



**HAL**  
open science

# Biomolécules et immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau

Giuseppe G. Percoco

► **To cite this version:**

Giuseppe G. Percoco. Biomolécules et immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau. Polymères. Université de Rouen, 2012. Français. NNT: . tel-02053638

**HAL Id: tel-02053638**

**<https://normandie-univ.hal.science/tel-02053638>**

Submitted on 1 Mar 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale Normande de Biologie  
Intégrative, Santé et Environnement  
Spécialité : Biologie Cellulaire



Présentée par :

**GIUSEPPE PERCOCO**

Soutenue le 11 Décembre 2012

## **Biomolécules et Immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau**

Directeur de thèse : **Pr. A. Driouich**

Co-directeur de thèse : **Dr. ML. Follet-Gueye**

### **Membres du jury**

Pr. L. Misery

Dr. M. Simon

Dr. G. Redziniak

Dr. L. Lefeuvre

Dr. E. Lati

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur/Membre invité





# THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale Normande de Biologie  
Intégrative, Santé et Environnement  
Spécialité : Biologie Cellulaire

Présentée par :

**GIUSEPPE PERCOCO**

Soutenue le 11 Décembre 2012

## Biomolécules et Immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau

Directeur de thèse : **Pr. A. Driouich**, Professeur, Université de Rouen

Co-directeur de thèse : **Dr. ML. Follet-Gueye**, Maître de conférences, Université de Rouen

### Membres du jury

<b>Pr. L. Misery</b>	Professeur, Université de Brest	Rapporteur
<b>Dr. M. Simon</b>	Chercheur CNRS, Université de Toulouse III	Rapporteur
<b>Dr. G. Redziniak</b>	Consultant scientifique en cosmétique, Cosmetic Invention	Examineur
<b>Dr. L. Lefeuvre</b>	Responsable R&D, Lab. dermatologiques d'Uriage	Examineur
<b>Dr. E. Lati</b>	Directeur du laboratoire Bio-EC	Examineur/Membre Invité



## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV) EA4348 de l'Université de Rouen sous la codirection du Prof. Azeddine Driouich et du Dr. Marie Laure Follet-Gueye.

Je tiens à remercier la région d'Haute Normandie et le Pôle de Compétitivité de la Cosmetic Valley pour le soutien financier qu'ils m'ont apporté pendant ces 3 ans de thèse.

Je voudrais remercier le Professeur Patrice Lerouge et le Professeur Azeddine Driouich, directeur et directeur adjoint du laboratoire « Glyco-MEV » pour m'avoir permis de réaliser ces travaux dans cette structure.

Je tiens à remercier Patrice Lerouge, président de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement de m'avoir permis de participer à trois congrès internationaux pendant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Laurent Misery, de l'Université de Brest, et Monsieur Michel Simon, de l'Université de Toulouse, d'avoir accepté d'évaluer ces travaux. Merci aussi à Elian Lati, Gérard Redziniak et Luc Lefeuvre, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Un grand merci à Marie Laure. C'était vraiment un plaisir de travailler avec toi, sous tous les points de vue, scientifiques et humains. Merci pour ton parfait encadrement, merci pour toutes les heures que tu as passés avec moi pour la correction d'un résumé, pour préparer un poster ou un oral pour un congrès, et je pourrais continuer. Merci pour ton aide (fondamentale) dans la rédaction de ce manuscrit. Je te souhaite que du bonheur dans la vie professionnel (j'espère être la pour ton HDR) ainsi que dans ta vie privée.

Merci aussi à Azeddine. Merci vraiment pour tout. Merci de m'avoir accepté dans ce laboratoire dans le cadre du projet Erasmus et merci de m'avoir permis de rester en France lors de mon M2, parce que c'est ce que je voulais. Merci de m'avoir fait confiance, avec Marie Laure, et m'avoir accepté en thèse ici au « Glyco-MEV ». Merci pour ton soutien quotidien et de m'avoir transmis ta passion pour la recherche et ton sens de rigueur. Aussi nos discussions sur le foot vont me manquer!

Je voudrais remercier aussi tout les gens qui ont participé au projet Skinoflor : Luc, Florent, Elian, Chloé, Thomas, Marc, Lily, Mélanie et Philippe. Merci de m'avoir fait découvrir un monde, celui de la dermo-cosmétologie, qui me fascine et merci pour tous les bons moments et les échanges scientifiques lors des réunions Skinoflor.

Plus particulièrement je voudrais remercier Chloé pour son agréable compagnie, sa disponibilité et son soutien et Thomas, l'autre italien du projet, pour sa disponibilité tout au long ces trois années.

Un grand merci aussi à Yasmina (la prédatrice). C'était un plaisir d'avoir partagé avec toi pendant plus de deux ans (!) cette expérience. Merci pour ton aide en microscopie électronique. Et merci encore pour ton agréable compagnie (mise à part le jour où j'avais oublié des échantillons dans ma blouse...☺ )!

Je voudrais remercier aussi Magalie Bénard. Merci pour tout Magalie! Merci tout d'abord de m'avoir transmis ton savoirfaire en microdissection laser et en PCR. Toujours disponible, toujours souriante, c'était vraiment agréable de travailler avec toi! Je te souhaite beaucoup de chance et de réussite, tu le mérites!

Je voudrais ensuite remercier toutes les personnes que j'ai rencontrées au laboratoire depuis mon arrivé en France.

Merci à Thaddée, mon premier encadrant. Tes méthodes, parfois extrêmes (voire travailler jusqu'à minuit et un week-end sur deux) m'ont bien fait comprendre ce que m'attendait pendant la thèse!

Merci à Sophie A. Tes conseils (ne prends pas beaucoup de vacances pendant l'été, organise ta biblio dès le début de la thèse...) ont vraiment été très précieux! Et j'espère venir chez toi au Gabon un jour!

Un grand merci à Flavien! Mon roommates préféré! Je me rappelle encore le premier jour où nous nous sommes rencontrés, il y a 5 ans à 8h30 pour visiter le campus!. Et de communiquer en anglais à l'époque, c'était pas gagné!☺ C'était un plaisir d'avoir partagé beaucoup de bons moments avec toi, au labo et en dehors du labo..Je te souhaite beaucoup de chance et que du bonheur dans tous les domaines!!!

Merci beaucoup aussi à mon chuchu Marco. Quel bonheur de t'avoir connu! Avec toi, j'ai passé sans doute un de mes plus beaux w-e depuis que je suis en France (Montpellier, tu te rappelles?). Je te souhaite beaucoup de réussite à toi aussi, dans ta vie professionnelle aussi bien que dans ta vie privée.

Je voudrais aussi remercier Aline, l'autre personne avec qui j'ai commencé cette bele aventure au Glyco-MEV. Merci pour ton aide et ton soutien au quotidien au cours de ces cinq dernières années. Bonne chance pour tout et surtout garde ton beau sourire!

Merci aussi à Sophie B. pour tes nombreux conseils en microscopie électronique et les bons moments passés en dehors du labo.

Un grand merci à tous mes collègues, que j'ai rencontré pendant ses cinq dernières années. Eric, Yousef, Ali (pour ton bon couscous), Abder (bon courage pour la suite!), Caroline, Barbara (bientôt sera ton tour, bon courage!), Bérengère, Maxime, Raj (bon courage à toi aussi pour la suite!), Christelle, François, Abdoul (un jour je vais te battre au basket!), Romain (pour tous les matchs de foot qu'on a regardés ensemble), Clément, Rim et désolé si j'en oublie quelques-uns.

Merci aussi à Tony, Philippe, Marianne et Sarah pour les bons moments passés ensembles.

Je n'oublie pas la grand famille du Glyco-MEV. Carole (pour tes mots toujours aussi gentils), Gérald (pour ta disponibilité et ton humour), Maïté, Odile (merci pour d'avoir lu ce manuscrit), Estelle (toujours aussi gentile), Jean-Claude (pour tes conseils et les bon repas, bon là c'est plutôt Conci qu'il faudrait remercier..), Arnaud (pour tes Buongiorno), Laurence, Muriel, Gaëlle, Aurélie, Alain, Christophe R., Carole P..

Voglio ringraziare Mamma e Papà. Grazie per avermi dato tutto e aiutato in ogni momento della mia vita. Senza di voi non avrei mai potute raggiungere questo traguardo. Vi voglio un mondo di bene.

Un abbraccio e grazie per tutto anche al resto della famiglia, mia Sorella, Michele, Flavietta e Stefanuccio

Per non dimenticare i nonni, nonno Pina, nonno Peppe, nonno Raffaele, Nonna Iole e Zia. Grazie anche a voi.

Vorrei inoltre ringraziare quei Disperati dei miei amici, per nessun motivo in particolare...Nazzareno, lo Sciupato, Lapo, Véfò, Ranf, il Dj, Spirit, Paoletto, CapoFece, Ariansa, Paoletto, Cappio, la Jatta e Spaghetto, Luchetta. Pu!

Et merci beaucoup à toi aussi...Pour ta présence pendant ces derniers temps, ton aide et ton soutien quotidien... Tu as été le plus beau cadeau que j'aurais pu recevoir. Et bon courage à toi aussi pour la suite.. :-)



## Liste des abréviations

<i>A. fumigatus</i>	: <i>Aspergillus fumigatus</i>
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
AGPs	: Arabinogalactane protéine
AH	: N-anhydroxyacyle, 6-hydroxy-sphingosine
AIR	: <i>Air insoluble residue</i>
AJ	: <i>Adherens junction</i>
AP	: N-alpha (a)-hydroxyacyle phyto-sphingosine
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
BEM®	: <i>Bio-EC's medium</i>
BSA	: <i>Bovin serum albumin</i>
B2M	: Bêta-2-microglobuline
<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
CCL2	: <i>Chemokine ligand 2</i>
CD14	: <i>Cluster of differentiation 14</i>
CFN	: <i>Colony-stimulating factor</i>
CpG	: <i>Cytosine-phosphate-guanine</i>
DCs	: <i>Dendritic cells</i>
DM	: <i>Dense midline</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DPBS	: <i>Dulbecco's Phosphate Buffer Saline</i>
dsARN	: ARN à double brin ( <i>double-strand RNA</i> )
DS	: Desmosome
Dsc	: Desmocolline

Dsg	: Desmogléine
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	: <i>Enterococcus faecium</i>
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EOH	: N-estérifiée u-hydroxyacyle 6-hydroxy-sphingosine
EOP	: N-estérifiée oméga (u)-hydroxyacyle phyto-sphingosine
EPG	: Endo-alpha (1,4) polygalacturonase
FEDER	: Fond Européen de Développement Régional
FITC	: <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FNH	: Facteur naturel d'hydratation
GA	: Glutaraldéhyde
GalA	: <i>Galacturonic acid</i>
Glyco-MEV	: Glyco-Matrice Extracellulaire Végétale
HaCaT	: <i>Immortalized human keratinocyte cell line</i>
hBD	: <i>human beta defensin</i>
hCAP18	: <i>human cationic antimicrobial protein 18</i>
H&E	: Hématoxyline et éosine
HMP	: <i>Human microbiome project</i>
HNP	: <i>Human neutrophil peptide</i>
ICE	: <i>IL-1 converting enzyme</i>
IDP	: <i>Inner dense plaque</i>
IFN	: Interféron
IL	: Interleukine
iNOS	: <i>Nitric oxyde synthase</i>
IGF-1	: <i>Insulin growth factor-1</i>

IRAK	: <i>IL1R-associated protein</i>
JAMs	: <i>Junctional adhesion molecules</i>
JDE	: Jonction dermo-épidermique
JNK	: <i>c-jun N-terminal kinase</i>
LCM	: <i>Laser capture microdissection</i>
LPS	: Lipopolysaccharide
LRR	: <i>Leucine-rich repeat</i>
MAL	: <i>MyD88 adaptator-like</i>
MAP	: <i>Mitogen activated protein</i>
MB	: Membrane basale
MCP-1	: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MET	: Microscopie électronique à transmission
MD-2	: <i>Myeloid differentiation-2</i>
MEC	: Matrice extra-cellulaire
MIC	: <i>Minimal inhibitory concentration</i>
MIP3-a	: <i>Macrophage inflammatory protein 3-a</i>
Mj	: <i>Mirabilis jalapa</i>
MyD88	: <i>Myeloid differentiation of primary response D88 gene</i>
NBS	: <i>Nucleotide binding site</i>
NEMO	: <i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NF-k B	: <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NH	: <i>N-nonhydroxyacyle 6-hydroxy-sphingosine</i>
NKT	: <i>Natural killer T</i>
NLR	: <i>Nod-like receptor</i>
NOD	: <i>Nucleotide oligomerization domain</i>
NP	: <i>N-nonhydroxyacyle phyto-sphingosine</i>

ODP	: <i>Outer dense plaque</i>
<i>P. acnes</i>	: <i>Propionibacterium acnes</i>
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAM	: Peptide antimicrobien
PAMP	: <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	: <i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PEN	: Polyéthylène naphthalate
PFA	: Paraformaldéhyde
PGN	: Peptidoglycane
PKR	: Protéine kinase R
PMA	: Phorbol 12-myristate 13-acétate
Poly I :C	: Acide polyribonucleosinique polyribocytidylique
qPCR	: PCR quantitative en temps réel
PRRs	: <i>Pathogen recognizing receptors</i>
RG-II	: Rhamnogalacturonane de type II
RNase7	: Ribonucléase 7
RPLP0	: <i>Ribosomal protein, large, P0</i>
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	: <i>Staphylococcus epidermidis</i>
SB	: <i>Stratum basale</i>
Sc	: <i>Stem cell</i>
SC	: <i>Stratum corneum</i>
SEC	: <i>Size exclusion chromatography</i>
SG	: <i>Stratum granulosum</i>
SKALP	: <i>Skin-derived anti-leukoprotease</i>
SLPI	: <i>Secretory leukoprotease inhibitor</i>

SP	: <i>Stratum spinosum</i>
SPRs	: <i>Small proline rich proteins</i>
STAT	: <i>Signal transducers and activators of transcription family of transcription factors</i>
TA	: <i>Transit amplifying cell</i>
TAK1	: <i>Transforming growth factor-beta-activated kinase 1</i>
TBS	: <i>Tris-buffered saline</i>
TEWL	: <i>Trans epidermal water loss</i>
TG	: <i>Transglutaminase</i>
TGF-alpha	: <i>Transforming growth factor-alpha</i>
Th1	: <i>T helper 1</i>
TIR	: <i>Toll-interleukin receptor</i>
TIRAP	: <i>Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein</i>
TJ	: <i>Tight junction</i>
TLR	: <i>Toll-like receptor</i>
TOLLIP	: <i>Toll-interacting protein</i>
TNF	: <i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	: <i>TFN receptor-associated factor</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
ZO	: <i>Zona occludens</i>



## Liste des figures et des Tableaux

<b><u>Figure 1.</u></b> Structure de la peau.	p.1
<b><u>Figure 2.</u></b> Structure du derme et fibres de collagène.	3
<b><u>Figure 3.</u></b> Structure de la jonction dermo-épidermique.	4
<b><u>Figure 4.</u></b> Structure de l'épiderme.	6
<b><u>Figure 5.</u></b> Mécanismes possibles de prolifération cellulaire au niveau de la couche basale.	9
<b><u>Figure 6.</u></b> Marqueurs de différenciation épidermique.	10
<b><u>Figure 7.</u></b> Structure et formation de la couche cornée.	12
<b><u>Figure 8.</u></b> Structure des céramides du <i>stratum corneum</i> .	13
<b><u>Figure 9.</u></b> Les jonctions cellulaires.	14
<b><u>Figure 10.</u></b> Structure moléculaire des jonctions adhérentes.	15
<b><u>Figure 11.</u></b> Formation et structure de jonctions communicantes.	16
<b><u>Figure 12.</u></b> Structure des jonctions serrées.	17
<b><u>Figure 13.</u></b> Structure et organisation moléculaire des desmosomes.	18
<b><u>Figure 14.</u></b> Facteurs de stress cutanés.	19
<b><u>Figure 15.</u></b> Distribution bactérienne en lien avec le site d'échantillonnage.	22
<b><u>Figure 16.</u></b> Interaction entre les immunités innée et adaptative en réponse à une infection bactérienne de la peau.	23
<b><u>Figure 17.</u></b> Structure des récepteurs TLRs.	25
<b><u>Figure 18.</u></b> Les ligands des TLRs.	26
<b><u>Figure 19.</u></b> Voies de signalisation des TLRs.	27
<b><u>Figure 20.</u></b> Famille des récepteurs Nod-like.	29
<b><u>Figure 21.</u></b> Expression tissu-spécifique des PAMs chez l'Homme.	30
<b><u>Figure 22.</u></b> Structure des trois familles de PAMs.	33
<b><u>Figure 23.</u></b> Séquence protéique et conformation des ponts disulfures des défensines.	34
<b><u>Figure 24.</u></b> Cathélicidine : structure du gène et clivage protéique.	38

<b><u>Figure 25.</u></b> Mécanisme de maturation de la RNase7 au sein de l'épiderme.	39
<b><u>Figure 26.</u></b> Expression de la psoriasine au sein de l'épiderme.	40
<b><u>Figure 27.</u></b> Membranes et spécificité d'action des PAMs.	42
<b><u>Figure 28.</u></b> Activité antimicrobienne de la hBD3.	43
<b><u>Figure 29.</u></b> Les modèles principaux d'action des PAMs.	44
<b><u>Figure 30.</u></b> Structure et organisation de la paroi végétale.	51
<b><u>Figure 31.</u></b> Structure du RG-II.	52
<b><u>Figure 32.</u></b> Structure du Téflose.	55
<b><u>Figure 33.</u></b> Stimulation <i>ex-vivo</i> de l'explant : conditions expérimentales.	59
<b><u>Figure 34.</u></b> Microdissection et PCR en temps réel : du tissu au gène.	61
<b><u>Figure 35.</u></b> Ultrastructure de la jonction dermo-épidermique et des jonctions cellulaires.	84
<b><u>Figure 36.</u></b> Ultrastructure de l'interface SG/SC.	85
<b><u>Figure 37.</u></b> Immunolocalisation de protéines structurales.	86
<b><u>Figure 38.</u></b> Immunolocalisation de protéines liées à la défense cutanée.	87
<b><u>Figure 39.</u></b> Profil d'expression génique après stimulation de l'explant avec <i>S. aureus</i> .	128
<b><u>Figure 40.</u></b> Immunolocalisation des épitopes associés à des PAMs et des cytokines pro-inflammatoires après exposition avec <i>S. aureus</i> .	129
<b><u>Figure 41.</u></b> Impact du RG-II sur la croissance bactérienne.	131
<b><u>Figure 42.</u></b> Effet du RG-II sur le profil d'expression des gènes de défense cutanés.	131
<b><u>Figure 43.</u></b> Immunolocalisation du RG-II au sein de l'explant.	132
<b><u>Figure 44.</u></b> Impact du RG-II sur l'expression génique au sein des tissus de l'explant en lien avec la microflore cutanée.	133
<b><u>Figure 45.</u></b> Impact du Téflose sur l'expression des gènes de défense de l'explant en lien avec la microflore cutanée.	134
<b><u>Figure 46.</u></b> Action « préventive » du Téflose.	135
<b><u>Figure 47.</u></b> Impact de l'Eau d'Uriage sur l'expression des gènes de défense en lien avec <i>S. aureus</i> .	136
<b><u>Figure 48.</u></b> Impact de l'émulsion P 385.02 sur l'expression des gènes de défense en lien avec <i>S. aureus</i> .	136
<b><u>Figure 49.</u></b> Mécanismes moléculaires de la pyroptose.	140

<b><u>Figure 50.</u></b> Mécanismes possibles activant l'expression génique des couches non superficielle de l'épiderme suite à l'exposition.	142
<b><u>Tableau 1.</u></b> Expression de la kératine dans l'épiderme.	7
<b><u>Tableau 2.</u></b> Les PAMs présents dans la peau humaine.	31
<b><u>Tableau 3.</u></b> <i>Minimal Inhibitory Concentration</i> en µg/mL des lipides de la couche cornée.	41
<b><u>Tableau 4.</u></b> Mode d'action des PAMs à activité intracellulaire.	45
<b><u>Tableau 5.</u></b> Anticorps utilisés : origine, référence et dilution utilisée.	64
<b><u>Tableau 6.</u></b> Activités enzymatiques des germes sélectionnés.	141



## Préambule

La peau joue un rôle central pour la survie et le bien-être de l'Homme. Même si l'importance de ses fonctions est parfois sous-estimée, la peau est un organe vital constituant le revêtement extérieur de l'organisme qui le protège d'un environnement externe très souvent délétère. Ce tissu garantit une protection efficace contre les stress physiques et chimiques du monde extérieur et contre de possibles attaques par des microorganismes pathogènes. La peau joue constamment un rôle de sentinelle, prête à tout moment à signaler un possible danger. C'est une barrière sélective, qui permet des échanges en laissant passer des substances tout en faisant sortir d'autres. De plus, cet organe est l'habitat naturel de millions de microorganismes et représente beaucoup plus qu'une simple barrière défensive. Grâce aux terminaisons nerveuses situées sur la surface cutanée, nous sommes en contact étroit avec notre environnement : la peau est l'organe du toucher (Boulais and Misery, 2008), grâce à laquelle nous percevons la sensation de froid en touchant un bout de glace, nous bronçons après une journée au soleil et nous avons mal lorsqu'une guêpe nous pique!

Pour mieux comprendre l'importance de cet organe extraordinaire, il suffit de penser que l'adaptation à la vie terrestre, qui s'est réalisée à partir du Carbonifère (ère géologique s'étendant de 359 à 299 millions d'années avant J.-C.) a été possible grâce, notamment, au développement d'une peau relativement imperméable à l'eau chez les amphibiens (Gray *et al.*, 1928). Tout au long du « voyage » de l'évolution de l'espèce humaine, un long chemin de plus de six millions d'années, notre peau a voyagé et a évolué avec nous, à travers une multitude de changements climatiques et de styles de vie différents. La peau est le reflet de notre âge, de notre état de santé, de notre identité culturelle : des maquillages retrouvés parmi les vestiges des premières civilisations jusqu'aux tatouages de nos jours, l'être humain a toujours décoré sa peau afin d'affirmer son identité ou souligner une appartenance sociale. C'est l'organe humain qui a le plus influencé notre vocabulaire : pensez aux multitudes d'expressions impliquant le terme peau : « à fleur de peau », « je lui ferai la peau ! » « je ne voudrais pas être dans sa peau » et la liste pourrait continuer...

Après vous avoir rapidement montré les différentes vertus de ce que je considère comme un système unique, grâce à sa capacité d'interagir à différents niveaux avec notre environnement, je vais me diriger vers la problématique de ce travail de thèse.

De plus en plus de femmes, environ 40-50 %, au Japon, en Europe et aux États-Unis (Kligman *et al.*, 2006; Escalas-Taberner *et al.*, 2011) déclarent avoir une peau sensible, c'est-à-dire une peau présentant ou non des dermatoses associées à des modifications des propriétés bio-physico-chimiques de la barrière cutanée. L'incidence sur ce type de peaux des facteurs d'origine

climatique (froid, chaleur, humidité, etc.) et d'origine physico-chimique (solvants, rayons ultraviolets) est bien connue. En revanche les effets, positifs ou négatifs, du microbiome cutané sur ces types de peaux n'a jamais été étudié jusqu'à présent.

L'objectif de ma thèse a été d'explorer l'impact d'actifs dermo-cosmétiques d'origine végétale ou non, sur les fonctions barrières de la peau en lien avec son exposition à des germes bactériens cutanés ciblés pour ce travail (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas fluorescens*), en utilisant l'explant de peau humaine, maintenu en survie, comme modèle d'étude.

Ce manuscrit est organisé de la manière suivante :

- Une introduction au sein de laquelle les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la peau en lien avec son environnement sont présentées.
- Un chapitre Matériel et Méthodes, au sein duquel toutes les conditions expérimentales et les techniques utilisées pendant ce projet sont décrites de façon détaillée.
- Les résultats obtenus tout au long de ces trois années de recherche sont organisés en trois sections différentes et font l'objet du troisième chapitre.

Ce chapitre comporte une première partie relative à la description, à l'échelle subcellulaire, des caractéristiques morphologiques de la peau combinée à des analyses immunocytologiques de protéines de structure et de défense par microscopie électronique à transmission. Cette première partie décrit également l'analyse d'expression de gènes structuraux et de gènes liés à l'immunité innée au sein de l'épiderme par PCR quantitative en temps réel suite à la microdissection laser.

Dans la deuxième partie, des résultats concernant les modifications (expression génique et morphologie) induites par les microorganismes sélectionnés sur l'explant de peau sont présentés.

La dernière partie du chapitre résultats montre les effets d'actifs, d'origine végétale ou non, sur les fonctions de défense de l'épiderme en lien avec son environnement microbiologique.

- Un quatrième chapitre relatif aux conclusions et perspectives reprend de façon synthétique les différents aspects de ce travail.

Enfin, un dernier volet consacré aux compétences acquises tout au long de ces trois années ainsi que les activités parallèles à ma thèse, conclura ce manuscrit.

# Sommaire

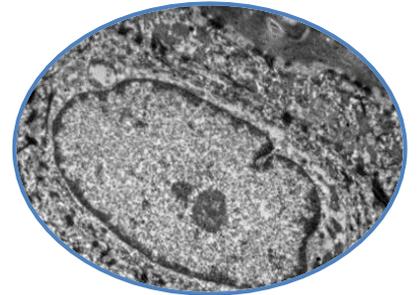
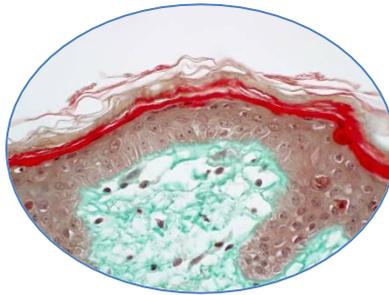
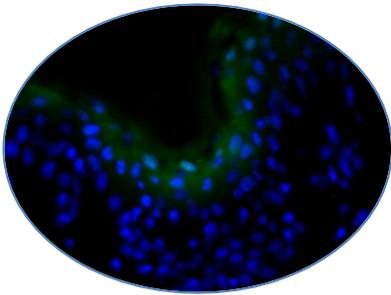
<b>Chapitre Premier : Introduction</b> .....	1
<b>I Généralités</b> .....	1
I.I Structure de la peau .....	1
I.I.1 L'hypoderme .....	1
I.I.2 Le derme .....	2
I.I.3 La jonction dermo-épidermique (JDE).....	3
I.I.4 L'épiderme .....	6
I.I.4.1 Les cellules de l'épiderme.....	7
a) Les kératinocytes .....	7
b) Les mélanocytes.....	7
c) Les cellules de Langerhans .....	8
d) Les cellules de Merkel.....	8
I.I.4.2 Les couches épidermiques.....	8
a) La couche basale ou stratum basale .....	8
b) La couche épineuse ou stratum spinosum.....	9
c) La couche granuleuse ou stratum granulosum.....	10
d) La couche cornée ou stratum corneum .....	10
I.I.4.3 Les jonctions cellulaires au sein de l'épiderme.....	14
a) Les jonctions adhérentes (adherent junctions).....	14
b) Les jonctions communicantes (gap junctions).....	15
c) Les jonctions serrées (tight junctions) .....	16
d) Les desmosomes.....	17
<b>II Les propriétés « barrières » de la peau et la défense innée</b> .....	19
II.I La flore bactérienne cutanée .....	19
II.II L'immunité cutanée innée .....	22
II.II.1 Signalisation <i>via</i> les récepteurs toll-like.....	24
II.II.1.1 Structure des TLRs et diversité de leurs ligands.....	24
II.II.1.2 Les voies de signalisation des TLRs .....	26
II.II.1.2 Expression des TLRs dans les kératinocytes .....	28
II.II.2 Signalisation <i>via</i> les récepteurs NOD-like (NLRs).....	28
II.II.3 Les peptides antimicrobiens .....	30

II.II.3.1 Les différents types de PAMs .....	33
a) Généralités .....	33
b) Les défensines .....	34
c) Les cathélicidines .....	37
d) La RNase 7 .....	38
e) S100A7 (psoriasine) .....	39
f) Autres molécules à activité antimicrobienne .....	40
II.II.3.2 Mécanismes d'action des PAMs .....	41
II.II.4 Les cytokines .....	46
II.II.4.1 La famille des IL-1 .....	46
II.II.4.2 La famille des IL-6 .....	47
II.II.4.3 Les TNF .....	48
<b>III Dermo-cosmétique et renforcement de la barrière cutanée</b> .....	49
III.I Les polysaccharides et protéoglycannes végétaux .....	50
III.II Le Rhamnogalacturonane II (RG-II) .....	51
<b>IV Objectifs de la thèse</b> .....	53
<b>Chapitre Deuxième : Matériel et Méthodes</b> .....	55
I Préparation des glycomolécules .....	55
II Préparation et culture des explants de peau humaine .....	56
III Préparation des souches bactériennes .....	57
IV Stimulation ex-vivo des explants .....	57
V Analyse du profil d'expression des gènes de la défense innée .....	60
V.I Microdissection laser .....	60
V.II Extraction de l'ARN à partir des tissus microdissequés .....	60
V.III Extraction de l'ARN à partir de tranche entière d'explants .....	61
V.IV Rétrotranscription et PCR quantitative en temps réel .....	61
V.V Analyses statistiques des données de qPCR .....	62
VI Analyses microscopiques .....	62
VI.I Microscopie optique : analyses morphologiques et immunofluorescence .....	62
VI.II Microscopie électronique à transmission .....	64
VI.II.1 Fixation chimique .....	65
VI.II.2 Congélations haute pression (HPF) et substitution à froid .....	65
VI.II.3 Analyses ultrastructurales et Immunogold .....	66

VII Test ELISA.....	66
<b>Chapitre Troisième : Résultats</b> .....	67
<b>I Analyse d’expression génique au sein de l’épiderme et caractéristiques ultrastructurales des explants</b> .....	67
Publication n.° 1 : « Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection: application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR ».....	67
Résultats complémentaires : analyse ultrastructurale de l’explant et immunolocalisation de protéines d’intérêt .....	83
<b>II Impact des bactéries <i>S. epidermidis</i>, <i>S. aureus</i> et <i>P. fluorescens</i> sur l’immunité cutanée innée / Apport du modèle explant</b> .....	88
Publication n.° 2 : “ Human skin explant: a model to study the interaction between the epidermal cells and the cutaneous microbiota ”.....	88
Résultats complémentaires : impact de <i>S. aureus</i> sur la physiologie de l’explant .....	127
<b>III Effet de biomolécules de nature polysaccharidique sur la défense cutanée innée en lien avec le microbiome</b> .....	130
III.I Biomolécule végétale : polysaccharide pectique, le rhamnogalacturonane II. ....	130
III.II Biomolécule polysaccharidique riche en rhamnose : le Téflose .....	133
<b>Chapitre Quatrième : Discussion et Perspectives</b> .....	137
I Microdissection laser des couches épidermiques d’explants de peau humaine : application à l’étude d’expression génique par PCR en temps réel.....	137
II Expression des gènes de défense et de l’inflammation en lien avec le microbiome cutané.....	139
III Impact de biomolécules sur les mécanismes de défense cutanée .....	144
<b>Références bibliographiques</b> .....	147
<b>Annexes</b> .....	182



# Introduction

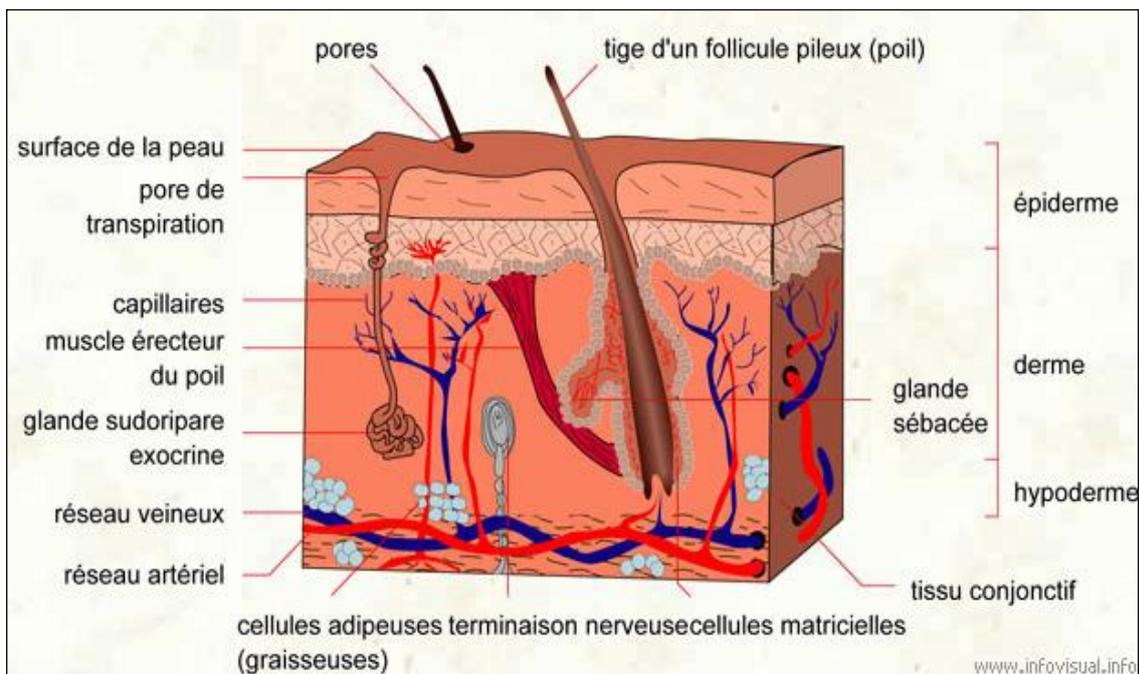




## Chapitre Premier : Introduction

### I Généralités

La peau est le plus grand organe de l'organisme qui joue un rôle primordial en le protégeant des stress biotiques et abiotiques de l'environnement. Chez un individu de 70 kg, elle peut atteindre 5 kg et recouvrir une surface de 2 m<sup>2</sup> environ, représentant 15% du poids corporel. La peau est constituée de 3 couches tissulaires distinctes superposées : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (**Fig. 1**). La plupart des fonctions protectrices de la peau est assurée par l'épiderme.



**Figure 1. Structure de la peau.** La peau, barrière entre l'organisme et l'environnement, est constituée de 3 tissus : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. La peau est caractérisée par différentes annexes épidermiques d'origine ectodermique telles que les unités pilo-sébacées, les glandes sudoripares et sébacées et les ongles. Des terminaisons nerveuses et des vaisseaux sanguins sont également présents. [http://www.inFovisual.info/03/036\\_fr.html](http://www.inFovisual.info/03/036_fr.html)

### I.I Structure de la peau

#### I.I.1 L'hypoderme

L'hypoderme (du grec *hypo*-sous et *dermis*-peau) est la couche la plus profonde de la peau, située juste sous le derme. D'une épaisseur très variable allant de 6 mm à quelques cm, l'hypoderme est un tissu conjonctif lâche très riche en cellules adipeuses, les adipocytes, qui jouent le rôle de réserve énergétique pour l'organisme et qui forment le panicule adipeux. Il relie la peau aux organes

# Introduction

---

plus internes, permettant les mouvements simultanés de l'un par rapport à l'autre. L'hypoderme est hautement vascularisé et contient des terminaisons nerveuses, des fibres de collagène parallèles à la surface de la peau, des fibres d'élastine et d'autres cellules telles que les macrophages.

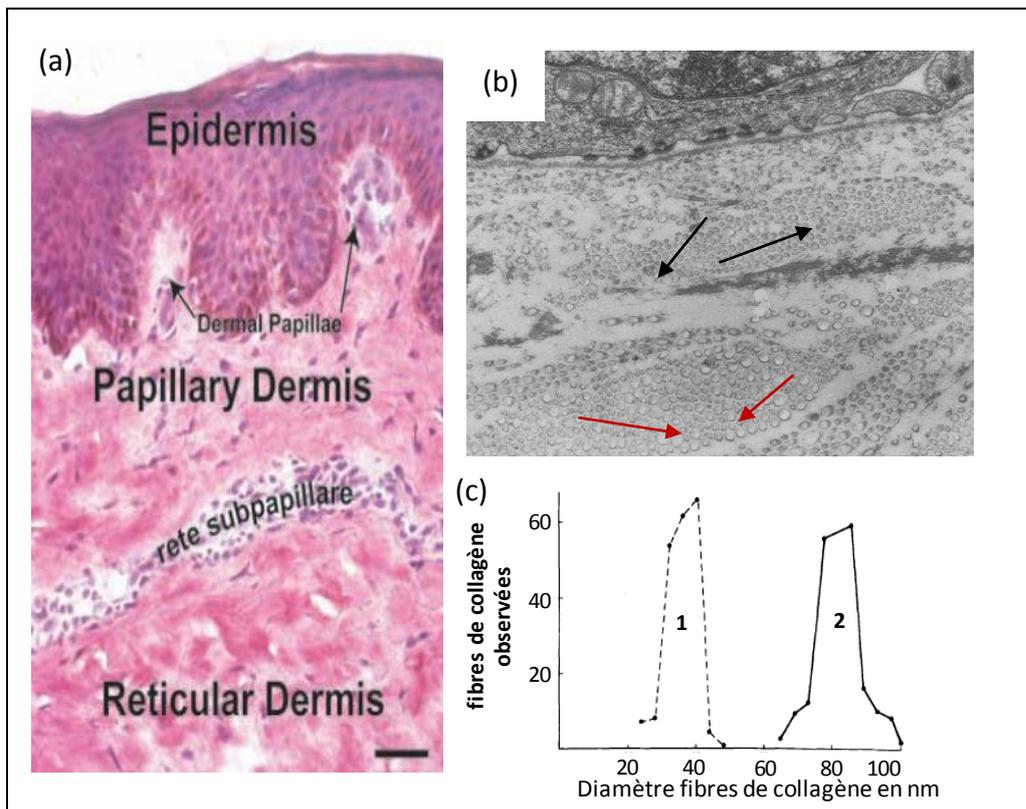
## I.I.2 Le derme

Le derme (du latin *dermis*, peau), couche de la peau située entre l'épiderme et l'hypoderme, est un tissu conjonctif dont l'épaisseur peut varier selon les régions corporelles : de 0,3 mm au niveau des paupières à 3 mm ou plus au niveau du dos et des pieds. Il joue un rôle essentiel dans la thermorégulation de notre organisme et la cicatrisation. Le derme est caractérisé par la présence de plusieurs structures spécialisées, les annexes cutanées : follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares, et terminaisons nerveuses. De plus, il contient de nombreux vaisseaux sanguins qui assurent la nutrition de l'épiderme par diffusion. La matrice extracellulaire (MEC) du derme, la composante la plus abondante de ce tissu, est extrêmement riche en protéines fibreuses telles que le collagène (essentiellement de type I et III), la fibronectine et l'élastine. Ces trois molécules confèrent à la MEC et à la peau souplesse et élasticité. La MEC est également riche en glycosaminoglycannes et protéoglycannes, molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire (Clark *et al.*, 2003; Matsuura *et al.*, 2004), l'hydratation de la peau (Masson, 2010), le vieillissement cutané (Carrino *et al.*, 2000; Nomura, 2006; Carrino *et al.*, 2011) ou encore la cicatrisation (Gall, 2010). Le type cellulaire le plus abondant du derme est le fibroblaste, cellule impliquée dans le renouvellement de la MEC, qui possède la capacité de synthétiser le collagène ainsi que les protéoglycannes et d'autres glycoprotéines. D'autres types cellulaires sont également présents, notamment les cellules plasmiques, les dendrocytes et des cellules impliquées dans la défense telles que les macrophages, les cellules T et les cellules NKT (Natural Killer T) (Nestle *et al.*, 2009). Le derme est constitué de deux régions différentes (i) **le derme papillaire** et (ii) **le derme réticulaire** : (i) **Le derme papillaire**, d'une épaisseur de 300-400 µm, est la couche la plus externe du derme. Son nom est dû à la présence de nombreuses papilles dermiques qui servent à accroître l'adhésion et les échanges avec l'épiderme. Il est caractérisé par la présence de fibres de collagène fines, organisées de manière irrégulière. Il recouvre des fonctions thermorégulatrices et de nutrition vis-à-vis de l'épiderme avascularisé. Un plexus vasculaire, la « *rete subpapillare* » délimite le derme papillaire du derme réticulaire (Sorrell et Caplan, 2004) (**Fig. 2**).

(ii) **Le derme réticulaire**, à l'inverse, est caractérisé par la présence de fibres de collagène plus épaisses et organisées de façon parallèle à la surface de la peau. Il représente un support pour les couches sous-jacentes en assurant l'élasticité de la peau. De plus, il constitue la partie du derme

# Introduction

dans laquelle on retrouve la plupart des appendices cutanés tels que les follicules pileux et les glandes sébacées et sudoripares. Un autre plexus vasculaire, la « *rete cutaneum* », délimite le derme réticulaire de l'hypoderme.



**Figure 2. Structure du derme et fibres de collagène.** (a) Le derme papillaire et le derme réticulaire sont séparés par la « *rete subpapillaire* ». Le derme papillaire est caractérisé par une densité cellulaire plus importante que le derme réticulaire. (b) Les fibres de collagène du derme papillaire (flèches noires) sont moins épaisses que les fibres de collagène du derme réticulaire (flèches rouges). (c) Diamètre des fibres du collagène du derme papillaire (1) et du derme réticulaire (2). Deux populations de collagène sont présentes dans les compartiments du derme. D'après Junqueira *et al.*, 1983; Sorrel et Caplan, 2004.

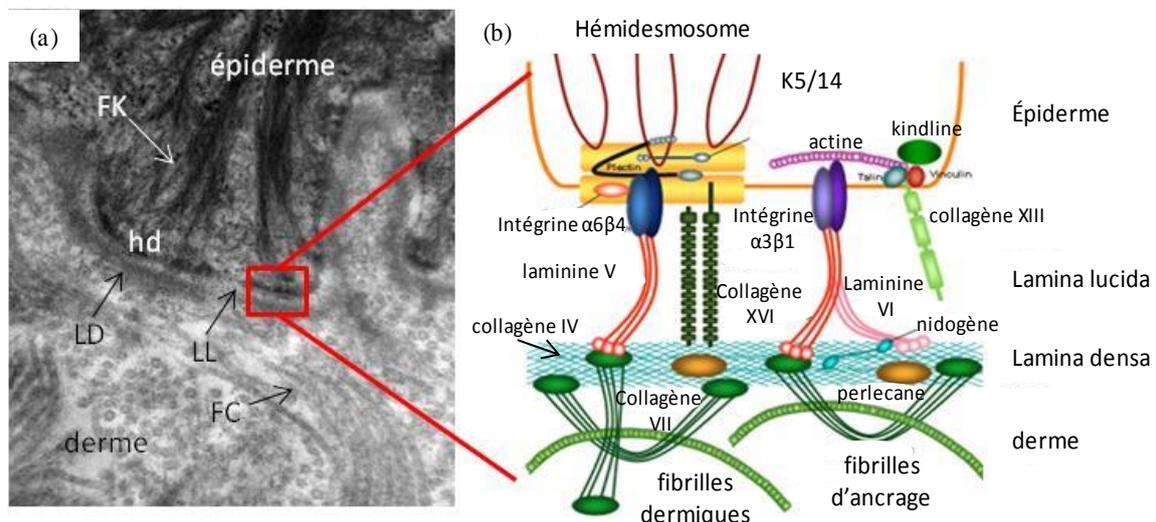
## I.I.3 La jonction dermo-épidermique (JDE)

Les membranes basales (MB) sont des structures très spécialisées qui se trouvent à l'interface entre un tissu conjonctif et des cellules épithéliales. La MB cutanée se situe entre l'épiderme et le derme et est connue comme jonction dermo-épidermique (JDE). La JDE sépare ces deux compartiments en assurant l'adhésion et une interface dynamique entre le derme et l'épiderme. Elle garantit, par conséquent, l'intégrité structurale générale de la peau. Parallèlement, cette structure contrôle le trafic moléculaire entre le derme et l'épiderme en permettant la migration de

# Introduction

cellules telles que les mélanocytes (Haass *et al.*, 2005), les cellules de Langherans (Aiba *et al.*, 1993; Price *et al.*, 1997) ou encore les lymphocytes (Warfel et Hull, 1984) et les cellules tumorales (Li *et al.*, 2001; Tsuji *et al.*, 2002).

