, and E. von Mutius. 2004. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin Exp Allergy* 34:340-345.

82. Kato, A., K. Fukai, N. Oiso, N. Hosomi, T. Murakami, and M. Ishii. 2003. Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br J Dermatol* 148:665-669.
83. Moffatt, M.F. 2004. SPINK5: a gene for atopic dermatitis and asthma. *Clin Exp Allergy* 34:325-327.
84. Nishio, Y., E. Noguchi, M. Shibasaki, M. Kamioka, E. Ichikawa, K. Ichikawa, Y. Umebayashi, F. Otsuka, and T. Arinami. 2003. Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese. *Genes Immun* 4:515-517.
85. Walley, A.J., S. Chavanas, M.F. Moffatt, R.M. Esnouf, B. Ubhi, R. Lawrence, K. Wong, G.R. Abecasis, E.Y. Jones, J.I. Harper, A. Hovnanian, and W.O. Cookson. 2001. Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet* 29:175-178.
86. Buxman, M., J. Hickman, W. Ragsdale, G. Stretcher, L. Krochmal, and R.F. Wehr. 1986. Therapeutic activity of lactate 12% lotion in the treatment of ichthyosis. Active versus vehicle and active versus a petrolatum cream. *J Am Acad Dermatol* 15:1253-1258.
87. Wehr, R.F., J. Hickman, and L. Krochmal. 1988. Effective treatment of Netherton's syndrome with 12% lactate lotion. *J Am Acad Dermatol* 19:140-142.
88. Borzyskowski, M., D.B. Grant, and R.S. Wells. 1976. Cushing's syndrome induced by topical steroids used for the treatment of non-bullous ichthyosiform erythroderma. *Clin Exp Dermatol* 1:337-342.
89. Caputo, R., P. Vanotti, and E. Bertani. 1984. Netherton's syndrome in two adult brothers. *Arch Dermatol* 120:220-222.
90. Hartschuh, W., I. Hausser, and D. Petzoldt. 1989. [Successful retinoid therapy of Netherton syndrome]. *Hautarzt* 40:430-433.
91. Hausser, I., I. Anton-Lamprecht, W. Hartschuh, and D. Petzoldt. 1989. Netherton's syndrome: ultrastructure of the active lesion under retinoid therapy. *Arch Dermatol Res* 281:165-172.
92. Traupe, H., and R. Happle. 1985. Etretinate therapy in children with severe keratinization defects. *Eur J Pediatr* 143:166-169.
93. Nagata, T. 1980. Netherton's syndrome which responded to photochemotherapy. *Dermatologica* 161:51-56.
94. Kragballe, K., P.M. Steijlen, H.H. Ibsen, P.C. van de Kerkhof, J. Esmann, L.H. Sorensen, and M.B. Axelsen. 1995. Efficacy, tolerability, and safety of calcipotriol ointment in disorders of keratinization. Results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled, right/left comparative study. *Arch Dermatol* 131:556-560.
95. Lucker, G.P., P.C. van de Kerkhof, M.R. van Dijk, and P.M. Steijlen. 1994. Effect of topical calcipotriol on congenital ichthyoses. *Br J Dermatol* 131:546-550.
96. Godic, A., and V. Dragos. 2004. Successful treatment of Netherton's syndrome with topical calcipotriol. *Eur J Dermatol* 14:115-117.
97. Gisondi, P., C.N. Ellis, and G. Girolomoni. 2005. Pimecrolimus in dermatology: atopic dermatitis and beyond. *Int J Clin Pract* 59:969-974.
98. Grassberger, M., M. Steinhoff, D. Schneider, and T.A. Luger. 2004. Pimecrolimus -- an anti-inflammatory drug targeting the skin. *Exp Dermatol* 13:721-730.
99. Gupta, A.K., A. Adamiak, and M. Chow. 2002. Tacrolimus: a review of its use for the management of dermatoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16:100-114.
100. Hoetzenecker, W., J.G. Meingassner, R. Ecker, G. Stingl, A. Stuetz, and A. Elbe-Burger. 2004. Corticosteroids but not pimecrolimus affect viability, maturation



- and immune function of murine epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 122:673-684.
101. Kalthoff, F.S., J. Chung, P. Musser, and A. Stuetz. 2003. Pimecrolimus does not affect the differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells, in contrast to corticosteroids. *Clin Exp Immunol* 133:350-359.
  102. Panhans-Gross, A., N. Novak, S. Kraft, and T. Bieber. 2001. Human epidermal Langerhans' cells are targets for the immunosuppressive macrolide tacrolimus (FK506). *J Allergy Clin Immunol* 107:345-352.
  103. Allen, A., E. Siegfried, R. Silverman, M.L. Williams, P.M. Elias, S.K. Szabo, and N.J. Korman. 2001. Significant absorption of topical tacrolimus in 3 patients with Netherton syndrome. *Arch Dermatol* 137:747-750.
  104. Bens, G., F. Boralevi, C. Buzenet, and A. Taieb. 2003. Topical treatment of Netherton's syndrome with tacrolimus ointment without significant systemic absorption. *Br J Dermatol* 149:224-226.
  105. Saif, G.B., and S. Al-Khenaizan. 2007. Netherton syndrome: successful use of topical tacrolimus and pimecrolimus in four siblings. *Int J Dermatol* 46:290-294.
  106. Billich, A., H. Aschauer, A. Aszodi, and A. Stuetz. 2004. Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus. *Int J Pharm* 269:29-35.
  107. Oji, V., G. Beljan, K. Beier, H. Traupe, and T.A. Luger. 2005. Topical pimecrolimus: a novel therapeutic option for Netherton syndrome. *Br J Dermatol* 153:1067-1068.
  108. Mrowietz, U., S. Wustlich, G. Hoexter, M. Graeber, M. Brautigam, and T. Luger. 2003. An experimental ointment formulation of pimecrolimus is effective in psoriasis without occlusion. *Acta Derm Venereol* 83:351-353.
  109. Leung, D.Y., and T. Bieber. 2003. Atopic dermatitis. *Lancet* 361:151-160.
  110. Novak, N., T. Bieber, and D.Y. Leung. 2003. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 112:S128-139.
  111. Novak, N., and T. Bieber. 2003. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 112:252-262.
  112. Akdis, C.A., M. Akdis, D. Simon, B. Dibbert, M. Weber, S. Gratzl, O. Kreyden, R. Disch, B. Wuthrich, K. Blaser, and H.U. Simon. 1999. T cells and T cell-derived cytokines as pathogenic factors in the nonallergic form of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 113:628-634.
  113. Jeong, C.W., K.S. Ahn, N.K. Rho, Y.D. Park, D.Y. Lee, J.H. Lee, E.S. Lee, and J.M. Yang. 2003. Differential in vivo cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR. *Clin Exp Allergy* 33:1717-1724.
  114. Kagi, M.K., B. Wuthrich, E. Montano, J. Barandun, K. Blaser, and C. Walker. 1994. Differential cytokine profiles in peripheral blood lymphocyte supernatants and skin biopsies from patients with different forms of atopic dermatitis, psoriasis and normal individuals. *Int Arch Allergy Immunol* 103:332-340.
  115. Mihm, M.C., Jr., N.A. Soter, H.F. Dvorak, and K.F. Austen. 1976. The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 67:305-312.
  116. Leung, D.Y., A.K. Bhan, E.E. Schneeberger, and R.S. Geha. 1983. Characterization of the mononuclear cell infiltrate in atopic dermatitis using monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 71:47-56.
  117. Akdis, C.A., M. Akdis, T. Bieber, C. Bindslev-Jensen, M. Boguniewicz, P. Eigenmann, Q. Hamid, A. Kapp, D.Y. Leung, J. Lipozencic, T.A. Luger, A. Muraro, N. Novak, T.A. Platts-Mills, L. Rosenwasser, A. Scheynius, F.E. Simons,

- J. Spergel, K. Turjanmaa, U. Wahn, S. Weidinger, T. Werfel, and T. Zuberbier. 2006. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *J Allergy Clin Immunol* 118:152-169.
118. Cookson, W.O., B. Ubhi, R. Lawrence, G.R. Abecasis, A.J. Walley, H.E. Cox, R. Coleman, N.I. Leaves, R.C. Trembath, M.F. Moffatt, and J.I. Harper. 2001. Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 27:372-373.
119. Haagerup, A., T. Bjerke, P.O. Schiotz, R. Dahl, H.G. Binderup, Q. Tan, and T.A. Kruse. 2004. Atopic dermatitis -- a total genome-scan for susceptibility genes. *Acta Derm Venereol* 84:346-352.
120. Lee, Y.A., U. Wahn, R. Kehrt, L. Tarani, L. Businco, D. Gustafsson, F. Andersson, A.P. Oranje, A. Wolkertstorfer, A. v Berg, U. Hoffmann, W. Kuster, T. Wienker, F. Ruschendorf, and A. Reis. 2000. A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. *Nat Genet* 26:470-473.
121. Cookson, W. 2004. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 4:978-988.
122. Chien, Y.H., W.L. Hwu, and B.L. Chiang. 2007. The genetics of atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 33:178-190.
123. Hoffjan, S., and J.T. Epplen. 2005. The genetics of atopic dermatitis: recent findings and future options. *J Mol Med* 83:682-692.
124. Morar, N., S.A. Willis-Owen, M.F. Moffatt, and W.O. Cookson. 2006. The genetics of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 118:24-34; quiz 35-26.
125. Marenholz, I., R. Nickel, F. Ruschendorf, F. Schulz, J. Esparza-Gordillo, T. Kerscher, C. Gruber, S. Lau, M. Worm, T. Keil, M. Kurek, E. Zaluga, U. Wahn, and Y.A. Lee. 2006. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 118:866-871.
126. Nomura, T., A. Sandilands, M. Akiyama, H. Liao, A.T. Evans, K. Sakai, M. Ota, H. Sugiura, K. Yamamoto, H. Sato, C.N. Palmer, F.J. Smith, W.H. McLean, and H. Shimizu. 2007. Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 119:434-440.
127. Palmer, C.N., A.D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S.P. Lee, D.R. Goudie, A. Sandilands, L.E. Campbell, F.J. Smith, G.M. O'Regan, R.M. Watson, J.E. Cecil, S.J. Bale, J.G. Compton, J.J. DiGiovanna, P. Fleckman, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, A. Sergeant, C.S. Munro, B. El Houate, K. McElreavey, L.B. Halkjaer, H. Bisgaard, S. Mukhopadhyay, and W.H. McLean. 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38:441-446.
128. Sandilands, A., A. Terron-Kwiatkowski, P.R. Hull, G.M. O'Regan, T.H. Clayton, R.M. Watson, T. Carrick, A.T. Evans, H. Liao, Y. Zhao, L.E. Campbell, M. Schmuth, R. Gruber, A.R. Janecke, P.M. Elias, M.A. van Steensel, I. Nagtzaam, M. van Geel, P.M. Steijlen, C.S. Munro, D.G. Bradley, C.N. Palmer, F.J. Smith, W.H. McLean, and A.D. Irvine. 2007. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat Genet* 39:650-654.
129. Weidinger, S., T. Illig, H. Baurecht, A.D. Irvine, E. Rodriguez, A. Diaz-Lacava, N. Klopp, S. Wagenpfeil, Y. Zhao, H. Liao, S.P. Lee, C.N. Palmer, C. Jenneck, L. Maintz, T. Hagemann, H. Behrendt, J. Ring, M.M. Nothen, W.H. McLean, and

- N. Novak. 2006. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 118:214-219.
130. Compton, J.G., J.J. DiGiovanna, K.A. Johnston, P. Fleckman, and S.J. Bale. 2002. Mapping of the associated phenotype of an absent granular layer in ichthyosis vulgaris to the epidermal differentiation complex on chromosome 1. *Exp Dermatol* 11:518-526.
131. Kuokkanen, K. 1969. Ichthyosis vulgaris. A clinical and histopathological study of patients and their close relatives in the autosomal dominant and sex-linked forms of the disease. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 62:1-72.
132. Irvine, A.D., and W.H. McLean. 2006. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 126:1200-1202.
133. O'Regan, G.M., A. Sandilands, W.H. McLean, and A.D. Irvine. 2008. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 122:689-693.
134. Barker, J.N., C.N. Palmer, Y. Zhao, H. Liao, P.R. Hull, S.P. Lee, M.H. Allen, S.J. Meggitt, N.J. Reynolds, R.C. Trembath, and W.H. McLean. 2007. Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *J Invest Dermatol* 127:564-567.
135. Vasilopoulos, Y., M.J. Cork, R. Murphy, H.C. Williams, D.A. Robinson, G.W. Duff, S.J. Ward, and R. Tazi-Ahnini. 2004. Genetic association between an AACC insertion in the 3'UTR of the stratum corneum chymotryptic enzyme gene and atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 123:62-66.
136. Kusunoki, T., I. Okafuji, T. Yoshioka, M. Saito, R. Nishikomori, T. Heike, M. Sugai, A. Shimizu, and T. Nakahata. 2005. SPINK5 polymorphism is associated with disease severity and food allergy in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 115:636-638.
137. Bennett, C.L., M.E. Brunkow, F. Ramsdell, K.C. O'Briant, Q. Zhu, R.L. Fuleihan, A.O. Shigeoka, H.D. Ochs, and P.F. Chance. 2001. A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics* 53:435-439.
138. Chatila, T.A. 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116:949-959; quiz 960.
139. Snapper, S.B., and F.S. Rosen. 1999. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol* 17:905-929.
140. Seidenari, S., and G. Giusti. 1995. Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in eczematous and clinically uninvolved skin. *Acta Derm Venereol* 75:429-433.
141. Werner, Y., and M. Lindberg. 1985. Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 65:102-105.
142. Bleck, O., D. Abeck, J. Ring, U. Hoppe, J.P. Vietzke, R. Wolber, O. Brandt, and V. Schreiner. 1999. Two ceramide subfractions detectable in Cer(AS) position by HPTLC in skin surface lipids of non-lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 113:894-900.
143. Di Nardo, A., P. Wertz, A. Giannetti, and S. Seidenari. 1998. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 78:27-30.
144. Imokawa, G., A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima, and A. Hidano. 1991. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 96:523-526.

145. Fartasch, M. 1997. Epidermal barrier in disorders of the skin. *Microsc Res Tech* 38:361-372.
146. He, R., M.K. Oyoshi, H. Jin, and R.S. Geha. 2007. Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15817-15822.
147. Spergel, J.M., E. Mizoguchi, J.P. Brewer, T.R. Martin, A.K. Bhan, and R.S. Geha. 1998. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest* 101:1614-1622.
148. Bieber, T. 2008. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 358:1483-1494.
149. Leung, D.Y., E.E. Schneeberger, R.P. Siraganian, R.S. Geha, and A.K. Bhan. 1987. The presence of IgE on macrophages and dendritic cells infiltrating into the skin lesion of atopic dermatitis. *Clin Immunol Immunopathol* 42:328-337.
150. Santamaria-Babi, L.F. 2004. CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol* 14:13-18.
151. Santamaria Babi, L.F., L.J. Picker, M.T. Perez Soler, K. Drzimalla, P. Flohr, K. Blaser, and C. Hauser. 1995. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med* 181:1935-1940.
152. Nakatani, T., Y. Kaburagi, Y. Shimada, M. Inaoki, K. Takehara, N. Mukaida, and S. Sato. 2001. CCR4 memory CD4+ T lymphocytes are increased in peripheral blood and lesional skin from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 107:353-358.
153. Bilsborough, J., D.Y. Leung, M. Maurer, M. Howell, M. Boguniewicz, L. Yao, H. Storey, C. LeCiel, B. Harder, and J.A. Gross. 2006. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 117:418-425.
154. Dillon, S.R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Bilsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S.R. Presnell, H.S. Haugen, M. Maurer, B. Harder, J. Johnston, S. Bort, S. Mudri, J.L. Kuijper, T. Bukowski, P. Shea, D.L. Dong, M. Dasovich, F.J. Grant, L. Lockwood, S.D. Levin, C. LeCiel, K. Waggle, H. Day, S. Topouzis, J. Kramer, R. Kuestner, Z. Chen, D. Foster, J. Parrish-Novak, and J.A. Gross. 2004. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5:752-760.
155. Sonkoly, E., A. Muller, A.I. Lauerma, A. Pivarcsi, H. Soto, L. Kemeny, H. Alenius, M.C. Dieu-Nosjean, S. Meller, J. Rieker, M. Steinhoff, T.K. Hoffmann, T. Ruzicka, A. Zlotnik, and B. Homey. 2006. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 117:411-417.
156. Raap, U., K. Wichmann, M. Bruder, S. Stander, B. Wedi, A. Kapp, and T. Werfel. 2008. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 122:421-423.
157. Hamid, Q., M. Boguniewicz, and D.Y. Leung. 1994. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 94:870-876.
158. Jin, H., L. Kumar, C. Mathias, D. Zurakowski, H. Oettgen, L. Gorelik, and R. Geha. 2009. Toll-like receptor 2 is important for the T(H)1 response to cutaneous sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 123:875-882 e871.
159. Akdis, M., K. Blaser, and C.A. Akdis. 2006. T regulatory cells in allergy. *Chem Immunol Allergy* 91:159-173.

160. Verhagen, J., M. Akdis, C. Traidl-Hoffmann, P. Schmid-Grendelmeier, D. Hijnen, E.F. Knol, H. Behrendt, K. Blaser, and C.A. Akdis. 2006. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol* 117:176-183.
161. Ou, L.S., E. Goleva, C. Hall, and D.Y. Leung. 2004. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 113:756-763.
162. Reefer, A.J., S.M. Satinover, M.D. Solga, J.A. Lannigan, J.T. Nguyen, B.B. Wilson, and J.A. Woodfolk. 2008. Analysis of CD25hiCD4+ "regulatory" T-cell subtypes in atopic dermatitis reveals a novel T(H)2-like population. *J Allergy Clin Immunol* 121:415-422 e413.
163. Wollenberg, A., M. Wagner, S. Gunther, A. Towarowski, E. Tuma, M. Moderer, S. Rothenfusser, S. Wetzel, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 119:1096-1102.
164. Wollenberg, A., S. Wen, and T. Bieber. 1999. Phenotyping of epidermal dendritic cells: clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry* 37:147-155.
165. Novak, N., T. Bieber, and S. Kraft. 2004. Immunoglobulin E-bearing antigen-presenting cells in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 4:263-269.
166. Oyoshi, M.K., R. He, L. Kumar, J. Yoon, and R.S. Geha. 2009. Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis. *Adv Immunol* 102:135-226.
167. Novak, N., and T. Bieber. 2005. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 53:S171-176.
168. Kagi, M.K., H. Joller-Jemelka, and B. Wuthrich. 1992. Correlation of eosinophils, eosinophil cationic protein and soluble interleukin-2 receptor with the clinical activity of atopic dermatitis. *Dermatology* 185:88-92.
169. Omoto, M., L.H. Gu, H. Sugiura, and M. Uehara. 2000. Heterogeneity of dermal deposition of eosinophil granule major basic protein in acute lesions of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 292:51-54.
170. Hossny, E., M. Aboul-Magd, and S. Bakr. 2001. Increased plasma eotaxin in atopic dermatitis and acute urticaria in infants and children. *Allergy* 56:996-1002.
171. Taha, R.A., D.Y. Leung, O. Ghaffar, M. Boguniewicz, and Q. Hamid. 1998. In vivo expression of cytokine receptor mRNA in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 102:245-250.
172. Taha, R.A., E.M. Minshall, D.Y. Leung, M. Boguniewicz, A. Luster, S. Muro, M. Toda, and Q.A. Hamid. 2000. Evidence for increased expression of eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 105:1002-1007.
173. Leiferman, K.M., S.J. Ackerman, H.A. Sampson, H.S. Haugen, P.Y. Venencie, and G.J. Gleich. 1985. Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis. Comparison with onchocerciasis. *N Engl J Med* 313:282-285.
174. Navi, D., J. Saegusa, and F.T. Liu. 2007. Mast cells and immunological skin diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 33:144-155.
175. Badertscher, K., M. Bronnimann, S. Karlen, L.R. Braathen, and N. Yawalkar. 2005. Mast cell chymase is increased in chronic atopic dermatitis but not in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 296:503-506.
176. Novak, N., S. Kruse, J. Potreck, L. Maintz, C. Jenneck, S. Weidinger, R. Fimmers, and T. Bieber. 2005. Single nucleotide polymorphisms of the IL18 gene are associated with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 115:828-833.

177. Soumelis, V., P.A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt Rd, F. Bazan, R.A. Kastelein, and Y.J. Liu. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3:673-680.
178. Allakhverdi, Z., M.R. Comeau, H.K. Jessup, B.R. Yoon, A. Brewer, S. Chartier, N. Paquette, S.F. Ziegler, M. Sarfati, and G. Delespesse. 2007. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 204:253-258.
179. Bogiatzi, S.I., I. Fernandez, J.C. Bichet, M.A. Marloie-Provost, E. Volpe, X. Sastre, and V. Soumelis. 2007. Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol* 178:3373-3377.
180. Ebner, S., V.A. Nguyen, M. Forstner, Y.H. Wang, D. Wolfram, Y.J. Liu, and N. Romani. 2007. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J Allergy Clin Immunol* 119:982-990.
181. He, R., M.K. Oyoshi, L. Garibyan, L. Kumar, S.F. Ziegler, and R.S. Geha. 2008. TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11875-11880.
182. Giustizieri, M.L., F. Mascia, A. Frezzolini, O. De Pita, L.M. Chinni, A. Giannetti, G. Girolomoni, and S. Pastore. 2001. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 107:871-877.
183. Wakugawa, M., K. Nakamura, T. Kakinuma, and K. Tamaki. 2002. CC Chemokine Receptor 4 as a Possible Target for Therapy of Atopic Dermatitis. *Drug News Perspect* 15:175-179.
184. Song, T.W., M.H. Sohn, E.S. Kim, K.W. Kim, and K.E. Kim. 2006. Increased serum thymus and activation-regulated chemokine and cutaneous T cell-attracting chemokine levels in children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 36:346-351.
185. Nomura, I., E. Goleva, M.D. Howell, Q.A. Hamid, P.Y. Ong, C.F. Hall, M.A. Darst, B. Gao, M. Boguniewicz, J.B. Travers, and D.Y. Leung. 2003. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 171:3262-3269.
186. Ong, P.Y., T. Ohtake, C. Brandt, I. Strickland, M. Boguniewicz, T. Ganz, R.L. Gallo, and D.Y. Leung. 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 347:1151-1160.
187. Howell, M.D., M. Boguniewicz, S. Pastore, N. Novak, T. Bieber, G. Girolomoni, and D.Y. Leung. 2006. Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. *Clin Immunol* 121:332-338.
188. Matsuda, H., N. Watanabe, G.P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi, M. Matsumoto, H. Ushio, S. Saito, P.W. Askenase, and C. Ra. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 9:461-466.
189. Aioi, A., H. Tonogaito, H. Suto, K. Hamada, C.R. Ra, H. Ogawa, H. Maibach, and H. Matsuda. 2001. Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 144:12-18.
190. Kohara, Y., K. Tanabe, K. Matsuoka, N. Kanda, H. Matsuda, H. Karasuyama, and H. Yonekawa. 2001. A major determinant quantitative-trait locus

- responsible for atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice is located on Chromosome 9. *Immunogenetics* 53:15-21.
191. Asakawa, M., T. Yoshioka, T. Matsutani, I. Hikita, M. Suzuki, I. Oshima, K. Tsukahara, A. Arimura, T. Horikawa, T. Hirasawa, and T. Sakata. 2006. Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J Invest Dermatol* 126:2664-2672.
  192. Hikita, I., T. Yoshioka, T. Mizoguchi, K. Tsukahara, K. Tsuru, H. Nagai, T. Hirasawa, Y. Tsuruta, R. Suzuki, M. Ichihashi, and T. Horikawa. 2002. Characterization of dermatitis arising spontaneously in DS-Nh mice maintained under conventional conditions: another possible model for atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 30:142-153.
  193. Watanabe, A., M. Takeuchi, M. Nagata, K. Nakamura, T. Hirasawa, H. Nakao, S. Makino, and M. Harada. 2003. Spontaneous development of dermatitis in DS-Nh mice under specific pathogen-free conditions. *Exp Anim* 52:77-80.
  194. Watanabe, O., K. Natori, M. Tamari, Y. Shiimoto, S. Kubo, and Y. Nakamura. 1999. Significantly elevated expression of PF4 (platelet factor 4) and eotaxin in the NOA mouse, a model for atopic dermatitis. *J Hum Genet* 44:173-176.
  195. Chan, L.S., N. Robinson, and L. Xu. 2001. Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 117:977-983.
  196. Hamid, Q., T. Naseer, E.M. Minshall, Y.L. Song, M. Boguniewicz, and D.Y. Leung. 1996. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 98:225-231.
  197. Yoo, J., M. Omori, D. Gyarmati, B. Zhou, T. Aye, A. Brewer, M.R. Comeau, D.J. Campbell, and S.F. Ziegler. 2005. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med* 202:541-549.
  198. Konishi, H., H. Tsutsui, T. Murakami, S. Yumikura-Futatsugi, K. Yamanaka, M. Tanaka, Y. Iwakura, N. Suzuki, K. Takeda, S. Akira, K. Nakanishi, and H. Mizutani. 2002. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11340-11345.
  199. Yamanaka, K., M. Tanaka, H. Tsutsui, T.S. Kupper, K. Asahi, H. Okamura, K. Nakanishi, M. Suzuki, N. Kayagaki, R.A. Black, D.K. Miller, K. Nakashima, M. Shimizu, and H. Mizutani. 2000. Skin-specific caspase-1-transgenic mice show cutaneous apoptosis and pre-endotoxin shock condition with a high serum level of IL-18. *J Immunol* 165:997-1003.
  200. Tsukuba, T., K. Okamoto, Y. Okamoto, M. Yanagawa, K. Kohmura, Y. Yasuda, H. Uchi, T. Nakahara, M. Furue, K. Nakayama, T. Kadowaki, K. Yamamoto, and K.I. Nakayama. 2003. Association of cathepsin E deficiency with development of atopic dermatitis. *J Biochem* 134:893-902.
  201. Barton, D., H. HogenEsch, and F. Weih. 2000. Mice lacking the transcription factor RelB develop T cell-dependent skin lesions similar to human atopic dermatitis. *Eur J Immunol* 30:2323-2332.
  202. Weih, F., G. Warr, H. Yang, and R. Bravo. 1997. Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *J Immunol* 158:5211-5218.
  203. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.