La JDE est un complexe de protéines étroitement associées les unes aux autres (Ghohestani *et al.*, 2001; Hashmi et Marinkovich, 2011) (**Fig. 3**). Elle est constituée essentiellement de quatre régions différentes : (1) la membrane plasmique des kératinocytes basaux riche en hémidesmosomes associés aux filaments de kératine de type 5 et 14; deux régions, qui doivent leur nom à leur aspect visible en microscopie électronique : (2) la *lamina lucida* et la (3) *lamina densa* cette dernière est liée au filament d'ancrage; et enfin (4) la *lamina sub-basale*, constituée par les fibrilles dermiques. De nombreuses protéines sont présentes dans ce complexe, notamment la laminine V et VI au niveau de la *lamina lucida*, le nidogène et le collagène de type IV au niveau de la *lamina densa*, et le collagène de type VII constituant les fibrilles d'ancrage de la *lamina sub-basale*. Une partie de ces protéines, à savoir les laminines V et VI, et le collagène de type IV est synthétisée par les kératinocytes basaux alors que le collagène de type VII, le nidogène et la fibronectine sont synthétisés à partir des fibroblastes du derme papillaire.



**Figure 3. Structure de la jonction dermo-épidermique.** En (a), micrographie électronique de la jonction dermo-épidermique (Percoco *et al.*, non publié). En (b), représentation schématique du complexe protéique constituant la JDE. Les filaments de kératine 5/14 sont capables de s'associer à la plectine, une protéine structurale spécifique des hémidesmosomes. La plectine est liée à une autre protéine, l'intégrine alpha6-béta4 et au collagène de type XVI. L'intégrine alpha6béta4, via la laminine V et la laminine VI, interagit avec d'autres protéines localisées au niveau de la *lamina densa* telles que le nidogène, le collagène de type VII et la fibronectine. La plupart des molécules de collagène

# Introduction

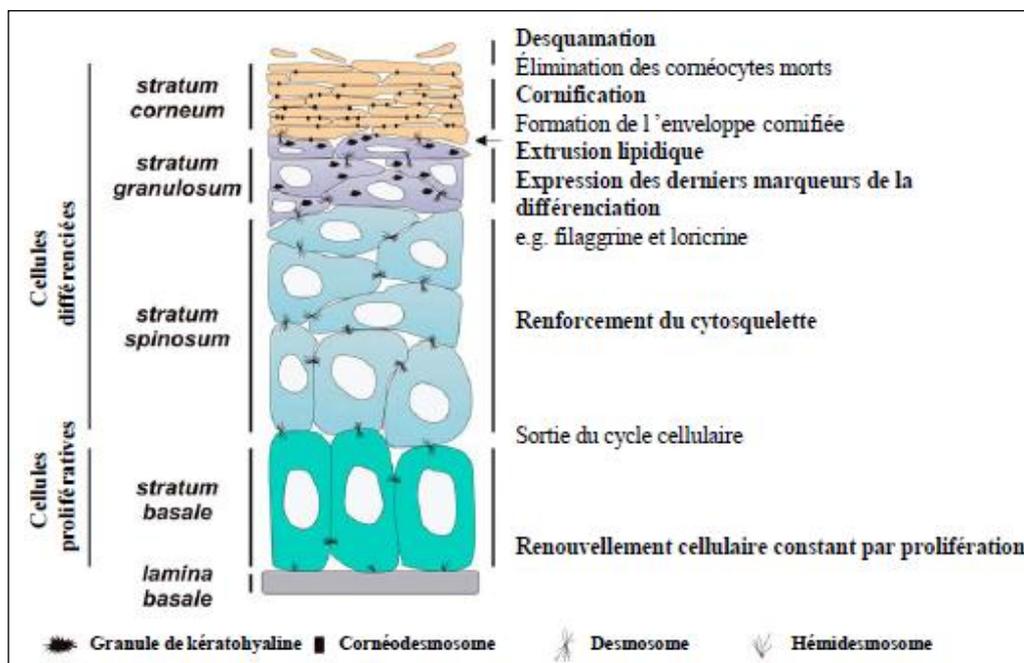
---

VII sont capables de former des structures en forme de boucle, connues en tant que fibres d'ancrage, qui se lient aux fibres de collagène de type I ou III constituant les fibrilles dermiques.

Abréviations : FC, fibre de collagène; FK, filaments de kératine; hd, hémidesmosome; LD, *lamina densa*; LL, *lamina lucida*. Barre d'échelle : 0,2 µm. <http://www.netzwerk-eb.de>.

## I.I.4 L'épiderme

L'épiderme (du grec *epi*-sur et *dermis*-peau), la couche la plus externe de la peau, est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé composé essentiellement de cellules appelées kératinocytes. Au sein de l'épiderme d'autres types cellulaires sont également présents, tels que les mélanocytes, les cellules de Merkel, les cellules de Langherans et occasionnellement les cellules T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (Nestle *et al.*, 2009). L'épiderme, dont l'épaisseur peut varier de 60 à 120 µm, est constitué de quatre couches cellulaires superposées, caractérisées par leur position, leur morphologie et leur degré de différenciation : la couche basale ou *stratum basale* (SB), la couche épineuse ou *stratum spinosum* (SP), la couche granuleuse ou *stratum granulosum* (SG) et la couche cornée ou *stratum corneum* (SC) (**Fig. 4**). Il est admis que les kératinocytes migrent de la couche basale vers la couche épineuse puis vers la couche granuleuse, en changeant de forme et en synthétisant des fibres de kératine spécifiques, des protéines telles que la filaggrine et l'involucrine et des lipides. Les kératinocytes deviennent, au cours du dernier stade de différenciation, les cellules de la couche cornée qui est la couche superficielle de la peau. Ce programme de différenciation a une durée d'environ 30 jours.



**Figure 4. Structure de l'épiderme.** L'épiderme est un épithélium stratifié. Les kératinocytes, le type cellulaire le plus représenté se différencient en migrant de la couche basale vers la couche épineuse, puis vers la couche granuleuse en synthétisant des protéines marqueurs de la différenciation telles que la filaggrine et l'involucrine et des lipides. Le *stratum corneum*, couche la plus superficielle de la peau, est caractérisé par la présence de cellules mortes, appelées cornéocytes, qui sont enveloppées dans une matrice extracellulaire de nature hydrophobe constituée par des protéines, telles que l'involucrine et la loricrine, liées à des lipides tels que les céramides, les acides gras et le cholestérol. D'après Denecker *et al.*, 2008.

## I.I.4.1 Les cellules de l'épiderme

### a) Les kératinocytes

Les kératinocytes sont le type cellulaire le plus important au sein de l'épiderme, représentant environ 90% de la population cellulaire. Ces cellules synthétisent la kératine (**Tableau 1**), un type de filament intermédiaire, qui en s'associant aux filaments d'actine et aux microtubules, forme le cytosquelette intracellulaire. En se différenciant progressivement, les kératinocytes migrent de la couche basale jusqu'à la couche cornée, où ils sont libérés dans l'environnement, suite au processus de desquamation. Ils jouent un rôle central dans la fonction protectrice de l'épiderme.

**Tableau 1. Expression de la kératine dans l'épiderme.** Les kératinocytes basaux produisent des filaments de kératines 5 et 14 et une quantité moins importante de kératine 15 et 17. Au sein d'épidermes « activés » après blessure et (ou) exposition aux UV, ou d'épidermes psoriasiques, les kératinocytes suprabasaux produisent les kératines 16 et 17, deux isoformes de la kératine 6. D'après Magin *et al.*, 2006.

Couche épidermique	Type de kératine
<i>stratum basale</i>	K5, K14, K15, K17
<i>stratum spinosum</i>	K1, K10, Isoformes K6 (K16, K17)
<i>stratum granulosum</i>	K9, K2e

### b) Les mélanocytes

Les mélanocytes sont responsables de la pigmentation de la peau, grâce à leur capacité à synthétiser la mélanine. Au sein de la peau deux types différents de mélanine sont produits : l'eumélanine, de couleur noire/marron et la phaeomélanine, de couleur jaune/rouge. Elles sont impliquées dans l'une des fonctions majeures de la peau, la fonction photo-protectrice (Brenner et Healing, 2008). L'exposition aux rayons ultraviolets peut susciter un photo-endommagement des cellules épidermiques et le développement de cancers cutanés. La mélanine assure la protection du matériel génétique des kératinocytes suite à son transfert *via* des structures filamenteuses appelées les dendrites.

## *c) Les cellules de Langerhans*

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques qui, avec les macrophages du derme, font partie du système phagocytaire mononucléaire de l'épiderme. Elles sont capables de phagocytose, mais aussi d'apprêter et de présenter un antigène exogène. En migrant vers les ganglions lymphatiques, elles vont interagir avec les lymphocytes et d'activer la réponse immunitaire (Romani *et al.*, 2010).

## *d) Les cellules de Merkel*

Les cellules de Merkel sont les cellules minoritaires de l'épiderme (1% environ). Elles se trouvent principalement au niveau de la couche basale. Ces cellules sont capables de produire de nombreuses protéines neuronales et semblent être impliquées dans la perception somatosensorielle (Maricich *et al.*, 2009).

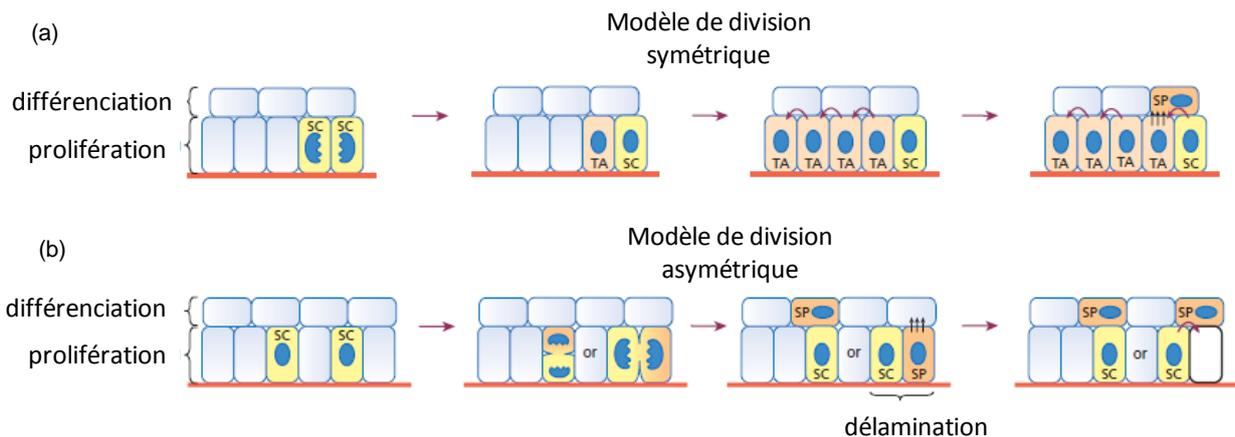
## **I.I.4.2 Les couches épidermiques**

### *a) La couche basale ou stratum basale*

La couche basale, ou couche germinative, est une monocouche attachée au derme grâce à la JDE. Elle est constituée par des kératinocytes basaux, cellules de forme cubique, mitotiquement actives et indifférenciées. Cette division, marquant l'activation d'un programme de différenciation élaboré, assure le renouvellement systématique de l'épiderme. Pendant des années, la division mitotique au sein de la couche basale a été vue comme un processus symétrique (**Fig. 5a**) au cours duquel une cellule staminale donnait naissance à une cellule à amplification transitoire (TA), cellule qui pouvait se diviser plusieurs fois avant de se différencier et migrer vers les couches supérieures (Potten, 1974; Barradon et Green, 1987; Mackenzie, 1997). À l'appui de cette hypothèse, il a été montré que les cellules, nommées cellules « holoclones », caractérisées par une forte présence d'intégrine bêta-1 étaient capables de se diviser indéfiniment. Inversement, les cellules avec des niveaux d'intégrine bêta-1 beaucoup moins importants, et nommées cellules « paraclones », après une quinzaine de cycles cellulaires, se différenciaient en cellules de la couche épineuse (Jones *et al.*, 1995; Watt *et al.*, 1982). Des travaux plus récents (Lechler et Fuchs, 2005; Clayton *et al.*, 2007) ont suggéré l'existence d'une division asymétrique par laquelle une cellule staminale peut générer directement une cellule différenciée, voire une cellule épineuse (**Fig. 5b**). Lechler et Fuchs (2005) ont observé chez la souris, que des cellules de la couche basale en cours de mitose, peuvent changer l'orientation de leur fuseau mitotique, de façon perpendiculaire, afin de subir une division

# Introduction

asymétrique. Cependant seulement 70 % des cellules basales seraient capables d'effectuer ce type de division, ce qui suggère que les deux modèles, divisions symétrique et asymétrique, peuvent coexister au sein de l'épiderme. Au sein du SB, les kératinocytes sont caractérisés par la production des filaments de kératine 5 et 14, marqueurs spécifiques de la couche basale.



**Figure 5. Mécanismes possibles de prolifération cellulaire au niveau de la couche basale.**

Dans le modèle de division symétrique (a), deux cellules souches (sc) sont générées après division mitotique. Certaines de ces cellules, nommées cellules à amplification transitoire (TA), sont capables de se diviser, de 4 à 5 fois, avant de migrer vers la couche épineuse, grâce au mécanisme de la délamination (flèches noires). Elles commencent alors le programme de différenciation terminale. En revanche, selon le modèle de la division asymétrique (b), après division cellulaire, une cellule souche mère génère une cellule fille destinée à devenir directement une cellule de la couche épineuse. Selon l'orientation du fuseau mitotique, les cellules filles destinées à la différenciation peuvent se retrouver directement dans la couche épineuse ou au niveau de la couche basale pour ensuite délaminer et activer le programme de différenciation terminale. D'après McGrath et Uitto, 2010. Abréviations : sc, cellules souches; SP, cellules de la couche épineuse; TA, cellules à amplification transitoire.

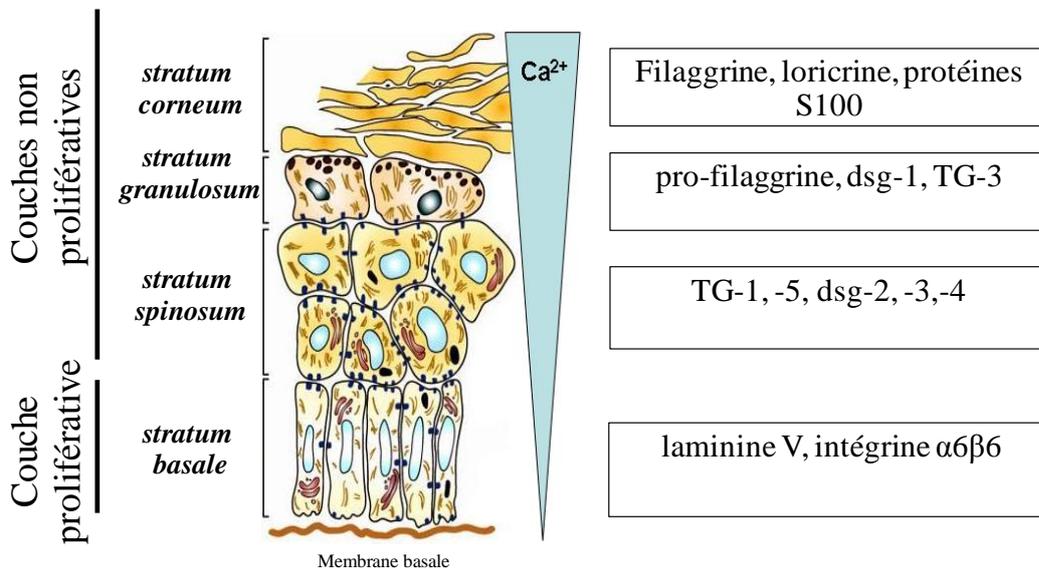
## b) La couche épineuse ou stratum spinosum

La couche épineuse est composée de 5 à 10 assises cellulaires. Elle doit son nom aux nombreuses « épines » visibles en microscopie optique sur coupe histologique. Ce sont en effet les desmosomes, à partir desquels se développent les filaments intermédiaires de kératine, qui assurent cohésion et résistance mécanique à tout l'épiderme. Dès qu'un kératinocyte rentre dans la couche épineuse, il cesse de se diviser et commence son programme de différenciation. A ce stade, les kératinocytes produisent des fibres de kératine de type 1 et 10 et subissent des modifications morphologiques en s'élevant et s'aplatissant graduellement.

## Introduction

### c) La couche granuleuse ou *stratum granulosum*

La couche granuleuse, dernière couche vivante de l'épiderme, est composée de 2 à 5 assises de cellules. Les kératinocytes appartenant à cette couche doivent leur nom à une forte présence de grains de kératohyaline (agrégats de pro-filaggrine) au niveau du cytoplasme. Les kératinocytes de la couche granuleuse ont une forme allongée et aplatie. Ils sont caractérisés par la production de nombreuses protéines marqueurs de la différenciation terminale, tels que la loricrine et la pro-filaggrine (**Fig. 6**). Ils sont également riches en corps lamellaires (appelés aussi kératinosomes ou corps d'Odland), de structures tubulo-vésiculaires d'origine golgienne qui secrètent leur contenu protéique et lipidique par exocytose au niveau de la couche cornée.



**Figure 6. Marqueurs de différenciation épidermique.** Schéma représentant le programme de différenciation épidermique. Les différentes couches de l'épiderme ainsi que les principaux marqueurs de différenciation sont indiqués. La plupart de gènes codant pour des marqueurs de différenciation épidermique terminale (protéines de la famille S100A, la filaggrine ou encore la loricrine) sont exprimés dans une région de 2-MB au niveau du chromosome 1q21 et connues comme « complexe de différenciation épidermique » (Volz *et al.*, 1993). D'après Fuchs, 2008. Abréviations : dsg, desmogléine; TG, transglutaminase

### d) La couche cornée ou *stratum corneum*

La couche cornée est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Elle est constituée de 5 à 30 assises cellulaires. Après avoir achevé leur migration jusqu'à cette zone de l'épiderme, les kératinocytes deviennent des cellules mortes anucléées, les cornéocytes, d'environ 30 µm de long et

## Introduction

---

0.5  $\mu\text{m}$  de large. Ces cellules représentent le dernier stade de différenciation épidermique. Leur membrane plasmique est remplacée par une coque rigide et insoluble, l'enveloppe cornée, et le cytoplasme est constitué principalement d'une matrice fibreuse riche en kératine et filaggrine. Les cornéocytes sont ensuite éliminés par le processus de desquamation et remplacés continuellement par des cellules de la couche inférieure. Selon l'organisation cellulaire, trois régions sont distinguées au sein de la couche cornée : (1) une partie plus interne, le *stratum compactum*, caractérisée par la présence de cornéocytes très cohésifs reliés par la cornédesmosine, et où la filaggrine est présente; (2) une zone intermédiaire au niveau de laquelle la filaggrine est dégradée en Facteur Naturel d'Hydratation (FNH) et (3) une couche plus superficielle, le *stratum disjonctum*, où la cornédesmosine est hydrolysée permettant le renouvellement de l'épiderme par l'élimination constante des cornéocytes.

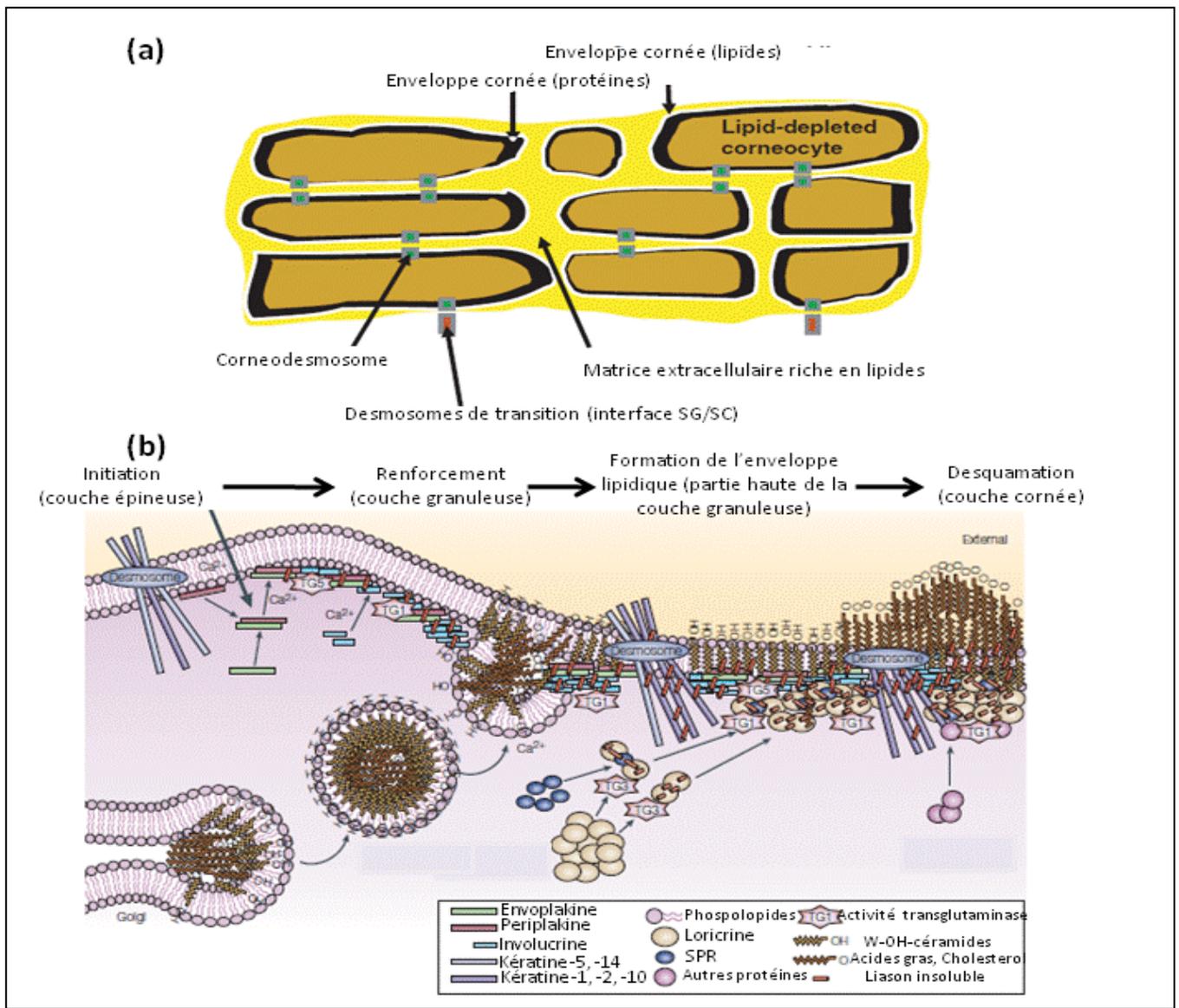
La couche cornée a longtemps été considérée comme une couche cellulaire inerte, non fonctionnelle.

En 1954, Rothman, dans un ouvrage intitulé « *Physiology and Biochemistry of Skin* », définissait le *stratum corneum* comme « une couche amorphe, une masse flasque de fibres de kératine » (« *basketweave stratum corneum* »). Dans les années 70, avec le développement des techniques de fixation à froid des échantillons (Menton et Eisen, 1971, Odland et Reed, 1974; Elias, 1975; Elias *et al.*, 1979) une autre vision de la couche cornée prend forme : elle est décrite avec une définition encore largement utilisée de nos jours, comme une structure à « briques et mortier », concept créé par le Pr. Elias.

Les briques sont les cornéocytes, remplis d'une masse hydrophile de filaments de kératine et entourés par une matrice extracellulaire riche en lipides, le mortier (**Fig. 7a**). Les lipides intercornéocytaires les plus représentés sont les céramides (**Fig. 8**), le cholestérol et les acides gras constituant respectivement 50 %, 25 % et 10% de la masse lipidique totale (Wertz et Norlen, 2003). Les précurseurs de ces lipides sont emmagasinés dans les corps lamellaires au niveau de la couche granuleuse. Il s'agit de glycosphingolipides, de stérols libres et de phospholipides. Ces vésicules sécrètent ensuite leur contenu dans les espaces extracellulaires de la couche cornée (**Fig. 7b**). Une fois excrétés dans le *stratum corneum*, ces lipides polaires sont modifiés par l'action d'enzymes spécifiques en lipides non polaires et sont organisés en structures lamellaires intercellulaires. Les glycolipides sont ainsi convertis en céramides et les phospholipides en acides gras libres. De nature hydrophobe, les lipides intercornéocytaires limitent la perte d'eau trans-épidermique (Trans Epidermal Water Loss, TEWL), qui correspond à la perte d'eau par évaporation au sein de l'épiderme (Grubauer *et al.*, 1989; Denda *et al.*, 1998). Cette fonction est accomplie par le FNH, un

# Introduction

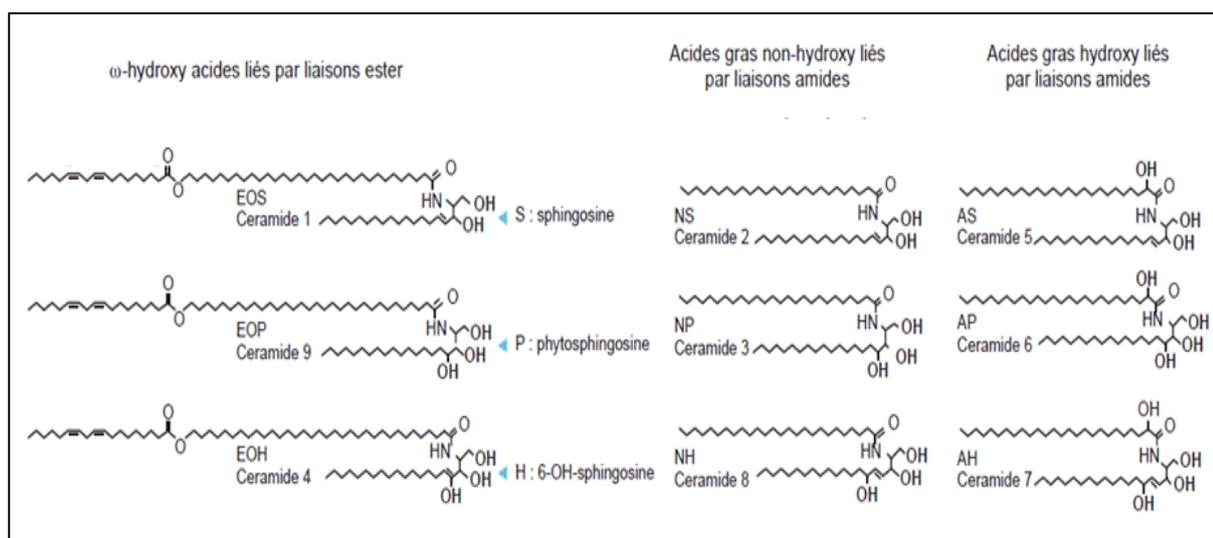
mélange d'acides aminés hygroscopiques dérivant de la dégradation de la filaggrine, tels que l'acide urocanique et l'acide carboxylique pyrrolidone. Ces molécules, avec l'acide lactique, l'urée et le citrate maintiennent l'hydratation de la peau en absorbant l'eau à travers la couche cornée.



**Figure 7. Structure et formation de la couche cornée.** (a) Modèle à « briques et mortier » de la couche cornée. Une fois migrés au niveau du *stratum corneum*, les kératinocytes atteignent la dernière phase de différenciation épidermique et deviennent cornéocytes, cellules dénuées de tout organe intracellulaire. Les cornéocytes, ou briques, sont enveloppés dans une matrice extracellulaire (le mortier) insoluble riche en protéines et lipides. Les cornéodesmosomes assurent la cohésion de tout le compartiment. Les différentes étapes impliquées dans la mise en place de l'enveloppe cornée sont détaillées en (b). Pendant la première étape d'initiation, qui a lieu au niveau de la couche épineuse, les protéines structurales de la couche cornée sont synthétisées, ainsi que la production et l'extrusion dans les espaces intercellulaires de lipides spécifiques. Les transglutaminases (TG) 1 et TG5 participent à l'assemblage de la périplakine

## Introduction

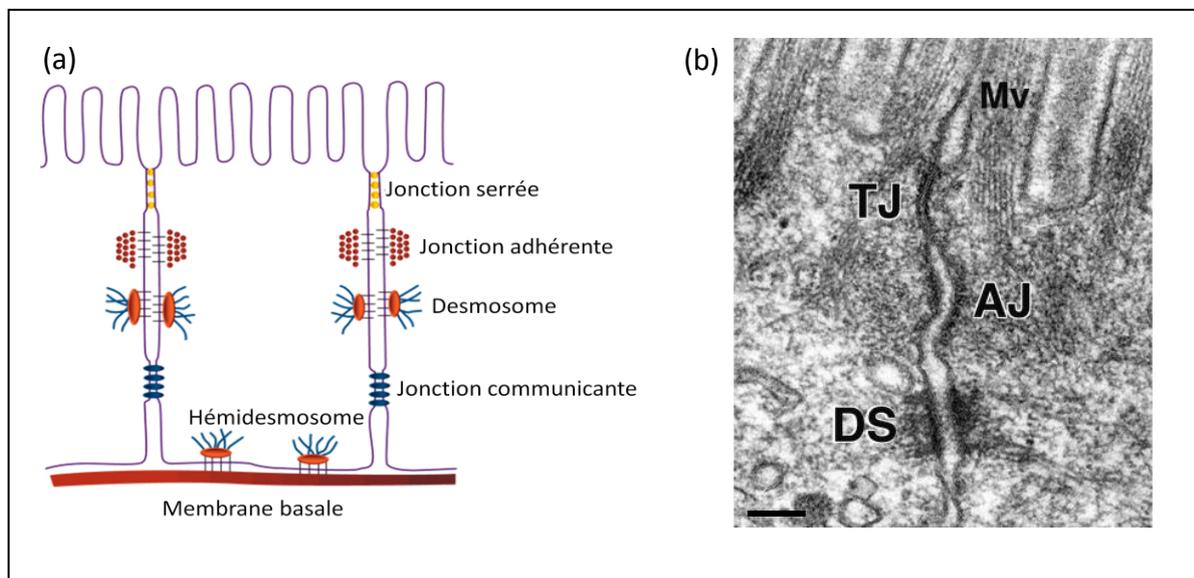
et de l'envoplakine juste en dessous de la membrane plasmique en les ancrant aux desmosomes. Pendant la phase 2, l'étape de renforcement spécifique de la couche granuleuse, les lipides sont liés de manière covalente aux protéines de l'enveloppe cornée. Au cours de cette étape la loricrine est liée aux protéines riches en proline (SPRs, *small proline-rich proteins*) par la TG3 et la TG1. Pendant l'étape de formation de la couche cornée, étape qui a lieu dans la partie la plus externe de la couche granuleuse, les lipides lamellaires d'origine golgienne sont assemblés au complexe envoplakine-périplakine-involucrine. Pendant la phase de desquamation au sein de la couche cornée, d'autres protéines, telles que la loricrine, vont s'ajouter à cette structure, et les céramides, les acides gras et le cholestérol sont excrétés dans le *stratum corneum*. D'après Candi *et al.*, 2005 et Proksch *et al.*, 2008.



**Figure 8. Structure des céramides du *stratum corneum*.** Les céramides sont les précurseurs de tous les sphingolipides. Ils sont constitués par la liaison entre un acide gras et une base sphingoïde, la sphingosine pour les céramides ou la déhydro-sphingosine pour les déhydro-céramides. Les phyto-céramides, incorporant une base de phytosphingosine avec un groupe hydroxyle en C-4 sont également présents au niveau du SC. Comme montré dans la figure, différentes typologies de sphingosine peuvent être incorporées dans un céramide, à savoir l'oméga-hydroxyle-sphingosine (EOS), la N-nonhydroxyacyle phyto-sphingosine (NP), la N-alpha (α)-hydroxyacyle phyto-sphingosine (AP) et la N-estérifiée oméga (ω)-hydroxyacyle phyto-Sphingosine (EOP). Certaines sphingosines cutanées, la N-nonhydroxyacyle 6-hydroxy-sphingosine (NH), la N-ahydroxyacyle, 6-hydroxy-sphingosine (AH) et la N-esterifiée ω-hydroxyacyle 6-hydroxy-sphingosine (EOH), contiennent aussi l'unique base 6-hydroxy-sphingosine (6-hydroxy-sphingosine). D'autres types de céramides, tels que les céramides 10 et 11 ont été récemment décrits. Lafforgue, 2008; Masukawa *et al.*, 2008.

## I.I.4.3 Les jonctions cellulaires au sein de l'épiderme

Même si le *stratum corneum* est considéré comme la principale barrière physique de la peau, les couches inférieures jouent aussi un rôle important dans la fonction barrière de cet organe. L'adhésion et la cohésion entre les cellules, et donc leur fonction défensive, sont assurées aussi par les différentes jonctions présentes au sein de l'épiderme. Nous retrouvons 5 types principaux de jonctions (**Fig. 9**) : les jonctions adhérentes (*adherens junctions*), les jonctions communicantes (*gap junctions*), les jonctions serrées (*tight junctions*), les desmosomes et les hémidesmosomes.

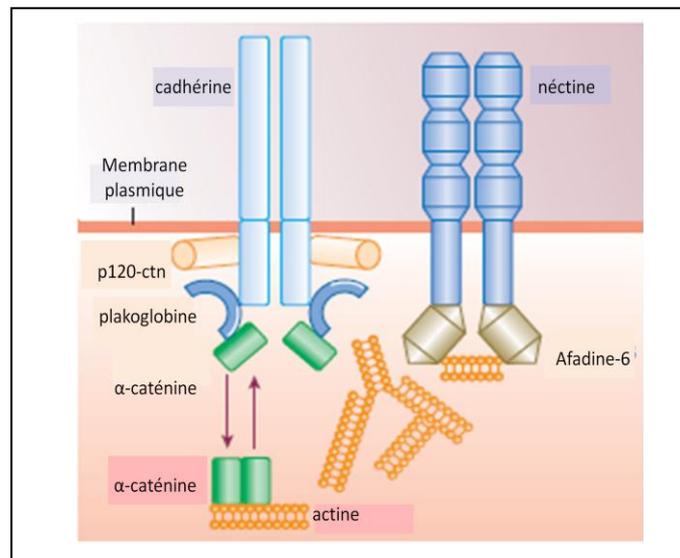


**Figure 9. Les jonctions cellulaires.** Les principales jonctions cellulaires des tissus épithéliaux sont présentées en (a) (<http://fr-fr.invitrogen.com/>). En (b), section d'intestin de souris montrant les desmosomes (DS), les jonctions adhérentes (AJ) et les jonctions serrées (TJ). Mv, microvillosités. Barre d'échelle : 200 nm. D'après Tsukita *et al.*, 2001.

### a) Les jonctions adhérentes (*adherent junctions*)

Les jonctions adhérentes sont des structures transmembranaires associées aux filaments d'actine. Elles sont caractérisées par la présence de deux membranes de 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  en épaisseur et distantes d'environ 20 nm. Elles sont composées de deux unités adhésives : le complexe nectine-afadine et le complexe cadhérine (**Fig. 10**). Plusieurs typologies de cadhérines et nectines sont présentes. Les jonctions adhérentes assurent l'adhésion entre les kératinocytes et peuvent être associées ou non à des jonctions serrées et aux desmosomes (Niessen, 2007).

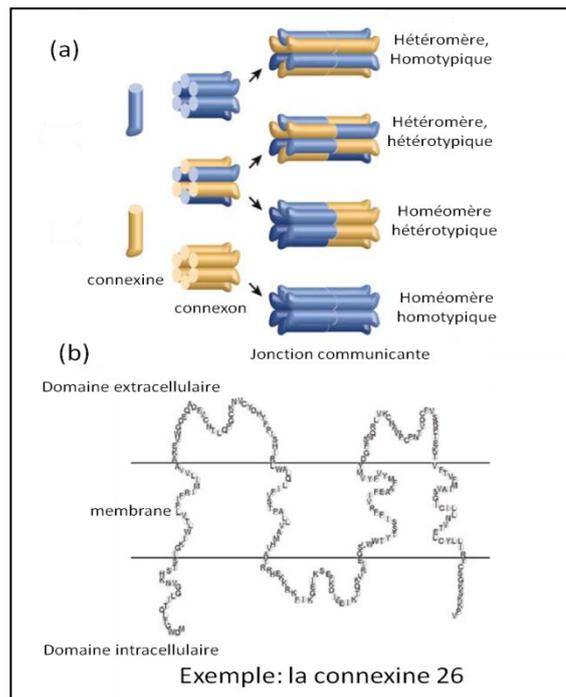
# Introduction



**Figure 10. Structure moléculaire des jonctions adhérentes.** Les néctines sont associées aux actines *via* l'afadine-6. Les cadhérines forment un complexe avec le caténine alpha, bêta (ou plakoglobine) et la protéine p120 (*120-kDa protein*). D'après Niessen, 2007.

## b) Les jonctions communicantes (*gap junctions*)

Les jonctions communicantes sont des complexes de canaux intracellulaires, les connexons, qui forment des connexions entre les cytoplasmes de deux kératinocytes adjacents. Chez l'Homme, 31 gènes codant pour des connexines ont été recensés. Les connexons sont formés par 6 monomères de connexine au niveau de l'appareil de Golgi, puis la structure entière est transportée vers la membrane plasmique. Selon la structure du gène et la présence de motifs spécifiques, les connexines sont divisées en trois groupes différents (alpha, bêta, et gamma) (Richard, 2005). Au niveau de la membrane plasmique, plusieurs connexons sont associés afin de former une jonction communicante. La nature des connexons conduit à distinguer deux types de jonctions communicantes : les jonctions communicantes homotypiques et hétérotypiques (**Fig. 11**). Leur formation et assemblage peuvent être contrôlés par des protéines kinases de type C, la concentration en calcium ou encore le pH (Kelsell *et al.*, 2001). La fonction des jonctions communicantes est de permettre l'échange d'ions et de molécules de masse moléculaire inférieure à 1000 Da (Richard, 2005), et donc d'assurer l'homéostasie et de coordonner le métabolisme de l'épiderme qui est avasculaire.



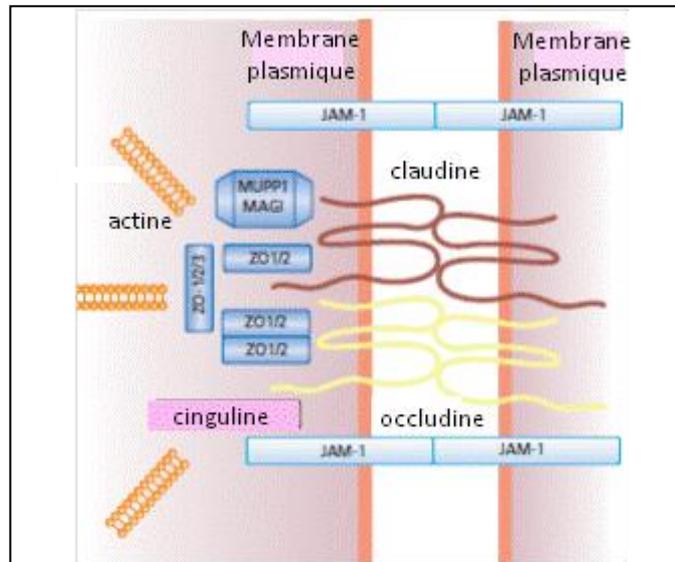
**Figure 11. Formation et structures de jonctions communicantes.** Au sein de l'appareil de Golgi, un complexe de 6 sous-unités de connexines, appelé connexon, est formé et ensuite transporté à proximité de la membrane plasmique. C'est à cet endroit que plusieurs connexons s'assemblent pour former une jonction communicante (a). Une jonction communicante est caractérisée par la présence d'un domaine extracellulaire, d'un domaine intracellulaire et d'un domaine transmembranaire. D'après Niessen, 2007.

### c) Les jonctions serrées (tight junctions)

Les jonctions serrées jouent un rôle clé dans la régulation de la perméabilité de l'épiderme (Furuse *et al.*, 2002). Elles participent au contrôle de l'équilibre hydrique de l'épiderme (Morita *et al.*, 2011). L'espace intermembranaire entre deux jonctions serrées est très souvent quasi inexistant, d'où le nom alternatif de *zonula occludens* (ZO). Ces jonctions contrôlent également le trafic paracellulaire, tout en assurant le maintien de la polarité cellulaire (Matter et Balda, 1999; Morita et Miyachi, 2003). La composante protéique majeure des jonctions serrées est la claudine, pour laquelle 24 sous-types ont été décrits. Les autres protéines spécifiques de ces jonctions sont les occludines et les JAMs (*junctional adhesion molecules*). Contrairement aux JAMs, les occludines et les claudines peuvent interagir avec d'autres protéines telles que la zona occludens-1 (ZO-1), ZO-2 et ZO-3. Ces protéines sont associées aux filaments d'actine et permettent donc une interaction avec le cytosquelette (**Fig. 12**). La localisation des protéines spécifiques des jonctions serrées varie considérablement au sein des différentes couches épidermiques. L'occludine et la cinguline sont localisées principalement au niveau de la couche granuleuse. La ZO-1, la claudine 4 et la

## Introduction

simplekine sont spécifiques des couches épineuse et granuleuse, alors que les claudines 1 et 7 sont exprimées dans tout l'épiderme (Brandner et Proksch, 2006).



**Figure 12. Structure des jonctions serrées.** Trois familles protéiques caractérisent les jonctions serrées : les JAMs, les occludines et les claudines. Ces deux dernières interagissent avec les protéines de la *zona occludens*, ZO-1 et ZO-2, ce qui assure un lien avec les filaments d'actine du cytosquelette. D'après McGrath et Uitto (2010). Abréviations: JAM, *junctional adhesion molecules*; MAG-1, *myelin associated glycoprotein*; MUPP1, *multi PDZ domain protein-1*; ZO, *zona occludens*.