204. Lin, W., N. Truong, W.J. Grossman, D. Haribhai, C.B. Williams, J. Wang, M.G. Martin, and T.A. Chatila. 2005. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol* 116:1106-1115.
205. Hansson, L., A. Backman, A. Ny, M. Edlund, E. Ekholm, B. Ekstrand Hammarstrom, J. Tornell, P. Wallbrandt, H. Wennbo, and T. Egelrud. 2002. Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *J Invest Dermatol* 118:444-449.
206. Ny, A., and T. Egelrud. 2003. Transgenic mice over-expressing a serine protease in the skin: evidence of interferon gamma-independent MHC II expression by epidermal keratinocytes. *Acta Derm Venereol* 83:322-327.
207. Jong, M.C., M.J. Gijbels, V.E. Dahlmans, P.J. Gorp, S.J. Koopman, M. Ponec, M.H. Hofker, and L.M. Havekes. 1998. Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J Clin Invest* 101:145-152.
208. Nagelkerken, L., P. Verzaal, T. Lagerweij, C. Persoon-Deen, J.F. Berbee, E.P. Prens, L.M. Havekes, and A.P. Oranje. 2008. Development of atopic dermatitis in mice transgenic for human apolipoprotein C1. *J Invest Dermatol* 128:1165-1172.
209. Shiina, T., A. Konno, T. Oonuma, H. Kitamura, K. Imaoka, N. Takeda, K. Todokoro, and M. Morimatsu. 2004. Targeted disruption of MAIL, a nuclear I $\kappa$ B protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J Biol Chem* 279:55493-55498.
210. Krakowski, A.C., and M.A. Dohil. 2008. Topical therapy in pediatric atopic dermatitis. *Semin Cutan Med Surg* 27:161-167.
211. Hoetzenecker, W., R. Ecker, T. Kopp, A. Stuetz, G. Stingl, and A. Elbe-Burger. 2005. Pimecrolimus leads to an apoptosis-induced depletion of T cells but not Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 115:1276-1283.
212. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-680.
213. Lebre, M.C., A.M. van der Aar, L. van Baarsen, T.M. van Capel, J.H. Schuitemaker, M.L. Kapsenberg, and E.C. de Jong. 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 127:331-341.
214. Kawai, K., H. Shimura, M. Minagawa, A. Ito, K. Tomiyama, and M. Ito. 2002. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 30:185-194.
215. Mempel, M., V. Voelcker, G. Kollisch, C. Plank, R. Rad, M. Gerhard, C. Schnopp, P. Fraunberger, A.K. Walli, J. Ring, D. Abeck, and M. Ollert. 2003. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J Invest Dermatol* 121:1389-1396.
216. Oikonomopoulou, K., K.K. Hansen, M. Saifeddine, I. Tea, M. Blaber, S.I. Blaber, I. Scarisbrick, P. Andrade-Gordon, G.S. Cottrell, N.W. Bunnett, E.P. Diamandis, and M.D. Hollenberg. 2006. Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling. *J Biol Chem* 281:32095-32112.
217. Oikonomopoulou, K., K.K. Hansen, M. Saifeddine, N. Vergnolle, I. Tea, M. Blaber, S.I. Blaber, I. Scarisbrick, E.P. Diamandis, and M.D. Hollenberg. 2006. Kallikrein-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). *Biol Chem* 387:817-824.



218. Oikonomopoulou, K., K.K. Hansen, M. Saifeddine, N. Vergnolle, I. Tea, E.P. Diamandis, and M.D. Hollenberg. 2006. Proteinase-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs) by kallikreins and more. *Biol Chem* 387:677-685.
219. Steinhoff, M., J. Buddenkotte, V. Shpacovitch, A. Rattenholl, C. Moormann, N. Vergnolle, T.A. Luger, and M.D. Hollenberg. 2005. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 26:1-43.
220. Okamoto, T., M. Nishibori, K. Sawada, H. Iwagaki, N. Nakaya, A. Jikuhara, N. Tanaka, and K. Saeki. 2001. The effects of stimulating protease-activated receptor-1 and -2 in A172 human glioblastoma. *J Neural Transm* 108:125-140.
221. Berger, P., J.M. Tunon-De-Lara, J.P. Savineau, and R. Marthan. 2001. Selected contribution: tryptase-induced PAR-2-mediated Ca(2+) signaling in human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91:995-1003.
222. Kanke, T., S.R. Macfarlane, M.J. Seatter, E. Davenport, A. Paul, R.C. McKenzie, and R. Plevin. 2001. Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem* 276:31657-31666.
223. Vouret-Craviari, V., D. Grall, and E. Van Obberghen-Schilling. 2003. Modulation of Rho GTPase activity in endothelial cells by selective proteinase-activated receptor (PAR) agonists. *J Thromb Haemost* 1:1103-1111.
224. Bretschneider, E., R. Kaufmann, M. Braun, M. Wittpoth, E. Glusa, G. Nowak, and K. Schror. 1999. Evidence for proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 126:1735-1740.
225. Buddenkotte, J., C. Stroh, I.H. Engels, C. Moormann, V.M. Shpacovitch, S. Seeliger, N. Vergnolle, D. Vestweber, T.A. Luger, K. Schulze-Osthoff, and M. Steinhoff. 2005. Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J Invest Dermatol* 124:38-45.
226. Macfarlane, S.R., M.J. Seatter, T. Kanke, G.D. Hunter, and R. Plevin. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53:245-282.
227. Shpacovitch, V.M., T. Brzoska, J. Buddenkotte, C. Stroh, C.P. Sommerhoff, J.C. Ansel, K. Schulze-Osthoff, N.W. Bunnett, T.A. Luger, and M. Steinhoff. 2002. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor kappaB in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 118:380-385.
228. Vliagoftis, H., A. Schwingshackl, C.D. Milne, M. Duszyk, M.D. Hollenberg, J.L. Wallace, A.D. Befus, and R. Moqbel. 2000. Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 106:537-545.
229. Derian, C.K., A.J. Eckardt, and P. Andrade-Gordon. 1997. Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth Differ* 8:743-749.
230. Gao, C., S. Liu, H.Z. Hu, N. Gao, G.Y. Kim, Y. Xia, and J.D. Wood. 2002. Serine proteases excite myenteric neurons through protease-activated receptors in guinea pig small intestine. *Gastroenterology* 123:1554-1564.
231. Wilson, B.J., R. Harada, L. LeDuy, M.D. Hollenberg, and A. Nepveu. 2009. CUX1 transcription factor is a downstream effector of the proteinase-activated receptor 2 (PAR2). *J Biol Chem* 284:36-45.

232. Nepveu, A. 2001. Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* 270:1-15.
233. Sansregret, L., and A. Nepveu. 2008. The multiple roles of CUX1: insights from mouse models and cell-based assays. *Gene* 412:84-94.
234. Bohm, S.K., L.M. Khitin, E.F. Grady, G. Aponte, D.G. Payan, and N.W. Bunnett. 1996. Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* 271:22003-22016.
235. Compton, S.J., S. Sandhu, S.J. Wijesuriya, and M.D. Hollenberg. 2002. Glycosylation of human proteinase-activated receptor-2 (hPAR2): role in cell surface expression and signalling. *Biochem J* 368:495-505.
236. Hachem, J.P., E. Houben, D. Crumrine, M.Q. Man, N. Schurer, T. Roelandt, E.H. Choi, Y. Uchida, B.E. Brown, K.R. Feingold, and P.M. Elias. 2006. Serine protease signaling of epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 126:2074-2086.
237. Steinhoff, M., C.U. Corvera, M.S. Thoma, W. Kong, B.E. McAlpine, G.H. Caughey, J.C. Ansel, and N.W. Bunnett. 1999. Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol* 8:282-294.
238. D'Andrea, M.R., C.K. Derian, D. Leturcq, S.M. Baker, A. Brunmark, P. Ling, A.L. Darrow, R.J. Santulli, L.F. Brass, and P. Andrade-Gordon. 1998. Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 46:157-164.
239. Sharlow, E.R., C.S. Paine, L. Babiarz, M. Eisinger, S. Shapiro, and M. Seiberg. 2000. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci* 113 ( Pt 17):3093-3101.
240. Hou, L., S. Kapas, A.T. Cruchley, M.G. Macey, P. Harriott, C. Chinni, S.R. Stone, and G.L. Howells. 1998. Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology* 94:356-362.
241. Santulli, R.J., C.K. Derian, A.L. Darrow, K.A. Tomko, A.J. Eckardt, M. Seiberg, R.M. Scarborough, and P. Andrade-Gordon. 1995. Evidence for the presence of a protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9151-9155.
242. Schechter, N.M., L.F. Brass, R.M. Lavker, and P.J. Jensen. 1998. Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. *J Cell Physiol* 176:365-373.
243. Takeuchi, T., J.L. Harris, W. Huang, K.W. Yan, S.R. Coughlin, and C.S. Craik. 2000. Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* 275:26333-26342.
244. Dulon, S., C. Cande, N.W. Bunnett, M.D. Hollenberg, M. Chignard, and D. Pidard. 2003. Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:339-346.
245. Uehara, A., K. Muramoto, H. Takada, and S. Sugawara. 2003. Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2. *J Immunol* 170:5690-5696.
246. Compton, S.J., B. Renaux, S.J. Wijesuriya, and M.D. Hollenberg. 2001. Glycosylation and the activation of proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) by human mast cell tryptase. *Br J Pharmacol* 134:705-718.

247. Versteeg, H.H., K.S. Borensztajn, M.E. Kerver, W. Ruf, P.H. Reitsma, C.A. Spek, and M.P. Peppelenbosch. 2008. TF:FVIIa-specific activation of CREB upregulates proapoptotic proteins via protease-activated receptor-2. *J Thromb Haemost* 6:1550-1557.
248. Loew, D., C. Perrault, M. Morales, S. Moog, C. Ravanat, S. Schuhler, R. Arcone, C. Pietropaolo, J.P. Cazenave, A. van Dorsselaer, and F. Lanza. 2000. Proteolysis of the exodomain of recombinant protease-activated receptors: prediction of receptor activation or inactivation by MALDI mass spectrometry. *Biochemistry* 39:10812-10822.
249. Kida, Y., H. Inoue, T. Shimizu, and K. Kuwano. 2007. Serratia marcescens serralyisin induces inflammatory responses through protease-activated receptor 2. *Infect Immun* 75:164-174.
250. Wakita, H., F. Furukawa, and M. Takigawa. 1997. Thrombin and trypsin induce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 gene expression in cultured normal human keratinocytes. *Proc Assoc Am Physicians* 109:190-207.
251. Borensztajn, K., J. Stiekema, S. Nijmeijer, P.H. Reitsma, M.P. Peppelenbosch, and C.A. Spek. 2008. Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol* 172:309-320.
252. Frungieri, M.B., S. Weidinger, V. Meineke, F.M. Kohn, and A. Mayerhofer. 2002. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15072-15077.
253. Houliston, R.A., R.J. Keogh, D. Sugden, J. Dudhia, T.D. Carter, and C.P. Wheeler-Jones. 2002. Protease-activated receptors upregulate cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 88:321-328.
254. Syeda, F., J. Grosjean, R.A. Houliston, R.J. Keogh, T.D. Carter, E. Paleolog, and C.P. Wheeler-Jones. 2006. Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *J Biol Chem* 281:11792-11804.
255. Cleator, J.H., W.Q. Zhu, D.E. Vaughan, and H.E. Hamm. 2006. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* 107:2736-2744.
256. Tennant, G.M., R.M. Wadsworth, and S. Kennedy. 2008. PAR-2 mediates increased inflammatory cell adhesion and neointima formation following vascular injury in the mouse. *Atherosclerosis* 198:57-64.
257. Moormann, C., M. Artuc, E. Pohl, G. Varga, J. Buddenkotte, N. Vergnolle, R. Brehler, B.M. Henz, S.W. Schneider, T.A. Luger, and M. Steinhoff. 2006. Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells. *J Invest Dermatol* 126:746-755.
258. Shpacovitch, V.M., G. Varga, A. Strey, M. Gunzer, F. Mooren, J. Buddenkotte, N. Vergnolle, C.P. Sommerhoff, S. Grabbe, V. Gerke, B. Homey, M. Hollenberg, T.A. Luger, and M. Steinhoff. 2004. Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *J Leukoc Biol* 76:388-398.
259. Bolton, S.J., C.A. McNulty, R.J. Thomas, C.R. Hewitt, and A.J. Wardlaw. 2003. Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. *J Leukoc Biol* 74:60-68.

260. Miike, S., A.S. McWilliam, and H. Kita. 2001. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 167:6615-6622.
261. Temkin, V., B. Kantor, V. Weg, M.L. Hartman, and F. Levi-Schaffer. 2002. Tryptase activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. *J Immunol* 169:2662-2669.
262. Bar-Shavit, R., M. Maoz, Y. Yongjun, M. Groysman, I. Dekel, and S. Katzav. 2002. Signalling pathways induced by protease-activated receptors and integrins in T cells. *Immunology* 105:35-46.
263. Hansen, K.K., M. Saifeddine, and M.D. Hollenberg. 2004. Tethered ligand-derived peptides of proteinase-activated receptor 3 (PAR3) activate PAR1 and PAR2 in Jurkat T cells. *Immunology* 112:183-190.
264. Li, T., and S. He. 2006. Induction of IL-6 release from human T cells by PAR-1 and PAR-2 agonists. *Immunol Cell Biol* 84:461-466.
265. Mari, B., S. Guerin, D.F. Far, J.P. Breitmayer, N. Belhacene, J.F. Peyron, B. Rossi, and P. Auberger. 1996. Thrombin and trypsin-induced Ca(2+) mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors. *Faseb J* 10:309-316.
266. Shichijo, M., S. Kondo, M. Ishimori, S. Watanabe, H. Helin, T. Yamasaki, M.E. Stevens, F. Gantner, and K.B. Bacon. 2006. PAR-2 deficient CD4+ T cells exhibit downregulation of IL-4 and upregulation of IFN-gamma after antigen challenge in mice. *Allergol Int* 55:271-278.
267. Steinhoff, M., N. Vergnolle, S.H. Young, M. Tognetto, S. Amadesi, H.S. Ennes, M. Trevisani, M.D. Hollenberg, J.L. Wallace, G.H. Caughey, S.E. Mitchell, L.M. Williams, P. Geppetti, E.A. Mayer, and N.W. Bunnett. 2000. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6:151-158.
268. Kawagoe, J., T. Takizawa, J. Matsumoto, M. Tamiya, S.E. Meek, A.J. Smith, G.D. Hunter, R. Plevin, N. Saito, T. Kanke, M. Fujii, and Y. Wada. 2002. Effect of protease-activated receptor-2 deficiency on allergic dermatitis in the mouse ear. *Jpn J Pharmacol* 88:77-84.
269. Seeliger, S., C.K. Derian, N. Vergnolle, N.W. Bunnett, R. Nawroth, M. Schmelz, P.Y. Von Der Weid, J. Buddenkotte, C. Sunderkotter, D. Metze, P. Andrade-Gordon, E. Harms, D. Vestweber, T.A. Luger, and M. Steinhoff. 2003. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. *Faseb J* 17:1871-1885.
270. Steinhoff, M., U. Neisius, A. Ikoma, M. Fartasch, G. Heyer, P.S. Skov, T.A. Luger, and M. Schmelz. 2003. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci* 23:6176-6180.
271. Ui, H., T. Andoh, J.B. Lee, H. Nojima, and Y. Kuraishi. 2006. Potent pruritogenic action of tryptase mediated by PAR-2 receptor and its involvement in anti-pruritic effect of nafamostat mesilate in mice. *Eur J Pharmacol* 530:172-178.
272. Vergnolle, N. 2003. The enteric nervous system in inflammation and pain: the role of proteinase-activated receptors. *Can J Gastroenterol* 17:589-592.
273. Brogden, K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238-250.
274. Brogden, K.A., M. Ackermann, P.B. McCray, Jr., and B.F. Tack. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents* 22:465-478.

275. Boman, H.G. 1994. Antimicrobial peptides. Chairman's opening remarks. *Ciba Found Symp* 186:1-4.
276. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720.
277. Izadpanah, A., and R.L. Gallo. 2005. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol* 52:381-390; quiz 391-382.
278. Braff, M.H., A. Di Nardo, and R.L. Gallo. 2005. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 124:394-400.
279. Chromek, M., Z. Slamova, P. Bergman, L. Kovacs, L. Podracka, I. Ehren, T. Hokfelt, G.H. Gudmundsson, R.L. Gallo, B. Agerberth, and A. Brauner. 2006. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 12:636-641.
280. Nizet, V., T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rudisill, R.A. Dorschner, V. Pestonjamasp, J. Piraino, K. Huttner, and R.L. Gallo. 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414:454-457.
281. Cowland, J.B., A.H. Johnsen, and N. Borregaard. 1995. hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 368:173-176.
282. Murakami, M., B. Lopez-Garcia, M. Braff, R.A. Dorschner, and R.L. Gallo. 2004. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* 172:3070-3077.
283. Yamasaki, K., J. Schaubert, A. Coda, H. Lin, R.A. Dorschner, N.M. Schechter, C. Bonnart, P. Descargues, A. Hovnanian, and R.L. Gallo. 2006. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *Faseb J* 20:2068-2080.
284. Braff, M.H., and R.L. Gallo. 2006. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr Top Microbiol Immunol* 306:91-110.
285. Yang, D., O. Chertov, and J.J. Oppenheim. 2001. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol* 69:691-697.
286. Niyonsaba, F., H. Ushio, N. Nakano, W. Ng, K. Sayama, K. Hashimoto, I. Nagaoka, K. Okumura, and H. Ogawa. 2007. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 127:594-604.
287. Di Nardo, A., M.H. Braff, K.R. Taylor, C. Na, R.D. Granstein, J.E. McInturff, S. Krutzik, R.L. Modlin, and R.L. Gallo. 2007. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J Immunol* 178:1829-1834.
288. Tokumaru, S., K. Sayama, Y. Shirakata, H. Komatsuzawa, K. Ouhara, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, H. Nagai, L. Yang, S. Higashiyama, A. Yoshimura, M. Sugai, and K. Hashimoto. 2005. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol* 175:4662-4668.
289. Yu, J., N. Mookherjee, K. Wee, D.M. Bowdish, J. Pistolic, Y. Li, L. Rehaume, and R.E. Hancock. 2007. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol* 179:7684-7691.

290. Dorschner, R.A., V.K. Pestonjamas, S. Tamakuwala, T. Ohtake, J. Rudisill, V. Nizet, B. Agerberth, G.H. Gudmundsson, and R.L. Gallo. 2001. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J Invest Dermatol* 117:91-97.
291. Frohm, M., B. Agerberth, G. Ahangari, M. Stahle-Backdahl, S. Liden, H. Wigzell, and G.H. Gudmundsson. 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 272:15258-15263.
292. Schaubert, J., R.A. Dorschner, A.B. Coda, A.S. Buchau, P.T. Liu, D. Kiken, Y.R. Helfrich, S. Kang, H.Z. Elalieh, A. Steinmeyer, U. Zugel, D.D. Bikle, R.L. Modlin, and R.L. Gallo. 2007. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 117:803-811.
293. Howell, M.D., A. Wollenberg, R.L. Gallo, M. Flaig, J.E. Streib, C. Wong, T. Pavicic, M. Boguniewicz, and D.Y. Leung. 2006. Cathelicidin deficiency predisposes to eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol* 117:836-841.
294. Howell, M.D., R.L. Gallo, M. Boguniewicz, J.F. Jones, C. Wong, J.E. Streib, and D.Y. Leung. 2006. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* 24:341-348.
295. Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y.H. Wang, B. Homey, W. Cao, Y.H. Wang, B. Su, F.O. Nestle, T. Zal, I. Mellman, J.M. Schroder, Y.J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449:564-569.
296. Bals, R., X. Wang, R.L. Meegalla, S. Wattler, D.J. Weiner, M.C. Nehls, and J.M. Wilson. 1999. Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs. *Infect Immun* 67:3542-3547.
297. Bals, R., X. Wang, M. Zasloff, and J.M. Wilson. 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9541-9546.
298. Fang, X.M., Q. Shu, Q.X. Chen, M. Book, H.G. Sahl, A. Hoefft, and F. Stuber. 2003. Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood. *Eur J Clin Invest* 33:82-87.
299. Garcia, J.R., F. Jaumann, S. Schulz, A. Krause, J. Rodriguez-Jimenez, U. Forssmann, K. Adermann, E. Kluver, C. Vogelmeier, D. Becker, R. Hedrich, W.G. Forssmann, and R. Bals. 2001. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 306:257-264.
300. Garcia, J.R., A. Krause, S. Schulz, F.J. Rodriguez-Jimenez, E. Kluver, K. Adermann, U. Forssmann, A. Frimpong-Boateng, R. Bals, and W.G. Forssmann. 2001. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J* 15:1819-1821.
301. Goldman, M.J., G.M. Anderson, E.D. Stolzenberg, U.P. Kari, M. Zasloff, and J.M. Wilson. 1997. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88:553-560.
302. Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J.M. Schroder. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387:861.
303. O'Neil, D.A., E.M. Porter, D. Elewaut, G.M. Anderson, L. Eckmann, T. Ganz, and M.F. Kagnoff. 1999. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 163:6718-6724.

304. Valore, E.V., C.H. Park, A.J. Quayle, K.R. Wiles, P.B. McCray, Jr., and T. Ganz. 1998. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101:1633-1642.
305. Yamaguchi, Y., T. Nagase, R. Makita, S. Fukuhara, T. Tomita, T. Tominaga, H. Kurihara, and Y. Ouchi. 2002. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol* 169:2516-2523.
306. Zhao, C., I. Wang, and R.I. Lehrer. 1996. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 396:319-322.
307. Ali, R.S., A. Falconer, M. Ikram, C.E. Bissett, R. Cerio, and A.G. Quinn. 2001. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 117:106-111.
308. Fulton, C., G.M. Anderson, M. Zasloff, R. Bull, and A.G. Quinn. 1997. Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet* 350:1750-1751.
309. Sorensen, O.E., D.R. Thapa, K.M. Roupe, E.V. Valore, U. Sjobring, A.A. Roberts, A. Schmidtchen, and T. Ganz. 2006. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 116:1878-1885.
310. Befus, A.D., C. Mowat, M. Gilchrist, J. Hu, S. Solomon, and A. Bateman. 1999. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol* 163:947-953.
311. Dieu-Nosjean, M.C., A. Vicari, S. Lebecque, and C. Caux. 1999. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 66:252-262.
312. Friend, S.L., S. Hosier, A. Nelson, D. Foxworthe, D.E. Williams, and A. Farr. 1994. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol* 22:321-328.
313. Sims, J.E., D.E. Williams, P.J. Morrissey, K. Garka, D. Foxworthe, V. Price, S.L. Friend, A. Farr, M.A. Bedell, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, K. Grabstein, and R.J. Paxton. 2000. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med* 192:671-680.
314. Quentmeier, H., H.G. Drexler, D. Fleckenstein, M. Zaborski, A. Armstrong, J.E. Sims, and S.D. Lyman. 2001. Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia* 15:1286-1292.
315. Reche, P.A., V. Soumelis, D.M. Gorman, T. Clifford, M. Liu, M. Travis, S.M. Zurawski, J. Johnston, Y.J. Liu, H. Spits, R. de Waal Malefyt, R.A. Kastelein, and J.F. Bazan. 2001. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* 167:336-343.
316. Ying, S., B. O'Connor, J. Ratoff, Q. Meng, K. Mallett, D. Cousins, D. Robinson, G. Zhang, J. Zhao, T.H. Lee, and C. Corrigan. 2005. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 174:8183-8190.
317. Demehri, S., M. Morimoto, M.J. Holtzman, and R. Kopan. 2009. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS Biol* 7:e1000067.
318. Zhang, Z., P. Hener, N. Frossard, S. Kato, D. Metzger, M. Li, and P. Chambon. 2009. Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1536-1541.