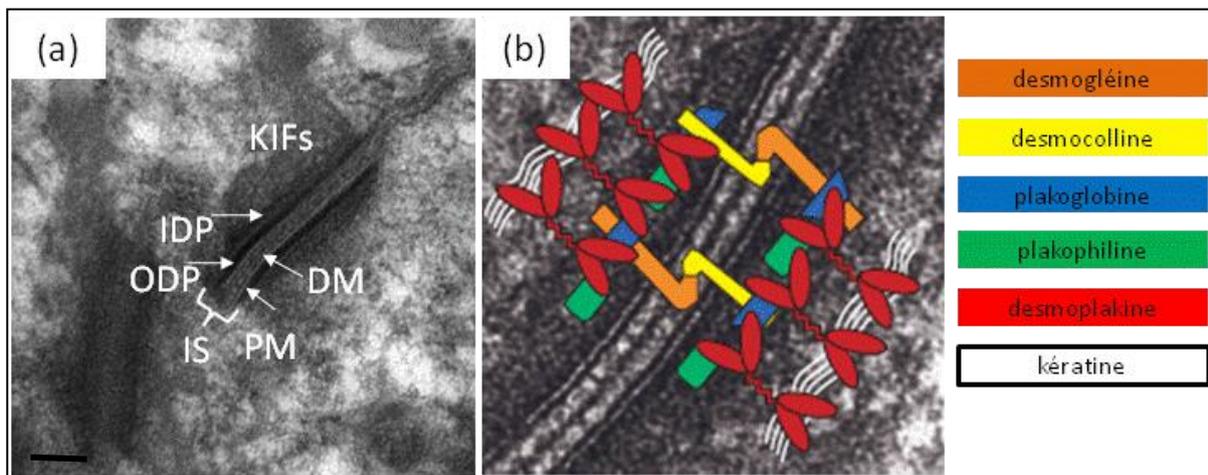
### d) Les desmosomes

Les desmosomes, visualisés pour la première fois par le docteur italien Bizzozero (1864), forment le complexe majeur d'adhésion au sein de l'épiderme, Ils sont associés aux filaments intermédiaires de kératine et assurent la connexion entre les kératinocytes. Les desmosomes garantissent une résistance mécanique à tout l'épiderme. Observés en microscopie électronique, les desmosomes ont un aspect caractéristique avec une ligne dense extracellulaire ou DM (de l'anglais *dense midline*) et deux plaques denses : l'une externe ou ODP (de l'anglais *outer dense plaque*) et l'autre interne ou IDP (*inner dense plaque*), dans le cytoplasme de deux kératinocytes adjacents (**Fig. 13a**). Trois familles de gènes, les cadhérines desmosomales, l'armadillo et la famille des plakines, codent la majorité des protéines caractérisant cette jonction (Green et Simpson, 2007). Parmi les cadhérines, protéines transmembranaires, on retrouve principalement les desmoglénines (Dsg) -1, -2, -3 et -4 et les desmocollines (Dsc)-1, -2 et -3. La Dsg-1 et la Dsc-1 sont exprimées essentiellement au niveau des couches épineuse et granuleuse alors que la Dsg-3 et la Dsc-3 sont localisées surtout au niveau de la couche basale. La portion intracellulaire de cette protéine est

## Introduction

associée aux filaments de kératine *via* la desmoplakine, la plakoglobine et d'autres molécules de la famille *armadillo*, telles que la plakophiline 1, l'envoplakine et la periplakine (North *et al.*, 1999) (**Fig. 13b**).

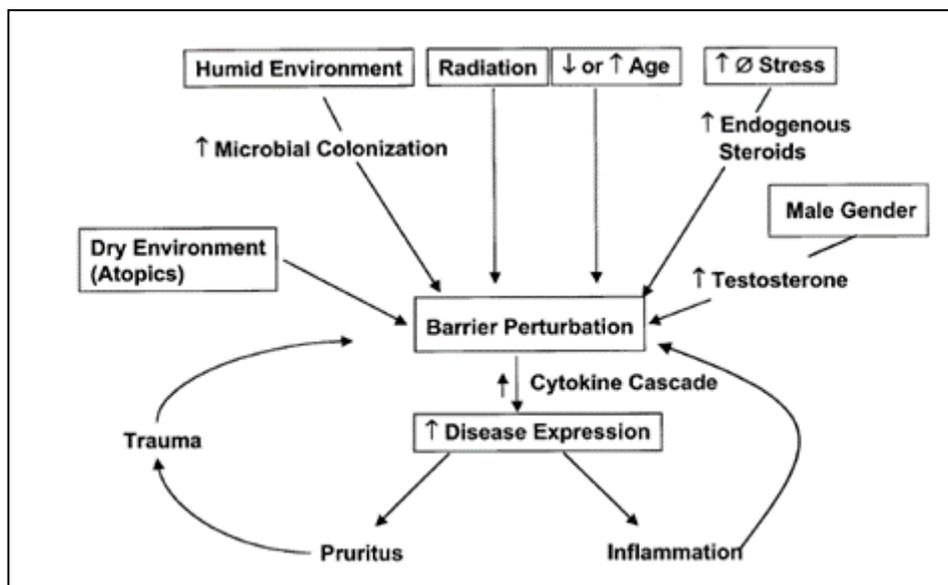
Lors de la migration vers les couches supérieures, les desmosomes subissent d'importantes modifications structurales : la plaque desmosomiale est incorporée par l'enveloppe cornée, l'espace intercellulaire se densifie et une nouvelle protéine, la cornédesmosine, est incorporée dans ce complexe. Les cornédesmosomes assurent l'adhésion de toute la couche cornée. Au niveau de la couche basale, les desmosomes, appelés hémidesmosomes sont caractérisés par la présence d'autres protéines telles que les intégrines et les laminines, et permettent l'adhésion des kératinocytes à la membrane basale.



**Figure 13. Structure et organisation moléculaire des desmosomes.** En (a), photo de microscopie électronique (Percoco *et al.*, non publié). Les différents éléments caractéristiques des jonctions desmosomiales sont clairement visibles. En (b), organisation des différents constituants moléculaires des desmosomes. D'après McGrath et Uitto, 2010. Barre d'échelle : 0,4  $\mu\text{m}$ . Abréviations : DM, *dense midline*; IDP, *internal dense plaque*; IS, *intercellular space*; KIFs, *keratin intermediate filament*; ODP, *outer dense plaque*; PM, *plasma membrane*.

## II Les propriétés « barrières » de la peau et la défense innée

La peau étant l'organe le plus superficiel de l'organisme, elle constitue la première zone d'interaction avec l'environnement. Les couches externes de la peau sont comparables à des sentinelles qui doivent être capables de reconnaître des ennemis potentiels, les combattre et envoyer des signaux aux couches plus profondes pour limiter de possibles invasions. Parmi les fonctions « barrières » de la peau, on distingue classiquement les notions de « barrière biophysique » et de « barrière biologique ». La première est assurée essentiellement par la couche cornée, alors que la seconde implique l'ensemble des assises épidermiques. La fonction de « barrière biologique » cutanée recouvre des processus biochimiques se déroulant au sein des espaces intercornéocytaires et des processus immunitaires combinant des mécanismes de défense innée et adaptative. Les facteurs pouvant influencer et perturber la physiologie naturelle de la peau sont multiples (**Fig. 14**). Dans ce manuscrit, les mécanismes de défense immune innée vis-à-vis des bactéries cutanées seront développés.



**Figure 14. Facteurs de stress cutanés.** La peau doit faire face au quotidien à une multitude de stress environnementaux biotiques, tels que l'attaque de microorganismes pathogènes, et abiotiques, tels qu'une atmosphère particulièrement sèche ou humide. D'autres facteurs liés à la physiologie humaine, tels que l'âge peuvent également altérer la fonction barrière de l'épiderme. Elias, 2005.

### II.I La flore bactérienne cutanée

Le microbiome cutané correspond à tous les agents microbiens (bactéries, champignons, virus) présents dans la peau ou à sa surface. A ce jour, la diversité des populations bactériennes est

## Introduction

---

loin d'être totalement répertoriée. Le nombre de bactéries cutanées chez un individu adulte est estimé entre  $10^2$  et  $10^7$  par  $\text{cm}^2$  (Rosebury, 1969; Fredricks, 2001). Pour décrire la flore bactérienne cutanée, les germes résidents et transitoires sont généralement différenciés. Les premiers correspondent aux bactéries viables se multipliant facilement dans l'environnement cutané. Les seconds sont définis comme des agents bactériens contaminants ayant une capacité plus restreinte à croître dans cet environnement. Un déséquilibre de la microflore cutanée, phénomène connu sur le nom de dysbiose, est très souvent associé à des pathologies cutanées. C'est le cas des peaux affectées par l'*acne vulgaris* (Chronnell *et al.*, 2001), peaux au sein desquelles une colonisation importante de *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) et *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) a été décrite, ou de la dermatite atopique, caractérisée par une forte présence de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Ong *et al.*, 2002; Maintz et Novak, 2011).

La composition de la surface cutanée est optimale pour prévenir la croissance bactérienne : la quantité d'eau et de glucides y est faible et le pH est d'environ 5.6. Au sein de la couche cornée, le pH est plus acide au niveau des couches superficielles et devient graduellement plus basique au niveau des couches cornéocytaires les plus internes (Ohman et Vahlquist, 1994). A la naissance, le pH cutané est neutre (Hardman *et al.*, 1998; Yosipovitch *et al.*, 2000) ce qui augmente les risques d'infections bactériennes et fongiques chez les nouveaux-nés (Leyden *et al.*, 1975). Inversement, un pH cutané acide chez les individus adultes diminue la possibilité de colonisation de la peau par des agents pathogènes et favorise l'adhésion de bactéries à caractère non pathogène (Aly *et al.*, 1975; Puhvel *et al.*, 1975). Par exemple, les microcoques, des bactéries de la flore cutanée, prolifèrent à un pH acide, alors que la croissance des champignons pathogènes du genre *Candida* est optimale à pH 7,5 et est inhibée à pH acide (Korting *et al.*, 1990). Les composants de la couche cornée tels que les acides aminés libres (Puhvel *et al.*, 1975), l'acide lactique produit par les glandes sébacées (Ament *et al.*, 1997), et l'acide urocanique produit par les kératinocytes *via* la dégradation de l'histidine (Krien et Kermici, 2000) contribuent à réguler le pH. Par ailleurs, dans un travail publié par Ushijima *et al.* (1984) il a été montré que la dose inhibitrice minimale (MIC, *Minimal inhibitory concentration*) d'acide acétique et d'acide propionique pour des bactéries résidentes de la peau, notamment *P. acnes* et *S. epidermidis* était de 25 mg/mL à des pH supérieurs à 5.5. Inversement, la MIC des mêmes acides diminuait sensiblement (6,25 mg/mL) à des valeurs de pH plus acides. En parallèle, *S. aureus* se montrait résistant à l'acide oléique (100  $\mu\text{g/mL}$ ) à pH 6.8, mais devenait sensible à des valeurs de pH moins élevées.

La peau est un organe assez hétérogène dans sa structure, sa composition et ses caractéristiques physico-chimiques. La microflore cutanée semble répondre à cette diversité : des

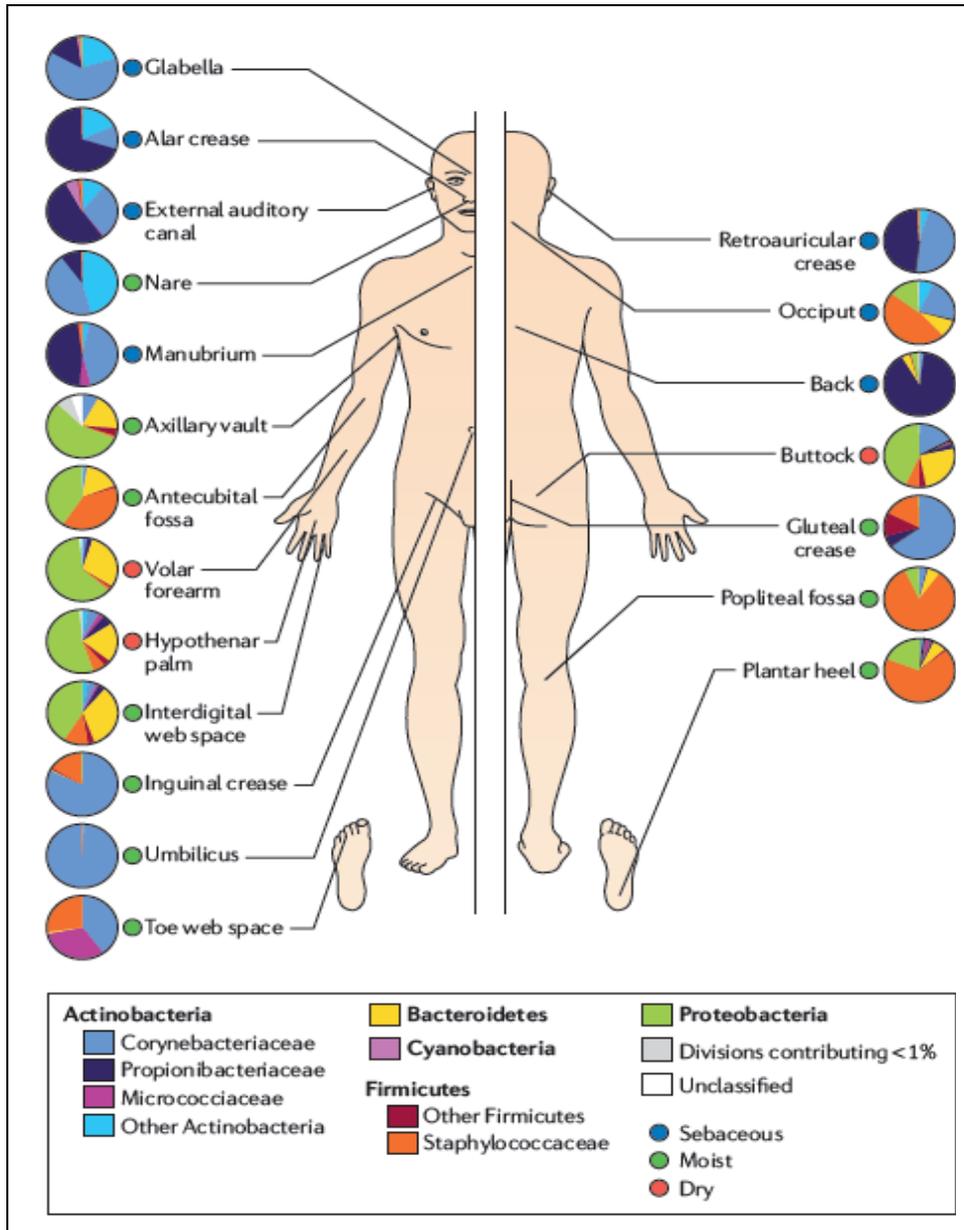
## Introduction

---

différences quantitatives et qualitatives du microbiome cutané ont été mises en évidence selon l'endroit du corps ou la région de la peau analysée (**Fig. 15**) (Costello *et al.*, 2009; Grice *et al.*, 2009). Par exemple, les glandes sébacées sont des régions relativement anaérobies, favorisant le développement de bactéries anaérobies facultatives telles que *P. acnes* (Leeming *et al.*, 1984). Les analyses du séquençage du génome de *P. acnes* ont révélé la présence de gènes codant pour des lipases, enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides du sébum (Bruggemann *et al.*, 2004). Cette dégradation génère des acides aminés libres, utilisés par la bactérie pour adhérer et ensuite coloniser les glandes sébacées (Gribbon *et al.*, 1993). Certaines régions du corps, comme les espaces entre les doigts et les aisselles, sont caractérisées par des températures plus élevées et un niveau d'humidité plus important. Ces conditions favorisent la colonisation de bactéries qui se développent en ambiances humides telles que *S. aureus*, et les bacilles à Gram négatif (Gram -) (Roth et James, 1988). Inversement, dans d'autres zones plus sèches telles que les bras et les jambes, la population bactérienne est quantitativement moins importante (Roth et James, 1988).

D'autres facteurs, tels que l'âge (Somerville, 1969; Leyden *et al.*, 1975; Capone *et al.*, 2011), le sexe (Marples, 1982), le niveau d'hygiène, ou encore des facteurs environnementaux comme la température ou l'humidité (McBride *et al.*, 1977) peuvent affecter la composition bactérienne de la peau. Des modifications génétiques affectant des protéines structurales comme la filaggrine (Cai *et al.*, 2012) peuvent aussi avoir une incidence sur la microflore cutanée. Enfin, des différences interpersonnelles ont été également documentées (Grice *et al.*, 2009).

Le projet de recensement du microbiome humain ou HMP (*Human Microbiome Project*) qui a débuté en 2007 (Turnbaugh *et al.*, 2007), développe de nouvelles approches génomiques d'identification bactérienne notamment basées sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S. Compte tenu du fait que la plupart des microorganismes isolés de la peau sont viables, mais que seuls 1% d'entre eux sont cultivables (Staley et Konopka, 1985), les méthodologies classiques de cultures bactériennes, conduisent à une mauvaise estimation quantitative et qualitative de la population bactérienne cutanée. Ce projet pourrait à terme redéfinir la composition du microbiome humain dans certaines zones du corps, y compris les zones les plus humides ou les plus sèches de la peau. Ainsi, Grice *et al.* (2008) et Kong (2011), en s'appuyant sur ces nouvelles techniques moléculaires d'identification, révèlent que le *phylum* des *Proteobacteria* est le plus représenté avec les genres *Pseudomonas* et *Janthinobacterium*. Les *phylum* des *Actinobacteria*, des *Firmicutes*, des *Bacteroidetes* et des *Cyanobacteria* ont été également identifiés. Seulement 5% des séquences d'ARNr de la sous-unité 16S se sont montrés être spécifiques des souches *S. epidermidis* et *P. acnes*, remettant en cause la vision classique de la flore bactérienne cutanée (Roth et James, 1988).



**Figure 15. Distribution bactérienne en lien avec le site d'échantillonnage.** La composition quantitative et qualitative du microbiome cutané est fortement associée aux caractéristiques des différents sites du corps humain. Les différentes familles bactériennes sont indiquées. Grice *et al.*, 2009.

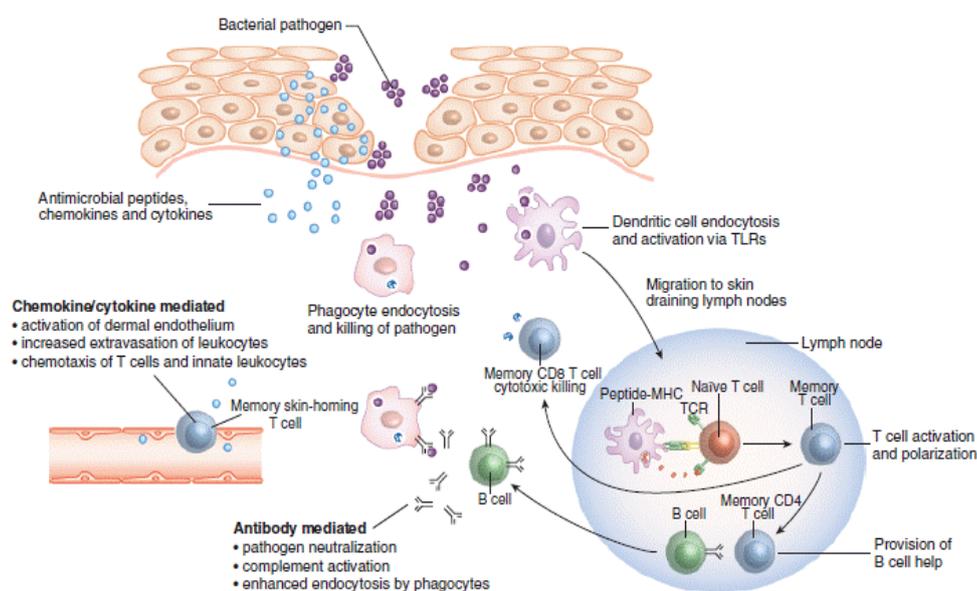
## II.II L'immunité cutanée innée

Les bactéries de la flore cutanée peuvent influencer la physiologie de la peau, en modulant la réponse immunitaire cutanée. La défense immunitaire chez les vertébrés renferme deux composantes : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. Ces deux

# Introduction

systèmes ont longtemps été considérés individuellement comme deux entités séparées. Aujourd'hui, il est reconnu que les défenses innée et adaptative, agissent de manière syneRG-Ique afin de combattre avec succès une infection ou une blessure (**Fig. 16**). Le système inné est caractérisé par une réponse rapide capable de reconnaître des molécules associées aux agents microbiens, viraux ou fongiques nommés PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Ces PAMPs sont reconnus par des récepteurs PRRs (*Pathogen Recognizing Receptors*) cytoplasmiques ou membranaires. Ces mêmes mécanismes de défense ont été décrits chez les plantes (Nishimura et Dangl, 2010) et les invertébrés (Iwanaga et Lee, 2005). L'immunité adaptative, spécifique des vertébrés, est caractérisée par une réponse plus lente mais aussi par deux particularités essentielles : la spécificité de reconnaissance et la mémoire.

Bien que différents, ces deux systèmes collaborent étroitement. En réponse à une invasion bactérienne, l'interaction entre les PRRs et les PAMPs conduit à la production de peptides antimicrobiens (PAMs) et de médiateurs de l'inflammation, les cytokines. Les PAMs, en plus de leur action antibactérienne directe, ont des propriétés chimiotactiques vis-à-vis des autres éléments de l'immunité innée, notamment les cellules dendritiques ou les phagocytes, mais aussi vis-à-vis des cellules T (Yang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002).



**Figure 16. Interaction entre les immunités innée et adaptative en réponse à une infection bactérienne de la peau.** Lors d'une infection bactérienne, les kératinocytes produisent des PAMPs, des chimiokines et des cytokines. Suite à cet évènement, le tissu endothélial est activé, avec une migration des cellules T et des leucocytes dans la peau. Ces facteurs peuvent aussi activer les phagocytes ou stimuler la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques pour la présentation de l'antigène exogène. Au niveau des ganglions lymphatiques, les cellules T mémoire sont activées et peuvent se différencier en cellules T cytotoxiques CD8 qui migrent sur le site de l'inflammation. Elles peuvent aussi

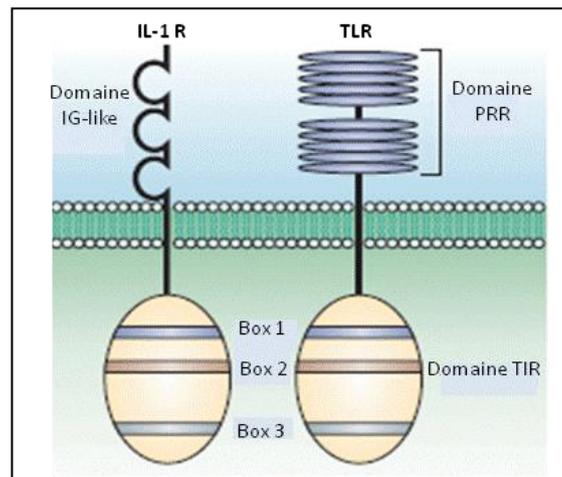
se différencier en cellules T helper CD4 responsables de l'activation des cellules B, en induisant la production d'anticorps. Clark et Kupper, 2005.

## II.II.1 Signalisation *via* les récepteurs toll-like

### II.II.1.2 Structure des TLRs et diversité de leurs ligands

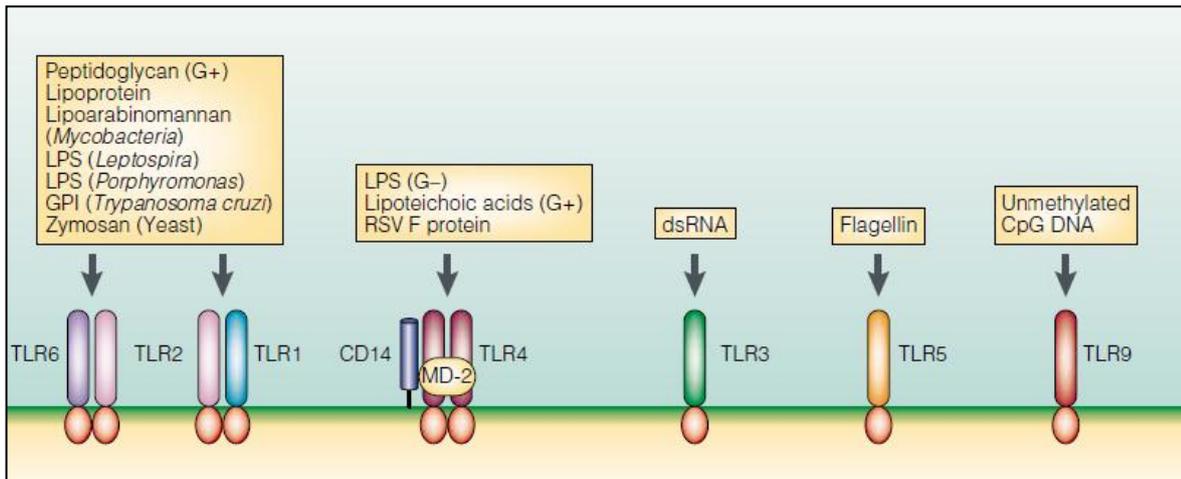
Les récepteurs toll-like (TLRs) sont des glycoprotéines transmembranaires avec une fonction essentielle dans l'immunité innée. Ils sont impliqués dans la reconnaissance de molécules issues des microorganismes (virus, bactéries et champignons), dénommées PAMPs et capables d'activer et de moduler le système de défense associé à l'immunité innée et à la réponse inflammatoire. Les récepteurs toll-like font partie de la famille des récepteurs de type I et sont caractérisés par un domaine extracellulaire riche en leucine LRR (*leucine-rich repeat*) et un domaine intracellulaire Toll/Interleukine 1 (IL-1) ou domaine TIR (Hashimoto *et al.*, 1988; Medzhitov *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998) (**Fig. 17**). Le domaine extracellulaire contient de 19 à 25 copies du domaine LRR. Chaque copie est constituée d'une séquence de 24 à 29 acides aminés enrichie en leucine : L(X<sub>2</sub>)LXL(X<sub>2</sub>)NXL(X<sub>2</sub>)L(X<sub>7</sub>)L(X<sub>2</sub>) où X représente un acide aminé quelconque (Bell *et al.*, 2003). Chez les TLRs, la séquence LRR est séparée de la région transmembranaire par le domaine carboxy-terminal LRR, caractérisé par le motif : CXC(X<sub>23</sub>)C(X<sub>17</sub>)C. Le domaine TIR est un site d'interaction protéine-protéine hautement conservé chez les récepteurs TLR, mais également chez le récepteur pour l'IL-1 (IL-1R). Il est décrit chez les plantes aussi bien que chez les animaux, où il assure un rôle clé dans la défense immunitaire. Ce domaine, d'environ 200 acides aminés, contient trois sous-régions très conservées et directement impliquées dans la transduction du signal (Slack *et al.*, 2000).

## Introduction



**Figure 17. Structure des récepteurs TLRs.** Les récepteurs TLRs et le récepteur IL1-R possèdent un domaine cytoplasmique Toll/IL-1 R (TIR) très conservé. Le domaine TIR est caractérisé par trois régions homologues hautement conservées, nommées Box 1, 2 et 3. Inversement, la région extracellulaire de ces deux types de récepteurs est différente : les TLRs sont caractérisés par une région LRR enrichie en leucine, alors que le IL-1R possède trois régions immunoglobuline-like. D'après Akira et Takeda, 2004.

A ce jour, une dizaine de TLRs a été identifiée et caractérisée chez l'Homme. Chaque TLR reconnaît un PAMP spécifique, et de nombreux PAMPs reconnus par ces différents TLRs ont été caractérisés (**Fig. 18**). Par exemple le TLR2 reconnaît le peptidoglycane (PGN) (Schwandner *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 1999), l'acide lipoteichoïque (Schwandner *et al.*, 1999), le zymosane (Underhill *et al.*, 1999) et le lipopolysaccharide (LPS) de différentes bactéries (Girard *et al.*, 2003; Hirschfeld *et al.*, 2001; Werts *et al.*, 2001). Les protéines TLR1 et TLR6 sont des partenaires du TLR2. Les hétérodimères TLR1/TLR2 et TLR2/TLR6 reconnaissent respectivement le lipopeptide di- et tri-acétylé (Brightbill *et al.*, 1999; Hirschfeld *et al.*, 1999; Lien *et al.*, 1999). Le récepteur TLR3 reconnaît les séquences double-brin d'ARN (dsRNA) d'origine virale (Alexopoulou *et al.*, 2001). Récemment il a été montré que le TLR3 est aussi capable de reconnaître l'ARN des cellules cutanées endommagées suite à une blessure, en activant l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Lai *et al.*, 2009). Le TLR4 reconnaît, en s'associant avec le corécepteur CD14 (*cluster of differentiation* 14), l'endotoxine des bactéries à Gram - (Takeuchi *et al.*, 1999), le LPS (Hoshino *et al.*, 1999; Lien *et al.*, 2000) et le domaine A de la fibronectine (Okamura *et al.*, 2001), alors que le TLR5 reconnaît la flagelline (Hayashi *et al.*, 2001). Les TLR 7 et 8 sont spécifiques des séquences d'ARN double brin d'origine virale (Heil *et al.*, 2004). Le TLR9 reconnaît les régions hypométhylées du motif cytosine-phosphate-guanine (CpG) de l'ADN viral et bactérien (Hemmi *et al.*, 2000). Il reste à élucider la nature du ligand pour le TLR10.



**Figure 18. Les ligands des TLRs.** Les TLRs reconnaissent différents PAMPs. La reconnaissance du LPS par le TLR4 requiert la coopération de deux protéines « accessoires », la CD14 et la MD-2 (*Myeloid differentiation-2*). Les TLR2 reconnaissent plusieurs ligands d'origines diverses en combinaison ou non avec le TLR1 et le TLR6. Le TLR3 est spécifique des séquences double-brin d'origine virale alors que le TLR5 reconnaît la flagelline, la principale protéine du flagelle des microorganismes. Les TLR9 reconnaissent des régions spécifiques de l'ADN bactérien et viral. D'après Medzhitov, 2001.

## II.II.1.2 Les voies de signalisation des TLRs

L'activation de la transduction du signal lié aux TLRs induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la défense immunitaire innée, notamment les gènes codant pour les interleukines pro-inflammatoires et les peptides antimicrobiens. Les voies de signalisation activées par les TLRs peuvent être divisées en deux groupes : une *voie de signalisation « générale »* ou **MyD88** (*Myeloid differentiation primary response gene D88*)-*dépendante* et une *voie de signalisation « spécifique »* ou **MyD88-indépendante** (Fig. 19). La voie de signalisation « générale » peut être déclenchée par tous les TLRs, et également par le récepteur IL-1R, alors que la voie de signalisation « spécifique » ne caractérise que quelques TLRs.

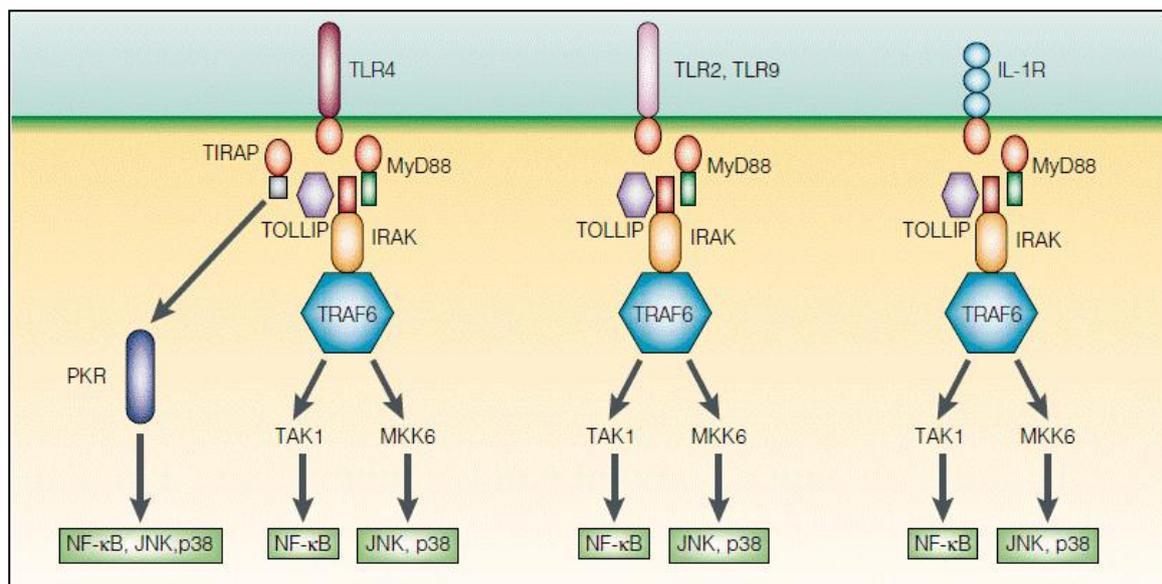
**La voie de signalisation générale** est déterminée par quatre composantes essentielles : les protéines adaptatrices MyD88 (Wesche *et al.*, 1997; Medzhitov *et al.*, 1998) et la protéine TOLLIP (*Toll-interacting protein*) (Burns *et al.*, 2000), la protéine kinase IRAK (IL1R-associated protein) (Cao *et al.*, 1996a) et une autre protéine adaptatrice TRAF6 (*TFN receptor-associated factor 6*) (Cao *et al.*, 1996b). La protéine MyD88 contient deux domaines d'interaction, dont le domaine carboxy-terminal TIR capable de s'associer au domaine TIR des récepteurs TLRs et du récepteur IL-1R, alors que l'autre domaine d'interaction recrute la protéine IRAK (Wesche *et al.*, 1997). La protéine TOLLIP peut, de la même manière, s'associer aux domaines TIR et IRAK (Burns *et al.*, 2000). En s'associant à ce complexe, la protéine IRAK subit une autophosphorylation et interagit

## Introduction

alors avec la protéine TRAF6 (Cao *et al.*, 1996b). Une fois phosphorylée, TRAF6 active TAK1 (*Transforming growth factor-beta-activated kinase 1*) et MKK6 (MAP-kinase 6), protéines capables d'activer les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), JNK (*c-jun N-terminal kinase*) et la MAP (mitogen activated proteins) kinase p38 (Wang *et al.*, 2001).

**La voie de signalisation spécifique** (MyD88-indépendante) ne concerne que les récepteurs TLR3 et TLR4. Cette voie de signalisation, capable d'induire également la maturation des cellules dendritiques ou DCs (*dendritic cells*) (Kaisho *et al.*, 2001), utilise d'autres protéines adaptatrices, comme la protéine TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adapter *protein*) ou la protéine MAL (*MyD88 adaptor-like*) (Fitzgerald *et al.*, 2001; Horng *et al.*, 2001). TIRAP est caractérisée par la présence d'un domaine TIR et d'un domaine riche en sérine et proline à l'extrémité carboxy-terminale. TIRAP peut s'associer au domaine TIR des récepteurs TLR3 et TLR4, et ensuite activer la protéine kinase R (PKR) avec induction de l'expression génique *via* les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, JNK et la kinase MAP p38.

Les TLRs constituent une interface entre l'immunité innée et adaptative. Ainsi, l'activation des TLRs des DCs peut induire la production de l'IL-18, cytokine qui favorise la maturation des cellules T helper 1 (Th-1) appartenant à l'immunité adaptative (Humann et Lenz, 2010; Lousberg *et al.*, 2011).



**Figure 19. Voies de signalisation des TLRs.** Les récepteurs de la famille toll-like et le récepteur IL-1R ont en commun différentes molécules impliquées dans la transduction du signal : la protéine adaptatrice MyD88, la protéine TOLLIP, la protéine kinase IRAK et TRAF6. TRAF6 peut activer les facteurs nucléaires de transcription NF- $\kappa$ B, JNK et p 38 *via*

MKK6 et TAK1. Le récepteur TLR4 possède une autre protéine adaptatrice, la TIRAP, qui active la voie de signalisation MyD88-indépendante. Medzhitov, 2001.

### II.II.1.3 Expression des TLRs dans les kératinocytes

De nombreuses études ont montré que les kératinocytes expriment les TLRs de 1 à 6 et 9 (Kawai *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002; Mempel *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2003; Curry *et al.*, 2003; Pivarcsi *et al.*, 2003; Kawai, 2003; Lebre *et al.*, 2003; Pivarcsi *et al.*, 2004; Kollisch *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Lebre *et al.*, 2007.) et que ces récepteurs sont directement impliqués dans la réponse immunitaire. Par exemple, Mempel *et al.*, (2003) ont montré que l'exposition des kératinocytes à *S. aureus* donnait lieu à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B *via* le TLR2, avec induction de l'expression des gènes codant pour le précurseur de l'IL8 et pour l'enzyme oxyde nitrique synthase (iNOS). D'autres études ont montré que les récepteurs TLR2, TLR3, TLR4 et TLR5 des kératinocytes peuvent être activés par des ligands spécifiques à chacun d'eux (Kawai *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002; Pivarcsi *et al.*, 2003; Lebre *et al.*, 2003; Kollisch *et al.*, 2005). Miller *et al.*, (2005) révèlent que le TLR5 est exprimé principalement au niveau des kératinocytes de la couche basale, alors que le TLR9 est exprimé au niveau des couches les plus superficielles. Récemment, Lebre *et al.*, 2007 ont montré que les kératinocytes pouvaient exprimer les TLRs de 1 à 6, 9 et 10 et que leur activation conduisait à des voies de signalisation distinctes. Par exemple, l'activation des TLR3, 4, 5 et 9 induit respectivement l'expression des gènes codant le TNF-alpha, l'IL-8, la chemokine ligand 2 (CCL2) et la protéine CCL20. Seule l'activation des TLR3 et 5 entraîne une augmentation de l'expression du gène *CCL27*, qui favorise le recrutement au niveau du site d'inflammation des cellules T mémoire. De plus, l'activation du TLR2 dans les kératinocytes induit l'expression des gènes codant pour la bêta-défensine 2 (hBD2) et la bêta-défensine 3 (hBD3) (Kumar *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2010) et favorise le renforcement des jonctions serrées (Yuki *et al.*, 2011). D'autres cellules cutanées, telles que les cellules de Langherans (Renn *et al.*, 2006), les mastocytes (Kulka et Metcalfe, 2006), les fibroblastes (Proost *et al.*, 2003; Proost *et al.*, 2004) ou encore les DCs (Schnare *et al.*, 2001) peuvent exprimer des TLRs.

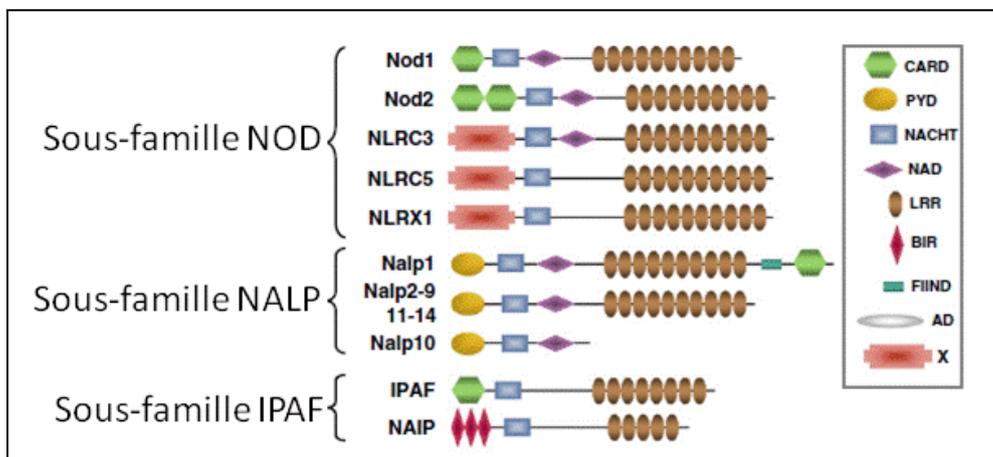
### II.II.2 Signalisation *via* les récepteurs NOD-like (NLRs)

Les récepteurs NOD (*nucleotide oligomerizaion domain*)-like (NLRs) sont une famille de récepteurs intracellulaires, jouant un rôle dans l'immunité innée et l'inflammation (Fritz *et al.*, 2006; Franchi *et al.*, 2009). Ces protéines ont été identifiées grâce à leur forte homologie avec les protéines R d'origine végétale, protéines impliquées dans la résistance contre des phytopathogènes. Comme les protéines R, les récepteurs NLR sont caractérisés par un domaine central, nommé NBS

## Introduction

(*nucleotide binding site*) capable de s'associer aux nucléotides et par d'autres domaines dont une région carboxy-terminale riche en leucine (**Fig. 20**). Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance du PGN (Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003; Sabbah *et al.*, 2009) et de la flagelline (Miao *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006; Sutterwala *et al.*, 2007). L'interaction entre les PAMPs et les récepteurs NLRs déclenche une voie de signalisation impliquant plusieurs protéines, telles que la protéine NEMO (NF-kappa-B essential modulator) et la Sérine/Thréonine kinase, ce qui aboutit à la translocation dans le noyau du facteur de transcription NFk-B et à la modulation de l'expression génique (Franchi *et al.*, 2009). L'activation de Nod2 par exemple, un récepteur appartenant à la sous-famille des récepteurs NOD, se traduit par une augmentation de l'expression du gène *hBD2* (Voss *et al.*, 2006).

De plus, il a été montré que l'activation du récepteur Nod1 favorise le clivage de la pro-IL1 vers sa forme active *via* l'action de la caspase-1 (Yoo *et al.*, 2003).

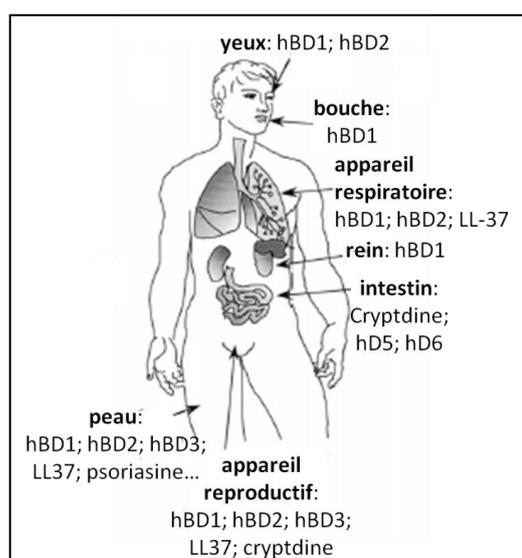


**Figure 20. Famille des récepteurs Nod-like.** Représentation schématique, avec les différents domaines, de la structure des récepteurs appartenant à la famille des NLRs. Abréviations : AD, *activation domain*; BIR, *baculoviral inhibitory repeat*; CARD, *caspase recruitment domain*; IPAF, *Apaf-1-related protein*; LRR, *leucine rich repeat*; NALPC, *nuclear oligomerization domain proteins subfamily C*; NAD, *NACHT-associated domain*; NLRX, *nuclear oligomerization domain proteins subfamily X*; NALP, *NACHT-LRR and pyrin domain containing Proteins*; PYR, *pyrin domain*. D'après Benko *et al.*, 2008.

## II.II.3 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des acteurs essentiels du système immunitaire inné. La plupart des PAMs sont des peptides de petite taille chez l'Homme, de nature cationique et amphipathique. Ils ont un large spectre d'action contre les bactéries, virus et champignons. Le premier PAM à avoir été caractérisé est la magainine en 1987, isolée à partir de la peau de grenouille *Xenopus laevis* par Micheal Zasloff. Aujourd'hui, de nombreux peptides ont été étudiés et décrits chez les plantes (Stotz *et al.*, 2009, Padovan *et al.*, 2010), tels que les PAM MJ1 (*Mirabilis jalapa*) et MJ2 (Cammue *et al.*, 1992), chez les insectes (Otvos, 2000; Bulet et Stöcklin, 2005) et chez les mammifères, comme par exemple l'indolicine chez les bovins (Selsted *et al.*, 1992), la PR-9 chez le porc (Boman *et al.*, 1993) ou encore la bacténécine chez la chèvre et le mouton (Shamova *et al.*, 1999). A l'heure actuelle, environ 1200 gènes codant pour des PAMs de différentes origines ont été identifiés et répertoriés dans des bases de données comme « The antimicrobial peptides database » (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) ou « CAMP » (<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial>).