319. Pandey, A., K. Ozaki, H. Baumann, S.D. Levin, A. Puel, A.G. Farr, S.F. Ziegler, W.J. Leonard, and H.F. Lodish. 2000. Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol* 1:59-64.
320. Park, L.S., U. Martin, K. Garka, B. Gliniak, J.P. Di Santo, W. Muller, D.A. Largaespada, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, A.G. Farr, S.F. Ziegler, P.J. Morrissey, R. Paxton, and J.E. Sims. 2000. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med* 192:659-670.
321. Tonozuka, Y., K. Fujio, T. Sugiyama, T. Nosaka, M. Hirai, and T. Kitamura. 2001. Molecular cloning of a human novel type I cytokine receptor related to delta1/TSLPR. *Cytogenet Cell Genet* 93:23-25.
322. Zhang, W., J. Wang, Q. Wang, G. Chen, J. Zhang, T. Chen, T. Wan, Y. Zhang, and X. Cao. 2001. Identification of a novel type I cytokine receptor CRL2 preferentially expressed by human dendritic cells and activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 281:878-883.
323. Liu, Y.J., V. Soumelis, N. Watanabe, T. Ito, Y.H. Wang, W. Malefyt Rde, M. Omori, B. Zhou, and S.F. Ziegler. 2007. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* 25:193-219.
324. Omori, M., and S. Ziegler. 2007. Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol* 178:1396-1404.
325. Isaksen, D.E., H. Baumann, P.A. Trobridge, A.G. Farr, S.D. Levin, and S.F. Ziegler. 1999. Requirement for stat5 in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *J Immunol* 163:5971-5977.
326. Hofmeister, R., A.R. Khaled, N. Benbernou, E. Rajnavolgyi, K. Muegge, and S.K. Durum. 1999. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:41-60.
327. Levin, S.D., R.M. Koelling, S.L. Friend, D.E. Isaksen, S.F. Ziegler, R.M. Perlmutter, and A.G. Farr. 1999. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J Immunol* 162:677-683.
328. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793.
329. Constant, S.L., and K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15:297-322.
330. Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46:111-147.
331. Kalinski, P., C.M. Hilkens, E.A. Wierenga, and M.L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20:561-567.
332. Liu, Y.J. 2007. Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 120:238-244; quiz 245-236.
333. Pulendran, B., K. Palucka, and J. Banchereau. 2001. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293:253-256.
334. Ito, T., Y.H. Wang, O. Duramad, T. Hori, G.J. Delespesse, N. Watanabe, F.X. Qin, Z. Yao, W. Cao, and Y.J. Liu. 2005. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 202:1213-1223.
335. O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275-283.



336. Borish, L., A. Aarons, J. Rumblyrt, P. Cvietusa, J. Negri, and S. Wenzel. 1996. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 97:1288-1296.
337. Akbari, O., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2:725-731.
338. Oh, J.W., C.M. Seroogy, E.H. Meyer, O. Akbari, G. Berry, C.G. Fathman, R.H. Dekruyff, and D.T. Umetsu. 2002. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 110:460-468.
339. Moffatt, M.F., and W.O. Cookson. 1997. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* 6:551-554.
340. So, T., J. Song, K. Sugie, A. Altman, and M. Croft. 2006. Signals from OX40 regulate nuclear factor of activated T cells c1 and T cell helper 2 lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3740-3745.
341. Seshasayee, D., W.P. Lee, M. Zhou, J. Shu, E. Suto, J. Zhang, L. Diehl, C.D. Austin, Y.G. Meng, M. Tan, S.L. Bullens, S. Seeber, M.E. Fuentes, A.F. Labrijn, Y.M. Graus, L.A. Miller, E.S. Schelegle, D.M. Hyde, L.C. Wu, S.G. Hymowitz, and F. Martin. 2007. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest* 117:3868-3878.
342. Eisenbarth, S.C., D.A. Piggott, and K. Bottomly. 2003. The master regulators of allergic inflammation: dendritic cells in Th2 sensitization. *Curr Opin Immunol* 15:620-626.
343. Kapsenberg, M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3:984-993.
344. Moser, M., and K.M. Murphy. 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1:199-205.
345. Sher, A., E. Pearce, and P. Kaye. 2003. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 15:421-429.
346. Liu, Y.J. 2009. TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Adv Immunol* 101:1-25.
347. Al-Shami, A., R. Spolski, J. Kelly, T. Fry, P.L. Schwartzberg, A. Pandey, C.L. Mackall, and W.J. Leonard. 2004. A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4(+) T cell development. *J Exp Med* 200:159-168.
348. Al-Shami, A., R. Spolski, J. Kelly, A. Keane-Myers, and W.J. Leonard. 2005. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med* 202:829-839.
349. Zhou, B., M.R. Comeau, T. De Smedt, H.D. Liggitt, M.E. Dahl, D.B. Lewis, D. Gyarmati, T. Aye, D.J. Campbell, and S.F. Ziegler. 2005. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 6:1047-1053.
350. Li, M., P. Hener, Z. Zhang, K.P. Ganti, D. Metzger, and P. Chambon. 2009. Induction of thymic stromal lymphopoietin expression in keratinocytes is necessary for generating an atopic dermatitis upon application of the active vitamin D3 analogue MC903 on mouse skin. *J Invest Dermatol* 129:498-502.
351. Li, M., P. Hener, Z. Zhang, S. Kato, D. Metzger, and P. Chambon. 2006. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11736-11741.
352. Li, M., N. Messaddeq, M. Teletin, J.L. Pasquali, D. Metzger, and P. Chambon. 2005. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an

- atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14795-14800.
353. Bradding, P., A.F. Walls, and S.T. Holgate. 2006. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 117:1277-1284.
354. Imayama, S., Y. Shibata, and Y. Hori. 1995. Epidermal mast cells in atopic dermatitis. *Lancet* 346:1559.
355. Ray, R.J., C. Furlonger, D.E. Williams, and C.J. Paige. 1996. Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro. *Eur J Immunol* 26:10-16.
356. Vosshenrich, C.A., A. Cumano, W. Muller, J.P. Di Santo, and P. Vieira. 2004. Pre-B cell receptor expression is necessary for thymic stromal lymphopoietin responsiveness in the bone marrow but not in the liver environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11070-11075.
357. Vosshenrich, C.A., A. Cumano, W. Muller, J.P. Di Santo, and P. Vieira. 2003. Thymic stromal-derived lymphopoietin distinguishes fetal from adult B cell development. *Nat Immunol* 4:773-779.
358. Watanabe, N., S. Hanabuchi, V. Soumelis, W. Yuan, S. Ho, R. de Waal Malefyt, and Y.J. Liu. 2004. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4<sup>+</sup> T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol* 5:426-434.
359. Rimoldi, M., M. Chieppa, V. Salucci, F. Avogadri, A. Sonzogni, G.M. Sampietro, A. Nespoli, G. Viale, P. Allavena, and M. Rescigno. 2005. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6:507-514.
360. Watanabe, N., Y.H. Wang, H.K. Lee, T. Ito, W. Cao, and Y.J. Liu. 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436:1181-1185.
361. Besin, G., S. Gaudreau, M. Menard, C. Guindi, G. Dupuis, and A. Amrani. 2008. Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes. *Diabetes* 57:2107-2117.
362. Jiang, Q., H. Su, G. Knudsen, W. Helms, and L. Su. 2006. Delayed functional maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal thymus: role of TSLP. *BMC Immunol* 7:6.
363. Lee, J.Y., Y.M. Lim, M.J. Park, S.Y. Min, M.L. Cho, Y.C. Sung, S.H. Park, H.Y. Kim, and Y.G. Cho. 2008. Murine thymic stromal lymphopoietin promotes the differentiation of regulatory T cells from thymic CD4<sup>(+)</sup>CD8<sup>(-)</sup>CD25<sup>(-)</sup> naive cells in a dendritic cell-independent manner. *Immunol Cell Biol* 86:206-213.
364. Mazzucchelli, R., J.A. Hixon, R. Spolski, X. Chen, W.Q. Li, V.L. Hall, J. Willette-Brown, A.A. Hurwitz, W.J. Leonard, and S.K. Durum. 2008. Development of regulatory T cells requires IL-7/Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112:3283-3292.
365. Lee, H.C., and S.F. Ziegler. 2007. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:914-919.
366. Zaph, C., A.E. Troy, B.C. Taylor, L.D. Berman-Booty, K.J. Guild, Y. Du, E.A. Yost, A.D. Gruber, M.J. May, F.R. Greten, L. Eckmann, M. Karin, and D. Artis. 2007. Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 446:552-556.
367. Kato, A., S. Favoreto, Jr., P.C. Avila, and R.P. Schleimer. 2007. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol* 179:1080-1087.

368. Briot, A., C. Deraison, M. Lacroix, C. Bonnart, A. Robin, C. Besson, P. Dubus, and A. Hovnanian. 2009. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med* 206:1135-1147.
369. Komatsu, N., K. Saijoh, C. Kuk, A.C. Liu, S. Khan, F. Shirasaki, K. Takehara, and E.P. Diamandis. 2007. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol* 16:513-519.
370. Voegeli, R., A.V. Rawlings, M. Breternitz, S. Doppler, T. Schreier, and J.W. Fluhr. 2009. Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. *Br J Dermatol* 161:70-77.
371. Ong, C., E.A. O'Toole, L. Ghali, M. Malone, V.V. Smith, R. Callard, and J.I. Harper. 2004. LEKTI demonstrable by immunohistochemistry of the skin: a potential diagnostic skin test for Netherton syndrome. *Br J Dermatol* 151:1253-1257.
372. Roedl, D., C. Traidl-Hoffmann, J. Ring, H. Behrendt, and M. Braun-Falco. 2009. Serine protease inhibitor lymphoepithelial Kazal type-related inhibitor tends to be decreased in atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*
373. Komatsu, N., K. Saijoh, C. Kuk, F. Shirasaki, K. Takehara, and E.P. Diamandis. 2007. Aberrant human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of patients with psoriasis: dependence on phenotype, severity and therapy. *Br J Dermatol* 156:875-883.
374. Yamasaki, K., A. Di Nardo, A. Bardan, M. Murakami, T. Ohtake, A. Coda, R.A. Dorschner, C. Bonnart, P. Descargues, A. Hovnanian, V.B. Morhenn, and R.L. Gallo. 2007. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 13:975-980.
375. Homey, B., and A. Zlotnik. 1999. Chemokines in allergy. *Curr Opin Immunol* 11:626-634.
376. Nylander-Lundqvist, E., and T. Egelrud. 1997. Formation of active IL-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. *Acta Derm Venereol* 77:203-206.
377. Kreuzmann, P., A. Schulz, L. Standker, W.G. Forssmann, and H.J. Magert. 2004. Recombinant production, purification and biochemical characterization of domain 6 of LEKTI: a temporary Kazal-type-related serine proteinase inhibitor. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 803:75-81.
378. Amagai, M., V. Klaus-Kovtun, and J.R. Stanley. 1991. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67:869-877.
379. Amagai, M., N. Matsuyoshi, Z.H. Wang, C. Andl, and J.R. Stanley. 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med* 6:1275-1277.
380. Seguchi, T., C.Y. Cui, S. Kusuda, M. Takahashi, K. Aisu, and T. Tezuka. 1996. Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch Dermatol Res* 288:442-446.
381. Howell, M.D., B.E. Kim, P. Gao, A.V. Grant, M. Boguniewicz, A. De Benedetto, L. Schneider, L.A. Beck, K.C. Barnes, and D.Y. Leung. 2007. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 120:150-155.
382. Folster-Holst, R., M. Stoll, W.A. Koch, J. Hampe, E. Christophers, and S. Schreiber. 2005. Lack of association of SPINK5 polymorphisms with nonsyndromic atopic dermatitis in the population of Northern Germany. *Br J Dermatol* 152:1365-1367.