Chez l'homme, les peptides antimicrobiens sont exprimés au niveau de différents tissus épithéliaux. Ceux-ci incluent l'appareil respiratoire et digestif, la cavité orale, les yeux, les tubes de Malpighi, l'appareil reproductif et la peau (Leher et Ganz, 1999; Bals, 2000; Tzou *et al.*, 2000; Selsted et Ouellette, 2005) (**Fig. 21**).



**Figure 21. Expression tissu-spécifique des PAMs chez l'Homme.** Les PAMs sont exprimés dans plusieurs tissus épithéliaux, notamment la peau, l'appareil respiratoire et reproductif, ou encore les yeux et la cavité orale. D'après Tzou *et al.*, 2000.

## Introduction

La peau étant un tissu exposé au quotidien à une multitude de stress environnementaux, elle est un des sites principaux de production de peptides antimicrobiens. Le premier peptide cutané à activité antimicrobienne identifié chez l'Homme est le lysozyme (Klenha et Krs, 1967). Depuis, de nombreux peptides ont été isolés, identifiés et caractérisés au sein de la peau (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Les PAMs présents dans la peau humaine. D'après Wiesner et Vilcinskas (2010).

Peptide	Type cellulaire	Organisme cible	Commentaire
Dermicidine	glandes sudoripares	Large spectre d'action	-exprimé de manière constitutive
Psoriasine (S100A7)	Kératinocytes, sébocytes	<i>Escherichia coli</i>	-PAM le plus abondant des peaux saines - Induit par la flagelline
RNase7	kératinocytes	Large spectre d'action	-activité antimicrobienne indépendante de l'activité RNase
RNase 5	kératynocytes	<i>C. albicans</i>	-rôle aussi dans la formation de vaisseaux sanguins
Cathélicidine (LL37)	Kératinocytes, sébocytes	Gram +; Gram -	-PAM induit par blessure/inflammation -rôle aussi dans la cicatrisation
hBD1	Kératinocytes, sébocytes	Gram -	-PAM exprimé de manière constitutive
hBD2	Kératinocytes, sébocytes	Gram -	-PAM induit par blessure/inflammation
hBD3	Kératinocytes	Large spectre d'activité	-PAM induit par blessure/inflammation
hBD4	Kératinocytes	Gram +; Gram -	-induction <i>in-vitro</i> -rôle <i>in-vivo</i> inconnu

## Introduction

---

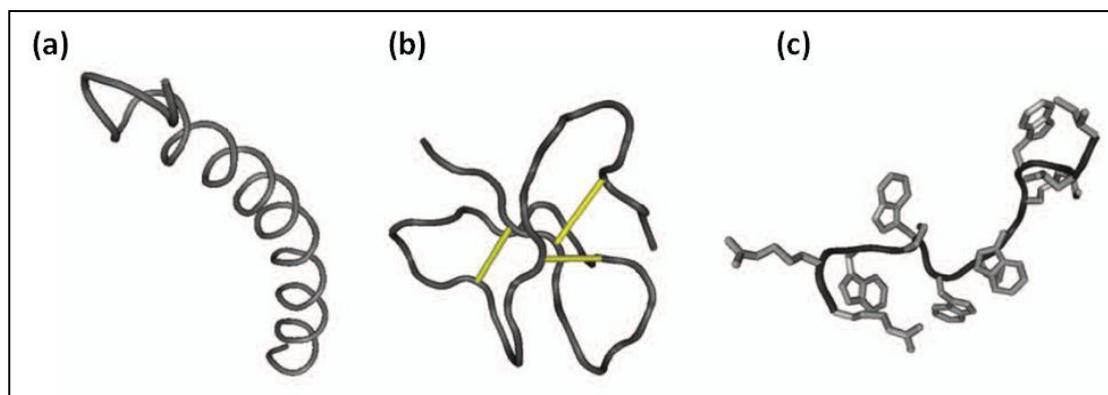
Peptide	Type cellulaire	Organisme cible	Commentaire
SLPI	Kératinocytes	Large spectre d'activité	-rôle dans la cicatrisation -PAM induit par inflammation
Lysozyme	Kératinocytes, sébocytes, cellules du bulbe aérien	Gram+	-dégradation de la paroi bactérienne par son activité muramidase
Élafine	Kératinocytes	Large spectre d'activité	-PAM induit par inflammation
adrénomédulline	Kératinocytes, sébocytes, glandes sudoripares	<i>E. coli</i> <i>P. acnes</i>	-PAM exprimé par les kératinocytes, les glandes sébacées et les glandes sudoripares
Substance P	Kératinocytes	<i>E. coli</i>	- neurotransmetteur
CCL20	Kératinocytes	Large spectre d'activité	- appartient au groupe des kinocidines

(suite **Tableau 2**)

### II.II.3.1 Les différents types de PAMs

#### a) Généralités

Sur la base de leur structure et de leur séquence en acides aminés, les PAMs ont été regroupés en 3 familles (Bulet *et al.*, 2004) (**Fig. 22**) : les *PAMs linéaires* structurés en hélice amphipatique; les *PAMs cycliques* à un ou plusieurs ponts disulfures; les *PAMs enrichis en certains acides aminés particuliers*.



**Figure 22. Structure des trois familles de PAMs.** A gauche, en (a), structure de l'hélice alpha cathélicidine. Au milieu, en (b), structure de la bêta défensine 2 humaine, stabilisée par la présence de 3 ponts disulfures (en jaune). A droite, en (c) structure de l'indocine, peptide antimicrobien riche en tryptophane, isolé à partir du bovin. Wiesner et Vilcinskis, 2010.

La famille des *PAMs linéaires* inclut des molécules de diverses origines, isolées à partir d'un groupe d'organismes variés. Cette famille est retrouvée chez les invertébrés et les vertébrés, comme la cathélicidine chez l'Homme ou la magainine chez *Xenopus leavis*. Ils ont un spectre d'action très large contre les bactéries à Gram -, les bactéries à Gram + et les champignons. Ils ont une séquence de 30 à 40 acides aminés, riche en lysine. Ils sont très amphiphiles et nettement chargés positivement.

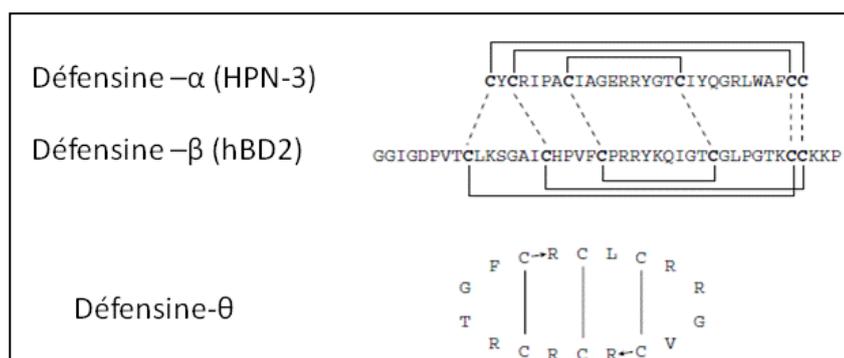
Les *PAMs cycliques* contiennent entre 2 et 8 résidus de cystéine capables de former des ponts disulfures. Selon le nombre de résidus de cystéine, ils peuvent adopter différentes structures, notamment en feuillets anti-parallèles, en épingle à cheveux, en structure mixte avec à la fois des hélices et des feuillets, ou totalement cycliques. Chez les mammifères ils ont une séquence de 10 à 40 acides aminés. Chez l'Homme, les membres appartenant à cette famille les plus représentés sont les défensines.

## Introduction

*Les PAMs comportant une séquence enrichie en certains acides aminés*, sont appelés « *extended-peptides* » (Hancock et Diamond, 2000; Lai et Gallo, 2009). L'indolicine, enrichie en tryptophane, l'histatine enrichie en histidine ou encore la diptéricine enrichie en glycine en sont des représentants.

### b) Les défensines

Les défensines constituent la famille de peptides antimicrobiens la plus représentée chez les mammifères. Ces sont des peptides cationiques de 24 à 44 acides aminés et de 3-4 kDa de masse moléculaire. Les membres de cette famille contiennent de 6 à 8 résidus de cystéine qui facilitent la formation de ponts disulfures. Sur la base de leur structure et de la configuration des ponts disulfures trois sous-groupes ont été identifiés (**Fig. 23**) : les *alpha-défensines*, les *bêta-défensines* et le *thêta-défensines*. Les défensines sont exprimées de manière ubiquitaire chez les mammifères, notamment dans l'appareil gastro-intestinal, l'appareil reproductif et respiratoire. Au niveau de la peau, seules les bêta-défensines sont exprimées.



**Figure 23. Séquence protéique et conformation des ponts disulfures des défensines.** Chez les alpha-défensines les six résidus de cystéine sont liés en 1-6, 2-4 et 3-5 (Selsted et Harwing, 1989). Inversement, les bêta-défensines sont liées en 1-5, 2-4 et 3-6 (Tang et Selsted, 1993). Les résidus de cystéine 5 et 6 sont adjacents chez les alpha- et bêta-défensines rendant ces différentes liaisons non essentielles pour la structure générale du peptide (Zimmermann *et al.*, 1995). La structure des thêta-défensines est circulaire, sans extrémités N- ou C-terminales libres. D'après Ganz, 2001.

Les *alpha-défensines* sont des peptides de 29 à 35 acides aminés comportant 3 ponts disulfures entre les cystéines en position 1-6, 2-4 et 3-5. Chez l'Homme, la première alpha-défensine a été identifiée en 1988 à partir des neutrophiles (Ganz *et al.*, 1985). Depuis six alpha-défensines ont été identifiées : les HNP (*human neutrophil peptide*) -1, -2, -3 et -4 sont exprimés au niveau des granulocytes de neutrophiles (Ganz *et al.*, 1985). Les deux autres alpha-défensines, la 5 et 6, sont exprimées principalement au niveau de cellules de Paneth de l'intestin et au niveau de l'appareil urogénital féminin (Quayle *et al.*, 1998). Il a été montré que les HPN-1, -2 et -3 induisent

## Introduction

---

l'expression du facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF-alpha) et de l'IL-1 chez les monocytes activés par *S. aureus*. Ils ont aussi une activité antivirale, notamment contre les adénovirus (Bastian et Shafer, 2001).

La famille de **thêta-défensines** a été récemment identifiée chez le singe (Tang *et al.*, 1999). Chez l'Homme, 6 pseudogènes codant pour des thêta-défensines ont été retrouvés. L'expression de ces gènes est supprimée par la présence d'un codon stop dans la portion du peptide signal (Nguyen *et al.*, 2003).

Les **bêta-défensines** appartiennent à une famille de peptides de 36 à 46 acides aminés comprenant 3 ponts disulfures en position 1-5, 2-4 et 3-6. Chez l'Homme, quatre bêta-défensines, les hBD (*human beta defensin*) -1, -2, -3 et -4, ont été identifiées et caractérisées. Elles sont exprimées dans de nombreux tissus, dont la peau.

La **bêta-défensine 1** est le premier membre de cette famille à avoir été isolé, à partir de filtrat de sang humain (Bensch *et al.*, 1995). Successivement, dans un article publié par Zhao *et al.* (1996), il a été montré que la hBD1 est exprimée au niveau de nombreuses glandes sécrétoires et de tissus épithéliaux. Ali *et al.* (2001), en utilisant des biopsies cutanées d'origines diverses, à savoir l'abdomen, les seins, la zone faciale et plantaire, montrent que la hBD1 est exprimée au sein des différentes couches épidermiques avec une spécificité et une intensité liée à la nature de l'explant. De plus, à l'échelle cellulaire la hBD1 semble avoir une localisation nucléaire (Poindexter *et al.*, 2006; Bick *et al.*, 2007). Malgré une expression constitutive, l'expression du gène codant pour la hBD1 n'est pas augmentée par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1-bêta, le TNF-alpha et l'Interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ni par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Harder *et al.*, 2004). Par contre, dans un article publié par Sørensen *et al.* en 2005 il a été décrit que le niveau d'expression du gène codant la hBD1 est augmenté dans des kératinocytes en culture après traitement avec des monocytes activés par le LPS. Très peu d'études ont porté sur le spectre d'action de la hBD1. A des concentrations micromolaires (0.3 à 10  $\mu$ M), elle a une activité antibactérienne vis-à-vis d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Valore *et al.*, 1998). Enfin, la réduction des ponts disulfures semble être nécessaire pour l'activité antimicrobienne du peptide (Schröder *et al.*, 2011).

La **bêta-défensine 2** est un peptide de 43 acides aminés, isolé pour la première fois à partir d'un échantillon de peau présentant la pathologie du psoriasis (Harder *et al.*, 1997). Cependant, son expression dans des peaux saines est très faible. Dans un article publié par Ali *et al.* (2001), il a été montré que l'expression du gène codant la hBD2 était liée à la nature de l'explant utilisé. Une fois synthétisé, le peptide est stocké dans les corps lamellaires et puis libéré au niveau des espaces intercellulaires de la couche cornée (Oren *et al.*, 2003). Le TNF-alpha et l'interleukine-1 bêta sont

## Introduction

---

capables d'induire l'expression du gène codant pour la hBD2 dans des kératinocytes en culture (Harder *et al.*, 2004).

D'autres facteurs, tels que le degré de différenciation des kératinocytes et donc la concentration de calcium intracellulaire (Liu *et al.*, 2002; Pernet *et al.*, 2003; Wanke *et al.*, 2011), des chocs mécaniques comme une blessure (Sørensen *et al.*, 2003; Harder *et al.*, 2010) ou encore l'exposition à des PAMPs (Chadebech *et al.*, 2003; Sørensen *et al.*, 2005) peuvent également moduler l'expression du gène *hBD2*.

La **bêta-défensine 3** a été isolée pour la première fois par Harder *et al.*, 2001 à partir de kératinocytes et de cellules épithéliales pulmonaires. Plusieurs approches bioinformatiques ont permis de prédire l'existence de ce peptide antimicrobien (Garcia *et al.*, 2001b; Jia *et al.*, 2001). L'ARNm spécifique de la hBD3 code pour un polypeptide précurseur de 67 acides aminés, avec un peptide signal de 22 acides aminés. Le gène codant pour la hBD3 présente une homologie de séquence de 43% avec celui de la hBD2 (Garcia *et al.*, 2001b; Harder *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2001). Il est exprimé au niveau de l'épiderme, des amygdales, de la trachée, de la langue, de l'utérus et du thymus (Harder *et al.*, 2001). L'IFN-  $\gamma$ , l'IL-1- bêta, le TNF- alpha et le PGN sont capables d'induire l'expression du gène codant pour la hBD3 dans des kératinocytes en culture (Harder *et al.*, 2001; Harder *et al.*, 2004; Sørensen *et al.*, 2005).

Ce peptide révèle une activité antimicrobienne contre un large spectre de bactéries à Gram +, à Gram - et de champignons (Garcia *et al.*, 2001b; Harder *et al.*, 2001; Hoover *et al.*, 2003; Maisetta *et al.*, 2003). Plus particulièrement, la capacité des kératinocytes à prévenir la colonisation de *S. aureus* à la surface cutanée est associée à la présence constitutive de la hBD3 (Kisich *et al.*, 2007; Zanger *et al.*, 2010) *via* la voie de signalisation du récepteur TLR2 (Menzies et Kenoyer, 2006). Comme les bêta-défensines hBD2 et hBD4, la bêta-défensine hBD3 favorise aussi la migration et la prolifération des kératinocytes et des cellules dendritiques (Niyonsaba *et al.*, 2006; Ferris *et al.*, 2012).

Le quatrième membre de la famille des bêta-défensines, la **bêta-défensine 4**, fut identifié initialement par des études bioinformatiques (Garcia *et al.*, 2001a). La hBD4 a une activité antibactérienne vis-à-vis de *P. auruginosa* et *Staphylococcus carnosus*, chez des cellules épithéliales. Récemment, Harder *et al.* (2004), ont montré que la hBD4 est inductible par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) chez des kératinocytes en culture.

En plus de leur activité antimicrobienne, les défensines jouent plusieurs autres rôles complémentaires. Récemment, Niyonsaba *et al.* (2006), montrent que les défensines hBD-1, -2 et -3 sont capables d'induire chez les kératinocytes la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6

## Introduction

---

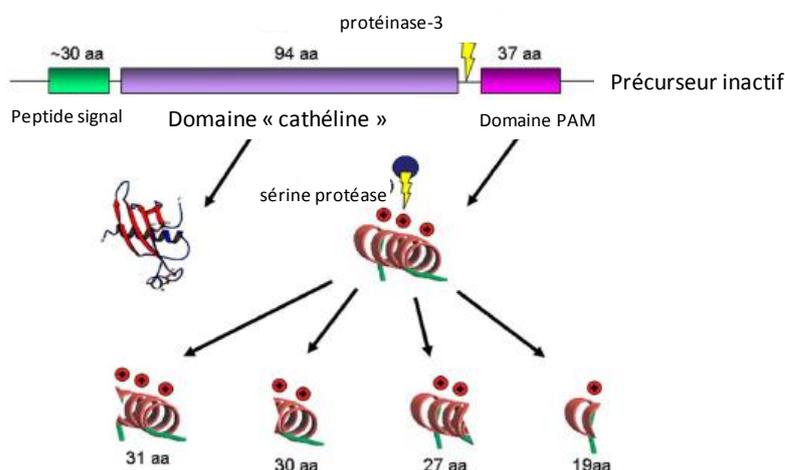
et IL-10 et de la MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) et la MIP-3a (*macrophage inflammatory protein 3-a*). En traitant les kératinocytes avec la toxine de la coqueluche, une toxine inhibitrice de la protéine G, les auteurs ont observé que ces effets activateurs étaient supprimés. Ces données suggèrent que les défensines sont des ligands potentiels des récepteurs associés aux protéines G. De plus, ces peptides sont capables d'induire la phosphorylation du récepteur pour le facteur de croissance épidermique (EGF), une protéine impliquée dans l'activation de la transcription des gènes codant les protéines STAT1 (*Signal Transducers and Activators of Transcription family of transcription factors*) et STAT3, molécules elles-mêmes modulatrices de la migration et de la prolifération des kératinocytes. Ces derniers résultats confirment donc le rôle des défensines dans la cicatrisation cutanée. De plus, les bêta-défensines peuvent avoir une activité chemoattractive vis-à-vis des neutrophiles (Chertov *et al.*, 1996; Niyonsaba *et al.*, 2004) et des mastocytes (Niyonsaba *et al.*, 2002). Elles peuvent aussi stimuler la production d'IL-18 chez les kératinocytes (Niyonsaba *et al.*, 2005), d'histamine et de prostaglandine chez les mastocytes (Niyonsaba *et al.*, 2001). Pour conclure, Biragyn *et al.* en 2002 ont montré que la hBD2 était capable de promouvoir la maturation des cellules dendritiques *via* le TLR4.

### c) Les cathélicidines

L'LL-37 (ou hCAP18) est le seul membre appartenant à la famille des cathélicidines chez l'Homme. Il a été identifié pour la première fois au niveau de la moelle osseuse (Agerberth *et al.*, 1995). Le gène correspondant code pour un précurseur de 18 kDa, d'où le nom hCAP18 (*human cationic antimicrobial protein 18*) qui, après clivage protéique par la sérine protéase 3, donne naissance au peptide C-terminal de 37 acides aminés appelé LL-37 (**Fig. 24**). Récemment, il a été montré que ce peptide peut être ultérieurement clivé par une autre sérine protéase et donner naissance à quatre peptides antimicrobiens comprenant respectivement 20, 27, 30 et 31 acides aminés (Murakami *et al.*, 2004). Ces peptides ont montré une activité antimicrobienne très efficace vis-à-vis de bactéries telles que *S. aureus* et *E. coli* et de champignons, tels que *Candida albicans* (*C. albicans*). Le PAM LL-37 est exprimé au niveau de peaux inflammatoires, alors qu'il n'est pas détecté au sein des peaux saines de l'adulte (Frohm *et al.*, 1997). Cependant, il est exprimé de manière constitutive au niveau de l'épiderme du nouveau-né (Dorschner *et al.*, 2003), des kératinocytes ongulaires (Dorschner *et al.*, 2004) et des glandes sudoripares (Murakami *et al.*, 2002). Similairement à hBD2, LL37 est aussi stocké dans les corps lamellaires (Braff *et al.*, 2004). Il est induit après infection par *S. aureus* (Braff *et al.*, 2005), *Micobacterium tuberculosis* (Rivas-Santiago *et al.*, 2008), les streptocoques du groupe A (Dorschner *et al.*, 2001) et après une blessure

## Introduction

(Dorschner *et al.*, 2001). Pour conclure, dans un article publié par Midorikawa *et al.* en 2003, il a été montré que LL37 peut agir de manière syneRG-Ique avec hBD2 et hBD3 pour combattre les infections liées à *S. aureus*.

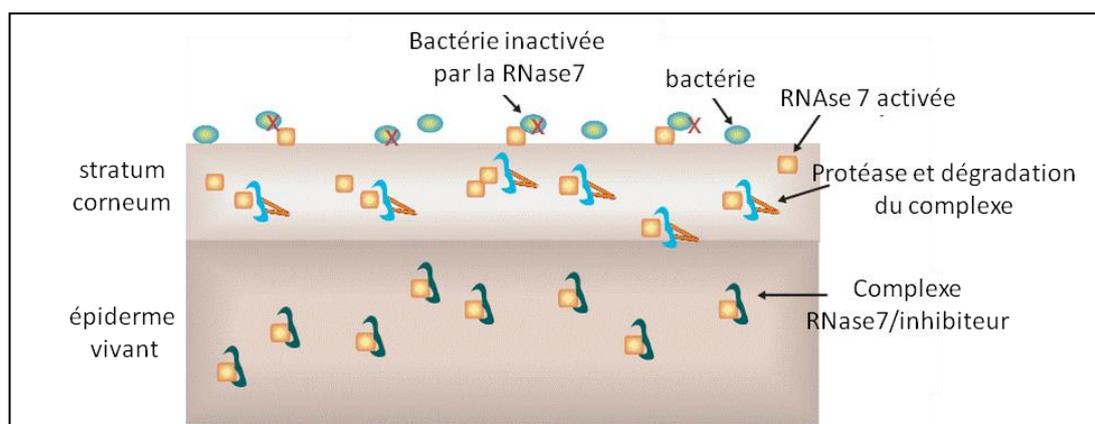


**Figure 24. Cathélicidine : structure du gène et clivage protéique.** Le gène codant pour la cathélicidine est composé d'un peptide signal, un domaine « cathéline » et un domaine à activité antimicrobienne. Une protéinase-3 clive ce domaine PAM, codant pour un peptide de 37 acides aminés. Dans une dernière étape, le domaine LL-37 peut être clivé pour donner naissance à plusieurs peptides à activité antimicrobienne. Le domaine cathéline, quant à lui, montre à la fois une activité antibactérienne et inhibitrice de protéase. D'après Izadpanah et Gallo, 2005.

### d) La RNase 7

Les kératinocytes expriment aussi la Ribonucléase 7 (RNase7), un membre appartenant à la famille de la RNase A. Ce peptide a été isolé pour la première fois à partir de la couche cornée (Harder et Schröder, 2002). Il est exprimé dans les kératinocytes suprabasaux (Köten *et al.*, 2009). L'expression constitutive de la RNase 7 confère une protection contre de possibles infections liées à *S. aureus* (Zanger *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2010). Son rôle de protection contre la colonisation de *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) a aussi été démontré (Köten *et al.*, 2009). Son expression est aussi induite suite à une blessure (Harder *et al.*, 2010; Kennedy-Crispin *et al.*, 2011). En 2009, Abtin *et al.*, ont montré la présence d'une protéine inhibitrice de protéase surtout au niveau des couches les plus profondes de l'épiderme et non au niveau du *stratum corneum*. Ils ont avancé l'hypothèse de l'existence d'un complexe RNase7-inhibiteur, complexe qui rendrait inactive la RNase7 au niveau des couches vivantes de l'épiderme. Ce complexe serait ensuite activé par une protéase et la RNase7 serait libérée au niveau de la couche cornée (Fig. 25).

## Introduction

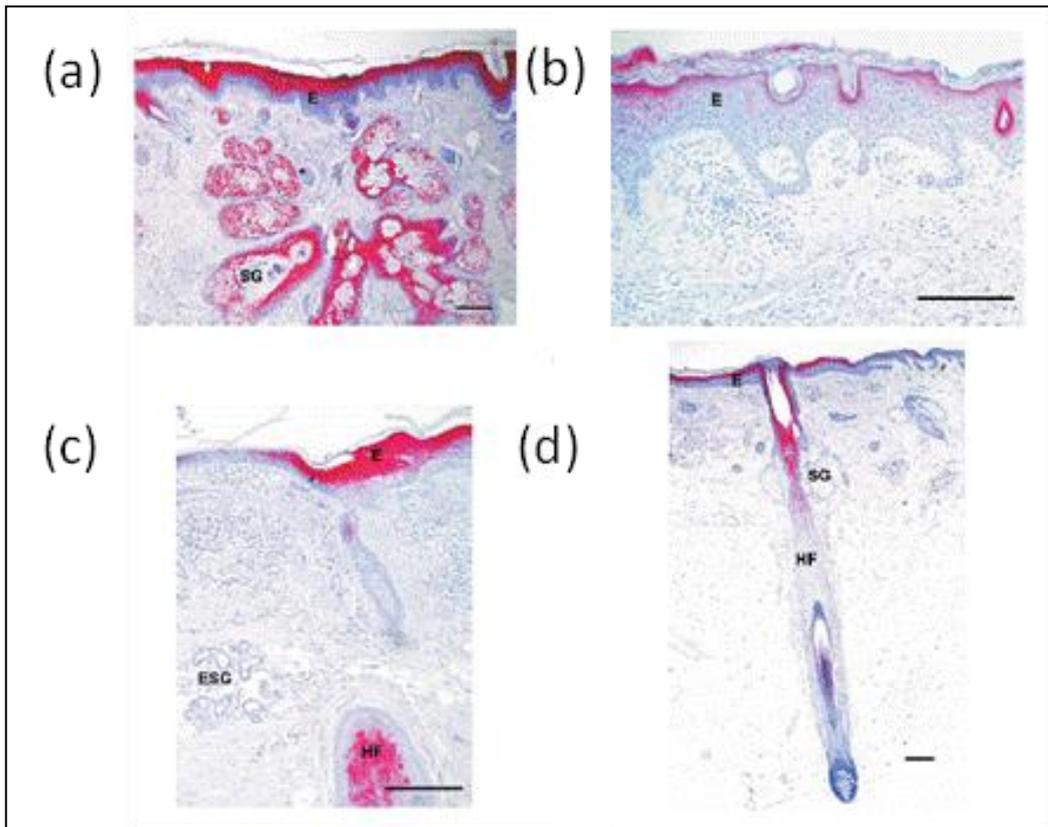


**Figure 25. Modèle de maturation de la RNase7 au sein de l'épiderme.** Abtin *et al.* (2009) ont montré la présence d'une protéine inhibitrice de protéase au niveau des couches de l'épiderme vivant en suggérant l'existence d'un complexe RNase7-protéine inhibitrice. Ce complexe serait ensuite activé par une protéase au niveau du *stratum corneum* afin de libérer et activer l'RNase7. D'après Zasloff, 2009.

### e) S100A7 (psoriasine)

La S100A7 ou psoriasine est une protéine de 11 kDa, faisant partie de la famille S100. Ces protéines, une fois complexées à des ions calcium, sont capables de moduler l'activité d'autres protéines cibles impliquées dans différents processus cellulaires tels que la phosphorylation (Pozdnyakov *et al.*, 1998; Wilder *et al.*, 1998), le métabolisme glucidique (Landar *et al.*, 1996; Zimmer et Van Eldik, 1986) ou encore l'assemblage du cytosquelette (Krieg *et al.*, 1997; Presland *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2000).

Les propriétés antimicrobiennes de la psoriasine ont également été démontrées (Gläser *et al.* 2005). La psoriasine est exprimée surtout dans les zones les plus sensibles à une colonisation bactérienne telles que les couches superficielles de l'épiderme, la glande sébacée et les follicules pileux (**Fig. 26**). En traitant les kératinocytes avec un anticorps anti-psoriasine, les auteurs ont observé une inhibition de la capacité des cellules à tuer *E. coli*, ce qui suggère le rôle protecteur de la psoriasine contre les infections liées à cette bactérie. De plus, d'autres facteurs comme les blessures ou la présence de certaines pathologies cutanées telles que la dermatite atopique peuvent influencer l'expression de la psoriasine (Gläser *et al.*, 2009; Harder *et al.*, 2010; Kennedy-Crispin *et al.*, 2011).



**Figure 26. Expression de la psoriasine au sein de l'épiderme.** La psoriasine est fortement exprimée au niveau des zones les plus sensibles à une infection bactérienne, c'est-à-dire au niveau des kératinocytes suprabasaux de l'épiderme (a) et au sein des glandes sébacées de la peau du nez (b et c). Les couches les plus superficielles des follicules pileux ont également montré une forte présence de psoriasine. D'après Gläser *et al.*, 2005. Abréviations : E, épiderme; HF, follicules pileux; ESG, glandes sudoripares. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

### f) Autres molécules à activité antimicrobienne

D'autres protéines avec des propriétés antimicrobiennes sont exprimées au niveau de la peau. Le SLPI (*secretory leukoprotease inhibitor*), protéine avec des propriétés anti-protéolytiques largement présente au niveau des muqueuses et des fluides corporels (Fritz, 1988), a été isolé à partir du *stratum corneum* et du milieu de culture de kératinocytes (Wiedow *et al.*, 1998). Son expression est induite par l'IL-1 bêta, le TNF-alpha, le facteur de croissance de transformation-alpha (TGF-alpha) et le facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGF-1) (Wiedow *et al.*, 1998; Wingens *et al.*, 1998). Une induction de son expression est également observée au niveau de blessure. Outre ses propriétés anti-protéolytiques, une activité antimicrobienne vis-vis de *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus* (Hiemstra *et al.*, 1996; Wiedow *et al.*, 1998; Wingens *et al.*, 1998)

## Introduction

---

ou antifongique contre *C. albicans* et *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) (Tomee *et al.*, 1997) a été démontrée.

Un autre inhibiteur de protéase, l'élafine ou SKALP (*skin-derived anti-leukoproteinase*) est exprimé au sein des kératinocytes (Alkemade *et al.*, 1994) et il montre une activité bactéricide contre *P. aeruginosa* (Meyer-Offert *et al.*, 2003) et *S. aureus* (Simpson *et al.*, 1999).

L'adrénomédulline est un peptide de 52 acides aminés exprimé dans les kératinocytes et les follicules pileux, et au sein des glandes sudoripares et sébacées (Martinez *et al.*, 1997). Il possède une activité antimicrobienne vis-à-vis de *E. coli*, *S. aureus* et *P. acne* (Allaker *et al.*, 1999).

De nombreux neuropeptides à activité antimicrobienne, tels que la Substance P (Kowalska *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2006), le Neuropeptide Y (Lambert *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2006), la catestatine (Radek *et al.*, 2008) ou encore la chromogranine A et B (Tasiemski *et al.*, 2002) ont été détectés au niveau de l'épiderme.

Enfin, il est admis que certains composants de la couche cornée (céramides, cholestérol et acides aminés libres) possèdent une activité antimicrobienne. Chez la souris, des acides aminés libres ont une activité antimicrobienne face à *S. aureus*. (Bibel *et al.*, 1989). En parallèle, les sphingosines semblent aussi limiter la colonisation de la surface cutanée par *S. aureus* et d'autres bactéries (**Tableau 3**), alors que l'action des déhydro-sphingosines est moindre.

**Tableau 3. Minimal Inhibitory Concentration en µg/mL des lipides de la couche cornée.** Les sphingosines et les phytosphingosines ont une activité antimicrobienne à faible dose contre *S. aureus* et deux souches de MRSA (*metalloproteinase-resistant S. aureus*). L'activité antimicrobienne des dehydro-sphingosines est moins importante sur les mêmes bactéries utilisées dans ce travail. D'après Drake *et al.*, 2008.

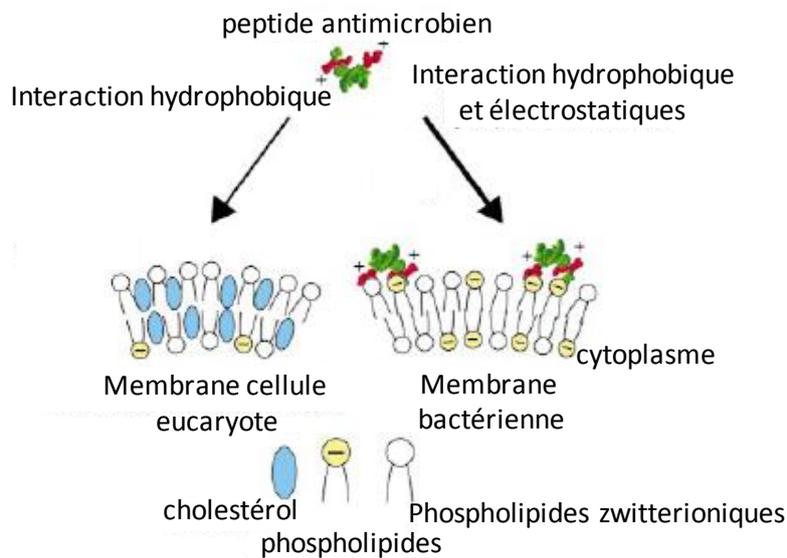
bactérie	sphingosine	déhydro- sphingosine	phyto- sphingosine	acide sapiénique
		<i>µg/ml</i>		
<i>S. aureus</i>	2	8–60	2	30
MRSA 6	5	8–60	3	
MRSA 7	4	8–60	2	
<i>C. albicans</i>	6–18	100	6–12	
<i>E. coli</i>	42	>50	4.2	

### II.II.3.2 Mécanismes d'action des PAMs

Les peptides antimicrobiens sont capables de former des pores dans la membrane bactérienne et d'entraîner la mort des microorganismes. Grâce à leur nature cationique, les PAMs

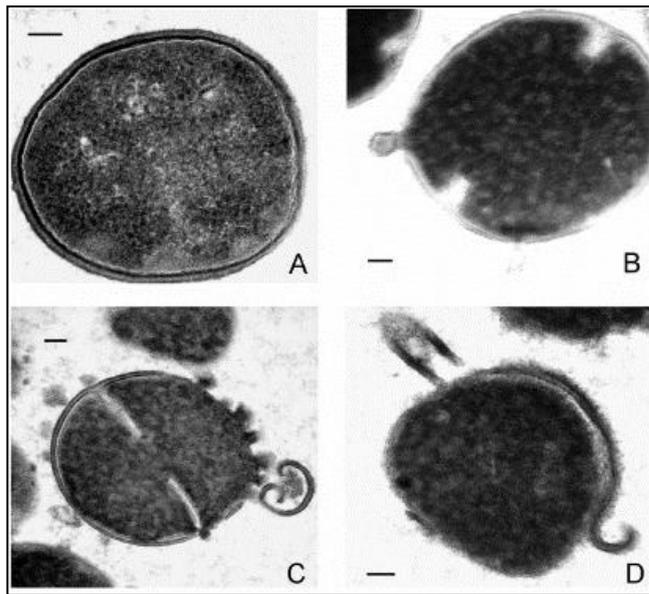
## Introduction

sont attirés par des forces électrostatiques aux différentes structures de la membrane bactérienne chargées négativement, à savoir les lipopolysaccharides des Gram - et le PGN et le lysophosphatidylglycérol des Gram +. Une fois intégrés dans la membrane grâce à leur portion hydrophobe, les PAMs créent des pores déstabilisant la bicouche lipidique et génèrent une osmolyse cellulaire. La spécificité de cible cellulaire des PAMs est due à la composition membranaire différente entre les cellules procaryotes et eucaryotes (**Fig. 27**). Ces dernières, contrairement aux membranes bactériennes contiennent des glycolipides et du cholestérol sans aucune charge nette. La présence de cholestérol réduit l'activité des PAMs, soit par une stabilisation de la couche lipidique, soit par une interaction entre le cholestérol et le peptide (Matsuzaki, 1999).



**Figure 27. Membranes et spécificité d'action des PAMs.** L'action des peptides antimicrobiens requiert une reconnaissance spécifique des cellules microbiennes, ce qui leur permet de distinguer les cellules infectieuses des cellules de l'hôte. Cette spécificité se base sur les différences de constitution entre membranes eucaryotes et procaryotes. D'après Zasloff, 2002.

Des analyses de microscopie électronique ont montré que le PAM hBD3 est capable de créer des pores au niveau de la paroi de *S. aureus* et d'entraîner la bactériolyse après 2 heures (**Fig. 28**).



**Figure 28. Activité antimicrobienne de la hBD3.** Micrographie de *S. aureus* ( $10^8$  cellules/mL) incubé dans une solution phosphate 10 mM pendant 2 h (A) ou traité avec la hBD-3 (500 mg/mL) pendant 30 min (B) ou 2 h (C et D). Barre d'échelle : 0.1  $\mu$ m. Harder *et al.*, 2001.

Différents modèles d'action ont été proposés, mais l'activité du peptide est néanmoins dépendante de sa concentration (Huang, 2006). A de faibles concentrations, les PAMs sont orientés de façon parallèle à la membrane bactérienne (Yang *et al.*, 2001). Dès que le rapport peptides/lipides augmente, les PAMs commencent à s'orienter de manière perpendiculaire par rapport aux lipides de la membrane. Cette nouvelle disposition spatiale favorise la formation de pores au niveau de la membrane bactérienne. La valeur du rapport peptides/lipides nécessaire pour déclencher l'activité de PAMs est variable et liée à la nature du peptide et des lipides des membranes bactériennes (Lee *et al.*, 2004).

Trois modèles principaux (**Fig. 29**) ont été décrits dans la littérature :

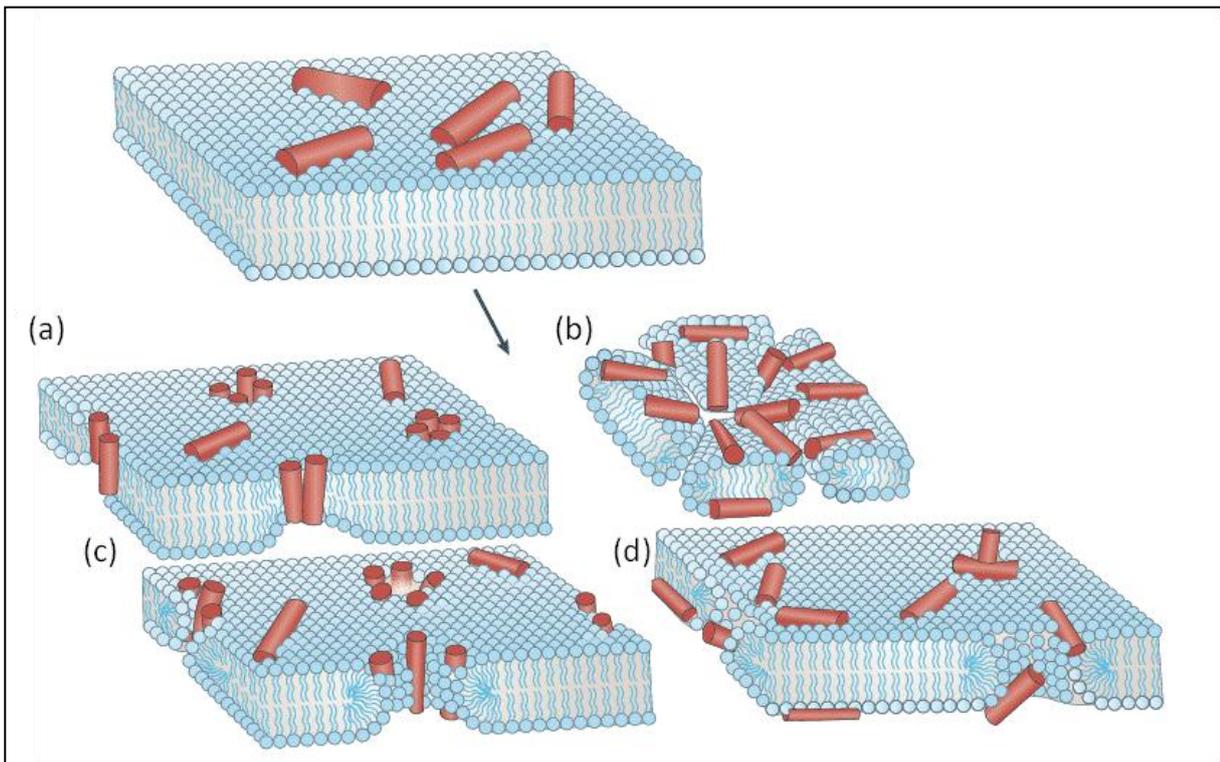
- Le modèle des pores transmembranaires (*Barrel-stave model*) (Baumann et Mueller, 1974)
- Le modèle des pores toroïdaux (*Toroidal pore, wormhole model*) (Ludtke *et al.*, 1996).
- Le modèle « carpet-like », qui est souvent décrit comme un mécanisme de type détergent (Pouny *et al.*, 1992).

Selon le modèle *des pores transmembranaires*, les peptides s'assemblent pour former un pore dont le lumen est parallèle aux lipides membranaires. Ce modèle a été décrit uniquement pour le PAM alaméthicine d'origine fongique (Yang *et al.*, 2001). Il a été montré que cette protéine peut créer un pore contenant de 3 à 11 molécules à hélices parallèles d'un diamètre de 1,8 nm en surface (He *et al.*, 1995; Spaar *et al.*, 2004) et de 4 nm plus en profondeur.

## Introduction

Selon le *modèle des pores toroïdaux*, les peptides antimicrobiens sont insérés de manière à ce que les lipides soient courbés tout au long du lumen du pore. Un tel modèle a été décrit pour les PAMs magainine, protégrine et mélittine (Matsuzaki *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Hallock *et al.*, 2003). En particulier, la magainine est capable de former des pores d'un diamètre de 3 à 8 nm avec 4 à 7 monomères de magainine pour 90 molécules de lipides (Yang *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 1996; Matsuzaki *et al.*, 1997).

Selon le *modèle «carpet-like»*, les PAMs se disposent sur la surface lipidique. Une fois la concentration seuil atteinte, ils provoquent une déstabilisation de la membrane bactérienne par un mécanisme de type détergent, avec désintégration de la membrane et formation éventuelle de micelles.



**Figure 29. Les modèles principaux d'action des PAMs.** Les PAMs agissent au niveau de la membrane plasmique bactérienne. A partir d'une concentration seuil, les peptides antimicrobiens provoquent une rupture de la membrane bactérienne par formation de pores. En (a), le modèle des pores transmembranaires, en (b) le modèle de type détergent et en (c) des pores toroïdaux. Un quatrième modèle a été récemment décrit (d) : il s'agit d'une modification du modèle des pores toroïdaux. Selon ce modèle, les peptides antimicrobiens seraient alignés au groupement polaire lipidique avec des phospholipides membranaires. Leontiadou *et al.*, 2006.

Les propriétés antimicrobiennes de la psoriasine ne sont pas liées à la capacité à former des pores au niveau de la membrane de la bactérie, comme décrit pour les défensines, mais plutôt à la

## Introduction

capacité de séquestrer les ions zinc, ions indispensables à la bactérie pour se protéger contre les stress oxydatifs au cours de la phase stationnaire de croissance. Par ailleurs, d'autres mécanismes d'action, regroupés sous le nom de mécanismes à activité intracellulaire, ont été décrits (**Tableau 4**).