383. Jongepier, H., G.H. Koppelman, I.M. Nolte, M. Bruinenberg, E.R. Bleeker, D.A. Meyers, G.J. te Meerman, and D.S. Postma. 2005. Polymorphisms in SPINK5 are not associated with asthma in a Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 115:486-492.
384. Hubiche, T., C. Ged, A. Benard, C. Leaute-Labreze, K. McElreavey, H. de Verneuill, A. Taieb, and F. Boralevi. 2007. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort. *Acta Derm Venereol* 87:499-505.
385. Liu, Q., Y. Xia, W. Zhang, J. Li, P. Wang, H. Li, C. Wei, and Y. Gong. 2009. A functional polymorphism in the SPINK5 gene is associated with asthma in a Chinese Han Population. *BMC Med Genet* 10:59.
386. Petraki, C.D., V.N. Karavana, P.T. Skoufogiannis, S.P. Little, D.J. Howarth, G.M. Yousef, and E.P. Diamandis. 2001. The spectrum of human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin) expression in human tissues as assessed by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 49:1431-1441.
387. Raica, M., S. Encica, A. Motoc, A.M. Cimpean, T. Scridon, and M. Barsan. 2006. Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus. *Ann Anat* 188:345-352.
388. Shaw, J.L., and E.P. Diamandis. 2007. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem* 53:1423-1432.
389. Borgono, C.A., I.P. Michael, N. Komatsu, A. Jayakumar, R. Kapadia, G.L. Clayman, G. Sotiropoulou, and E.P. Diamandis. 2007. A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *J Biol Chem* 282:3640-3652.
390. Bowlus, C.L., J. Ahn, T. Chu, and J.R. Gruen. 1999. Cloning of a novel MHC-encoded serine peptidase highly expressed by cortical epithelial cells of the thymus. *Cell Immunol* 196:80-86.
391. Pilgram, G.S., D.C. Vissers, H. van der Meulen, S. Pavel, S.P. Lavrijsen, J.A. Bouwstra, and H.K. Koerten. 2001. Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol* 117:710-717.
392. Kelso, E.B., J.C. Lockhart, T. Hembrough, L. Dunning, R. Plevin, M.D. Hollenberg, C.P. Sommerhoff, J.S. McLean, and W.R. Ferrell. 2006. Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 316:1017-1024.
393. Jesmin, S., S. Gando, S. Zaedi, S.H. Proadhan, A. Sawamura, T. Miyauchi, M. Hiroe, and N. Yamaguchi. 2009. Protease-activated receptor 2 (PAR2) blocking peptide counteracts endotoxin-induced inflammation and coagulation and ameliorates renal fibrin deposition in a rat model of acute renal failure. *Shock*

# ANNEXES



## **Annexe 1**





**COMITE de PROTECTION des PERSONNES  
SUDOUEST ET OUTRE MER II**

Secrétariat : Mme FOURTANÉ - Mme GUINART  
HOPITAL PURPAN - Place du Dr Baylac - TSA 40031 - 31059 TOULOUSE CEDEX 9  
Tél. : 05 61 77 97 64 / 05 61 77 97 65 - Fax 05 61 77 21 10 - Mail : cppsoom1-2@chu-toulouse.fr

**INSERM**  
Mme POLLARD  
101 rue de Tolbiac  
75654 Paris Cedex 13

Toulouse, le 7 septembre 2007

Projet de recherche enregistré  
sous le n°2-07-18 / Avis n°2

Madame,

Dans sa séance du 6 septembre 2007, le comité de protection des personnes (CPP) Sud-Ouest et Outre-Mer II a examiné les modifications apportées au protocole de recherche intitulé :

**Rôle de Th2 et de PAR-2 dans les manifestations allergiques du syndrome de Netherton** protocole C06-51 version provisoire n°9 du 2 août 2007.

que vous lui avez soumis le 5 juillet 2007, en qualité de promoteur et dont l'investigateur-coordonnateur est le Professeur Hovnanian, Inserm U563 de Toulouse.

Etaient présents : Mme DUGUET, médecin, Mr DEGUINE, médecin, Mme BOCQUET, médecin épidémiologiste, Mme COUDERC, scientifique, Mr CHATELUT, pharmacien hospitalier, Mme DUMOUTIER, infirmière (1<sup>er</sup> collègue) ; Mr ARMANI, personne compétente en matière d'éthique, Mr AGNIEL, psychologue, Mme LASSERRE, personne compétente en matière juridique, Mr MELENOTTE, représentant des associations de malades (2<sup>ème</sup> collègue).

Assistaient aussi à la séance en qualité de suppléants : Mme BERCHERY, médecin épidémiologiste, Mme MALKA-COURTOIS, infirmière (1<sup>er</sup> collègue) ; Mme BEC, psychologue, Mr MARTY, représentant des associations de malades (2<sup>ème</sup> collègue).

Après examen de ces modifications dans les documents fournis : protocole version n°9 du 2 août 2007, réponses aux remarques formulées par le CPP SOOM II, le comité estime que :

**1. Sur la pertinence du projet :**

Les raisons scientifiques qui justifient d'entreprendre la recherche sont pertinentes.

Les objectifs et la méthodologie sont bien définis.

L'évaluation des bénéfiques et des risques attendus est satisfaisante. Les risques liés à la biopsie ont été explicités.

**2. Sur les moyens mis en œuvre :**

La qualification des investigateurs est adaptée. Le curriculum vitae du Docteur Mazereeuw a été versé au dossier.

Les moyens mis en œuvre sont en adéquation avec les objectifs. Le devenir des biopsies a été explicité.

Le cahier d'observation a été modifié ainsi que le numéro d'assurance.

Le nombre de sujets a été homogénéisé.

Les différents cas contrôles ont été précisés.

**3. Sur la protection des personnes :**

Les modalités de recrutement des sujets sont précisées.

**4. Les notices d'information et les formulaires de consentement éclairé - version du 2 août 2007** sont clairement rédigés et contiennent toutes les mentions prévues.

La lettre d'information concernant l'utilisation des déchets opératoires a été versée au dossier.

En conséquence, le CPP Sud-Ouest et Outre Mer II émet un

**AVIS FAVORABLE**

à la réalisation de votre recherche.

Je vous prie de croire, Madame, à l'assurance de toute notre considération.



La Présidente  
Dr A.M DUGUET.

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	Code promoteur	Code Centre	Numéro du sujet
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]



**Institut thématique  
Santé publique**  
Recherche clinique et thérapeutique

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

**Rôle des Th2 et de PAR-2 dans les manifestations allergiques du  
syndrome de Netherton**

## CAHIER D'OBSERVATION

PROMOTEUR	Nom Adresse  Téléphone	<b>Inserm</b> Département de la Recherche Clinique et Thérapeutique (DRCT) 101, rue de Tolbiac 75654 Paris Cedex 13
INVESTIGATEUR COORDONATEUR	Nom Adresse  Téléphone e-mail	<b>Professeur Alain HOVNANIAN</b> Inserm U563 – CPTP Pavillon Lefebvre – Hôpital Purpan BP 3028. 31024 Toulouse cedex 03 05 62 74 45 00 alain.hovnanian@toulouse.inserm.fr
INVESTIGATEUR	Nom Adresse  Téléphone e-mail	<b>Professeur Christine BODEMER</b> Dermatologie CHU NECKER ENFANTS MALADE 149 Rue de sèvres 75713 PARIS CEDEX 15 01 44 49 46 64 Christine.Bodemer@nck.ap-hop-paris.fr

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	C     0     6     5     1		

### **1- Consignes pour remplir le cahier d'observation :**

- Ecrire de manière lisible au stylo à bille noir ou bleu
- Les pages portant la mention « signature de l'investigateur » doivent être validées par l'investigateur lorsque toutes les données sont complétées.
- Si une donnée est incorrecte la barrer d'un trait horizontal en laissant lisible l'information erronée et écrire la donnée exacte à côté.
- Les initiales du correcteur doivent figurer à côté de chaque correction.
- Compléter toutes les cases, mettre un 0 si besoin (ex : poids | \_0\_ | \_8\_ | \_0\_ | Kg)
- Compléter toutes les sections (noter « DM » pour les données manquantes)
- Pas de commentaires en complément des items demandés
- Ne pas utiliser de correcteur
- Remplir les bandeaux en haut de chaque page : indiquer
  - o le code du centre : **TLS** pour le Centre de Toulouse et **NCK** pour celui de Necker,
  - o le numéro du sujet se fera par ordre chronologique d'inclusion.  
Exemple : Mr DURAND Yves est le premier patient inclus provenant du Centre de Toulouse, il sera noté TLS-001.  
Afin de connaître le numéro du sujet se reporter à la DataBiotech®.

### **2- Inclusion :**

- Vérifier les critères d'inclusion
- Donner au patient la notice d'information
- Faire signer le consentement par le patient et l'investigateur concerné selon le centre impliqué et en remettre un exemplaire au patient
- Remplir une fiche d'inclusion et la faxer à l'investigateur principal. Garder une copie dans le cahier d'observation.
- Investigateur Principal: Professeur Alain Hovnanian  
Inserm U563 – CPTP  
Pavillon Lefebvre – Hôpital Purpan  
BP 3028. 31024 Toulouse cedex 03  
Tél : 05 62 74 50 00  
Fax : 05 62 74 50 58

### **3- Sortie d'essai :**

En cas de sortie d'essai, remplir la fiche de déclaration (à la fin du cahier d'observation) et la faxer au promoteur. Garder une copie dans le cahier d'observation.

### **4- Événement Indésirable Grave : Conduite à tenir**

A la prise de connaissance d'un événement indésirable grave, informez sans délai le promoteur de l'étude en complétant la fiche de déclaration d'événement indésirable grave et en l'adressant :

- par télécopie au **01 44 23 67 10**
- puis par courrier à l'Inserm :

**Institut Thématique de Santé publique**  
**Recherche Clinique et Thérapeutique**  
**101, Rue de Tolbiac**  
**75654 Paris Cedex 13**

Garder une copie dans le cahier d'observation.

*Rappel de définition de l'EIG :*

Un événement indésirable grave est un événement indésirable :

- Ayant pu contribuer à la survenue d'un décès,
- Susceptible de mettre en jeu le pronostic vital immédiat du sujet,
- Qui entraîne une invalidité ou une incapacité,
- Qui provoque ou prolonge une hospitalisation,
- Anomalie/malformation congénitale,
- Tout événement potentiellement grave selon l'investigateur


Le jugement médical de l'investigateur ou du promoteur pourra conduire à la déclaration d'autres événements considérés comme « potentiellement graves » (notamment certaines anomalies biologiques). Une distinction est faite entre les événements indésirables graves attendus et les événements indésirables graves inattendus. Les effets indésirables graves attendus dans le cadre du protocole seront obligatoirement listés de manière exhaustive.

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

## CONSULTATION D'INCLUSION

### **C<sub>0</sub> : Critères d'éligibilité**

- **Examen clinique**
- **Obtention et signature du consentement éclairé**
- **Attribution du numéro sujet**
- **Traitements associés**

 <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	Code promoteur	Code Centre	Numéro du sujet
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]



CENTRE DE REFERENCE  
MALADIES ORPHELINES DE LA PEAU  
MIDI-PYRENEES

**QUESTIONNAIRE CLINIQUE**  
(Cahier d'observation)

Investigateur : \_\_\_\_\_

Date de la consultation

|\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|  
jj mm aaaa

Date de naissance

|\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

Lieu de naissance

-----

Sexe (M/F)

|\_|

Poids

|\_|\_|\_| Kg

Taille

|\_|\_|\_| cm

Autres membres de la famille atteints:

non  oui  qui:

Parents apparentés:

non  oui

Origine ethnique des parents:

Arbre généalogique (indiquer le nom, le prénom et de la date de naissance de chaque individu)

**Diagnostic:** \_\_\_\_\_

Confirmé:

Suspecté:

**Antécédents familiaux:**

non

oui

atopie

surdité

kératite

*Manifestations cliniques/biologiques, voir le tableau de la page suivante :*

*Si la réponse est NON, inscrire : - (moins)*

*Si la réponse est OUI, inscrire : +, et/ou (si possible): 1, 2, 3 selon l'intensité (3 étant le plus sévère)/*

*L'objectif est d'évaluer l'évolution de la maladie.*

*Si les manifestations sont permanentes ou chroniques (amélioration ou rechute), inscrire : P ou C*

*Ex: Erythème : NON*

*: -*

*OUI, permanente, sévère : + et/ou P 3*

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

	Intensité de chaque manifestation: de 1 à 3	Période Néonatale	1m<âge<3a	3a<âge<10a	10a<âge<16a	Adulte
<b>PEAU</b>	Bébé collodion					
	Erythrodermie desquamative (P/C)					
	Ichtyose (P/C)					
	Erythème (P/C)					
	Ichtyose linéaire circonflexe					
	Hyperkératose					
	Lichénification des plis/Macération					
	Erythème de la face (P/C)					
	Peau douloureuse (P/C)					
	Prurit 0 to 10 (P/C)					
<b>CHEVEUX</b>	Alopécie des cheveux (a), cils (b), sourcils (c)					
	Perte/croissance chronique des cheveux					
	Trichorrhexis invaginata (cheveux (a), cils (b), sourcils (c))					
	Autres Trichorrhexis Nodosa (TN), Pili Torti (PT)					
<b>Manifestations atopiques</b>	Eruption eczématiforme (prédominance périorale)					
	Asthme					
	Angio-oedème					
	Fièvre					
	Urticaire					
	Allergie					
	HyperIgE (titre UI/ml)					
Hyperéosinophilie (nombre/ml)						
<b>Soins</b>	Infections fréquentes					
	Systemique (d), cutanées (e), autres (f)					
	Gram+, Gram-, Virus, mycoses, autres : ...					
	Déshydratation hypernatrémique (Na <sup>+</sup> , nombre d'épisodes)					
<b>Croissance</b>	Retard de développement					
	Retard de croissance (taille et poids actuels)					
<b>Manifest. neuro</b>	Anomalie du système nerveux central					
	Retard mental					
	Convulsions					
<b>Autres</b>	Anomalies pulmonaires					
	Anomalies dentaires					
	Déficit immunitaire					
	Troubles métaboliques /Hormonaux (Ph <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , PTH ...)					
	Autres: surdité, kératite, cataracte, troubles digestifs...					