**Tableau 4.** Mode d'action des PAMs à activité intracellulaire. D'après Brogden, 2005.

Modèles à activité intracellulaire		
Type d'activité	PAM	Références
Altération de la division cellulaire	PR-39, PR-26, indolicidine, microcine	Salomon et Farias 1992; Shi <i>et al.</i> , 1996; Subbalakshmi et Sitaram, 1998
Inhibition de la synthèse de la paroi	Mersadicine	Brotz <i>et al.</i> , 1998
Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Buforine, dermaseptine, pleurocidine	Park <i>et al.</i> , 1998; Subbalakshmi et Sitaram, 1998; Patrzykat <i>et al.</i> , 2002
Inhibition de la synthèse protéique	HNP-1 et 2, dermaseptine, pleurocidine	Lehrer <i>et al.</i> , 1989 Patrzykat <i>et al.</i> , 2002
Inhibition de l'activité enzymatique	Histatine, drosocine, apiaecine	Andreu et Rivas, 1998; Otvos, 2000

## II.II.4 Les cytokines

Les cytokines sont des polypeptides produits par la plupart des cellules nucléées de l'organisme y compris les cellules épithéliales, telles que les kératinocytes ou les cellules de Langerhans. Les cytokines ont été classées en six familles différentes : les interleukines (ILs), les chemokines, les facteurs de croissance, les interférons (IFNs), les facteurs de nécrose tumorale (TNF), et le CNF (*colony-stimulating factor*). Comme les hormones, les cytokines sont reconnues par des récepteurs spécifiques, interaction qui permet l'activation et la transduction du signal. Les cytokines, en stimulant l'expression des gènes codant pour les PAMs d'une part et en activant l'action de cellules impliquées dans le système immunitaire acquis d'autre part, peuvent être considérées comme une interface fonctionnelle entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Dans le cadre de cette thèse, deux membres appartenant à la famille des ILs, l'IL-1 et IL-6 et un membre de la famille de TNF, le TNF-alpha, ayant un rôle dans la réponse immunitaire de la peau, seront décrits plus en détails.

### II.II.4.1 La famille des IL-1

L'IL-1 alpha et l'IL-1 bêta sont les produits de deux gènes différents, mais partagent pourtant 25 % d'homologie. Elles interagissent avec le même récepteur, le récepteur IL-1R (**Fig. 17**) et ont les mêmes propriétés biologiques (Dinarello, 1991). Elles sont produites par plusieurs types cellulaires, notamment les kératinocytes, les macrophages, les fibroblastes, les lymphocytes et les cellules de Langerhans (Kupper *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1996). Contrairement aux autres types cellulaires, chez les kératinocytes l'IL-1 alpha est la forme prédominante, constitutivement produite à des taux relativement élevés (Kupper *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1996).

Les deux isoformes de l'IL-1 sont initialement synthétisées sous forme d'un précurseur de 31 kDa. La pro-IL-1 alpha est biologiquement active, alors que la pro-IL-1 bêta nécessite le clivage par une cystéine protéase, l'ICE (*IL-1 converting enzyme*) afin de libérer sa forme mature fonctionnelle de 17 kDa. Plusieurs facteurs, tels que la nécrose cellulaire ou l'apoptose, l'exposition à des endotoxines ou encore la stimulation par d'autres cytokines, peuvent induire la sécrétion des l'IL-1 alpha et bêta (Rubartelli *et al.*, 1990). Les ILs-1 au niveau de l'épiderme sont capables de moduler la réponse immunitaire, l'inflammation et la synthèse de lipides (Feingold, 1991). Les kératinocytes expriment les deux formes de IL-1, mais au sein de l'épiderme seulement l'IL-1 alpha est présente dans sa forme active (Kupper *et al.*, 1986, Mizutani *et al.*, 1991). Cependant, une enzyme potentiellement capable de cliver la pro-IL-1 bêta en sa forme active, a été isolée à partir de la couche cornée (Mizutani *et al.*, 1991; Nylander-Lundqvist et Egelrud, 1997). Une induction de

l'expression de l'IL-1 a été observée en réponse à une large variété de facteurs, y compris l'exposition aux ultraviolets (UV) (Kupper *et al.*, 1987) ou dans le cas de l'IL-1 alpha, suite à une blessure (Kennedy-Crispin *et al.*, 2011). Différentes études ont montré la présence des IL-1 alpha et bêta sur toute l'épaisseur de l'épiderme, de la couche basale à la couche cornée (Hauser *et al.*, 1986; Didierjean *et al.*, 1989; Romero *et al.*, 1989; Anttila *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1996).

Les IL-1 peuvent stimuler la prolifération (Ristow, 1987) et avoir des propriétés chimioattractives vis-à-vis des kératinocytes, et semblent également stimuler l'expression d'autres cytokines telles que l'IL-8 (Larsen *et al.*, 1990). De plus, les IL-1 alpha et bêta stimulent l'expression génique des peptides antimicrobiens, notamment celle de la *hBD2* et *iNOS* (Liu *et al.*, 2002; Mempel *et al.*, 2003; Oren *et al.*, 2003; Harder *et al.*, 2004; Sørensen *et al.*, 2005). En utilisant des cultures primaires de kératinocytes, Harder *et al.* (2004) ont observé un effet stimulant de l'IL-1 bêta sur l'expression du gène *hBD2*, jusqu'à une augmentation d'un facteur 20 fois par rapport aux lignées non-traitées. Les effets sur l'expression des bêta défensine *hBD1*, *hBD3* et *hBD4* étaient moins importants.

Récemment, de nouveaux membres de la famille des IL-1s, à savoir l'IL-1F5, -F6, -F8, et -F9 ont été identifiés chez l'Homme. En 2011, Johnston *et al.* ont montré par des analyses de microarrays et en utilisant l'épiderme reconstitué comme modèle expérimental, que les kératinocytes expriment ces nouveaux types d'IL-1. De plus, ils ont montré que l'IL-1F8 est capable d'induire l'expression des gènes *hBD2*, *hBD3* et le gène codant pour la cathélicidine.

### II.II.4.2 La famille des IL-6

L'IL-6 appartient à une plus large famille regroupant l'IL-11, l'oncostatine M, la cardiotropine 1 et la neutrophine-1 (Taga et Kishimoto, 1997). L'IL-6 est une glycoprotéine d'environ 22-27 kDa, produite au niveau de l'épiderme essentiellement par les kératinocytes (Castells-Rodellas *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2004; Niebuhr *et al.*, 2009), mais aussi par d'autres cellules comme les adipocytes, les macrophages ou encore les fibroblastes (May *et al.*, 1986; Grossman *et al.*, 1989; Kestler *et al.*, 1995). L'IL-6 a été détectée au niveau de toutes les couches épidermiques (Wang *et al.*, 2004). Une augmentation de son expression a été observée en réponse à divers facteurs tels qu'une exposition aux UV, à l'acide polyribonoinosinique polyribocytidylique (poly I :C) ou encore à des agents bactériens (Kupper *et al.*, 1989; Urbanski *et al.*, 1990; Grellner *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2009). Les PAMs, *hBD2*, *hBD3* et *hBD4* semblent induire également l'expression de l'IL-6 (Niyonsaba *et al.*, 2006).

### II.II.4.3 Les TNF

Les TNF-alpha et bêta sont les deux membres les plus représentés de la famille des TNF, comprenant au total 10 protéines différentes. Le TNF-alpha est produit par plusieurs types cellulaires, notamment les macrophages, les lymphocytes, les neutrophiles et les kératinocytes (Vilcek et Lee, 1991) alors que le TNF-bêta n'est pas produit au sein de l'épiderme. Le TNF-alpha est initialement synthétisé sous forme d'un précurseur protéique de 26 kDa ancré à la membrane plasmique, et ensuite clivé par une métalloprotéinase vers sa forme mature de 17 kDa pour être libéré dans les espaces intercellulaires. Le TNF-alpha a été détecté au niveau de l'épiderme, plus particulièrement dans les couches granuleuse et épineuse (Oxholm *et al.*, 1988). Son expression est induite suite à une exposition aux UV, suite à une blessure ou après contact avec des endotoxines ou des molécules exogènes telles que l'acide poly I :C (Oxholm *et al.*, 1988; Köck *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2009). Il semble avoir un rôle dans la prolifération de l'épiderme et la différenciation des kératinocytes (Pillai *et al.*, 1989), et comme les IL-1, il est capable d'induire une augmentation de l'expression de certains gènes codant pour des peptides antimicrobiens, notamment la hBD2 et iNOS (Mempel *et al.*, 2003; Harder *et al.*, 2004).

## III Dermo-cosmétique et renforcement de la barrière cutanée

Les premières utilisations de produits cosmétiques (du grec *kosmētikós*, décoration) apparaissent très tôt. Déjà, lors de la Préhistoire, les Hommes réalisaient de la peinture corporelle d'origine minérale, mélangée à des corps gras. Au fil des siècles, l'utilisation de ces produits s'est répandue et est devenue de plus en plus importante. Aujourd'hui, l'industrie cosmétique s'intéresse à « toutes substances ou préparations destinées à être mises en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, par exemple, la peau, les cheveux, les ongles, les lèvres ou encore les dents, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou d'en corriger les odeurs » (cf. article L.5131-1 du code de la santé publique).

Les extraits d'origine végétale ont toujours été largement employés en dermo-cosmétique. Ainsi, l'extrait de camomille (*Chamomilla recutita*) est utilisé pour traiter des maladies cutanées ou pour soigner la peau lors d'une brûlure depuis l'époque égyptienne. Aujourd'hui de nombreux extraits végétaux sont utilisés pour leurs effets antioxydants (Chompoo *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012), anti-vieillessement (Kim *et al.*, 2012; Takasao *et al.*, 2012), anti-inflammatoire (Akkol *et al.*, 2012; Güvenç *et al.*, 2012) ou encore leurs effets protecteurs vis-à-vis des UV (Korać et Khambholja, 2012; Giampieri *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2012). Certains composés favorisent la cicatrisation en induisant la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes (Araújo *et al.*, 2012; Warashina *et al.*, 2012) ou inhibent des infections fongiques au sein de la peau (Ozaslan, 2011; Sule *et al.*, 2012).

D'autres études ont montré la capacité de certains produits végétaux à renforcer l'expression de gènes codant pour des peptides antimicrobiens chez les kératinocytes (Donnarumma *et al.*, 2007; Man *et al.*, 2011). Par exemple, Donnarumma *et al.* (2007) ont observé que l'AV119, un sucre extrait de l'avocat, avait la capacité d'induire l'expression du gène *hBD2* jusqu'à 70% par rapport au contrôle chez des cultures de kératinocytes. Les extraits végétaux utilisés en dermo-cosmétique sont issus de différentes espèces végétales, préparés à partir d'organes variés (extraits de feuille, racines, fleurs etc...) et de nature moléculaire diverse. Le laboratoire Glyco-MEV est spécialisé dans l'extraction et la caractérisation structurale des polysaccharides, des glycoprotéines et protéoglycannes pariétaux extraits de plantes. L'un des axes de recherche développé par le Glyco-MEV consiste à déterminer l'implication de ces composés pariétaux dans l'immunité végétale. Dans ce travail de thèse, l'influence sur l'expression des gènes de défense cutanée d'un polysaccharide extrait de feuille de tabac a été étudiée.

## III.I Les polysaccharides et protéoglycannes végétaux

Les cellules végétales sont caractérisées par la présence d'une matrice extracellulaire complexe et dynamique appelée aussi paroi (**Fig. 30**). Il existe une paroi primaire et une paroi secondaire. La paroi primaire entoure tous les types cellulaires de la plante, tandis que la paroi secondaire n'est présente que dans certaines parties différenciées. Seule, la paroi primaire sera décrite dans ce manuscrit.

La paroi primaire joue un rôle fondamental dans la cohésion tissulaire, la communication et la croissance cellulaire ainsi que dans les mécanismes de défense vis-à-vis de stress biotiques (Vicré *et al.*, 2005) ou abiotiques (Moore *et al.*, 2006). La paroi des cellules végétales est constituée essentiellement de polysaccharides celluloses et non-celluloses, ou polysaccharides complexes, tels que les hémicelluloses et les pectines. La cellulose est un polymère de résidus bêta-(1,4)-D-glucose, organisés sous forme de microfibrilles. Ce polymère est synthétisé dans la membrane plasmique par le complexe enzymatique de la cellulose synthase. Trente-six chaînes de bêta-(1,4)-D-glucose s'assemblent, par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes, pour former les microfibrilles de cellulose. Ces liaisons stabilisent l'ensemble, ce qui confère aux microfibrilles une grande résistance mécanique (Somerville, 2006).

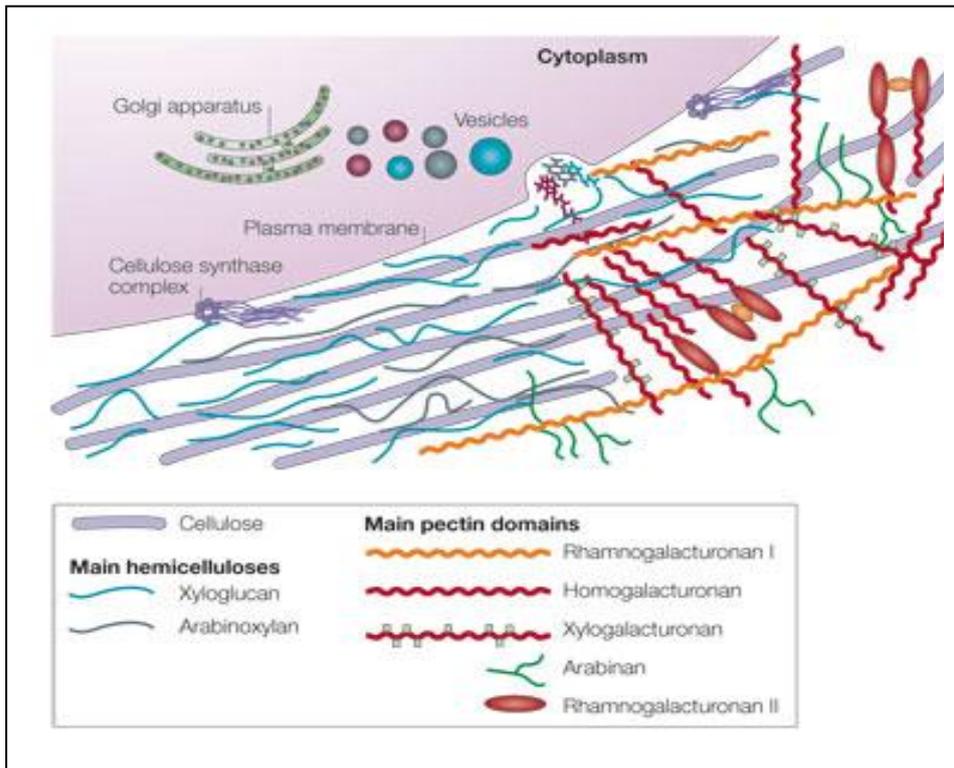
Les hémicelluloses possèdent une chaîne principale de sucres liés en bêta-(1,4) (Scheller et Ulvskov, 2010). Ainsi les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes, les glucomannanes et les bêta-(1-3, 1-4)-glucanes sont définis comme étant des hémicelluloses. Leur structure est fonction des espèces et varie considérablement d'un type cellulaire à l'autre.

Les pectines constituent la famille la plus complexe de polysaccharides pariétaux. Elles sont constituées soit d'une chaîne principale d'acide galacturonique, soit d'une chaîne principale d'acide galacturonique et de rhamnose alternés. Les pectines incluent principalement les homogalacturonanes, le rhamnogalacturonane I (RG-I) et le rhamnogalacturonane II (RG-II) (Willats *et al.*, 2001). Les homogalacturonanes sont des homopolymères, formés par la répétition d'une centaine de résidus d'acide galacturonique (GalA) (Thibault *et al.*, 1993). Les RG-I sont des hétéropolymères constitués par la répétition d'une centaine de motifs de disaccharides alpha-(2,4)-D-GalA-alpha-(1,2)-L-rhamnose (Albersheim *et al.*, 1996). Les résidus de rhamnose peuvent être substitués par différentes chaînes latérales.

Des protéines à activité enzymatique et des autres protéines structurales, telles que les arabinogalactane protéines (AGPs), sont également présentes au sein de la paroi végétale.

La paroi végétale est à l'origine de multiples applications dans le domaine de l'agro-alimentaire, de la dermo-cosmétique, de l'industrie pharmaceutique, de l'industrie textile et dans la

production de biocarburants. Au cours de cette thèse, une composante de la matrice extracellulaire végétale, le RG-II, sera décrite plus en détails.



**Figure 30. Structure et organisation de la paroi végétale.** Les cellules végétales sont entourées par une matrice extracellulaire, très complexe : la paroi. Elle est composée principalement de cellulose, organisée en microfibrilles, qui forment un réseau avec les hémicelluloses et les pectines. Les microfibrilles de cellulose sont synthétisées par la cellulose-synthase au niveau de la membrane plasmique tandis que les pectines et les hémicelluloses sont synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi. Les hémicelluloses, les plus représentées sont les xyloglucanes; les arabinoxylanes et les mannanes sont moins abondants. Les pectines les plus abondantes sont les RG-I et les homogalacturonanes. Des xylogalacturonanes, des arabinanes, des arabinogalactanes et du RG-II sont également présents. Cosgrove, 2005.

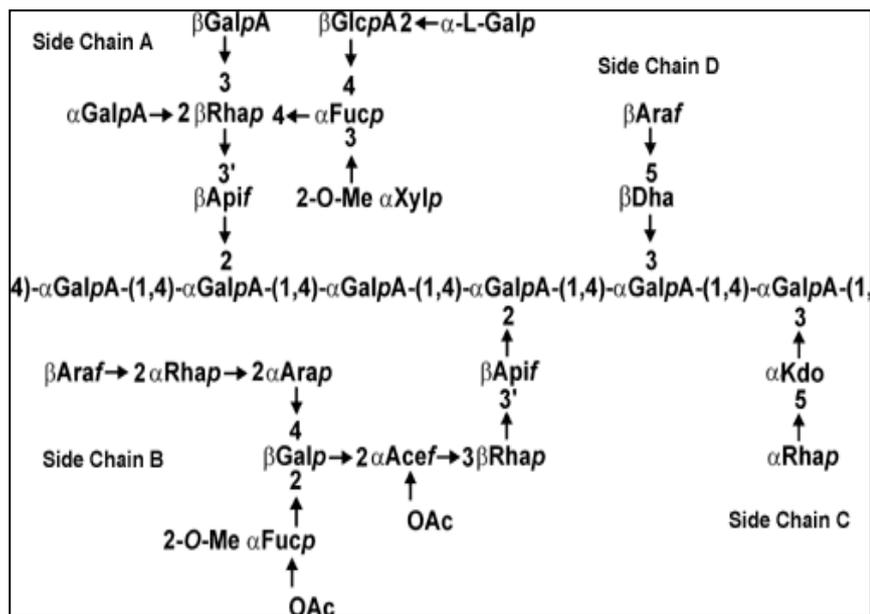
### III.II Le Rhamnogalacturonane II (RG-II)

Les pectines sont des polysaccharides riches en acide galacturonique regroupant les homogalacturonanes, le rhamnogalacturonane I et le rhamnogalacturonane II (Willats *et al.*, 2001). A ce jour, le RG-II est le polysaccharide le plus complexe à avoir été identifié. Il est constitué de douze monosaccharides différents, dont plusieurs sont rares, liés entre eux par plus de vingt liaisons glycosidiques distinctes (O'Neill *et al.*, 2004). Le RG-II se caractérise par un squelette homogalacturonique central à partir duquel se ramifient quatre chaînes oligosaccharidiques latérales (**Fig. 31**) nommées A, B, C et D (Pérez *et al.*, 2003). Dans la paroi primaire, le RG-II se trouve

## Introduction

principalement sous forme de dimère, grâce à la liaison diester de borate qui se forme entre les résidus apiose des chaînes A (Kobayashi *et al.*, 1996).

Vu sa complexité unique et compte tenu de la présence de résidus rhamnose, monosaccharide avec des propriétés intéressantes en dermo-cosmétique (Andrès *et al.*, 2006; Ravelojaona *et al.*, 2008), nous avons décidé de tester les effets de ce polysaccharide sur l'explant de peau humaine en lien avec sa microflore cutanée.



**Figure 31. Structure du RG-II.** Le squelette est formé par des résidus de  $\alpha$ -D-GalpA. Quatre chaînes latérales structurellement très différentes, sont liées à l'axe central. Plusieurs sucres rares sont présents au sein du RG-II : le D-apiose, le L-acide acérique, l'acide 2-céto-3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique, l'acide 2-céto-3-déoxy-D-manno-octulosonique, le 2-O-méthyl-L-fucose et le 2-O-méthyl-D-xylose. Il s'avère qu'au moins 20 glycosyltransférases sont requises pour la synthèse du RG-II. D'après Pérez *et al.*, 2003.

## IV Objectifs de la thèse

Ce travail s'inscrit dans un projet global appelé SKINOFLOR. Ce projet, labellisé par le Pôle de Compétitivité « Cosmetic Valley » (pôle fédérant plusieurs entreprises françaises dans le domaine de la cosmétique) est financé par le Fond Européen de Développement Régional (FEDER) et par la région Haute-Normandie. Ce projet a été réalisé en partenariat avec cinq laboratoires dont deux de l'Université de Rouen : les laboratoires Glyco-MEV (Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale) EA4358 sur le site de Mont-Saint-Aignan, et le LMSM (Laboratoire de Microbiologie du Froid-Signaux et Microenvironnement) EA2123 sur le site d'Evreux. Les trois laboratoires de recherche privés participant à ce projet sont les laboratoires d'Uriage (Courbevoie), Bio-EC (Longjumeau), et Bio-Europe du Groupe Solabia (Anet).

De plus en plus de femmes, environ 40-50 %, au Japon, en Europe et aux États-Unis (Kligman *et al.*, 2006; Escalas-Taberner *et al.*, 2011) déclarent avoir une peau sensible. Les peaux sensibles sont classées en deux catégories : les peaux sensibles présentant des dermatoses et les peaux sensibles saines sans dermatoses associées. Ces dernières sont caractérisées par des modifications des propriétés bio-physico-chimiques de la barrière cutanée, expliquant leur sensibilité à l'environnement extérieur. Les peaux sensibles saines peuvent se dessécher plus facilement et présenter dans certains cas des rougeurs passagères. L'incidence sur ce type de peaux des facteurs d'origine climatique (froid, chaleur, humidité, etc.) et d'origine physico-chimique (solvant, UV) est bien connue. En revanche les effets, positifs ou négatifs, du microbiome cutané n'ont jamais été explorés jusqu'à présent.

L'objectif de cette thèse est d'explorer l'impact de biomolécules de nature polysaccharidique d'origine végétale ou non, sur les fonctions barrières de la peau en lien avec son exposition à trois germes bactériens. Les bactéries cutanées ciblées dans ce projet sur la base de leur représentativité et de leur rôle clé au sein du microbiome cutané sont deux coques à Gram + *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus*, et un bacille à Gram -, *Pseudomonas fluorescens*.

Premièrement, nous avons effectué une analyse transcriptomique, au niveau des différentes couches épidermiques, des gènes liés à l'immunité innée. Cette étude, accomplie grâce à l'utilisation de la microdissection laser couplée à la PCR quantitative en temps réel (qPCR), a été réalisée à partir d'explants de peau humaine maintenus en survie et fournis par le laboratoire Bio-EC. Ces explants ont été exposés ou non aux germes bactériens présélectionnés. Ces travaux ont donné lieu à un article de recherche intitulé « Isolation of human epidermal layers by laser capture

## Introduction

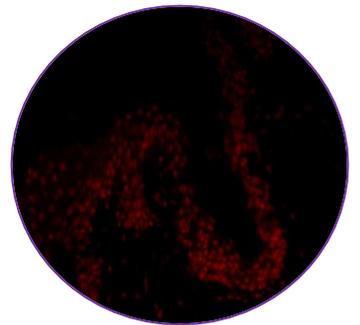
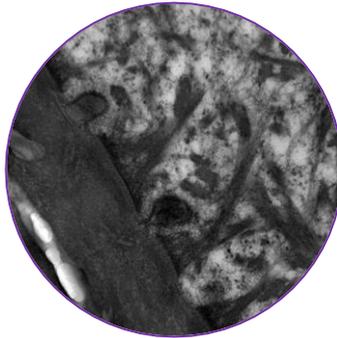
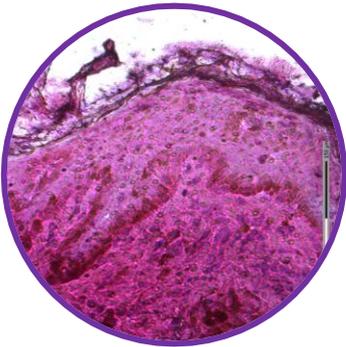
---

microdissection : application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR » et publié dans *Experimental Dermatology* en 2012 (Percoco *et al.*, 2012).

Dans un second temps, nous avons étudié à l'échelle subcellulaire les caractéristiques morphologiques de la peau. Des analyses immunocytologiques des mécanismes de défense en lien avec l'exposition bactérienne, ont également été conduites par microscopie optique à épifluorescence et par microscopie électronique à transmission (MET). Une analyse d'expression de gènes codant pour les PAMs et les cytokines pro-inflammatoires suite à l'exposition aux trois bactéries sélectionnées a été également menée. Les résultats de cette deuxième partie ont fait l'objet d'un article de recherche intitulé « *Human skin explant: a model to study the interaction between epidermal cells and the cutaneous microbiota* » soumis à *Experimental Dermatology* (Percoco *et al.*, soumis)

Puis, nous avons étudié les effets sur la défense cutanée en lien avec le microbiome de deux glycomolécules : une molécule polysaccharidique riche en rhamnose préparée par le laboratoire BioEurope (Solabia) et commercialisée sous le nom de « Téfloxe » et des extraits végétaux enrichis en RG-II.

# Matériel et Méthodes

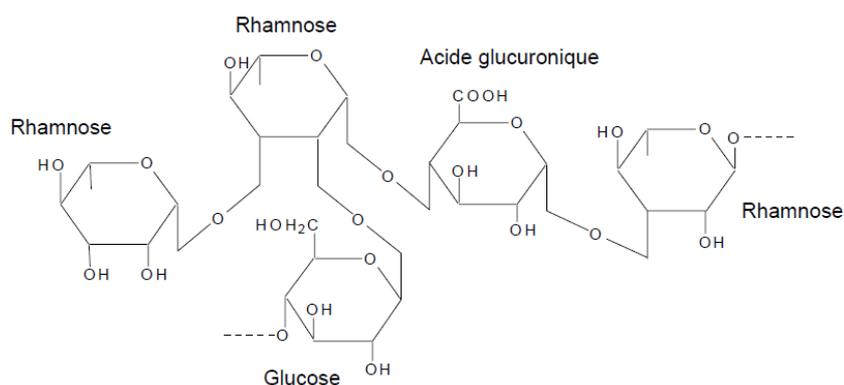




## Chapitre Deuxième : Matériel et Méthodes

### I Préparation des glycomolécules

Dans ce travail, l'influence de 2 glycomolécules sur les mécanismes de défense innée cutanée en lien avec la microflore bactérienne a été explorée. Un polysaccharide riche en rhamnose a été préparé par le laboratoire BioEurope (groupe Solabia). Il est issu d'une fermentation bactérienne. Il est commercialisé sous le nom de « Téflose » (**Fig. 32**). Ce polysaccharide est testé seul ou incorporé dans une base lamellaire préparée par les laboratoires dermatologiques d'Uriage. Cette base est une émulsion contenant le Téflose à une concentration finale de 0,03% et l'eau d'Uriage d'une teneur de 30%. Cette émulsion constitue le produit fini qui dans la suite de ce document sera cité sous la référence P 385.02.



**Figure 32. Structure du Téflose.** Le Téflose est un polysaccharide anionique obtenu par fermentation bactérienne et présentant une structure ramifiée dont la séquence polysaccharidique comprend des résidus de rhamnose, glucose et acide glucuronique.

La seconde glycomolécule étudiée est issue de parois cellulaires végétales. Elle a été extraite par le laboratoire Glyco-MEV de l'Université de Rouen. Il s'agit d'un polysaccharide pectique, le rhamnogalacturonane II (RG-II) extrait à partir de feuille de tabac. La première étape consiste à extraire les parois des cellules de feuilles de tabac. Un gramme de feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum*) est immergé dans 15 mL d'éthanol 70% et chauffé au bain-marie à 70 °C afin d'inactiver les enzymes pariétales. Au bout de 15 minutes, l'éthanol est éliminé et le matériel végétal est broyé au potter, puis traité deux fois avec 5 mL d'éthanol 70% pendant 15 minutes. Entre chaque traitement, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 5000 g. Dans le but d'éliminer les membranes cellulaires, le culot est ensuite traité avec un mélange de chloroforme et méthanol (v/v). Le résidu alcool insoluble (AIR) obtenu qui comprend les composés pariétaux est ensuite lyophilisé et pesé. Les composés pectiques

présents dans ce résidu pariétal sont alors extraits. L'AIR est traité par 5 mL de NaOH 0,1 M pendant 16 h à 4°C sous agitation. Le pH est ensuite ajusté à 5 par une solution d'acide acétique 10 % (v/v). Trente unités de l'enzyme endo-alpha (1,4) polygalacturonase (EPG), enzyme qui clive les liaisons alpha-(1,4) entre des résidus d'acide galacturonique non méthylestérifiés, sont ensuite ajoutées et les échantillons sont laissés sous agitation pendant 16 h à 30°C. Le matériel pariétal est alors centrifugé pendant 10 minutes à 5500 g. Afin d'éliminer toutes contaminations par de l'amidon et des xylanes, 100 unités d'alpha-amylase d'*Aspergillus oryzae* (Megazyme) et 50 unités d'endoxylyanase d' *A. niger* (Megazyme) sont ajoutées au surnageant. Les échantillons sont placés sous agitation pendant 16 h à 30 °C puis centrifugés 10 minutes à 5500 g. Les surnageants contenant les pectines sont dialysés contre de l'eau déionisée pendant 2 jours à 4°C, en changeant régulièrement l'eau (seuil de coupure 3500 Da, Spectra/Por® : 3,500). La fraction obtenue est centrifugée 5 minutes à 5500 g et le surnageant est lyophilisé et pesé. La séparation des polysaccharides pectiques est réalisée par une colonne d'exclusion stérique (SEC) Superdex-75 prep grade High resolution 10/30 (Amersham Biosciences) en utilisant une solution de formate d'ammonium 50 mM comme tampon d'élution. Le profil d'élution de chaque fraction est obtenu grâce au logiciel de données chromatographiques Chromeleon 6.80. Les différentes fractions de 2 mL sont ensuite collectées par un collecteur automatique de fractions (Äkta Prime Plus, Biosciences Amersham), puis rassemblées conformément au pic chromatographique correspondant.

## II Préparation et culture des explants de peau humaine

Des plasties cutanées provenant de femmes âgées de 31 à 61 ans, ayant subi une opération de chiruRG-Ie plastique au niveau de l'abdomen, des fesses, de l'intérieur ou de l'extérieur des cuisses sont utilisées pour la réalisation des expériences. Au sein du laboratoire BioEC, expert à la fois dans la préparation d'explants de peau humaine et dans la mise en survie des biopsies cutanées, des explants circulaires d'1 cm de diamètre sont générés à partir de ces plasties après ablation de l'hypoderme et de la majeure partie du derme. Les explants obtenus sont ensuite placés durant 48 h (**Fig. 33a**) dans un milieu de survie appelé BEM® (Bio-EC's medium) puis transférés dans un milieu de culture commercial, le DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (DMEM 12-04, Lonza, Bâle, Suisse). La culture des explants est réalisée dans une enceinte thermostatée à 37° C sous un flux d'air contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Tous les prélèvements ont été réalisés conformément à la Déclaration d'Helsinki.

### III Préparation des souches bactériennes

Les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* (MFP03), *Staphylococcus epidermidis* (MFP04) et *Pseudomonas fluorescens* (MFP05) sont cultivées au laboratoire de Microbiologie du Froid-Signaux et Micro-environnement (LMSM) de l'Université de Rouen. Les précultures bactériennes sont réalisées dans 10 mL de milieu Luria-Bertani (LB) dans des erlenmeyers de 100mL stériles, par ensemencement à partir de colonies bien isolées sur milieu gélosé. Elles sont ensuite incubées à la température optimale de croissance (37°C) pendant une nuit sous agitation orbitale à 180 tours par minute (rpm).

Pour étudier l'impact de la glycomolécule végétale, le RG-II, sur la croissance bactérienne, une gamme de concentration de cette molécule (1 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL et 1mg/mL) est préparée dans de l'eau physiologique. Des suspensions bactériennes de *S. aureus* et *S. epidermidis* sont incubées pendant 24 h dans ces solutions de RG-II. Un suivi de croissance en continu est fait en lecteur de microplaques multimode thermocontrôlé Flx-Xenius XM (SAFAS).

### IV Stimulation *ex-vivo* des explants

Dans toutes les expériences, le repère temporel **T0** (**Fig. 33a**) correspond à des explants maintenus dans le milieu de culture DMEM depuis 24 h soit 3 jours après la réalisation de la plastie.

A la surface des explants, un volume de 10 µL de suspension bactérienne est appliqué sur une étendue d'environ 1 cm<sup>2</sup>, avec une concentration finale de 10<sup>7</sup> bactéries par cm<sup>2</sup>. L'infection bactérienne se fait à T0 ou dans l'heure qui suit ce repère temporel (**Fig. 33**). Le temps de contact des explants avec les bactéries varie entre 3 h et 96 h (**Fig. 33a**). Pour évaluer l'effet des molécules sur la défense en lien avec le microbiome cutané, plusieurs conditions expérimentales ont été réalisées (**Fig. 33b et c**) :

- ✓ **Condition A** (**Fig. 33b**) : une gamme de concentration du RG-II (1µg/mL, 50µg/mL, 100 µg/mL et 1 mg/mL) a été déposée à la surface des explants à T0 pendant 24 h. Ce dépôt n'est pas suivi ni précédé d'infection bactérienne.
- ✓ **Condition B** (**Fig. 33b**) : les bactéries ont été incubées avec l'une des 2 glycomolécules (Téflose : 0,001%, 0,005% et 0,01%; RG-II : 50µg/mL) pendant 24 h, rincées par de l'eau physiologique avant d'être déposées à la surface de l'explant à T0.
- ✓ **Condition C** (**Fig. 33b**) : les bactéries et RG-II 50 µg/mL ont été appliquées à la surface de l'explant de façon simultanément.

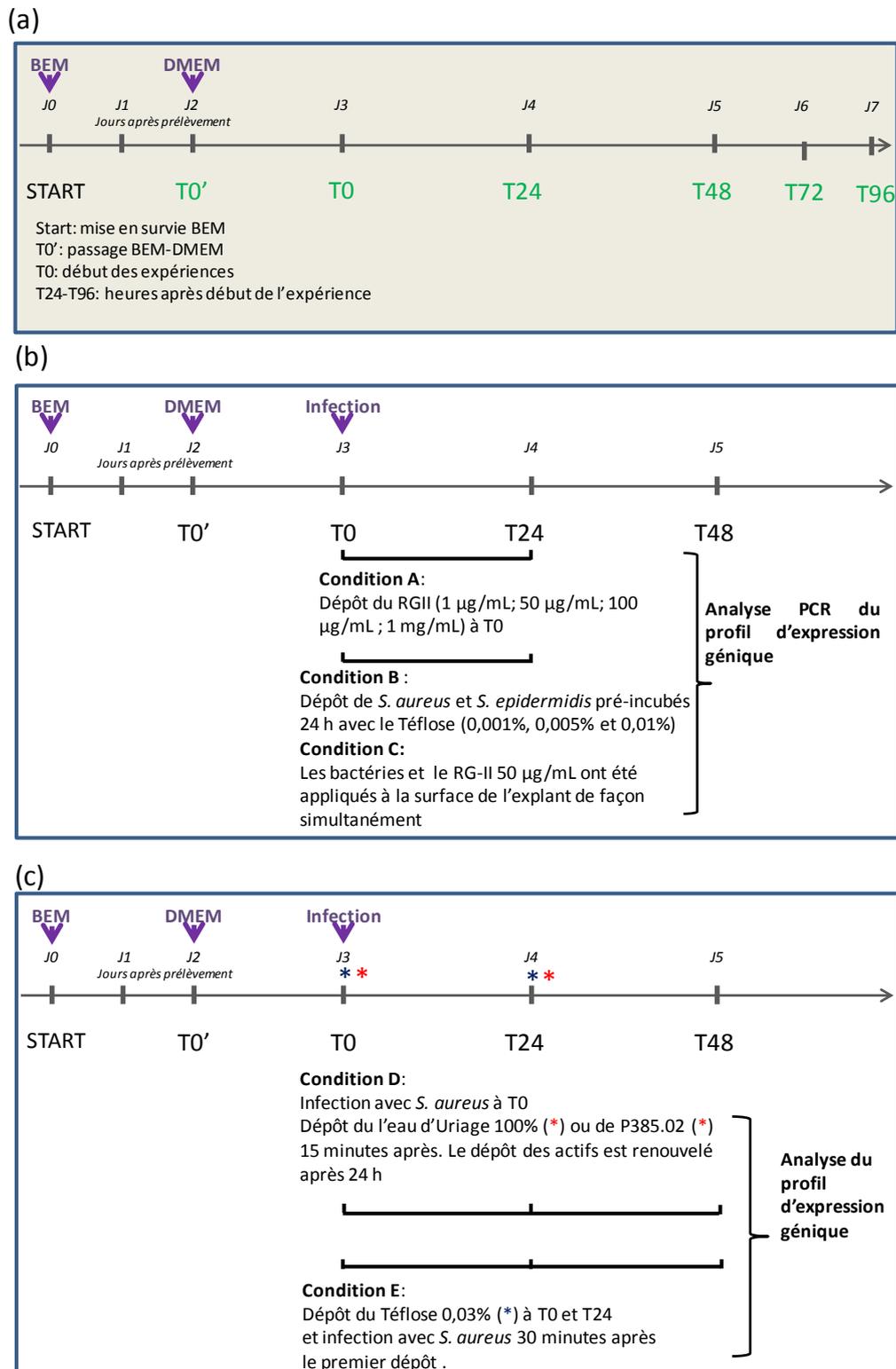
## Matériel et Méthodes

---

- ✓ **Condition D (Fig. 33c)** : les bactéries sont déposées sur l'explant à T0. 15 min et 24 h après le dépôt, les molécules à tester (eau thermale d'Uriage 100% et P 385.02) sont déposées sur l'explant.
- ✓ **Condition E (Fig. 33c)** : le Téfloze est appliqué à la surface de l'explant à T0 et à T24. 30 minutes après la première application du Téfloze, une suspension de *S. aureus* est déposée à la surface de l'explant.

Pour chacune des conditions expérimentales ci-dessus deux types de témoins sont réalisés. Des explants sont maintenus sur le milieu de culture DMEM sans dépôts ni de bactéries ni de composés et d'autres explants sont exposés à l'un des trois germes étudiés sans applications préalable ou postérieure de molécules.

# Matériel et Méthodes



**Figure 33. Stimulation *ex-vivo* de l'explant : conditions expérimentales.** Les différentes conditions testées dans ce travail sont montrées dans cette figure. En (a), les différents repères temporels. En (b) et (c) les conditions analysées et relatives à l'impact des deux glycomolécules sur la physiologie de l'explant en lien avec la microflore cutanée.

### V Analyse du profil d'expression génique

L'expression des gènes liés aux mécanismes de défense innée est analysée et comparée entre des explants témoins non traités et des explants traités selon l'une des conditions expérimentales citées au paragraphe IV (**Fig. 33**). Pour ce type d'expérience, les explants témoins et traités sont fixés dans de l'isopentane refroidi au préalable dans de la carboglace et stockés à -80 °C. L'analyse transcriptomique est menée soit sur toute l'épaisseur de l'explant soit sur des zones épidermiques isolées par microdissection laser.

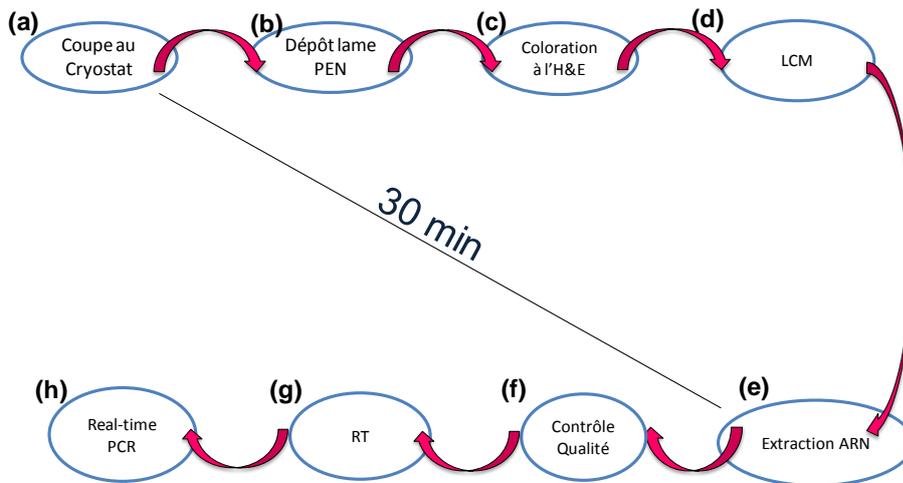
#### V.I Microdissection laser

Des sections transversales d'explants de 12 à 14 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat (Leica CM1950) et sont recueillies sur des lames en polyéthylène naphthalate, ou lames PEN, préalablement traitées avec de la RNase ZAP (Sigma-Aldrich). Les sections sont ensuite fixées dans de l'éthanol 70 % (v/v) et colorées à l'hématoxyline et éosine (H&E) (Sigma-Aldrich). Juste avant la microdissection, les tissus sont déshydratés en immergeant les lames pendant 30 secondes dans des concentrations croissantes d'éthanol (70 % et 100 %).

La microdissection laser est réalisée en utilisant l'appareil Palm Robot MicroBeam (Carl Zeiss) couplé à un microscope inversé avec un objectif X20 et équipé d'un laser à UVA avec un foyer optique de diamètre < 1 µm. Des fractions d'épiderme enrichies en kératinocytes de la couche basale ou granuleuse sont ensuite catapultées dans le capuchon d'un tube eppendorf contenant 34 µL du tampon de lyse RLT (Qiagen) et du bêta-mercaptoéthanol 1 % (v/v) (Sigma-Aldrich).

#### V.II Extraction de l'ARN à partir des tissus microdisséqués

Les ARN totaux sont extraits en utilisant le kit RNase Micro Kit (Qiagen). L'ARN est élué dans 14 µL d'eau RNase-free. Dans le but d'éliminer toutes contaminations par de l'ADN génomique, un traitement à la DNaseI est effectué par le kit RNase-free DNase Set (Qiagen). Les échantillons sont ensuite analysés par un système d'électrophorèse capillaire microfluidique (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) afin d'estimer la quantité et de déterminer la qualité des ARN totaux (**Fig. 34**).