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

## CRITERES DE SELECTION

### *Critères d'inclusion*

	Oui	Non
1. Majeur ou mineur âgé de 8 ans ou plus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Affilié à un régime de sécurité sociale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Forte suspicion du syndrome de Netherton	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Consentement libre et éclairé signé	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>


**IMPORTANT : Si une ou plusieurs cases NON sont cochées, le patient n'est pas inclus dans l'étude**

### *Critères de non inclusion*

	Oui	Non
1. Incapacité de comprendre la nature et les buts de l'étude et/ou difficultés de communication avec l'investigateur	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Privation de liberté par décision judiciaire ou administrative,	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Prise d'un traitement interdit, notamment immunosuppresseur Autre traitement : précisez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Contre-indication à la Xylocaïne	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Etat pathologique ou psychologique incompatible avec le bon déroulement de l'étude Précisez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Participation à une autre recherche biomédicale avec prise d'un médicament expérimental dans les 3 mois précédant la visite de sélection ou en période d'exclusion pour une autre recherche biomédicale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**IMPORTANT : Si une ou plusieurs cases OUI sont cochées, le patient n'est pas inclus dans l'étude**



 <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]


### Fiche d'inclusion :

Au terme de la visite de sélection et de la vérification des critères d'inclusion et de non inclusion, le sujet est-il inclus dans l'étude ?      Oui      Non

Si 'Oui', notez le numéro du sujet : |\_|\_|\_|\_|

Date d'inclusion :      |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|  
    jj      mm      aaaa

Nom et signature de l'investigateur :

	Code promoteur	Code Centre	Numéro du sujet
	C 0 6 1 5 1		

### BILAN BIOLOGIQUE

Date:       |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|  
              jj      mm      aaaa

Résultats

### TESTS:

Intitulé du test : immunomarquage de LEKTI sur biopsie cutanée fixée au formol.

Date:       |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

Immunomarquage de LEKTI :           positif                    négatif

Résultats :

Commentaires :

### TESTS:

Intitulé du test : analyse moléculaire du gène *SPINK5* par séquençage

Date:       |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

Confirmation du syndrome de Netherton :           oui            non

Résultats :

Identification des mutations :    1 - \_\_\_\_\_  
  2 - \_\_\_\_\_

Commentaires :

### AUTRES EXAMENS :

Date:       |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

Résultats

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

## MISE EN CULTURE DES KERATINOCYTES

Date:           |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|  
                  jj      mm      aaaa

Nombre d'ampoules stockées

Nombre de cellules par ampoules

Emplacement dans la cuve à azote

### CASCADE DE SIGNALISATION :

- PAR-2 :

Methode :

Résultats :

- NF-kB :

Methode :

Résultats :

- Sous unité p65 de NF-kB :

Methode :

Résultats :

- Gènes cibles, préciser :

Methode :

Résultats :

Commentaires :

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

**ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE ::**

- PAR-2 :                                    oui                                     non
- NF-kB :                                        oui                                     non
- Sous unité p65 de NF-kB :            oui                                     non
- Gènes cibles, préciser :                oui                                     non

Commentaires :

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

**REPONSE IMMUNITAIRE :**

**ISOLEMENT DES LEUCOCYTES**

Date:           |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|  
                      jj      mm      aaaa

Stimulation des lymphocytes :

PCRq :

Résultats :

Elisa :

Résultats :

Quantification Th1-Th2 :

Résultats :

Commentaires :

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

# TRAITEMENTS CONCOMITANTS

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

<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
[C][0][6]-[5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]


**TRAITEMENTS CONCOMITANTS**

Nom commercial	Indication médicale	Date de début	Date de fin (si applicable)
		[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]
		[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]
		[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]
		[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]
		[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	Code promoteur	Code Centre	Numéro du sujet
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

# EVENEMENTS INDESIRABLES



	Code promoteur		Code Centre		Numéro du sujet	
	[C][0][6][5][1]	[L][L][L][L]	[L][L][L][L]	[L][L][L][L]		

## EVENEMENTS INDESIRABLES\*

Evénements indésirables	Sévérité	Relation avec la maladie	Date de début	Date de fin	Action entreprise

\* Compléter le tableau à l'aide des échelles page suivante.

📌 **Echelle d'évaluation de la sévérité de l'événement indésirable (EI)** .

- 0 = nulle.
- 1 = légère.
- 2 = modéré.
- 3 = sévère.
- 4 = grave, vie du patient menacée.

📌 **Evaluation de la relation EI/ maladie.**

- 1 = non suspectée.
- 2 = probable
- 3 = peu probable

📌 **Action entreprise :**

- 0 = pas d'action.
- 1 = modification du traitement en cours.
- 2 = traitement concomitant.
- 3 = traitement non médicamenteux
- 4= hospitalisation

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

# DECLARATION D'EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	Code promoteur	Code Centre	Numéro du sujet
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

## DECLARATION D'UN EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE

Ce document (2 pages) est à adresser par télécopie au **01 44 23 67 10** puis par courrier à l'Inserm Institut Thématique Santé publique- Recherche clinique et thérapeutique, 101, rue de Tolbiac, 75654 Paris cedex 13

Déclaration Initiale *ou*  Déclaration Complémentaire

**Titre de l'étude:** «Rôle de Th2 et de PAR-2 dans les manifestations allergiques du syndrome de Netherton »

**N°Inserm :** C06-51

<b>Informations patient</b>	Age : [ ][ ] ans	Sexe : M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	
Date d'inclusion : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]	Poids : [ ][ ][ ], [ ] kg	Taille : [ ][ ][ ] cm	

<b>Evénement indésirable grave</b>	
<input type="checkbox"/> Décès, date [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ] Cause probable : ..... <input type="checkbox"/> Mise en jeu du pronostic vital <input type="checkbox"/> Invalidité ou incapacité <input type="checkbox"/> Hospitalisation ou prolongation d'hospitalisation	<input type="checkbox"/> Anomalie/malformation congénitale <input type="checkbox"/> Evénement potentiellement grave selon l'investigateur, préciser : .....

<b>Description de l'événement indésirable</b>
Date de survenue : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]   Prise de connaissance par l'investigateur : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ] Description (symptômes, intensité, chronologie):   (joindre les copies et comptes rendus d'hospitalisation des résultats relatifs à l'EIG)

<b>Informations sur le traitement au moment de l'EIG</b>
Médicament : .....   Posologie : .....   Voie d'administration : ..... Traitements concomitants et antécédents pertinents (médicaux, médicamenteux, sociaux...)

<b>Diagnostic de l'EIG</b>
Identifié : <input type="checkbox"/> Oui, si oui, préciser : ..... <input type="checkbox"/> Non
Examens complémentaires réalisés :

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

<b>Dispositions prises vis à vis du patient suite à l'EIG</b>	
<input type="checkbox"/>	Aucune mesure thérapeutique
<input type="checkbox"/>	Diminution de la posologie du traitement évalué, préciser : .....
<input type="checkbox"/>	Arrêt momentané du traitement    Date : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ] Reprise du traitement (si connue) : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]
<input type="checkbox"/>	Arrêt définitif du traitement    Date : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]
<input type="checkbox"/>	Hospitalisation    Date d'entrée : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ] Date de sortie : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ] <input type="checkbox"/> En cours
<input type="checkbox"/>	Administration d'un traitement spécifique, préciser : .....

<b>Evolution de l'EIG hors décès</b>	
<input type="checkbox"/>	Guérison sans séquelles <input type="checkbox"/> Guérison avec séquelles, préciser : .....
	Date de guérison : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]
<input type="checkbox"/>	Patient non encore rétabli : <input type="checkbox"/> évolution inconnue* <input type="checkbox"/> amélioration* <input type="checkbox"/> aggravation* <input type="checkbox"/> stable*
(* dans ces situations une fiche de déclaration complémentaire d'EIG devra être remplie)	

<b>Selon l'investigateur, l'événement indésirable semble plutôt lié</b>			
<input type="checkbox"/>	Au(x) traitement(s) étudié(s)	<input type="checkbox"/>	Aux procédures de l'essai
<input type="checkbox"/>	Au(x) médicament(s) associé(s)	<input type="checkbox"/>	A la progression de la maladie
<input type="checkbox"/>	A une maladie intercurrente	<input type="checkbox"/>	Autre, préciser : .....

<b>Informations concernant l'investigateur notificateur de l'EIG</b>	
Nom : .....	
Adresse : .....	
Tel : .....    Fax : .....    E-mail : .....	

<b>Commentaires de l'investigateur sur la relation possible avec l'étude</b>

Signature de l'investigateur :

Date de déclaration : [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ]

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	C 0 6 5 1		

**FIN D'ETUDE**

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

### ATTESTATION DE FIN D'ETUDE

A compléter par l'investigateur à transmettre dans les 24H au promoteur :

**Promoteur : INSERM**  
**A l'attention du Bureau Recherches Biomédicales**  
**101, rue de Tolbiac**  
**75654 Paris cedex 13**  
**Tél : 01 44 23 61 39**  
**Fax : 01 44 23 67 11**  
**E-mail : rqrc@tolbiac.inserm.fr**

**Date d'inclusion :**           |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|  
  jj      mm      aaaa

**Date de sortie du protocole :** |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

**Cause de sortie d'Etude :**

- Retrait du consentement
- Décès : date |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|  
                                  jj      mm      aaaa
- Décision Médicale
- Autre (préciser) :

Oui            Non

**Le sujet a-t-il effectué l'intégralité de l'étude ?**

**Y a-t-il eu apparition d'événement(s) indésirable(s) ?**

**Commentaire et conclusions du médecin investigateur :**

-----  
-----  
-----  
-----

**Date :** |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

**Signature de l'investigateur**

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

# SORTIE PREMATUREE

<b>Inserm</b> <small>Institut national de la santé et de la recherche médicale</small>	<b>Code promoteur</b>	<b>Code Centre</b>	<b>Numéro du sujet</b>
	[C][0][6][5][1]	[ ][ ][ ][ ][ ]	[ ][ ][ ][ ][ ]

## SORTIE PREMATUREE D'ETUDE

N° du patient : |\_|\_|

Date d'inclusion : |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|  
jj mm aaaa

Date de la sortie d'étude : |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

### Motif de l'arrêt prématuré et définitif du traitement :

présence d'événement indésirable grave ⇒ **REPLIR LA FEUILLE DE RECUEIL DES EVENEMENTS INDESIRABLES GRAVES**

présence d'événement indésirable non grave ⇒ **REPLIR LE TABLEAU DE RECUEIL DES EVENEMENTS INDESIRABLES**

souhait d'arrêter (retrait du consentement)

autre. Précisez : .....

perdu de vue ⇒ le patient a-t-il été recontacté :

**le jour de la consultation prévue, soit le** |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

8 jours après, soit le |\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

1 mois après

Pour toute sortie prématurée d'étude, merci de remplir, dans la mesure du possible, les **évaluations** prévues à la consultation de fin d'essai, ainsi que la **feuille de fin d'étude**.