**Figure 34. Microdissection et PCR en temps réel : du tissu au gène.** Des sections de peau de 8  $\mu\text{m}$  sont coupées à froid au cryostat (a). Après dépôt des sections de peau sur des lames PEN (b) et coloration des tissus à l'H&E (c), deux fractions enrichies en kératinocytes de la couche basale ou de la couche granuleuse sont isolées par LCM (d), et catapultées dans un capuchon contenant 34  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse cellulaire (e). La qualité de l'ARN est vérifiée et la concentration estimée par le Bioanalyseur 2100 (f). Les ARNs sont ensuite rétrotranscrits (g) et le profil d'expression est analysé par PCR en temps réel (h). Abréviations : H&E, hématoxyline et éosine; PEN, polyéthylène naphthalate; RT, rétrotranscription.

### V.III Extraction de l'ARN à partir de tranche entière d'explants

Pour l'extraction de l'ARN à partir de tranche entière d'explants, les échantillons sont coupés sur un cryostat et environ 50 sections de 15  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont récoltées dans un tube eppendorf contenant 1 mL du tampon d'extraction RA1 (Machery-Nagel) et 1% (v/v) de bêta-mercaptoéthanol. Les ARNs totaux sont ensuite extraits par le kit NucleoSpin® RNAII Kit (Machery-Nagel). L'ARN est dilué dans 40  $\mu\text{L}$  d'eau RNase-free. Afin d'éliminer toutes les contaminations par de l'ADN génomique, un traitement à la DNaseI est effectué. La concentration de l'ARN est tout d'abord déterminée par un spectrophotomètre Nano Drop® (ND-1000 Spectrophotomètre, LabTech) puis, environ 5 ng des ARN totaux sont analysés par électrophorèse microfluidique afin d'en déterminer la qualité.

### V.IV Rétrotranscription et PCR quantitative en temps réel

Environ 5 ng d'ARN sont rétrotranscrits par un mélange de 20  $\mu\text{L}$  contenant 4  $\mu\text{L}$  du tampon Qantitec 5X, 1  $\mu\text{L}$  d'un mélange d'amorces et 1  $\mu\text{L}$  de l'enzyme transcriptase inverse Qantitec (Qantitec Reverse Transcription Kit, Qiagen).

Successivement, 3  $\mu\text{L}$  d'ADNc dilué au 1 : 10 sont amplifiés par le thermocycleur 7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystem) par une réaction de 13  $\mu\text{L}$  finaux contenant du tampon 2X SYBR Green Master Mix et les amorces sens et anti-sens à une concentration finale de 300 nM. Les paramètres de l'amplification sont les suivants : un cycle de dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, suivi par 40 cycles d'amplification à 95 °C pendant 3 secondes et un cycle à 60 °C pendant 30 secondes. Afin d'évaluer la spécificité des amorces, une étape finale de dissociation est réalisée à 95°C pendant 15 secondes suivie par un cycle à 60°C pendant une minute, un cycle à 95°C pendant 15 secondes et un dernier cycle à 60°C pendant 15 secondes. Les amorces spécifiques des gènes analysés dans ce travail ont été conçues à l'aide du logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystem). Leur efficacité et leur spécificité ont été vérifiées avec précision par la construction de courbes standard et de courbes de dissociation. Les gènes de référence utilisés dans ce projet ont été sélectionnés en utilisant le logiciel GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) et NormFinder (Andersen *et al.*, 2004).

### **V.V Analyses statistiques des données de qPCR**

Les différences, entre les explants non-traités et traités, en terme de niveau de transcrits sont déterminées par la méthode du  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak *et al.*, 2001). La protéine ribosomale large P0 (RPLP0) et la bêta-microglobuline 2 (B2M) sont utilisées comme gènes de référence. Les données sont analysées statistiquement par un test de Mann-Whitney ou le test de Student pour des échantillons indépendants en utilisant le logiciel GraphPadPrism version 5 (GraphPad Software, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com), La Jolla, California). La valeur de probabilité  $p$  est considérée statistiquement significative quand elle est inférieure à 0,05.

## **VI Analyses microscopiques**

### **VI.I Microscopie optique : analyses morphologiques et immunofluorescence**

Pour les analyses morphologiques, les explants sont fixés pendant 24 heures dans une solution de formol. Une fois déshydratés, les échantillons sont substitués dans une solution constituée par un mélange de paraffine et d'acétone en utilisant l'automate de déshydratation Leica TP 1020. Successivement, les explants de peau sont enrésinés dans de la paraffine par l'automate d'enrésinement Leica EG 1160. Des coupes histologiques de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont ensuite coupées sur un microtome (Leica RM 2125), recueillies sur des lames histologiques Superfrost® et colorées par la coloration trichromique de Masson variante

## Matériel et Méthodes

---

Goldner. Les échantillons sont observés par un microscope Orthoplan équipé d'une camera Sony CCD DXC 390 et analysés par le logiciel Leica IM1000.

Pour les analyses d'immunofluorescence, les explants de peau sont fixés dans une solution d'isopentane préalablement refroidi à - 80°C dans de la carboglace. Des sections de 8 µm ont été ensuite coupées au cryostat. Pour la détection des épitopes associés aux protéines cornéodesmosine (CDNS), Claudine-4, psoriasine, hDB2 et hBD3, les sections de peau sont fixées dans une solution de PFA 4% (v/v) diluée dans du Tampon Phosphate salin (PBS) (8g/L NaCl, 0,29 g/L KCl, 1,45 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1M, pH 7,3) à 37 °C pendant 10 minutes et ensuite perméabilisées pendant 15 minutes à température ambiante par une solution de Triton X100 diluée dans du PBS.

Pour les immunolocalisations de l'intégrine bêta-4 et de l'IL-6, les sections sont fixées dans de l'acétone pendant 10 minutes à -20 °C. Après fixation, les échantillons sont saturés dans une solution de PBS-BSA 1% et incubés pendant 2 heures à 30 °C avec les anticorps primaires dilués dans du PBS-BSA 1% (**Tableau 5**). Après rinçage dans une solution de PBS, les échantillons sont incubés 1 heure à l'obscurité à 30 °C en présence de l'anticorps secondaire couplé à une molécule d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Sigma Aldrich; longueur d'onde d'excitation : 488 nm; fenêtre d'émission : 510-535 nm) dilué 1 :50 dans une solution PBS-BSA 1%. Après plusieurs rinçages au PBS, les noyaux sont marqués avec une solution aqueuse d'iodure de propidium à 0.2 mg/mL (Sigma Aldrich; longueur d'onde d'excitation : 514 nm; fenêtre d'émission : 610-635 nm) ou en utilisant la solution UltraCruz™ Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology, sc-24921). Les échantillons sont observés au microscope Leica DLMB équipé d'une camera DPC300FX.

## Matériel et Méthodes

**Tableau 5. Anticorps utilisés : origine, référence et dilution utilisée.** Abréviations : IF, immunofluorescence; MET, microscopie électronique à transmission; n. e., non effectué.

Anticorps	Origine	Référence	Dilution	
			IF	MET
anti-Claudine 4	Lapin	Abcam ab15104	1 : 25	n. e.
anti-CDNS	Lapin	Abcam ab90517	1 : 50	1 : 50
anti-hBD2	Lapin	Santa Cruz Biotechnology, sc-20798	1 : 60	1 : 25
anti-hBD3	Lapin	Santa Cruz Biotechnology, sc-30115	1 : 40	1 : 100
anti-IL 6	Lapin	Abcam, ab6672	1 : 60	1 : 125
anti-Intégrine bêta-4	Souris	Millipore MAB1964	1 : 200	n. e.
anti-kératine 2	Mouse	Progen Ks 2.398.3.1	n. e.	1 : 100
anti-kératine 14	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, sc-58724	n. e.	1 : 100
anti-RNase7	lapin	Sigma, HPA005690	n. e.	1 : 50
anti-RG-II	lapin	Match <i>et al.</i> , 2000	1 : 50	n. e.
anti-psoriasine	souris	Abcam ab13680	1 : 50	1 : 35

Pour l'immunodétection de la caspase-1, des sections paraffinées de 5 µm d'épaisseur sont incubées 2 heures avec l'anticorps monoclonal anti-Caspase-1 (Epitomix) dilué 1 : 200 dans une solution de PBS-BSA 1%. Après rinçage au PBS, les échantillons sont incubés avec un anticorps secondaire couplé à la streptavidine-biotine (Epitomix, Vecteur PK.7200) et le marquage est ensuite révélé par le système VIP (Epitomox, Vecteur SK-4600).

### VI.II Microscopie électronique à transmission

Pour toutes les analyses ultrastructurales ou immunocytochimiques, les explants de peau traités par les agents bactériens sont systématiquement préfixés dans la solution de fixation aldéhydique pendant 1h à température ambiante. Cette étape a pour objectif de stériliser les explants afin d'éviter la contamination des équipements utilisés dans les étapes ultérieures de préparation. Les explants de peau témoin (non exposés aux bactéries) sont donc pré-fixés de la même façon.

### VI.II.1 Fixation chimique

Les explants sont pré-fixés par une solution contenant 2% de paraformaldéhyde (PFA) et 2% de glutaraldéhyde (GA) dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,3 1 heure à température ambiante. Les explants pré-fixés sont dermatisés et fractionnés en disques de 3 mm<sup>3</sup>. Les spécimens sont à nouveau fixés dans la même solution de fixation pendant une heure, rincés avec du PBS et post-fixés dans une solution aqueuse de tétroxyde d'osmium pendant une heure à 4°C. Après rinçage dans de l'eau distillée, les échantillons sont déshydratés à température ambiante. L'étape d'infiltration est réalisée dans un mélange de résine Spurr et méthanol (1 :2, 1 : 1, 2 : 1) (Spurr Low Viscosity Embedding Kit; Biovalley). Dans une dernière étape, la résine est polymérisée à 60°C pendant 24 heures.

### VI.II.2 Congélation haute pression (HPF) et substitution à froid

Les explants sont pré-fixés 1 heure par une solution aldéhydique (2 % PFA (v/v) et 0,5 % GA (v/v) dans du PBS pH 7.2. Ils sont alors lavés dans le tampon de fixation, avant d'être partiellement dermatisés et coupés à l'aide d'un scalpel et d'un emporte pièce en disques de 1 mm de diamètre et de 200 µm d'épaisseur. Successivement les échantillons, avec le derme vers le bas, sont placés dans une cupule préalablement revêtue avec une solution de lécithine de soja 1% (v/v) dans du chloroforme et chargés dans un porte spécimen plat (Leica). Une solution d'hexadecene 1% (v/v) est utilisée en tant que cryoprotectant et ajoutée sur chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite cryo-fixés dans l'automate de congélation haute pression HPF-EM-PACT I (Leica) (Studer *et al.*, 2001), avec un taux de refroidissement maximal de 15000 °C/sec. Une fois cette étape terminée, les échantillons sont transférés dans l'automate de substitution AFS (Leica). La cryo-substitution est réalisée dans un milieu contenant du méthanol et de l'acétate d'uranyle 0,5 % (v/v). Les conditions de cryodéshydratation sont les mêmes que celles décrites par Chevalier *et al.* (2010) : - 90°C pendant 72 h, - 60°C pendant 12 h et - 30°C pendant 12 h. Après la substitution, les échantillons sont rincés deux fois dans du méthanol à température ambiante. Les infiltrations sont alors réalisées à - 15 °C dans un mélange de résine LR White (Biovalley) et méthanol (ratio 1 :2; 1 :1; 2 :1, 8 heures chaque étape). La polymérisation de la résine se fait à -15°C pendant 48 h sous l'action des UV.

### VI.II.3 Analyses ultrastructurales et Immunogold

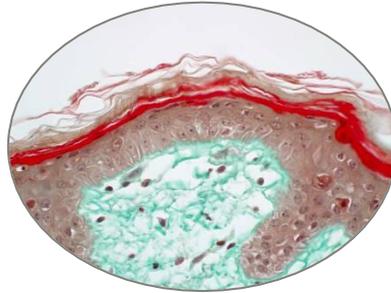
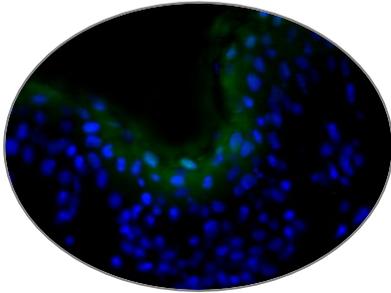
Les échantillons sont coupés sur un ultramicrotome (Leica) à l'aide d'un couteau de diamant. Les sections ultra-fines de 90 nm d'épaisseur sont recueillies sur des grilles de nickel recouvertes d'une membrane de formvar. L'immunolocalisation est réalisée selon le protocole développé par Chevalier *et al.*, 2010. Les sections sont incubées avec une solution de glycine 0.1 M dans du TBS (*Tris-Buffered Saline*) et successivement perméabilisées dans une solution de Tween 0,2 % (v/v). Après rinçage dans du TBS, les sections sont saturées par une solution de TBS-BSA 1% pendant 30 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite incubés 2 heures avec les anticorps primaires dilués dans une solution de TBS-BSA 1% (**Tableau 5**).

Successivement, les sections sont rincées 6 fois dans une solution de TBS/BSA 1% et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à une particule d'or colloïdal de 10 nm de diamètre (British BioCell International). Après rinçage dans une solution de TBS-BSA 1%, les échantillons sont post-fixés dans une solution de TBS-GA 2% (v/v). Avant leur observation au microscope électronique à transmission (Philips Tecnai 12 Biotwin FEI), les échantillons sont contrastés par des vapeurs de tétroxide d'osmium 0,2 % (v/v) et par une coloration classique à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

### VII Test ELISA

La quantification de l'IL-6 présente dans le milieu de culture est réalisée par le kit Cayman Elisa Kit (Cayman chemical). Le milieu de survie est récolté à la fin de chaque traitement, dilué dans du DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) et incubé pendant une nuit à 4 °C avec l'anticorps biotyliné anti-IL-6. Les échantillons sont ensuite incubés avec l'anticorps secondaire couplé à l'acétylcholinestérase. Au bout de 2 heures, le réactif d'Ellman est ajouté aux échantillons. L'absorbance est mesurée à 405-420 nm par le lecteur de plaques M200Pro Tecan et analysé par le logiciel Magellan 7.

# Résultats





## Chapitre Troisième : Résultats

### I Analyse d'expression génique au sein de l'épiderme et caractéristiques ultrastructurales des explants

Publication n.° 1: « *Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection: application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR* »

**Giuseppe Percoco**, Magalie Bénard, Yasmina Ramdani, Elian Lati, Luc Lefevre, Azeddine Driouich et Marie-Laure Follet-Gueye

*Experimental Dermatology* (2012). **21**, 531–534.

La peau est constituée de trois couches cellulaires, l'hypoderme, le derme et l'épiderme et de plusieurs types cellulaires. L'épiderme, en tant que couche la plus superficielle de la peau, joue un rôle majeur dans la défense contre les agents biotiques et abiotiques de l'environnement. Les kératinocytes, le type cellulaire le plus abondant au sein des différentes couches épidermiques, sont impliqués directement dans cette interaction environnement-cellules cutanées. En recherche dermatologique, de nombreuses études ont visé à comprendre les mécanismes cellulaires utilisés spécifiquement par les cellules épidermiques pour faire face aux stress environnementaux. Afin d'extraire des acides ribonucléiques ou des protéines spécifiques de l'épiderme, le développement de techniques de séparation de l'épiderme du derme a été nécessaire. Plusieurs méthodes de séparation dermo-épidermique ont été développées ces dernières années : **i**) la séparation chimique par le thiocyanate d'ammonium (Clemmensen *et al.*, 2009) ou le chlorure de sodium (Willstead *et al.*, 1991), **ii**) l'utilisation d'enzymes type trypsine (Toulza *et al.*, 2007) ou dispase (Kitano et Okada, 1983), **iii**) la séparation de l'épiderme par un traitement thermique (Allen *et al.*, 1997). Cependant, ces approches méthodologiques ne sont pas toutes compatibles avec une analyse transcriptomique en aval, dû très fréquemment à une dégradation des acides ribonucléiques. La microdissection laser (LCM, *laser capture microdissection*) est une technique relativement récente qui permet l'isolement d'une zone d'intérêt à partir d'un tissu hétérogène (Espina *et al.*, 2006).

Le but de la première partie de ma thèse, a été de développer une méthode de séparation de deux fractions enrichies en kératinocytes de la couche basale et en kératinocytes de la couche granuleuse afin d'étudier le profil d'expression de différents gènes codant soit

## Résultats

---

pour des protéines structurales soit pour des protéines impliquées dans la défense innée, telles que les peptides antimicrobiens et les récepteurs toll-like. Les résultats relatifs à cette partie ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans la revue *Experimental Dermatology* en 2012 sous le titre : « *Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection: application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR* ».

Les différents protocoles de préparation des échantillons pour la LCM, les paramètres pour une microdissection rapide et efficace du tissu, et les résultats concernant les différences entre les deux fractions isolées en terme d'expression génique, sont décrits en détail dans cet article présenté ci-dessous.

## Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection: application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR

Giuseppe Percoco<sup>1</sup>, Magalie Bénard<sup>2</sup>, Yasmina Ramdani<sup>1</sup>, Elian Lati<sup>3</sup>, Luc Lefevre<sup>4</sup>, Azeddine Driouich<sup>1,2</sup> and Marie-Laure Follet-Gueye<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Glycobiology and Plant Extracellular Matrix (GlycoMEV) Laboratory, UPRES EA 4358, IFRMP 23, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France; <sup>2</sup>The Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), IFRMP23, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France; <sup>3</sup>BIO-EC laboratory, Longjumeau, France; <sup>4</sup>Laboratoires Dermatologique d'Uriage, Courbevoie, France

Correspondence: Marie-Laure Follet-Gueye, PhD, GlycoMEV, UPRES EA 4358, IFRMP 23, University of Rouen, Bâtiment Henri Gadeau de Kerville, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France, Tel.: (33)2-35-14-00 39, Fax: (33)2-35-14-66-15, e-mail: marie-laure.follet-gueye@univ-rouen.fr

**Abstract:** We describe, for the first time, an efficient protocol based on laser capture microdissection (LCM) for the isolation of human epidermal layers for gene expression profiling using quantitative real-time PCR. Two areas enriched either in basal or granular layers were isolated by LCM. Skin biopsies were fixed in dry ice-cooled isopentane, cryosectioned and stained before the laser procedure. High-quality total RNA was extracted from each microdissected sample, which allowed the analysis of the spatial distribution of mRNA transcripts from 10 innate immunity-related genes within the epidermal layers. Using integrin alpha-6/integrin beta-4 and corneodesmosin/filaggrin-2 sets as gene markers for the basal and granular layers, respectively, we showed

that Toll-like receptor 2, RNase 7, human beta-defensin-2 and -3, psoriasin and nucleotide-binding oligomerization domain 1 are upregulated in the suprabasal layer of normal human epidermis. Our protocol, which is based on the rapid isolation of epidermal layers, can be used to follow transcriptional processes in specific areas of the epidermis and is a very promising tool to use in the study of numerous aspects of dermatology.

**Key words:** gene expression – human epidermis – laser capture microdissection – quantitative real-time PCR

Accepted for publication 11 April 2012

### Introduction

The skin is a stratified tissue that comprises three main compartments: the epidermis, the dermis and the hypodermis. The epidermis provides the organism with a multiple barrier, including water loss prevention (1) and defense against abiotic (2, 3) and biotic stresses (4–6). It consists of four distinct keratinocyte layers: the stratum basale (SB), the stratum spinosum (SP), the stratum granulosum (SG) and the uppermost stratum corneum (SC). During their journey from the SB to the SC, keratinocytes differentiate and sequentially turn on and off a series of specific genes. Most of them remain to be described. To identify new genes/proteins acting in this differentiation programme and to better understand the nature of the epidermal natural barrier, it is a crucial step to accurately isolate the various epidermis layers and extract the corresponding mRNAs. So far, different methods have been used to perform dermo-epidermal separation (7–9). Clemmensen et al. (7) improved a protocol that was based on the incubation of full-thickness skin biopsies with ammonium thiocyanate to obtain microarray data specific for epidermal cells. Toulza et al. (8) developed an original method that combined thermolysin treatment with trypsin digestion of the epidermis to investigate the patterns of gene expression profiling across the epidermis.

Laser capture microdissection (LCM) is a technique that allows an area of interest to be isolated from a heterogeneous tissue (10). During recent years, LCM has been applied to different fields of dermatological research, including the study of skin ageing (11), investigation of the effects of ultraviolet (UV) irradiation (12), research on cutaneous melanoma (13–15) and hair biology

research (16,17). To date, few studies have been devoted to the separation of the epidermal layers by LCM (12, 18). Here, we describe an optimized protocol for the preparation of samples by LCM. The protocol allowed the isolation of two human epidermal fractions that were enriched in keratinocytes from the SB and SG and could be used for downstream analysis like gene expression profile by quantitative real-time PCR (qPCR). This method could be applied to different aspects of dermatological research.

### Materials and methods

#### Human skin explants

Normal human skin biopsies were obtained from patients undergoing cosmetic surgery procedures, after they had provided informed consent. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The explants used were obtained after plastic surgery on healthy female donors aged 31–61 years. Abdominal area explants were derived from three different donors, whereas explants from internal thigh, external thigh and buttock areas were sourced from a single donor. The subcutaneous fat was removed from the skin, and the explants of approximately 1 cm in diameter were excised using a circular scalpel. The explants were placed in BIO-EC's explant medium (BEM) and cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Half of the medium was replaced with fresh medium every 2 days.

#### Preparation of the sample for laser capture microdissection

Data S1 the skin explants were fixed in dry ice-cooled isopentane and stored at –80°C until sectioning. The frozen samples were sectioned (12–14 µm sections) on a cryostat (Leica CM1950; Leica, Rueil-Malmaison, France) and transferred to glass slides that were coated with poly-ethylene-naphthalene (PEN, Membrane

Slide 1.0 PEN; Carl Zeiss, Le Pecq, France) and had been treated previously with RNase Zap (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and activated by exposure to UV. The sections were fixed in 70% ethanol for 10 s and stained successively with a classical haematoxylin and eosin (H&E) protocol. Briefly, the sections were stained by immersion in modified Harris haematoxylin solution (Sigma-Aldrich) for 1 min and then rinsed in 100% ethanol before staining in Eosin Y (Sigma-Aldrich) for 30 s. Just before the LCM procedure, the samples were dehydrated for a few seconds with increasing concentrations of ethanol (70 and 100%).

#### Laser capture microdissection

The LCM was performed using a Palm Robot MicroBeam apparatus (Carl Zeiss), by applying a pulsed UVA laser beam (focal spot  $<1 \mu\text{m}$ ) through an inverted microscope with an  $\times 20$  objective. After microdissection, keratinocytes from the SB- and SG-enriched fractions were collected by catapulting them into a tube cap of a tube that contained  $34 \mu\text{l}$  of RLT lysis buffer (Qiagen, Courtaboeuf, France) with 1%  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). For the study, we isolated two fractions from four explants of different origin using LCM.

#### RNA extraction, assessment of quality and reverse transcription

Total RNA was extracted using an RNeasy Micro kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. The RNA was eluted with  $10 \mu\text{l}$  of RNase-free water. DNase I treatment (RNase-Free DNase Set; Qiagen) was performed to remove contaminating genomic DNA. The quality of the RNA was assessed, and the quantity was estimated by microfluidic capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies, Massy, France). Approximately 5 ng of RNA were reverse-transcribed in a 20-ml reaction that contained  $5\times$  QuantiTec Buffer, RT Primer Mix and QuantiScript Reverse Transcriptase from a QuantiTec Reverse Transcription kit (Qiagen).

#### Quantitative real-time PCR

Amplification reactions were performed using a 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) in a final reaction volume of  $13 \mu\text{l}$ , which contained  $2\times$  SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM forward and reverse primers and the template cDNA. The thermal cycling conditions involved a denaturation step at  $95^\circ\text{C}$  for 20 s, followed by 40 cycles of amplification at  $95^\circ\text{C}$  for 3 s and  $60^\circ\text{C}$  for 30 s. The final dissociation step was performed at  $95^\circ\text{C}$  for 15 s,  $60^\circ\text{C}$  for 1 min,  $95^\circ\text{C}$  for 15 s and  $60^\circ\text{C}$  for 15 s. When possible, intron-spanning primers (Table S1) were designed using Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems). The efficiency and specificity of each of the primers were verified accurately (Figs S1 and S2).

#### Selection of reference genes

Reference genes were selected using two different VBA applets: GeNorm (version 3.5) (19) and NormFinder (version 20) (20).

#### Statistical analysis

The ratio in gene expressions between SB- and SG-enriched fractions was determined using  $\Delta\Delta C_t$  methods and were calculated using the SB expression profile as a reference, except for integrin  $\alpha$ -6, integrin  $\beta$ -4 and keratin 14 for which the SG expression profile was used as a reference. The data from each experiment were analysed statistically by Student's *t*-test (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA; www.graphpad.com). Differences were considered statistically significant when  $P \leq 0.05$ .

## Results

### Preparation of skin biopsies for LCM

The choice of fixation protocol is crucial to preserve the optimal RNA integrity required for downstream molecular analysis. First, we compared four different methods of skin fixation (Table S2). The results showed that the use of dry ice-cooled isopentane ensured the integrity of the nucleic acids and resulted in an RNA integrity number (RIN) of 8.1 (Table S2).

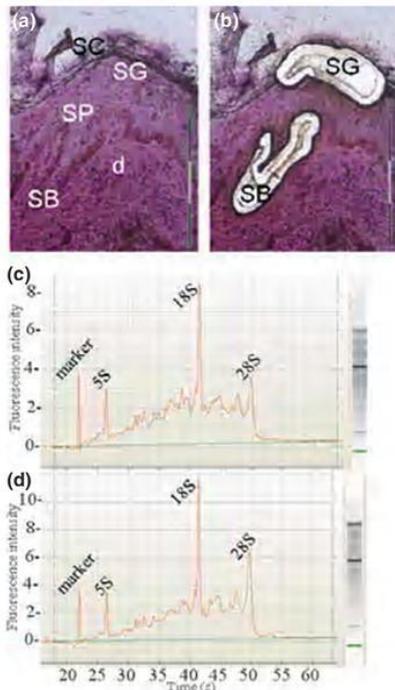
In parallel, accurate visualization of the tissue is essential to recognize different layers of the epidermis, and a staining protocol that does not interfere with the preservation of RNA integrity is required. To this end, four staining protocols were tested (Table S2). The best results were obtained using H&E staining, which had very little effect on RNA integrity (Table S2). Fixation with cold isopentane coupled with H&E staining, which allowed the optimal tissue preservation necessary for the recognition of the different epidermal layers, was adopted (Fig. 1).

We also determined that RNA extraction should be performed within 30 min after cryosectioning to avoid any RNA degradation (Fig. 2). Otherwise, we established the optimal size of the area to be microdissected and optimal relative thickness of the sections. Fine sections ( $\leq 10 \mu\text{m}$ ) showed a better morphological structure, but a larger amount of material was required for the downstream analysis of gene expression. To isolate the SB-enriched fraction, sections that were  $14\text{--}\mu\text{m}$  thick were selected to identify the epidermal layers and to collect a sufficient amount of material. We established that an area of  $0.5\text{--}0.7 \text{ mm}^2$  was required to detect gene expression by qPCR (corresponding to  $1148 \pm 416.8 \text{ pg}/\mu\text{l}$  of mRNA in this fraction). In contrast, the SG is connected closely with the SC, the layer of the epidermis that is rich in extracellular matrix, which means that it is more difficult to isolate by LCM. For this reason, we prepared areas of  $0.8\text{--}1 \text{ mm}^2$  from sections that were  $12\text{--}\mu\text{m}$  thick to isolate the SG (corresponding to  $972.1 \pm 198.8 \text{ pg}/\mu\text{l}$  of mRNA in this fraction).

In addition, to avoid degradation of the sample, we recommend using fresh lysis buffer for each microdissected section collecting the resulting material in separate Eppendorf tubes and combining the total sample at the end of the experiment.

### Analysis of epidermal layer-specific gene expression by qPCR

After LCM, the gene expression profile of each fraction obtained was investigated using qPCR. First, we analysed the expression of 10 reference genes (Table S3), and we showed that the genes encoding the ribosomal proteins RPL13A and RPLP0 (Fig. S3) were the best reference genes. However, to avoid redundancy of the findings, which would have resulted from using two reference genes that both encoded ribosomal proteins, we used RPLP0 and B2M, which was the third highest scoring reference gene. To validate our method for the separation of epidermal layers by LCM, we analysed the gene expression profiles of 10 structure-related genes. The expression and spatial distribution of these structural proteins, which included desmoglein-1 (*dsg-1*) (21), keratin 14 (22), filaggrin-2 (*FLG-2*) (23) and integrins (24), across the epidermal layers are reasonably well characterized, which allowed us to interpret the results relatively easily. As expected, all the structural genes analysed showed a distinct expression pattern in the SB- and SG-enriched fractions (Fig. 3a). Three genes, keratin 14, integrin  $\alpha$ -6 and integrin  $\beta$ -4, showed significant upregu-

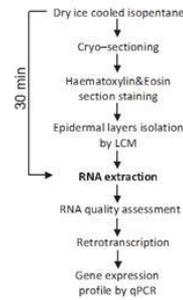


**Figure 1.** Isolation of epidermal layers by laser capture microdissection (LCM) and assessment of RNA quality. Sections (12–14  $\mu\text{m}$  in thickness) were stained with H&E before LCM processing. As shown in (a), the different layers of the human epidermis were clearly visible, which allowed the isolation of two fractions enriched in keratinocytes from the basal and granular layers. The RNA from the microdissected tissues was analysed subsequently by microfluidic capillary electrophoresis. As shown in the respective electropherograms, both basal (c) and granular (d) layer-enriched fractions showed a satisfactory preservation of RNA, resulting in a RNA integrity number of  $5.7 \pm 0.4$  (c) and  $5.5 \pm 0.4$  (d), respectively. The ribosomal subunits 5S, 18S and 28S are clearly identifiable. d, dermis; SB, stratum basale; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SP, stratum spinosum. Scale bar: 150  $\mu\text{m}$ .

lation in the basal layer, whereas the expression of claudin-4, FLG-2 and corneodesmosin (CDSN) was strongly upregulated in the upper layers of the epidermis. In subsequent expression analysis, we decided to use integrin  $\alpha$ -6 and integrin  $\beta$ -4 as markers of the SB-enriched fraction and FLG-2 and CDSN for the SG-enriched fraction to validate the correct isolation of the area of interest by LCM. These results were confirmed using explants sampled from different body sites (Fig. S4). We also analysed the expression of 10 defense-related genes (Fig. 3b), and we showed that the expression of most of them was upregulated significantly in the SG layer of the epidermis. Other defensive genes studied in this work did not show any difference of expression between the two layers. The levels of expression of these defense-related genes were also analysed using biopsies of different origins and the same trend was observed (Fig. S5). We confirmed this spatial distribution across the epidermal layers at protein level by immunostaining (Data S2 and Fig. S6).

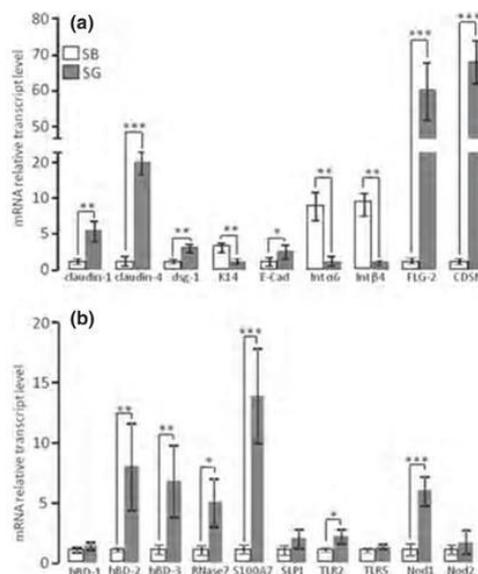
### Discussion

The epidermis plays key roles in skin barrier function, including waterproofness (1), defense against environmental stresses (2–6) and wound healing (25, 26). In this pluristratified epithelium,



**Figure 2.** Protocol for analysis of gene expression using human skin biopsy specimens subjected to laser capture microdissection. To maintain acceptable integrity of nucleic acids, the microdissected area of interest should be collected in lysis buffer within 30 min after cryosectioning.

keratinocyte proliferation occurs only in the basal layer whereas these cells differentiate throughout their journey in the spinous and granular layer. Moreover, the epidermal layers contribute differently to the defense against pathogens because of the specific localization of antimicrobial peptides (AMPs) (4, 27) and TLRs (28, 29). For isolation of the epidermis, several protocols based on chemical methods (9), compatible with qPCR analysis, have been described. Alternatively, Yazdi et al. (30) have optimized an LCM-based method to microdissect epidermal cells suitable for DNA but not RNA extraction. Ruetze et al. (18) have improved a protocol for extraction from specific epidermal cells, but without performing gene expression profiling by qPCR. Here, we optimized an LCM-based protocol to isolate for the first time two fractions



**Figure 3.** Gene expression analysis across epidermal layers. Fractions enriched in the basal layer or granular layer were analysed by qPCR to quantify the expression of structure-related (a) and defense-related (b) genes. Statistically significant differences were observed for both structural and defense-related genes. Except for K14, integrin  $\alpha$ -6 and integrin  $\beta$ -4, all the other structural genes were expressed specifically in the fraction enriched for the granular layer. Similarly, the majority of the genes implicated in the innate immunity were upregulated in the suprabasal layers of the epidermis. Three different biopsies from three different female donors were microdissected ( $N = 3$ ), and three explants for each donor have been processed ( $n = 9$ ). \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .

enriched in keratinocytes from either the basal or granular epidermal layers. The technique is compatible for subsequent molecular analysis by qPCR. Different methods of fixation, including the use of alcohol-based agents such as methanol and ethanol (31, 32), cross-linking reagents such as formalin (33–35) or dithio-bis succinimidyl propionate (DSP) (36) and cryomethods, such as plunging into liquid nitrogen (12, 13, 37), have been employed previously for sample preparation. These approaches affect RNA integrity differently. In this study, we showed that fixation of the skin with cold isopentane, coupled with H&E staining, ensured the highest quality of total RNA. However, we observed that when very small areas of epidermis, such as a specific layer, were microdissected, RIN values decreased significantly without affecting the qPCR analysis. The ratios, in the expression of the genes used as marker for each fraction,  $\geq 10$ -fold for integrin  $\alpha$ -6/integrin  $\beta$ -4 and  $\geq 60$ -fold for CDNS/FLG-2, demonstrated the efficacy of LCM method to isolate the SB from the SG. We then used the cDNA produced from both fractions to analyse the levels of mRNA of genes related to innate immunity encoding for several AMPs, TLRs and Nod receptors. We showed that, in healthy human skin, the expression of hBD-2 and -3, RNase 7, psoriasin and the receptors TLR2 and Nod1 was predominant in the uppermost layers of the epidermis, which confirmed that their expression is related to the degree of differentiation of the keratinocytes as previously described (5, 38–40). A similar expression profile was observed using biopsy sampled from other body sites (internal and external thigh and buttock).

The LCM protocol described here allowed the isolation of different layers of the human epidermis and provided high-quality RNA compatible with gene expression profiling by qPCR. Our method might represent a valid support for immunohistochemical analysis and could be used to elucidate the transcriptional mechanism involved in the cutaneous response to environmental stress factors or that related to a particular pathological state.

## Acknowledgements

This work was supported by 'Le Pôle de compétitivité de la Cosmetic Valley' and the 'FEDER' (Fonds Européens de Développement Régional) in the frame of 'Skinoflor' project. Images and data were obtained on PRIMACEN (<http://primacen.crihan.fr>): The Cell Imaging Platform of Normandy, SFR IRIB, Faculty of Science, University of Rouen 76821 Mont Saint Aignan. We thank Dr. Chloé Merle-Choinard from Bio-EC Laboratory, Lonjumeau, France for the preparation of the human skin explants. Thanks are also due to Dr. M. Simon from University of Toulouse for his critical reading of the manuscript.

G. Percoco, Y. Ramdani and M. Bénard performed the research, G. Percoco, M-L. Follet-Gueye, A. Driouich, L. Lefeuvre and E. Lati designed the research study, M. Bénard and E. Lati contributed essential reagents and tools, G. Percoco, M. Bénard, M-L. Follet-Gueye and Y. Ramdani analysed the data, and G. Percoco, M-L. Follet-Gueye and A. Driouich wrote the paper.

The study was carried out following the ethical policies of Experimental Dermatology. The BioEC laboratory possesses an authorization from French minister of health and research.

## Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

## References

- Proksch E, Brandner M J, Jensen J M. *Exp Dermatol* 2008; **17**: 1063–1072.
- Drexler H. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; **76**: 359–361.
- De Luca C, Valacchi G. *Mediat Inflamm* 2010; **2010**: 321494.
- Sørensen O E, Thapa R D, Rosenthal A *et al.* *J Immunol* 2005; **174**: 4870–4879.
- Gläser R, Harder J, Lange H *et al.* *Natur Immunol* 2005; **6**: 57–64.
- Zanger P, Holzer J, Schleucher R *et al.* *Inv Dermatol* 2009; **200**: 1907–1915.
- Clemmensen A, Thomassen M, Clemmensen O *et al.* *Exp Dermatol* 2009; **18**: 979–984.
- Toulza E, Mattiuzzo N R, Galliano M F *et al.* *Genome Biol* 2007; **8**: R107.
- Trost A, Bauer W J, Christoph Lanschützer C *et al.* *Exp Dermatol* 2007; **16**: 185–190.
- Espina V, Wulfkuhle J D, Calvert V S *et al.* *Nat Protoc* 2006; **1**: 586–603.
- Lochner K, Gaemlich A, Süde K M *et al.* *Biogerontology* 2007; **8**: 269–282.
- Agar N S, Halliday G M, Barnetson R *et al.* *PNAS* 2004; **101**: 4954–4959.
- Wang Y, DiGiovanna J J, Stern J B *et al.* *PNAS* 2009; **106**: 6279–6284.
- Greene V R, Johnson M M, Grimm E A *et al.* *J Inv Dermatol* 2009; **129**: 1483–1488.
- Moussai D, Mitsui H, Pettersen J *et al.* *J Inv Dermatol* 2011; **131**: 229–236.
- Ariza de Schellenberger A, Horland R, Rosowski M, Paus R, Lauster R, Lindner G. *Exp Dermatol* 2011; **20**: 361–366.
- Xu X, Lyle S, Liu Y, Solky B, Cotsarelis G. *Am J Pathol* 2003; **163**: 969–978.
- Ruetze M, Lochner M, Gallinat S, Knott A. *Analysis of Tissue-Specific Gene Expression Using Laser Capture Microdissection*. In: Turksen K, ed. *Epidermal Cells, Methods in Molecular Biology* 2nd edn. Ottawa Hospital Research Center, Ottawa, 2010: 183–192.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F *et al.* *Genome Biol* 2002; **3**: 1–11.
- Andersen C L, Jensen J L, Orntoft T F. *Cancer Res* 2004; **64**: 5245–5250.
- Boschini E, Dellavia C, Barajon I, Gagliano N. *Arch Dermatol Res* 2005; **297**: 31–38.
- Coulombe P A, Kopan R, Fuchs *et al.* *E J Cell Biol* 1989; **109**: 2295–2312.
- Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Gläser R, Schröder J M. *PLoS One* 2009; **4**: e5227.
- Hertle M D, Adams J C, Watt F M *et al.* *Development* 1991; **112**: 193–206.
- Cavani A, Zamburo G, Marconi A, Manca V, Marchetti M, Giannetti A. *J Inv Dermatol* 1993; **101**: 600–604.
- Havran V L, Jameson J M. *J Immunol* 2010; **184**: 5423–5428.
- Gläser R, Harder J, Hans Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder J M. *Nat Immunol* 2005; **6**: 57–64.
- Miller L, Sørensen O E, Liu P T *et al.* *J Immunol* 2005; **174**: 6137–6143.
- Pivarsci A, Bodai L, Reathi B *et al.* *Int Immunol* 2003; **15**: 721–730.
- Yazdi A S, Puchta U, Flaig M J, Christian A, Sander C A. *J Cut Pathol* 2004; **31**: 465–470.
- Gillespie J W, Best C J M, Bichsel V E *et al.* *Am J Pathol* 2002; **160**: 449–457.
- Wang S, Wang L, Zhu T *et al.* *BMC Genomics* 2010; **11**: 163–176.
- Pagedar N A, Wang W, Chen D H C *et al.* *Brain Res* 2006; **1091**: 289–299.
- Jiang R, Scott R S, Hutt-Fletcher L M. *Methods Mol Biol* 2011; **755**: 77–84.
- Burgemeister R. *Methods Mol Biol* 2011; **724**: 117–119.
- Xiang C C, Mezey E, Chen M, Key S, Ma L, Brownstein M. *J Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 185–193.
- Carneiro J R, Fuzii H T, Kayser C *et al.* *Clinics* 2011; **66**: 77–82.
- Kim E J, Kim B J, Jeong M S *et al.* *J Korean Med Sci* 2005; **20**: 649–654.
- Köten B, Simanski M, Gläser R, Podschun R, Jens-Michael Schröder J M, Harder J. *PLoS One* 2009; **4**: e6424.
- Liu A Y, Destoumieux D, Wong A V *et al.* *J Inv Derm* 2002; **118**: 275–281.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Data S1.** To compare the effect of different fixation protocols on RNA integrity, four different fixatives were tested.

**Data S2.** Frozen skin biopsies were cut by cryostat on 8  $\mu$ m thick sections.

**Figure S1.** Amplification plot (a), standard curve (b) and dissociation curve (c) of RLP0 gene.

**Figure S2.** Amplification plot (a), standard curve (b) and dissociation curve (c) of hBD2 gene.

**Figure S3.** Selection of reference genes.

**Figure S4.** Gene expression profile of structure-related genes.

**Figure S5.** Gene expression profile of defense-related genes.

**Figure S6.** Immunostaining of structural and defensive proteins in frozen skin sections.

**Table S1.** Accession numbers, primer sequences and the expected size of amplicons.

**Table S2.** Assessment of the quality of RNA extracted from whole epidermis isolated by LCM.

**Table S3.** Accession numbers, primer sequences and amplicon length of reference genes.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## Supplement data

### Preparation of samples for laser capture microdissection (Data S1)

To compare the effect of different fixation protocols on RNA integrity, four different fixatives were tested. Human skin explants were fixed in cold isopentane as described in the Materials and Methods, or in a solution of 4% paraformaldehyde (PFA) for 3 hours at 4°C, or in different dilutions of ethanol as described by Gillespie *et al.* (29), or in RCI2® fixative for 3 hours at room temperature. After fixation, all samples were embedded in Tissue-Tek®, cryosectioned, and the whole epidermis was isolated by LCM. The integrity of the RNA was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer. In addition, four different staining protocols were compared. Samples that had been fixed in cold isopentane were cryosectioned and the sections were immersed fully in a solution of cresyl violet or toluidine blue or thionine or haematoxylin and eosin for a few seconds. The samples were dehydrated successively for a few seconds with increasing concentrations of ethanol (70 and 100%) and the quality of the RNA was assessed.

### Immunofluorescence microscopy (Data S2)

Frozen skin biopsies were cut by cryostat on 8 µm thick sections. For CDSN, Claudin 4 and Psoriasin immunolabelling, sections were fixed with 4 % PFA for 10 min at 37°C and permeabilized in 0.5 % Triton X100 in PBS (Phosphate-Buffered Saline : 8g/L NaCl, 0.29 g/L KCl, 1.45 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) for 15 min at room temperature, and for Integrin-béta4 immunolabelling we used cold acetone fixation at -20°C for 10 min. Sections were saturated in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min at room temperature. Each primary antibodies were diluted in 1% BSA in PBS as following : mouse monoclonal Psoriasin 1 :50 (Abcam ab13680), rabbit polyclonal Claudin 4 1 :25 (Abcam ab15104), rabbit polyclonal CDSN 1 :50 (Abcam ab90517) and mouse monoclonal Integrin béta4 (clone 3E1) 1 :200 (Millipore MAB1964). Primary antibodies were incubated on the sections for 90 min at 30 °C. After rinsing in PBS, sections were incubated 1h at 30°C with FITC-conjugated secondary antibody (Sigma Aldrich) (absorption wavelength : 488 nm emission wavelength : 510-535 nm) diluted 1 :50 in 1% BSA-PBS in darkness. After rinsing with PBS, samples were counterstained with propidium iodide (0.2 mg/ml, Sigma Aldrich) (absorption wavelength : 514nm, emission wavelength : 610-635 nm) in darkness during 2 minutes, rinsed with distilled water, mounted with Citifluor AF2 antifading and observed using a confocal microscope TCS SP2 Leica Microsystems.

## Résultats

**Table S1.** Accession numbers, primer sequences and the expected size of amplicons.

Abbreviations : CDSN, corneodesmosin; FLG-2, filaggrin-2; hBD, human beta-defensin; SLPI, secretory leucoprotease inhibitor; TLR, toll-like receptor; NOD, nucleotide oligomerization domain-like receptors; B2M, beta-2-microglobulin; RPLP, acidic ribosomal phosphoprotein P0.

Gene name	Accession number	Primer sequence (5'→3')		Amplicon size (bp)
		Forward primer	Reverse primer	
Claudin-1	NM_021101	TGGCATGAAGTGTATGAAGTGCTT	CCCCAATGACAGCCATCCT	68
Claudin-4	NM_001305	TGGGAGGGCCTATGGATGA	TGCCAGCAGCGAGTCGTA	78
CDSN	NM_001264	CCAATCCAGTGGCAAATCA	CATGCAAGGGTGACCAGAAGA	70
dsg-1	NM_001942	GAAGGCAGAAACGTGAATGGA	TTTTGGCGATTGGGTTTCCT	83
E-Cadherin	NM_004360	CTGCTGCTCTTGCTGTTTCTTC	CTCCGCCTCCTTCTTCATCATA	112
FLG-2	NM_002016	TCTGAAGAACCCAGATGATCCA	CATCAAAAGAAACTCAGTAAAGTCCA A	100
Integrin alpha-6	NM_000210	GAAAGTGTGCATGGAGGAAACC	TGGGAATGGGACGCAGTT	68
Integrin beta-4	NM_0002133	GCAGATCTCCGGTGTACACAAG	GCTTTTTCCCGGCATTGG	68
Keratin 14	NM_000526	AGCAGCAGAACCAGGAGTACAAG	GGCGGTAGGTGGCGATCT	75
hBD-1	NM_005218	ATGGCCTCAGGTGGTAACTTTC	TGACGCAATTGTAATGATCAGATCT	64
hBD-2	NM_00108155	ATCAGCCATGAGGGTCTTGT	GAGACCACAGGTGCCAATTT	172
hBD-3	NM_018661	TTGCTCTTCCTGTTTTGGTG	CGCCTCTGACTCTGCAATAA	70
RNase 7	NM_032572	CAGCCCTCAAGCATGCAACT	GCACCGTTTTGTGTGCTTGT	58
SLPI	NM_003064	CCAAACCCAACAAGGAGGAA	GCATCAAACATTGGCCATAAGTC	61
TLR2	NM_003264	TTGTGACCGCAATGGTATCTG	GCCCTGAGGGAATGGAGTTT	62
TLR5	NM_003268	TGTATGCACTGTCACTCTGACTCTGT	AGCCCCGGAACCTTTGTGACT	65
Nod1	NM_006092	GCATCTTAAACTGGGAAAAAACA AAA	CTCAGAGATTGATTTGCTGTTCTTCA	90
Nod2	NM_022162	GCATCTGCAAGCTCATTGAATG	CAGTCAATTTGTTGTTGAATAGAGCTA A	77
B2M	NM_012920	ATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATC	CCACTTTTTCAATTCTCTCTCCATTC	78
RPLP0	NM_001002	ATCAACGGGTACAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG	60

## Résultats

**Table S2.** Assessment of the quality of RNA extracted from whole epidermis isolated by LCM.

Four different fixatives were compared. Only isopentane-fixed samples showed well preserved (a) RNA on unstained sections, as indicated by an RIN value of 8.1. (b) The effects on RNA integrity of four different staining protocols were evaluated on isopentane-fixed samples. Sections stained with H&E and cresyl violet showed well-preserved RNA, as indicated by RIN values of 7.8 and 6.7, respectively.

unstained sections	<b>(a) Fixation protocol</b>	<b>RIN</b>
	RCI2	2.2 ± 0.1
	Ethanol	1.9 ± 0.2
	PFA 4%	1.0 ± 0.1
	Isopentane	8.3 ± 0.2
isopentane fixed samples	<b>(b) Staining protocol</b>	<b>RIN</b>
	Thionine	2.6 ± 0.2
	Toluidine Blue	3.9 ± 0.3
	Cresyl Violet	6.7 ± 0.9
	Haematoxylin Eosin	7.7 ± 0.5

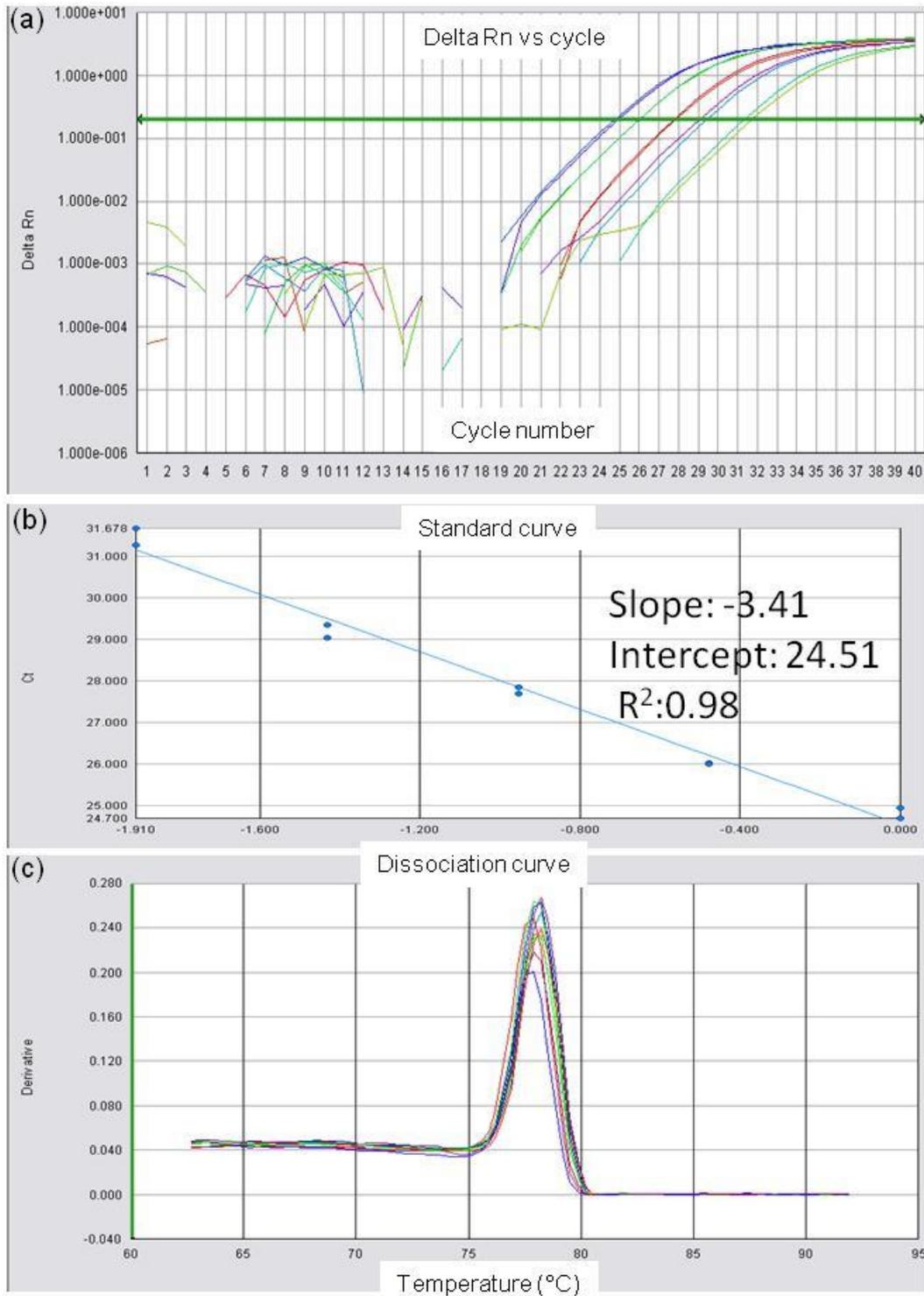
## Résultats

**Table S3.** Accession numbers, primer sequences and amplicon lengths of reference genes.

Abbreviations : B2M, beta-2-microglobulin GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GUSB, beta-glucuronidase; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; PGK1, phosphoglycerate kinase 1; RPLP, acidic ribosomal phosphoprotein P0; SDHA, succinate dehydrogenase complex, subunit A; YWHAZ, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein.

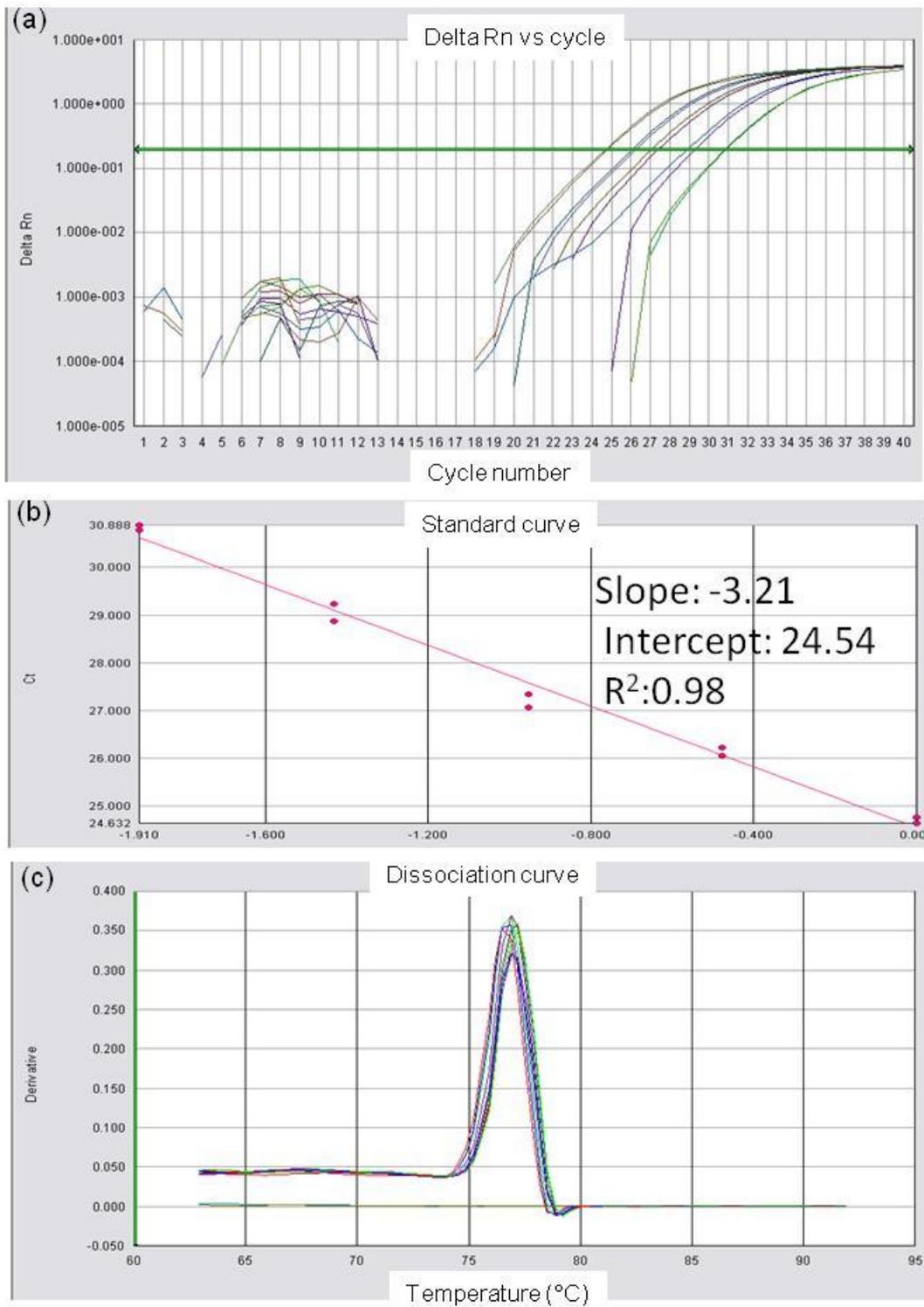
Gene name	Accession Number	Primers sequence (5'→3')		Amplicon Size (pb)
		Forward Primer	Reverse Primer	
B2M	NM_012920	ATTGCTATGTGTCGGGTTTCATC	CCACTTTTTCAATTCTCTCTCCATTC	78
CyclophilinA	NM_021130	TTTGTTATAAGGGTTCCTGCTTT	TGAAGTCACCACCCTGACACA	66
GAPDH	NM_002046	GGTCACCAGGGCTGCTTTT	GTAAACCATGTAGTTGAGGTCAATGAA	72
GUS-B	NM_000181	GTGGTTGGAGAGCTCATTTGG	ACTCTCGTCGGTGACTGTTTCAG	61
HPRT	NM_00019	GCCCTGGCGTCGTGATTA	ACCCTTCCAAATCCTCAGCAT	70
PGK1	NM_000291	GCTGCTGGGTCTGTCATCCT	TCTTTTCCCTTCCCTTCTTCCT	62
RPL13A	NM_012423	GGTTCCTGCTGCCCTCAA	CGCCCCAGATAGGCAAACCT	61
RPLP0	NM_001002	ATCAACGGGTACAAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG	60
SDHA	NM_004168	TGGAAGCATAAGAACATCGGAACT	GGAACACGGCAGCATGATT	52
YWHAZ	NM_001135699	GGTTGCCGCTGGTGATG	GCTTCTTGGTATGCTTGTGTGA	59

# Résultats



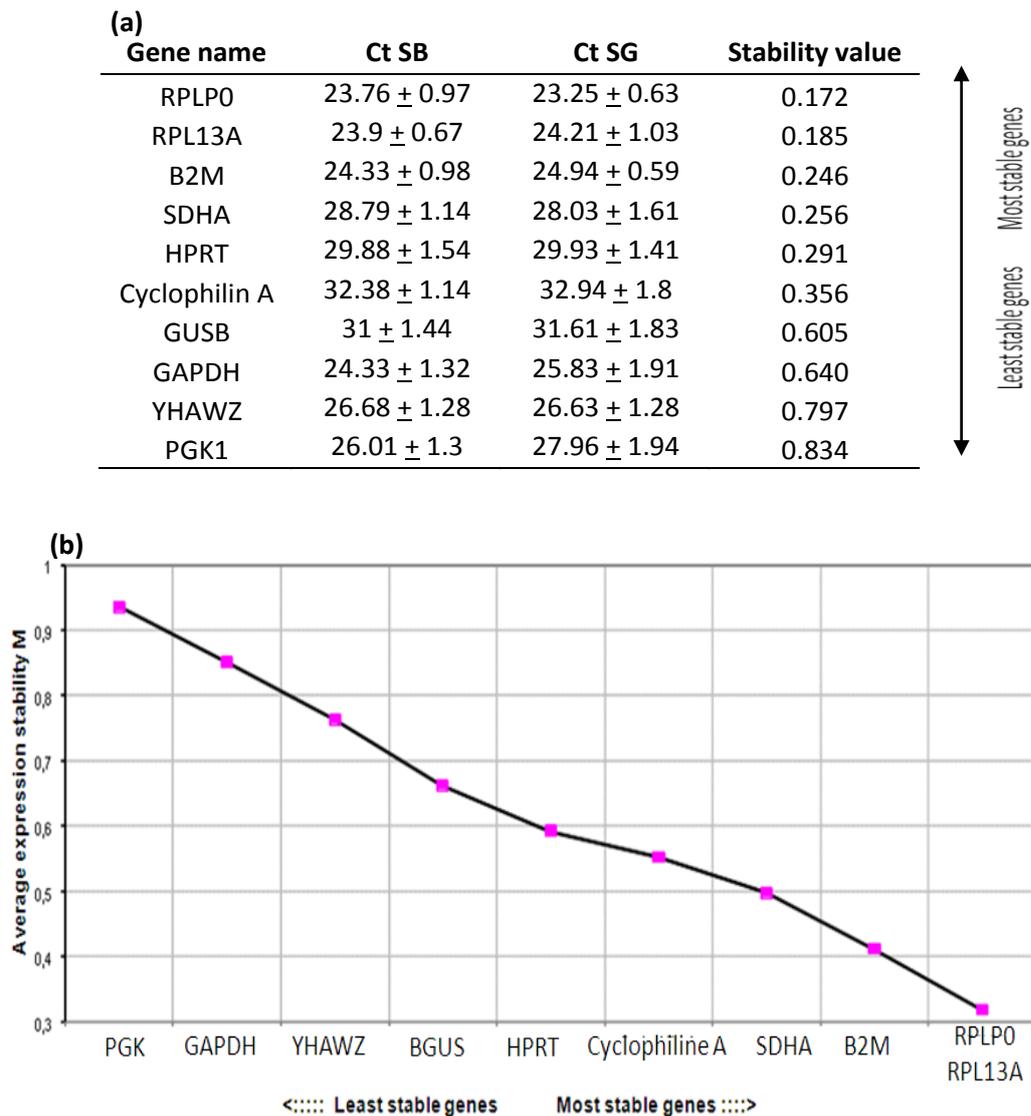
**Figure S1.** Amplification plot (a), standard curve (b) and dissociation curve (c) of RLP0 gene.

# Résultats



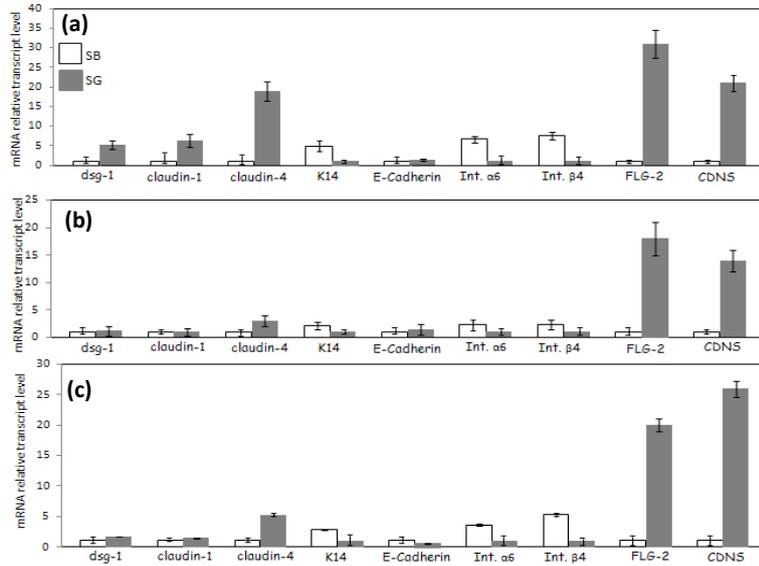
**Figure S2.** Amplification plot (a), standard curve (b) and dissociation curve (c) of hBD2 gene.

## Résultats

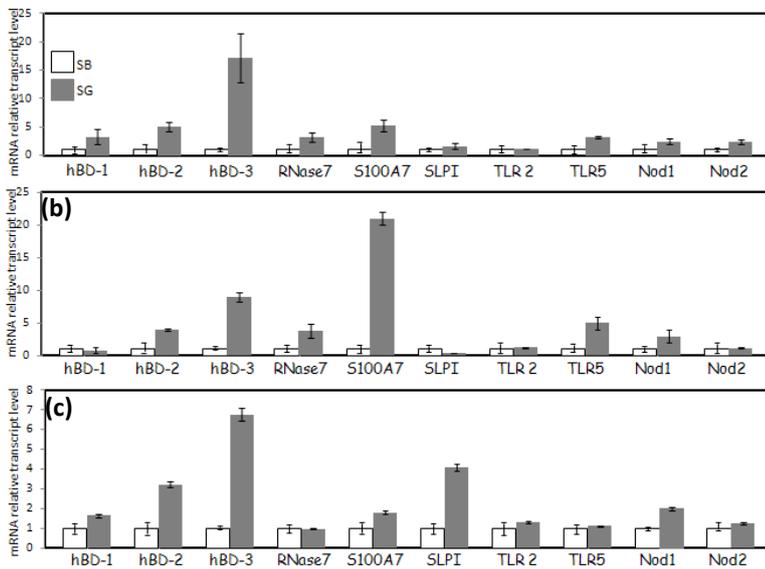


**Figure S3.** Analysis of the stability of gene expression for 10 reference genes using the VBA applets *Normfinder* (a) and *GeNorm* (b). Results derived from abdominal of 2 donors and from internal and external thigh, and buttock from one donor (N=3). One biopsy per donor was microdissected and used for house keeping gene selection. Each value represents an average of ten measures (average ± SEM).

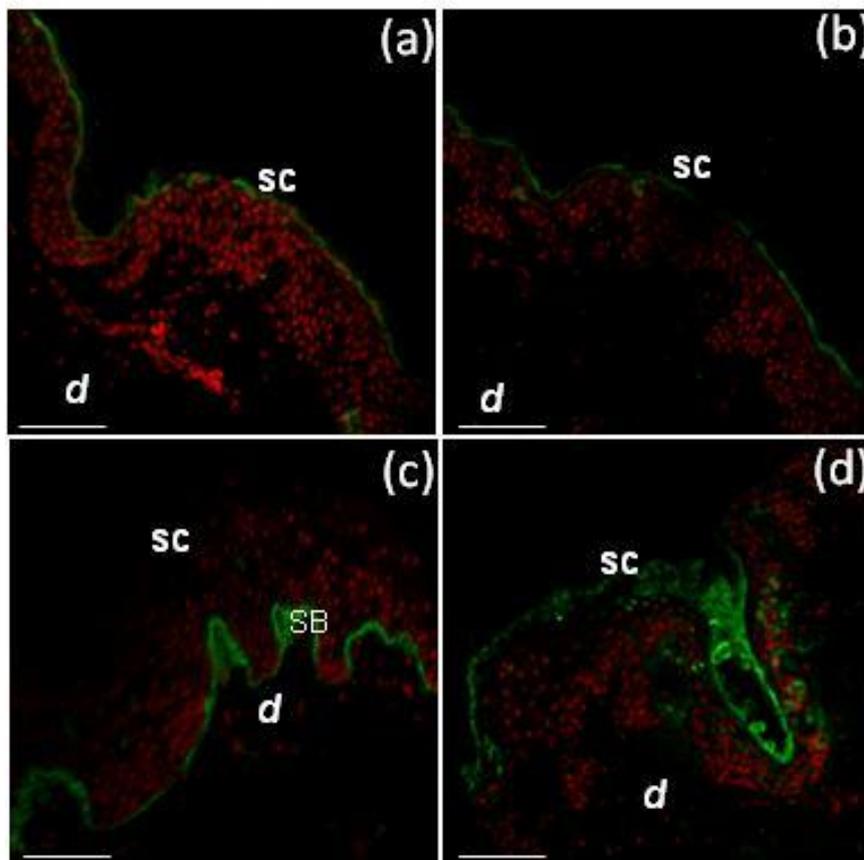
# Résultats



**Figure S4.** Gene expression profile of structure-related genes in biopsy specimens obtained from the internal (a) and external (b) thigh, and buttock (c),  $n = 3$ .



**Figure S5.** Gene expression profile of defence-related genes in biopsy specimens obtained from the internal (a) and external (b) thigh, and buttock (c),  $n = 3$ .



**Figure S6.** Immunostaining of structural and defensive proteins in frozen skin sections. Claudin 4 (a), CDSN (b) and Psoriasin (d) are detected in the upper most layers of the epidermis, whereas Integrin  $\beta$ 4 (c) is found in basal layer. Nucleus are counterstained in red with Propidium Iodide (PI). *d*, dermis; SB, stratum basale; SC, stratum corneum; Scale bar : 120 $\mu$ m.

## Résultats

---

**-Running title : Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection**

### Résultats complémentaires : analyse ultrastructurale de l'explant et immunolocalisation de protéines d'intérêt

Parallèlement à l'analyse d'expression génique au sein de l'épiderme, une analyse morphologique à l'échelle subcellulaire par microscopie électronique à transmission et l'immunolocalisation de protéines structurales ou liées à l'immunité innée, ont également été menées. La méthode de fixation est un paramètre critique pour une préservation optimale de la morphologie des échantillons et des épitopes d'intérêt. Il a été montré, par un article publié par Pfeiffer *et al.* (2000) que la fixation à froid d'explants de peau par la méthode de congélation sous haute pression (HPF, *High Pressure Freezing*), couplée à une substitution à froid (FS, *Freeze Substitution*) des échantillons, garantit une meilleure préservation du tissu par rapport aux méthodes classiques de fixation.

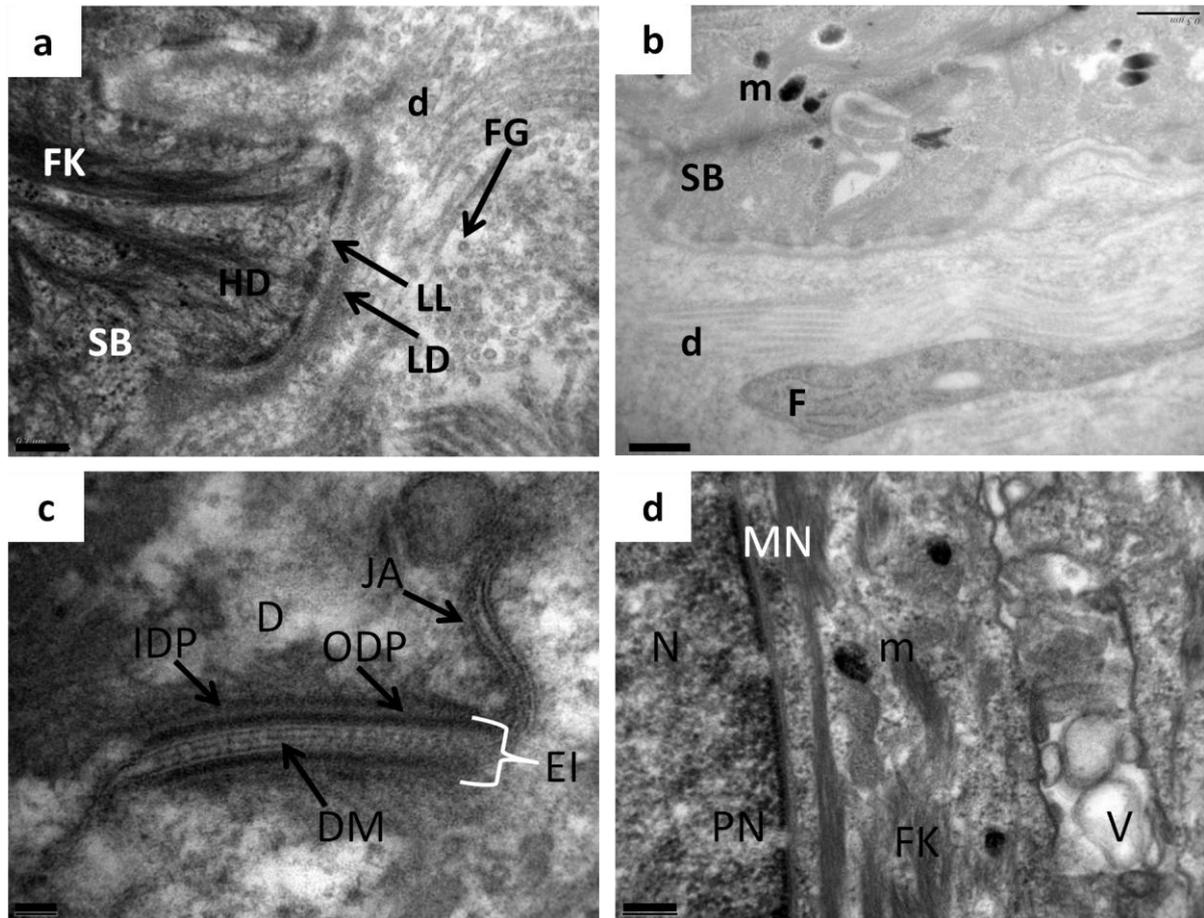
Les observations en microscopie électronique à transmission ont révélé une préservation excellente des différentes structures au sein de l'épiderme et du derme également. Au niveau de la jonction dermo-épidermique les différents éléments de la membrane basale, à savoir la *lamina densa* et la *lamina lucida*, ainsi que les hémidesmosomes, sont clairement visibles (**Fig. 35a**). Au niveau du derme, les fibres de collagène sont parfaitement préservées et les fibroblastes, type cellulaire majoritaire de ce compartiment, sont aussi visibles. Les jonctions cellulaires, comme montré dans la **Figure 35c**, sont aussi bien conservées. De plus la présence de vésicules au niveau du cytoplasme révèle l'importante efficacité de la HPF en terme de préservation des échantillons (**Figure 35d**).

Concernant les couches les plus superficielles de la peau, à savoir la couche granuleuse et la couche cornée, nous avons aussi observé une préservation optimale de la morphologie des échantillons. Les différents compartiments du *stratum corneum*, notamment le *stratum compactum* et le *stratum disjunctum* sont montrés dans la **Figure 36a**. De plus, les lipides intercornéocytaires ainsi que les corps lamellaires contenant les bicouches lipidiques sont également visibles, comme montré dans la **Figure 36c et d**.

Dans le but d'examiner la préservation des épitopes d'intérêt, nous avons également réalisé l'immunolocalisation de protéines structurales (**Fig. 37**) impliquées dans la défense cutanée (**Fig. 38**). Les résultats confirment l'importante efficacité de cette approche dans la préservation d'une bonne structure. Comme montré dans la **Fig. 37**, nous avons observé un marquage spécifique pour toutes les protéines structurales analysées : la cytokératine 14 est détectée majoritairement au niveau de la couche basale et la cytokératine 10 au niveau de la

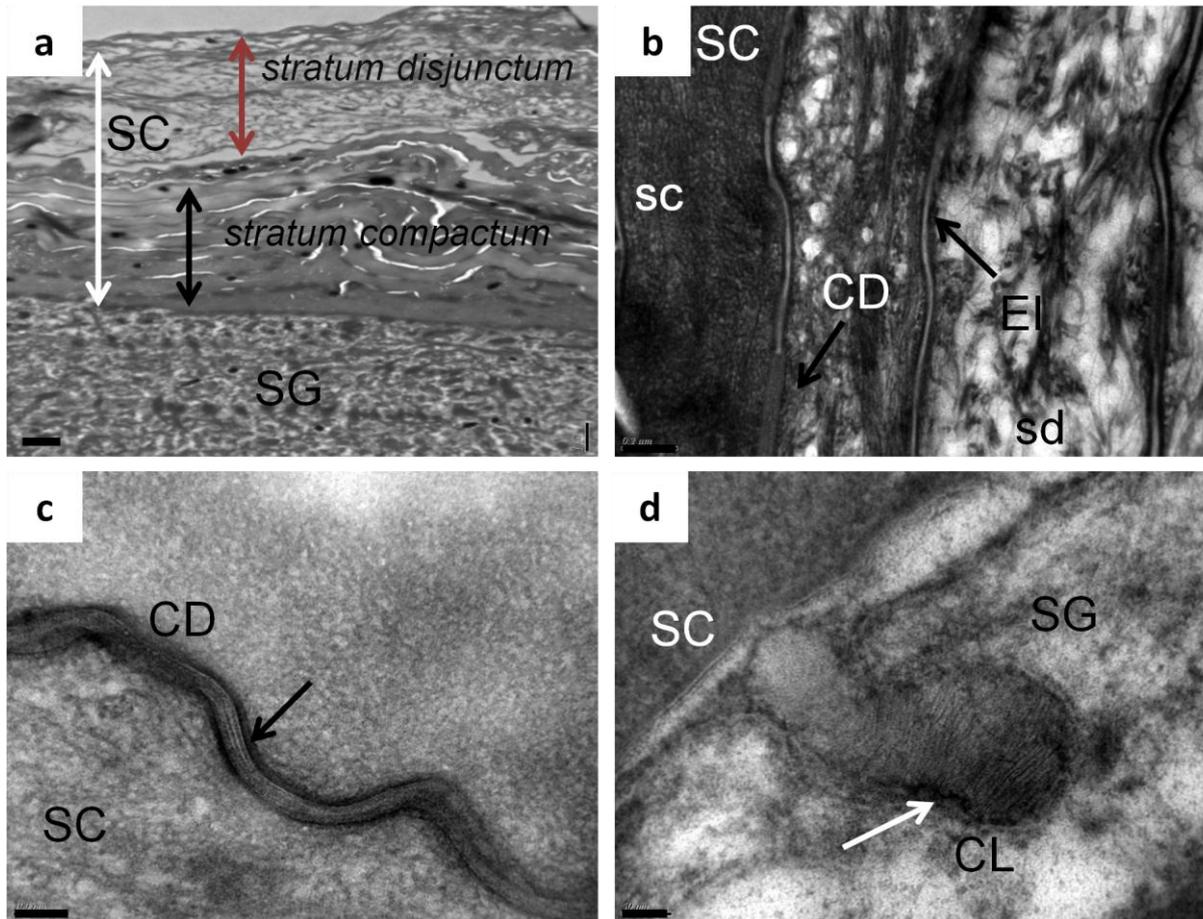
## Résultats

couche granuleuse. La filaggrine montre une forte immunoréactivité au sein de la couche cornée et au niveau des grains de kératohyaline de la couche granuleuse et l'involucrine au niveau de la couche cornée. Concernant l'immunolocalisation des protéines de défense, aucun marquage n'est observé pour la cathélicidine (**Fig. 38a**), alors que la hBD3, la RNase 7 et la psoriasine sont localisées essentiellement au niveau de l'interface SG/SC (**Fig. 38b, c et d**).



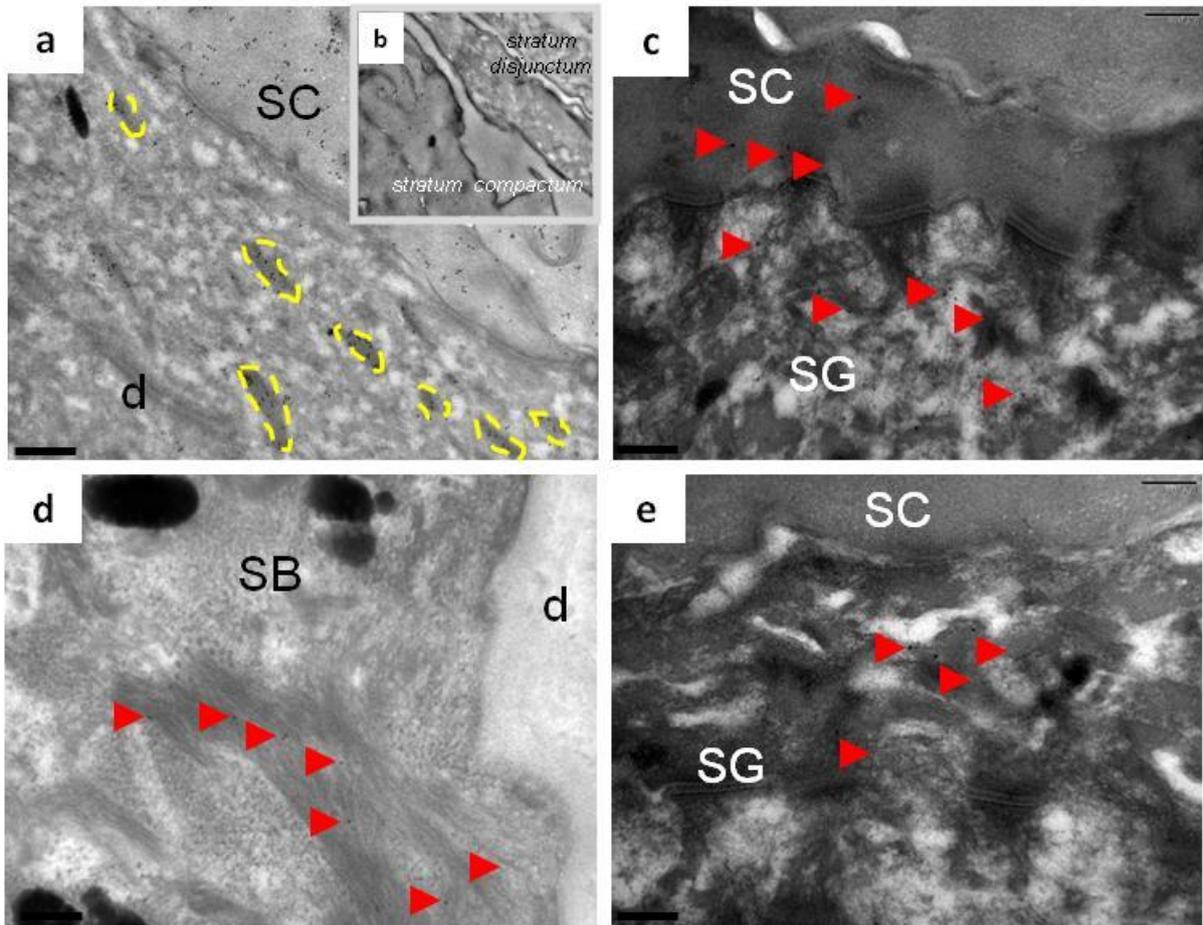
**Figure 35.** Ultrastructure de la jonction dermo-épidermique et des jonctions cellulaires. Après cryofixation des échantillons par HPF et substitution à froid dans un milieu contenant de l'acétone et de l'acétate d'uranyle, et enrobage dans la résine LR White, des sections de 90 nm d'épaisseur sont observées au microscope électronique à transmission. La structure de la jonction dermo-épidermique (**a** et **b**) ainsi que la structure d'un désmosome (**c**) et la bonne préservation des compartiments nucléaire et cytoplasmique (**d**) sont montrés ici.

Abréviations : d, derme; D, desmosome; DM, membrane dense centrale; EI, espace intercellulaire; F, fibroblaste; FG, fibre de collagène; FK, filaments de kératine; JA, jonction adhérente; HD, hemidesmosome; IDP, plaque dense intérieure; LD, lamina densa; LL, lamina lucida; m, grain de mélanine; MN, membrane nucléaire; N, noyau; ODP, plaque dense extérieure; PN, pore nucléaire; V, vésicule. Barres d'échelle : a et b : 0,5  $\mu$ m; c : 100 nm; d : 0,2  $\mu$ m.



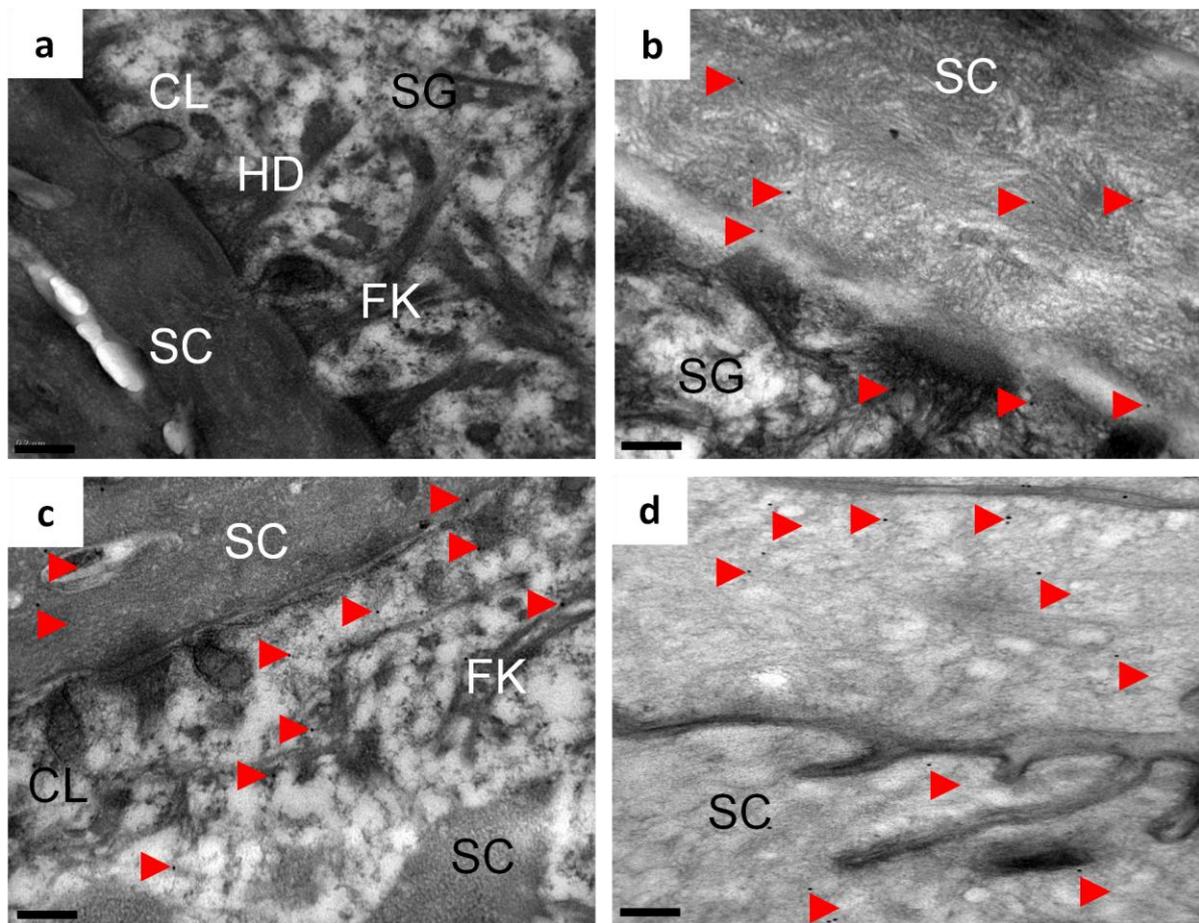
**Figure 36.** Ultrastructure de l'interface SG/SC. En (a) l'interface SG/SC ainsi que les deux compartiments caractérisant la couche cornée, à savoir le *stratum compactum* et le *stratum disjunctum* sont clairement visibles. En (b), les espaces intercornéocytaires ainsi que les cornéodesmosomes au sein de l'interface *stratum compactum/stratum disjunctum* sont montrés. En (c), le marquage par le RuO<sub>4</sub> (tétroxyde de Ruthénium) permet de visualiser les structures lamellaires situées dans les espaces intercellulaires, comme indiqué par la flèche noire. Pour conclure, en (d), un corps lamellaire au niveau de l'interface SC/SG contenant des bicouches lipidiques est indiqué par la flèche blanche.

Abréviations : CD, cornéodesmosome; CL, corps lamellaires; D, desmosome; EI, espace intercellulaire; SC, *stratum corneum*, sc, *stratum compactum*; sd, *stratum disjunctum*; SG, *stratum granulosum*; Barres d'échelle : a : 1 µm; b : 0,2 µm; c : 100 nm; d : 50 nm.