**Rappel** : Les patients ayant interrompu le traitement en raison d'un événement indésirable devront être suivis au moins jusqu'à résolution ou stabilisation de l'événement



## **Annexe 2**

### **“KLK5 Transgenic mice reproduce Netherton syndrome phenotype”**

C. Deraison, C. Bonnart, A. Robin, C. Besson, A. Briot, M. Lacroix and A. Hovnanian.  
37th Annual European Society for Dermatological Research, Septembre 2007, Zurich



# KLK5 Transgenic mice reproduce Netherton syndrome phenotype

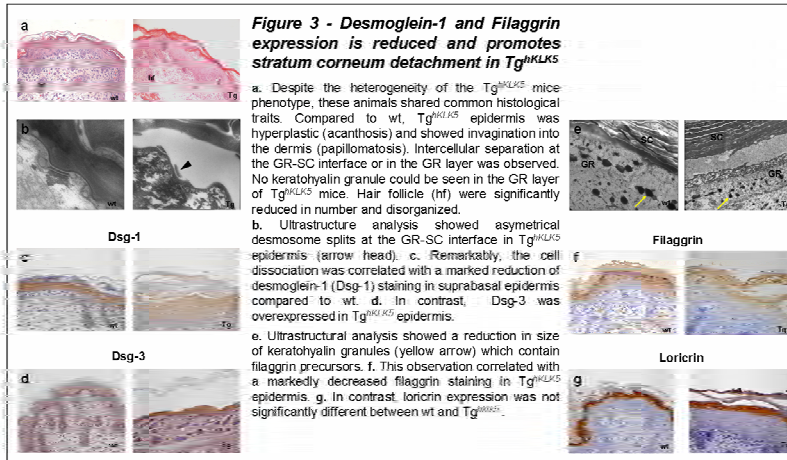
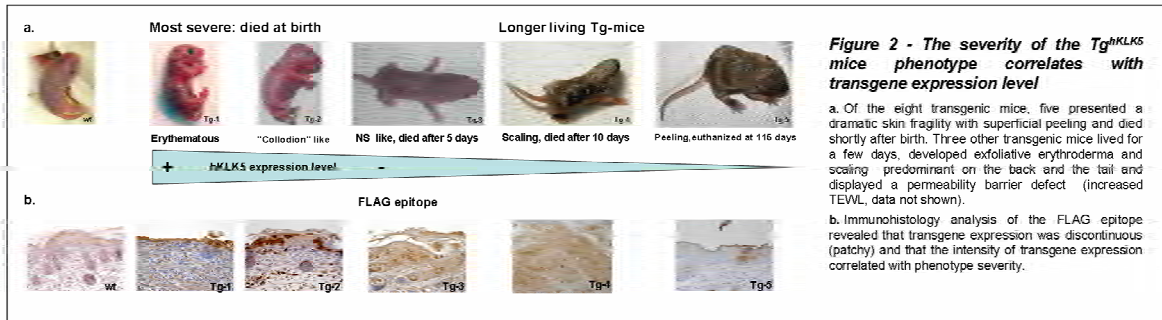
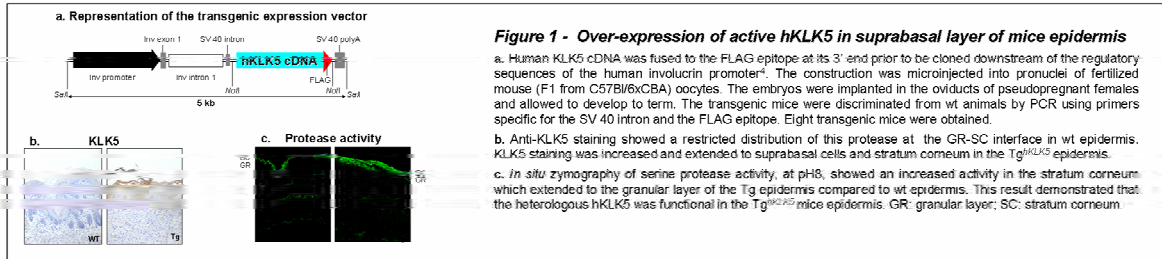
Inserm

C. Deraison<sup>1</sup>, C. Bonnart<sup>1</sup>, A. Robin<sup>1</sup>, C. Besson<sup>1</sup>, A. Briot<sup>1</sup>, M. Lacroix<sup>1</sup> and A. Hovnanian<sup>1\*</sup>

1 INSERM U563, Toulouse, France

\*contact email: alain.hovnanian@toulouse.inserm.fr

Skin homeostasis requires a tight control of the proteinase/inhibitor balance. LEKTI is a 15-domain serine protease inhibitor whose defective expression causes the severe autosomal recessive ichthyosiform skin condition, Netherton syndrome (NS)<sup>1</sup>. LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal-Type Inhibitor) is encoded by *SPINK5* (Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 5)<sup>2</sup>. LEKTI is a key regulator of epidermal proteases and we have shown that *Spink5*<sup>-/-</sup> mice display enhanced epidermal protease activity, including KLK5 (SCCE) and the newly identified elastase 2 (see poster # 435). These proteolytic hyperactivities resulted in desmosomal protein degradation (desmoglein-1 and desmoplakin) and accelerated proteolytic-processing of filaggrin<sup>3</sup>. In order to document the consequences of unregulated KLK5 activity in the terminal differentiated layers of the epidermis, we have developed a tissue-specific hKLK5 (human form of KLK5 cDNA) transgenic mice (*Tg<sup>hKLK5</sup>*) in which hKLK5 expression is under the control of the human involucrin promoter<sup>4</sup>.

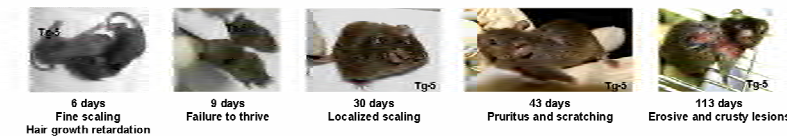


## Conclusion

In order to decipher the implication of each proteinase which is overactive in *Spink5*<sup>-/-</sup>, we have genetically modified mice which specifically over-express hKLK5 in the suprabasal layers of the epidermis. Our results show that KLK5 is directly involved in the following features of the Netherton syndrome phenotype:

- Asymmetrical separation of desmosomes and decreased Dsg-1 detection.** All transgenic *Tg<sup>hKLK5</sup>* mice showed scaling and stratum corneum detachment. The cell-cell detachment occurred at the granular layer and stratum corneum interface as illustrated by the presence of split desmosomes. This establishes that KLK5 has a direct role in the desquamation process.
- Abnormal keratohyalin granules and reduced filaggrin immunostaining.** Filaggrin expression and keratohyalin granules were reduced in *Tg<sup>hKLK5</sup>* mice epidermis suggesting that KLK5 could modulate the processing of pro-filaggrin into filaggrin monomers. This late terminal differentiation marker is the result of a complex proteolytic processing of pro-filaggrin by several enzymes. Our data suggest that KLK5 could play a direct role in pro-filaggrin processing, or could indirectly activate proteases involved in filaggrin processing such as matriptase.
- Abnormal hair follicle formation.** In normal epidermis, KLK5 is expressed in the inner root sheath of the hair follicle. *Tg<sup>hKLK5</sup>* mice showed hair growth retardation. Hair follicle were rare and disorganized. These anomalies are reminiscent of poor and sparse hair growth seen in *Spink5*<sup>-/-</sup> mice and in individuals with Netherton syndrome.

In conclusion, *Tg<sup>hKLK5</sup>* mice reproduce the main features of *Spink5*<sup>-/-</sup> mice. In contrast to the previously described transgenic mice overexpressing hKLK7 which developed signs of itch with increasing age (7-8 weeks) with no stratum corneum defect nor filaggrin anomaly<sup>5</sup>, these results show that KLK5 initiates the proteolytic cascade involved in the NS phenotype and identify KLK5 as a major target of LEKTI.



## REFERENCES

- Chavesse S, Bodemer C, Rochat A, Haraoui-Jedidi D, Alam J, Inoue AD, Bonde J, Wilkinson J, Teieb A, Barandon Y, Leperier JL, de Prost Y, Hovnanian A. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* (2002), 25(2):141-2
- Miyoshi H, Sanderson I, Krautmann P, Zichner D, Bernasconi M, Sommerhalder CP, Fritsch H, and Fournier TW. LEKTI, A novel 15-domain type of human serpin. *J Biol Chem* (1998), 273(11):21499-502.
- Desgarnes P, Deraison C, Bonnart C, Kretz M, Kishibe M, Ishida-Yamanoto A, Elias P, Barandon Y, Zamboni G, Sonnenberg A, Hovnanian A. *Spink5*-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal proteases hyperactivity. *Nat Genet* (2005), 37(1):55-65
- Carroll JM, Albers KM, Gallick JA, Hamilton R, Tachman LB. Tissue- and stratum-specific expression of the human involucrin promoter in transgenic mice. *PNAS* (1993), 90, 10273-10274
- Ny A, Egelrud T. Epidermal hyperproliferation and decreased skin barrier function in mice overexpressing Stratum corneum chymotryptic enzyme. *Acta Derm Venereol* (2004), 84, 10-22



# ABSTRACT

## Role of LEKTI in controlling allergic inflammation in Netherton syndrome

---

Netherton syndrome (NS, OMIM 256500) is a rare and severe autosomal recessive genodermatosis caused by mutations in *SPINK5* gene encoding the protease inhibitor LEKTI. LEKTI play a key role in skin barrier function through the regulation of epidermal proteases, kallikreins (KLK) 5 and 7. In the absence of LEKTI, hyperactive KLK5 and 7 degrade intercorneocyte adhesion molecules leading to abnormal *stratum corneum* detachment and severe barrier function impairment. Analysis of mouse models and primary keratinocytes from NS, allowed us to demonstrate that LEKTI-deficient epidermis has also the intrinsic capacity to overexpress Th2 polarizing cytokines, such as TSLP, secondary to PAR2 activation by KLK5. Using double knockout mice deficient for *Spink5* and *Par2*, we confirmed the major role of the KLK5-PAR2 pathway in the induction of early pro-inflammatory signaling independently of environmental stimuli and adaptive immune system. However inactivation of this pathway did not improve the skin barrier function and partially reversed cutaneous inflammation in adult skin.

These results together with constant atopic manifestations in NS patients suggest that immune response could be biased in favour of a Th2 differentiation. Thus we studied the polarization of peripheral T cells isolated from NS patients.

All together, our data emphasize the importance in controlling both sides of the disease: the skin barrier defect and the pro-allergic signals intrinsic of the epidermis. Moreover, we identified new potential therapeutic targets for the treatment of this orphan disease.

---

**AUTEUR** : Anaïs BRIOT

**TITRE** : Rôle de LEKTI dans le contrôle de l'inflammation allergique du syndrome de Netherton

**DIRECTEUR DE THESE** : Pr. Alain HOVNANIAN

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE** : CHU Purpan, Toulouse, le 24 Novembre 2009

---

## **RESUME**

Le syndrome de Netherton (SN, OMIM 256500) est une génodermatose rare et sévère due à des mutations du gène *SPINK5* codant l'inhibiteur de protéases LEKTI. LEKTI joue un rôle crucial dans la fonction de barrière cutanée via la régulation de protéases épidermiques dont les kallikréines (KLK) 5 et 7. En absence de LEKTI, l'hyperactivité des kallikréines entraîne un détachement anormal de la couche cornée et une perte de la fonction de barrière cutanée. A l'aide de modèles murins et de kératinocytes de patients SN, nous avons démontré que l'épiderme dépourvu de LEKTI avait également la capacité intrinsèque de produire des cytokines pro-Th2, telle que TSLP, suite à l'activation de PAR2 par la KLK5. Les animaux dépourvus à la fois des gènes *Spink5* et *Par2* nous ont permis de confirmer l'importance de la cascade KLK5-PAR2 dans l'induction des messages pro-allergiques précoces indépendamment des stimuli environnementaux et du système immunitaire adaptatif. Cependant, l'inactivation de cette voie ne rétablit pas la fonction de barrière et reverse partiellement le phénotype inflammatoire dans une peau adulte.

Ces résultats ainsi que la présence constante de manifestations atopiques chez les patients SN sont en faveur d'un biais de la réponse immune vers une différenciation de type Th2. Ainsi une étude de la polarisation de la réponse lymphocytaire T a été initiée chez ces patients.

L'ensemble de ces travaux souligne ainsi l'importance du contrôle des deux versants du SN : le défaut de barrière cutanée et l'induction de signaux pro-allergiques intrinsèque à l'épiderme. De plus, il identifie de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de cette maladie orpheline.

---

**MOTS CLEFS** : maladie monogénique, syndrome de Netherton, épiderme, protéases, barrière cutanée, inflammation, allergie

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE** : Physiopathologie moléculaire, cellulaire et intégrée

## **INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :**

INSERM U563, IFR150, CPTP

CHU Purpan, Place Baylac

Département de Génétique, Laboratoire du Pr A. Hovnanian

Bâtiment B, étage 5

31059 Toulouse cedex 03