**Figure 37. Immunolocalisation de protéines structurales.** Afin d'examiner la préservation des épitopes dans les explants de peau cryocongelés par HPF, nous avons effectué la localisation de protéines structurales par une approche immunocytoologique. Quatre protéines différentes sont étudiées : la filaggrine (a), l'involucrine (c), la cytokératine 14 (d) et la cytokératine 2 (e). Les épitopes associés aux trois premières protéines, montrent une immunoréactivité plus importante au niveau de l'interface SG/SC comme indiqué par les flèches rouges. Inversement, la cytokératine 14 est présente de manière plus importante au niveau de la couche basale. En (b), un contrôle négatif réalisé sans anticorps primaire.

Abréviations : d, derme; SB, *stratum basale*; SC, *stratum corneum*; SG, *stratum granulosum*; Barre d'échelle : 0,2  $\mu\text{m}$ .



**Figure 38.** Immunolocalisation de protéines liées à la défense cutanée. Aucun marquage n'est observé en utilisant un anticorps spécifique pour la cathélicidine (LL37) (a). En revanche, les autres protéines impliquées dans les mécanismes de défense de l'immunité innée, notamment la hBD3 (b), la RNase7 (c) et la psoriasine (d) montrent une immunoréactivité majeure au niveau du SC et de l'interface SC/SG.

Abréviations : CL, corps lamellaires; FK, filaments de kératine; SC, *stratum corneum*; SG, *stratum granulosum*.

Barre d'échelle : 0,2 µm.

### II Impact des bactéries *S. epidermidis*, *S. aureus* et *P. fluorescens* sur l'immunité cutanée innée / Apport du modèle explant

***Publication n.° 2: “ Human skin explant: a model to study the interaction between the epidermal cells and the cutaneous microbiota ”***

**Giuseppe Percoco**, Chloé Merle, Thomas Jaouen, Yasmina Ramdani, Magalie Bénard, Mélanie Hillion, Lily Mijouin, Elian Lati, Marc Feuilloley, Luc Lefeuvre, Azeddine Driouich and Marie-Laure Follet-Gueye

Soumis chez *Experimental Dermatology*

En protégeant l'organisme contre de nombreux stress environnementaux, la peau représente une barrière naturelle. Elle assure une protection efficace vis-à-vis de radiations UV qui atteignent quotidiennement la surface cutanée, elle garantit une barrière physique qui empêche la pénétration de produits toxiques pour la santé humaine et elle constitue une première ligne de défense contre les microorganismes pathogènes. Plusieurs modèles d'étude, y compris des lignées cellulaires de kératinocytes, des modèles animaux ou encore des peaux reconstituées, sont utilisés pour étudier la biologie et la physiologie cutanée en lien avec l'environnement. L'explant de peau humaine est un modèle expérimental largement utilisé pour explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans le vieillissement cutané, la cicatrisation ou encore pour étudier les effets des radiations UV sur les cellules cutanées. Cependant, son utilisation dans le domaine de la microbiologie de la peau est, à l'heure actuelle, encore limité.

Le but de cette deuxième partie est d'étudier l'impact de trois bactéries sur la morphologie et le profil d'expression génique d'explants maintenus en survie. Ces bactéries ont été sélectionnées sur la base de leur représentativité dans le microbiome cutané et de leur diversité phénotypique : deux coques à Gram +, *S. epidermidis* et *S. aureus* et un bacille à Gram - flagellé, *P. fluorescens*. Dans un second article, actuellement en cours de soumission chez *Experimental Dermatology*, intitulé : « *Human skin explant: a model to study the interaction between the epidermal cells and the cutaneous microbiota* » nous avons analysé la morphologie de l'explant à l'échelle cellulaire et subcellulaire par microscopie optique et MET suite à une exposition prolongée avec *S. epidermidis* et *P. fluorescens*. Nous avons également mené une analyse du profil d'expression de gènes liés à l'immunité innée et à la réponse pro-inflammatoire au sein d'explants traités avec les deux bactéries. Tout d'abord,

## Résultats

---

cette analyse a été conduite à partir de sections de peau comprenant le derme et l'épiderme. Ensuite, l'expression de ces gènes a été suivie au niveau des différentes couches épidermiques par PCR en temps réel couplée à la LCM. Ces derniers résultats obtenus ont été complétés par une localisation immunocytochimique de PAMs et de cytokines. Une partie des résultats complémentaires, concernant l'impact d'une exposition de l'explant avec *S. aureus* sur le profil d'expression génique ainsi que sur la localisation de protéines impliquées dans la réponse immunitaire innée et la réponse pro-inflammatoire, conclura le deuxième volet de ces résultats.

### **Human skin explants : a model to study the interaction between epidermal cells and the cutaneous microbiota**

**Giuseppe Percoco<sup>1</sup>, Chloé Merle<sup>2</sup>, Thomas Jaouen<sup>3</sup>, Yasmina Ramdani<sup>1</sup>, Magalie Bénard<sup>4</sup>,  
Mélanie Hillion<sup>3</sup>, Lily Mijouin<sup>3</sup>, Elian Lati<sup>2</sup>, Marc Feuilleley<sup>3</sup>, Luc Lefeuvre<sup>5</sup>, Azeddine  
Driouich<sup>1,4</sup> and Marie-Laure Follet-Gueye<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Glycobiology and Plant Extracellular Matrix (Glyco-MEV) Laboratory, UPRES EA 4358, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

<sup>2</sup>BIO-EC Laboratory, Longjumeau, France

<sup>3</sup>Microbiology Signals and Microenvironment (LMSM) Laboratory, UPRES EA 4312, University of Rouen, Evreux, France

<sup>4</sup>The Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), Institute of research and biomedical innovation (IRIB) of Upper Normandy, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

<sup>5</sup>Dermatological Laboratories of Uriage, Courbevoie, France

*Correspondence* : Marie-Laure Follet-Gueye, Glyco-MEV, UPRES EA 4358, IFRMP 23, University of Rouen, Bâtiment Henri Gadeau de Kerville, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France, Tel. : (33)2 35 14 00 39; Fax : (33)2 35 14 66 15; e-mail : [marie-laure.follet-gueye@univ-rouen.fr](mailto:marie-laure.follet-gueye@univ-rouen.fr)

## Abstract

The skin is a natural barrier between the body and the environment, and is colonised by a large number of microorganisms. Different models, including animals and keratinocyte cell lines, have been adopted widely to study the roles of skin microflora in health and disease. Here, we report a complete analysis of the response of a less well-used model, human skin explants, to microbial stimuli. Using this *ex vivo* model, we analysed at both the gene and protein level the response of epidermal cells to *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) and *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), which are present in the cutaneous microbiota. We showed that both bacterial species affect the structure of skin explants without penetrating the living epidermis. Both bacterial species induce several symptoms linked to pyroptosis in particular in the inner epidermis. We showed by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) that *S. epidermidis* and *P. fluorescens* increased the levels of transcripts that encode antimicrobial peptides (AMPs), including human  $\beta$  defensin (hBD)2 and hBD3, and the proinflammatory cytokines interleukin (IL)-1 $\alpha$  and - $\beta$ , as well as IL-6. In addition, we analysed the effects of bacterial stimuli on the expression profiles of genes related to innate immunity and the inflammatory response across the epidermal layers, using laser capture microdissection (LCM) coupled to qPCR. We showed that AMP transcripts were principally upregulated in suprabasal keratinocytes. Conversely, the expression of proinflammatory cytokines was upregulated in the lower epidermis. These findings were confirmed by protein localisation using specific antibodies coupled to optical or electron microscopy. This work underscores the potential value of further studies that use human skin explants as a model to study the roles and effects of the epidermal microbiota on human skin physiology.

## Résultats

---

**Keywords** : antimicrobial peptides; human skin explant; innate immunity; proinflammatory response; skin microflora

## Introduction

The skin is a complex and heterogeneous organ that plays a key role in protecting individuals against the surrounding environment (1–7). The skin surface is naturally colonised by a vast range of microorganisms (8–13) that can be classified as commensal, symbiotic, or pathogenic, on the basis of their relationship with the host. During the past decade, considerable efforts have been made to clarify the roles of epidermal microflora in the physiology of the skin (14–17).

The first molecular response after bacterial stimuli is the expression, by epidermal cells, of genes that encode antimicrobial peptides (AMPs), such as human  $\beta$  defensin (hBD)2 (18–20), hBD3 (21–23), S100A7 (psoriasin) (24), cathelicidin (25–27), and RNase7 (28, 29). In dermatological research, different models have been adopted to elucidate the role and regulation of AMPs in cutaneous defence. These include the culture of primary human keratinocytes (18–20, 22–24, 27, 30–34) and the use of animal models, such as mice (14, 16, 26, 35, 36) and pig (37), and skin equivalents (12, 38, 39). The use of skin explants is a valid and widely used method to study the cellular mechanisms that are involved in wound healing (40, 41), skin ageing (42, 43), and skin disease (44–46). Skin explants are also useful to investigate the effects of environmental stresses, such as UV irradiation, on cutaneous cells (47–49). Nevertheless, so far, their use in the field of skin microbiology remains limited (22, 23, 29, 50, 51). The protective roles of hBD3 (22, 23) and RNase7 (29) against *Staphylococcus aureus* infection of the skin were demonstrated using human skin explants as an experimental model. Sørensen *et al.* (50) demonstrated the impact of bacterium-derived molecules on the expression of hBD1, hBD2, and hBD3 in skin biopsies obtained from healthy donors. Frick *et al.* (51) described the defensive response of the epidermis triggered by the pathogens *Streptococcus pyogenes* and *Fingoldia magna*.

The aim of the study described herein was to provide the first comprehensive analysis of the effects of bacterial infection on human skin explants. To this end, we used two microorganisms that were isolated directly from healthy donors, *Pseudomonas fluorescens* (11) and *Staphylococcus epidermidis*. Whereas *P. fluorescens* is a flagellated Gram-negative bacterium that is present in the cutaneous microbiome (11), *S. epidermidis* is a Gram-positive bacterium and the most common microorganism in the epidermal microflora (52). We used microscopy to analyse the impact of the two bacterial species on the structure of the epidermis. We investigated the effect of bacterial stimuli on the full-thickness skin explants,

## Résultats

---

of a group of genes linked to innate immunity and the inflammatory response. Moreover, the distribution of mRNAs and proteins specific for AMPs, Toll-like receptors (TLRs), and proinflammatory cytokines across the epidermal layers after bacterial stimulation was also determined using laser capture microdissection (LCM) coupled to real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and immunohistochemical analysis.

## Methods

### Preparation of human skin explants

Human skin biopsies were obtained from the abdomens of healthy female donors (42–56 years) who had undergone aesthetic surgery. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki after the patients had given informed consent. The hypodermis was removed from the skin and circular explants (~1 cm diameter) were excised using a sample punch. The samples were placed immediately in BIO-EC's Explant Medium (BEM<sup>®</sup>) for 48 h, before being transferred to Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 12-04; Lonza, Basel, Switzerland). Skin samples were cultured under classical cell culture conditions (37°C in 5% CO<sub>2</sub>), and half of the medium was refreshed every 2 days.

### *Ex vivo* stimulation of human skin

The *S. epidermidis* MFP04 and *P. fluorescens* MFP05 strains were obtained from a human skin bacteria collection (Hillion *et al.*, not published), and were grown at 37°C on Tryptic Soy Agar medium. Forty-eight hours before infection, the BEM was removed from the skin explants and replaced with DMEM without antibiotics. Bacterial colonies were resuspended in sterile physiological water and applied to the skin explants (~1 cm<sup>2</sup>) at a final concentration of ~10<sup>7</sup> bacteria/cm<sup>2</sup>. Untreated skin served as a control. Skin explants were incubated for 3–96 h at 37°C in a humidified atmosphere that contained 5% CO<sub>2</sub>. For the gene expression analysis, the explants were fixed in dry-ice-cooled isopentane, and stored at –80°C until further processing. For gene expression analysis, treatment was achieved by fixation in dry-ice-cooled isopentane, and explants were stored at –80°C until further processing.

### Optical microscopy studies

For morphological analysis, the skin explants were fixed for 24 h in buffered formol solution, dehydrated, and impregnated in paraffin using a Leica TP 1020 dehydration automat (Leica, Rueil-Malmaison, France). The samples were then embedded in paraffin using a Leica EG 1160 embedding station. Sections (5 µm) were cut on a Leica RM 2125 Minot-type microtome, mounted on Superfrost histological glass slides, and stained in accordance with the Masson–Goldner trichome staining protocol. Sections were observed with a Leica

Orthoplan microscope equipped with a CCD DXC 390 Sony Camera, and analysed by using Leica IM1000 data storage software.

For immunofluorescence staining, skin samples fixed in dry-ice-cooled isopentane were processed for protein localisation as described by Percoco *et al.* (53). Each primary antibody was diluted in 1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS) as follows : mouse monoclonal anti-psoriasin (ab13680; Abcam, Cambridge, UK) 1 :50; rabbit polyclonal anti-hBD2 (sc-20798; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1 :60; rabbit polyclonal anti-hBD3 (sc-30115; Santa Cruz Biotechnology) 1 : 50; and rabbit polyclonal anti-IL-6 (Abcam, ab6672; Abcam) 1 :50. Fluorescein-isothiocyanate-conjugated secondary antibody (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) was diluted 1 :50 in Tris-buffered saline (TBS)–1% BSA. Nuclei were counterstained with UltraCruz Mounting Medium (sc-24921; Santa Cruz Biotechnology). Slides were observed using a Leica DLMB microscope, and images were acquired with a DPC300FX camera.

### **High-pressure freezing (HPF) and freeze substitution (FS)**

Samples were prefixed for 1 h at room temperature in a solution of 2% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde (GA) in PBS. Specimens were cut into small disks (~1 mm in diameter and 200 µm thick). Samples were placed with the dermis face down in a flat specimen carrier (Leica), coated with 1% soya lecithin in pure chloroform, loaded in a specimen holder filled with 1% hexadecene, and cryofixed in a high-pressure freezer (HPF-EM-PACT I; Leica) (54) with a maximum cooling rate of 15,000°C/s. After HPF, specimens were cryosubstituted by a automated freeze substitution (Leica). The freeze substitution conditions were as described previously (55), with slight modifications. Samples were cryosubstituted in medium that contained pure methanol and 0.5% uranyl acetate. The freeze substitution was performed as follows : –90°C for 72 h, followed by –60°C for 12 h, and –30°C for 12 h. After freeze substitution, the samples were rinsed twice with cold methanol. Infiltration conducted at –15°C in London Resin White (LRW, Biovalley, Illkirch, FRANCE; ratio 2 : 1; 1 : 1; 1 : 2; 8 h each step). Ultraviolet polymerisation was performed at –15°C for 48 h.

### **Ultrastructural and immunogold analysis**

Ultrathin sections (90 nm) were collected on formvar carbon-coated nickel grids. Immunostaining was performed as described previously (55). For immunogold staining, sections were incubated in TBS/0.1 M glycine for 15 min, saturated in TBS/0.2% Tween for 15 min, and incubated with primary antibody for 2 h at 25°C. Each primary antibody was diluted in TBS that contained 1% BSA and 1 :30 normal goat serum as follows : mouse monoclonal anti-psoriasin 1 :50, rabbit polyclonal anti-hBD2 1 :25, rabbit polyclonal anti-hBD3 1 : 25, and rabbit polyclonal anti-IL-6 1 :75. Sections were washed six times in TBS/1% BSA and incubated for 90 min at 25°C in the appropriate secondary antibody conjugated to 10-nm gold particles (British BioCell International, Cardiff, UK) diluted 1 :40 in TBS and 1% BSA. Sections were washed in TBS/1% BSA and post-fixed with 2% GA in TBS. For ultrastructural or immunogold studies, sections were counterstained with 0.2% osmium tetroxide vapour, followed by classical staining with uranyl acetate and lead citrate before observation with a Philips Tecnai 12 Biotwin FEI transmission electron microscope (Philips, Eindhoven, Netherlands).

### **RNA extraction from full-thickness human skin explants**

Frozen skin samples were cut on a cryostat (Leica CM1950) and approximately 50 sections of 10 µm in thickness were collected in a 2-ml tube that contained 1 ml of RA1 lysis buffer (Machery–Nagel, Hoerd, France) and 1% of β-mercaptoethanol (Sigma–Aldrich). Total RNA was extracted using a NucleoSpin RNAII Kit (Machery–Nagel) in accordance with the manufacturer's instructions. The RNA was eluted in 40 µL of RNase-free water. Treatment with DNase I (RNase-Free DNase I Set; Machery–Nagel) was performed to remove contaminating genomic DNA. The RNA concentration was quantified using a Nanodrop instrument (ND-1000 Spectrophotometer; LabTech, Palaiseau, France), and ~5 ng of total RNA were then analysed by microfluidic capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyser; Agilent Technologies, Massy, France) to assess the quality of the RNA.

## LCM and RNA extraction from microdissected samples

Skin explants were prepared for LCM as described previously (53). Total RNA from microdissected tissues was extracted using an RNeasy Micro Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) in accordance with the manufacturer's instructions. The quality and quantity of total RNA were assessed using a Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies).

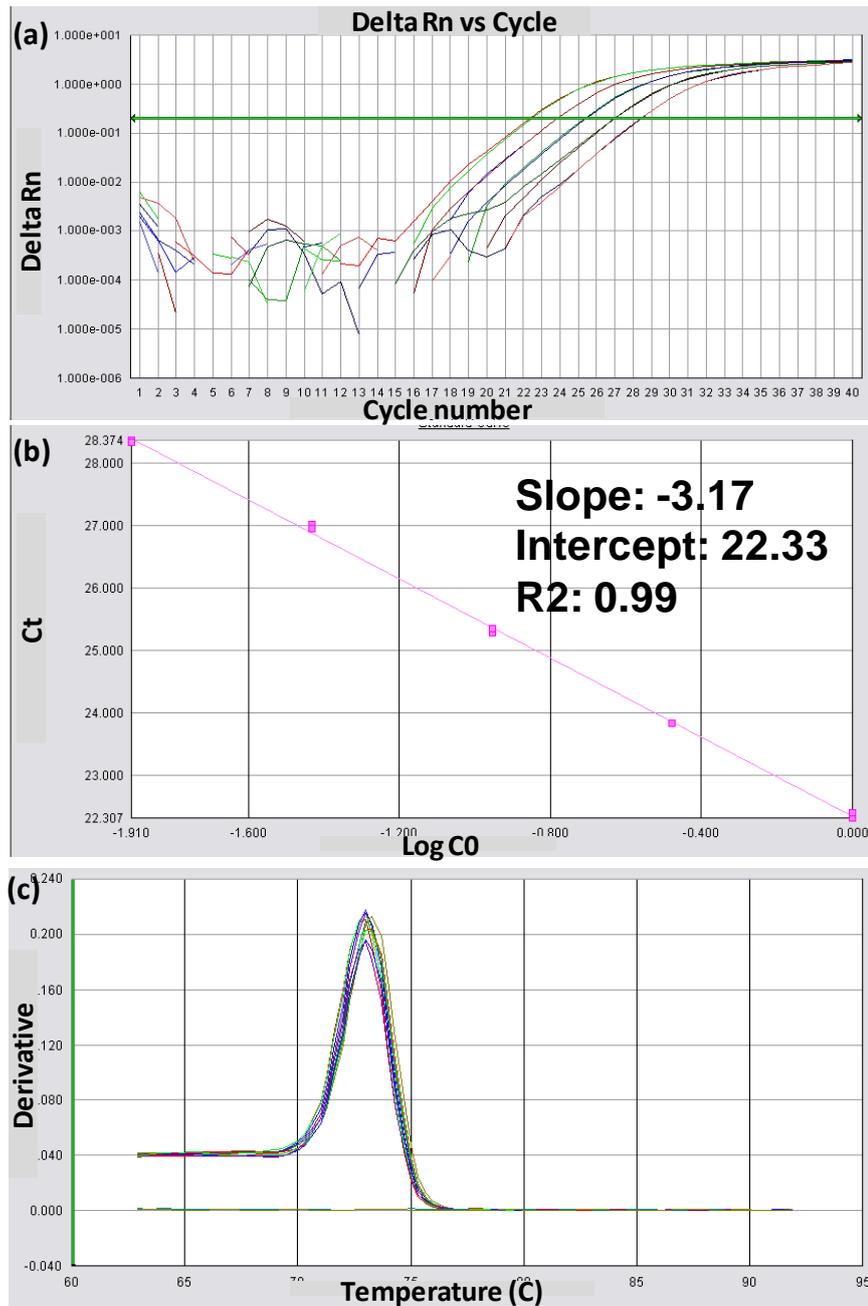
## Real-time qPCR

Real-time qPCR was carried out as described previously (53). The sequence and melting temperature of each primer and the size of the amplicons are shown in Table S1. The efficiency and specificity of each of the primers were verified accurately (Figs. S1 and S2).

## Statistical analysis

The differences in transcription (*n*-fold) were determined using the  $\Delta\Delta C_t$  method (56). Each value was represented as the transcriptional variation of expression level in relation to that for untreated skin, and was adjusted considering the basal expression in the respective controls (T 24 h, T 48 h and T 72 h) (Table S2). Acidic ribosomal phosphoprotein P0 (RPLP0) and  $\beta 2$  microglobulin (B2M) were used as reference genes. The data from each experiment were analysed statistically by the Mann–Whitney test using GraphPadPrism version 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant. All experiments were performed in triplicate.

# Résultats



**Figure S1.** Amplification plot (a), standard curve (b) and dissociation curve (c) of integrin  $\beta 4$  gene.

# Résultats

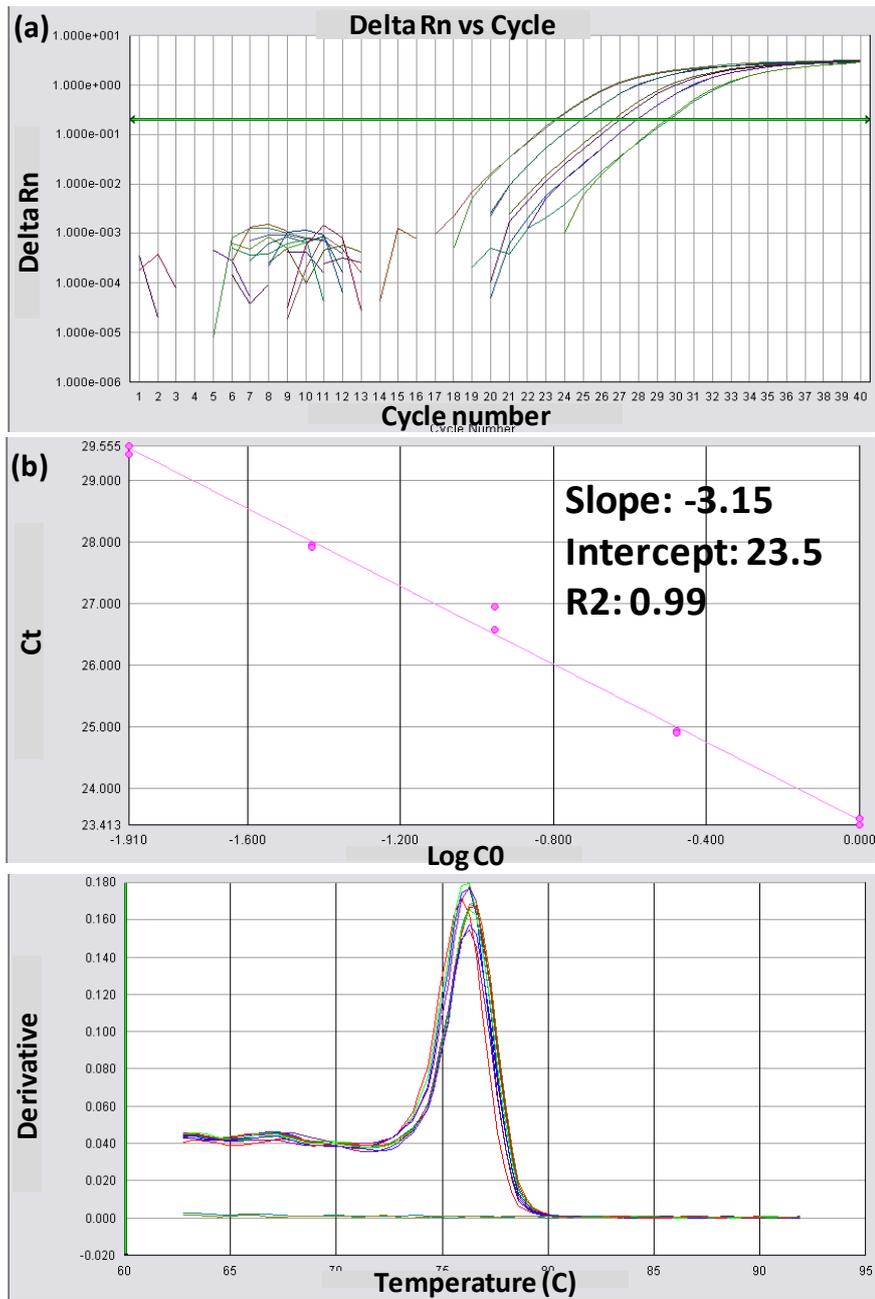


Figure S2. Amplification plot (a), standard curve (b) and dissociation curve (c) of IL-6 gene.

## Résultats

**Table S1.** Accession numbers, primer sequences and the expected size of amplicons.

Abbreviations : CDSN, corneodesmosin; FLG-2, filaggrin-2; hBD, human beta-defensin; SLPI, secretory leucoprotease inhibitor; TLR, toll-like receptor; NOD, nucleotide oligomerization domain-like receptors; IL, interleukin; TNF-alpha, tumor necrosis factor-alpha; TRAF3, TNF receptor-associated factor 3; B2M, beta-2-microglobulin; RPLP0, acidic ribosomal phosphoprotein P0.

Gene name	Accession number	Primer sequence (5'→3')		Amplicon size (bp)
		Forward primer	Reverse primer	
CDSN	NM_001264	CCAATCCAGTGGCAAAATCA	CATGCAAGGGTGACCAGAAGA	70
Integrin beta-4	NM_0002133	GCAGATCTCCGGTGTACACAAG	GCTTTTTCCCGGCATTGG	68
hBD-1	NM_005218	ATGGCTCAGGTGGTAACTTTC	TGACGCAATTGTAATGATCAGATCT	64
hBD-2	NM_00108155	ATCAGCCATGAGGGTCTTGT	GAGACCACAGGTGCCAATTT	172
hBD-3	NM_018661	TTGCTCTTCCTGTTTTGGTG	CGCTCTGACTCTGCAATAA	70
S100A7	NM_002963	AACTTCCTTAGTGCCTGTGACAAA	ATTCTTGTCTTTTTCTCAAAGACATC	71
RNase 7	NM_032572	CAGCCCTCAAGCATGCAACT	GCACCGTTTTGTGTGCTTGT	58
SLPI	NM_003064	CCAAACCCAACAAGGAGGAA	GCATCAAACATTGGCCATAAGTC	61
Substance P	NM_003182	CGTGGCCTTGGCAGTCTTT	TGGCTCCTATTTCTTCTGCAAAC	61
TLR1	NM_003263	TGTGCTGCCAATTGCTCATT	TTTTCCCCATAAGTCTCTCTAAGAC	68
TLR2	NM_003264	TTGTGACCGCAATGGTATCTG	GCCCTGAGGGAATGGAGTTT	62
TLR3	NM_003265	CCCAAGCCTTCAACGACTGA	GGTGAAGGAGAGCTATCCACATTT	65
TLR5	NM_003268	TGTATGCACTGTCACTCTGACTCTGT	AGCCCCGGAACCTTGTGACT	65
TLR6	NM_006068	TGGGAGGGCCTATGGATGA	TGCCAGCAGCGAGTCGTA	77
TLR9	NM_017442	TGGGAGGGCCTATGGATGA	TGCCAGCAGCGAGTCGTA	77
Nod1	NM_006092	GCATCTTAAACTGGGAAAAAACA AAA	CTCAGAGATGATTGCTGTCTTCA	90
Nod2	NM_022162	GCATCTGCAAGCTCATTGAATG	CAGTCAATTTGTTGTTGAATAGAGCTAA	77
S100A8	NM_002964	CAACACTGATGGTGCAGTTAACTTC	TGCCACGCCCATCTTTATC	63
S100A9	NM_002965	ATGCTGATGGCGAGGCTAA	CGTCACCCTCGTGCATCTT	54
Caspase-1	NM_001223	CCGCAAGGTTTCGATTTTCAT	TCTTTCAGTGGTGGGCATCTG	63
IL-1 alpha	NM_000566	CCAACGGGAAGGTTCTGAAG	GGCTCCAGGTCATCAGT	70
IL-1 beta	NM_000576	CATCAGCACCTCTCAAGCAGAA	CCTGGCCGCCTTTGGT	61
IL-6	NM_000600	AGTACCCCCAGGAGAAGATTCC	TGAAGAGGTGAGTGGCTGTCTGT	64
TNF-alpha	NM_000594	AGTCTGGGCAGGTCTACTTTGG	TGGGAAGGTTGGATGTTCTGT	63
TRAF3	NM_001199427	AATGGAGTGCTCATCTGGAAGATT	CATGACGGCCTCCTGCTT	59
B2M	NM_012920	ATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATC	CCACTTTTTCAATTCTCTCTCCATTC	78
RPLP0	NM_001002	ATCAACGGGTACAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG	60

## Résultats

---

**Table S2.** Example of expression level adjustment in infected skin explants. A slight induction of expression for all the genes analysed in the present work was observed over time (T24 h, T48 h and T72 h) in untreated skin. For this reason, the gene expression levels of infected skin were normalized using the respective control by the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method ( $\Delta\Delta\text{Ct}=[(\text{Ct gene } X_{\text{T24}}-\text{Ct reference gene}_{\text{T24h}}) - (\text{Ct gene } X_{\text{s. epidermidis } 24}-\text{Ct reference gene}_{\text{s. epidermidis } 24\text{h}})]$ ). Here, the example of hBD2 is shown.

hBD2	Expression level ( <i>n</i> -fold increase)		
	T 24 h	T 48 h	T 72 h
Untrated skin	2.93	3.19	56.3
<i>S. epidermidis</i>	102.2	66.5	21
Adjusted value	35	27	0.2

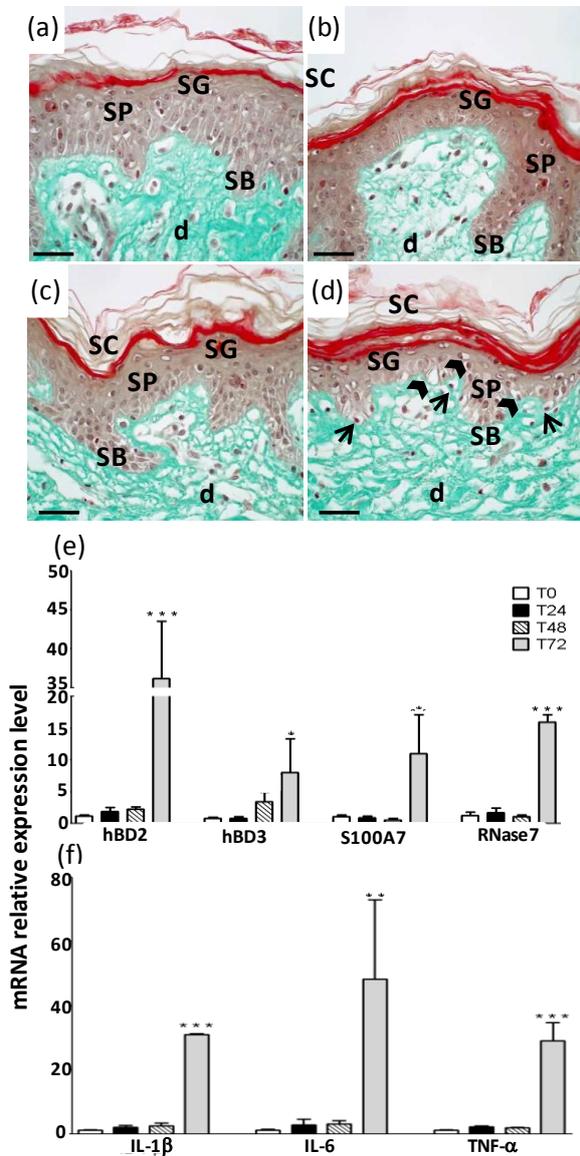
## Results

### **Impact of growth conditions on the morphological structure and gene expression profiles of skin explants**

Growth conditions are crucial to preserve good morphology of skin explants. Skin samples were cultured first for 48 h in BEM<sup>®</sup> that contained gentamicin and fungizone to avoid any bacterial cross-contamination, and then transferred to the commonly used medium DMEM (57, 58). To investigate the impact of growth conditions on skin structure, paraffin-embedded samples were sectioned and characterised morphologically after different incubation times (Fig. 1). Good preservation of the tissue was observed until 48 h incubation in DMEM, but the morphology began to undergo major alterations at 72 h (Fig. 1d) and 96 h (data not shown) survival, with the presence of pyknotic nuclei and intracellular oedema, especially in the stratum basale (SB). Immunolabelling of caspase-1, a marker of pyroptosis, was also performed (Fig. S3). Weak labelling of caspase-1 was observed in the stratum corneum (SC), which was in accordance with work published by Hosomi *et al.* (59) that showed basal activity of caspase-1 in the horned layer of normal skin. In addition, a strong increase in the release of IL-6 in the culture medium was observed; it reached a concentration of  $28,601 \pm 1,582$  pg/ml after 72 h survival (Table S3) compared with  $3,238 \pm 1,538$  pg/ml at T0.

In addition, the expression profiles of genes related to the innate immunity system and proinflammatory response were also investigated in full-thickness skin explants (Fig. 1e, f). Any variation was observed during the first 48 h of survival in DMEM. In contrast, a substantial increase in the expression levels of transcripts that encode AMPs, especially hBD2 ( $\geq 35$ -fold), was observed after 72 h survival in DMEM. In the same way, the expression levels of transcripts that encode the expression of proinflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$  ( $\geq 30$ -fold), IL-6 ( $\geq 45$ -fold), and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  ( $\geq 30$ -fold), increased dramatically after 72 h of incubation in DMEM. The expression of other genes triggered during cutaneous inflammation after skin injury (Fig. S4) was also investigated. Any significant variation in the expression level of transcripts encoding for the TNF-receptor-associated factor (TRAF)6 and TLR3 was observed, except for a downregulation of transcripts level specific for TLR3 after 72 h survival. Considering these data, in our study, explants were never incubated in the presence of bacteria for more than 48 h.

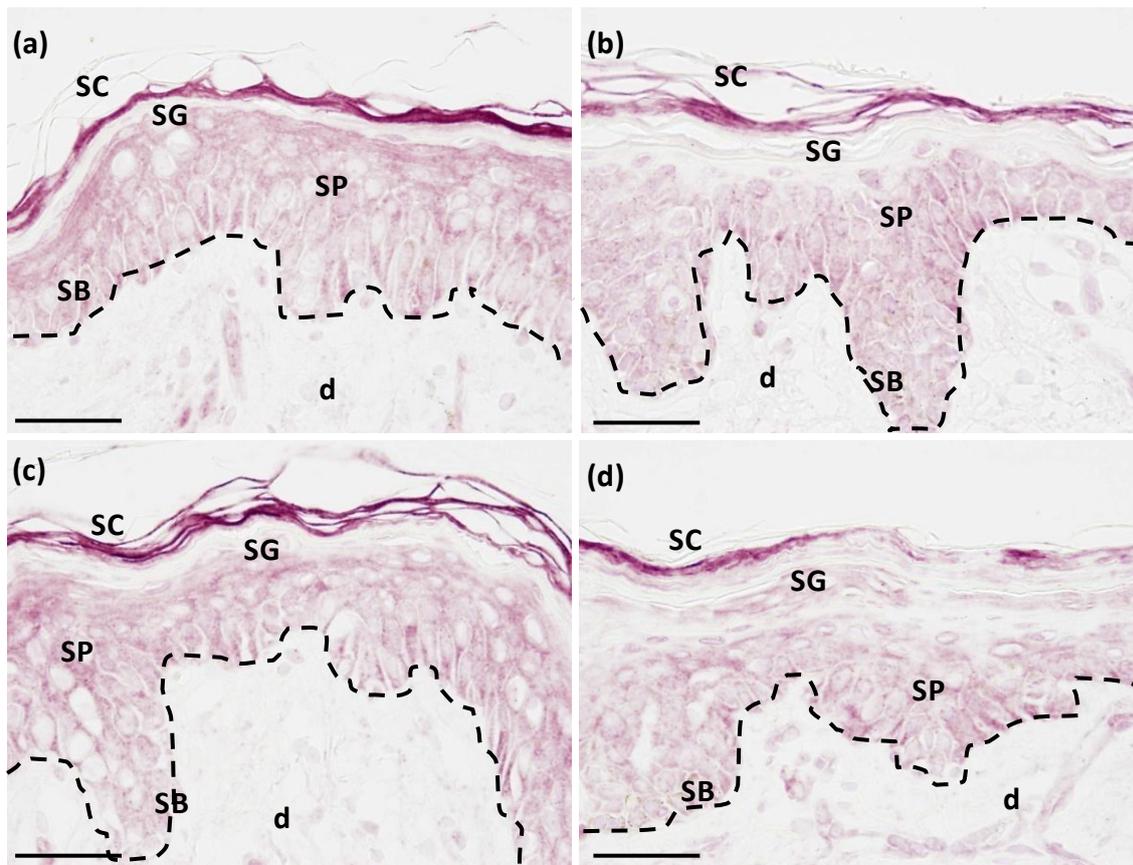
## Résultats



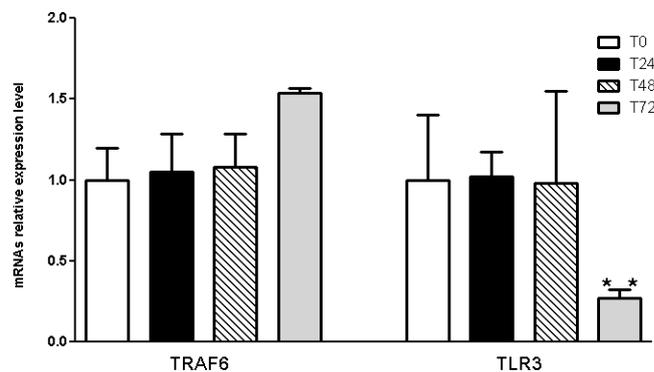
**Figure 1.** Morphological analysis and gene expression profiles of uninfected human skin explants. Paraffin-embedded sections of healthy human abdominal skin were stained by the Masson–Goldner trichrome staining protocol. Good morphology of the explants was observed in the controls (T0) (a), and after 24 h (b) and 48 h (c) of incubation in DMEM. After 72 h (d) of culture, pyknotic nuclei (arrows) and cellular oedema (arrowheads) were present, especially in the lower epidermis. The expression profiles of genes related to innate immunity (e) and proinflammatory cytokines (f) were also investigated. Significant upregulation of all the genes analysed was observed after 72 h of survival in DMEM.

d, dermis; SB, stratum basale; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SP, stratum spinosum. Scale bar : 50  $\mu$ m. Three different biopsies from the abdomen of female donors were analysed. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .

## Résultats



**Figure S3.** Caspase-1 immunolabelling in untreated human skin explants. Caspase-1 was detected in the horned layer and no differences were observed in the different samples analysed. a, T0; b, T 24h; c, T 48h; d, T72h. d, dermis; SB, stratum basale; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SP, stratum spinosum. Scale bar : 50  $\mu$ m.



**Figure S4.** Expression profile of skin injury-related genes. Any significant variation in TRAF1 and TLR3 expression was observed, except for a downregulation of TLR3 expression after 72h of survival.

Three different biopsies (n=3) from abdomen of a female donors analysed.

\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .

## Résultats

---

	IL-6 concentration (pg/mL)		
	untreated skin	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. fluorescens</i>
<b>T0</b>		3238 ± 1538	
<b>48 h</b>	4904 ± 2097	12226 ± 4900.9	3847 ± 712
<b>72 h</b>	28601 ± 1582	66851 ± 1606.5	53169 ± 5154

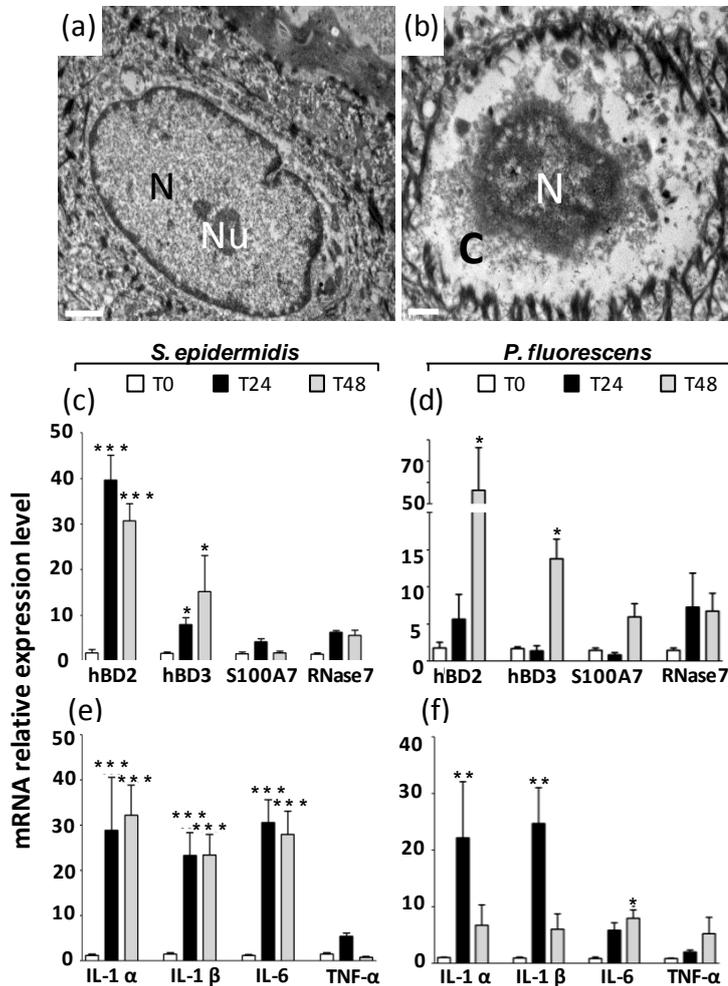
**Table S3.** IL-6 concentration in culture medium in untreated and treated human skin explants. We observed an important induction of IL-6 release in all the different controls used in this work. However, a significant increase in IL-6 concentration was observed in culture medium of infected skin biopsies. Values are expressed as pg/mL ± SEM of three independent experiments

### Morphological and ultrastructural patterns of skin explants after bacterial stimulation

As described previously, microorganisms can affect the structure of the skin by producing several exfoliative molecules (37). To investigate the impact of *S. epidermidis* and *P. fluorescens* on the morphologies of skin explants, the structure of infected samples was analysed by optical microscopy and transmission electron microscopy (TEM). Although bacteria of neither species penetrated to the granular layer, but resided exclusively in the external SC (Fig. S5d and g), we observed important alterations to the morphology of the skin explants. In infected skin, basal keratinocytes were characterised by the presence of pyknotic nuclei, which showed chromatin condensation (Fig. 2b). In particular, *S. epidermidis* induced severe hyperplasia and perinuclear oedema across all the epidermis after 48 h bacterial stimulation (Fig. S5c). In addition, labelling of caspase-1 revealed a strong induction of

## Résultats

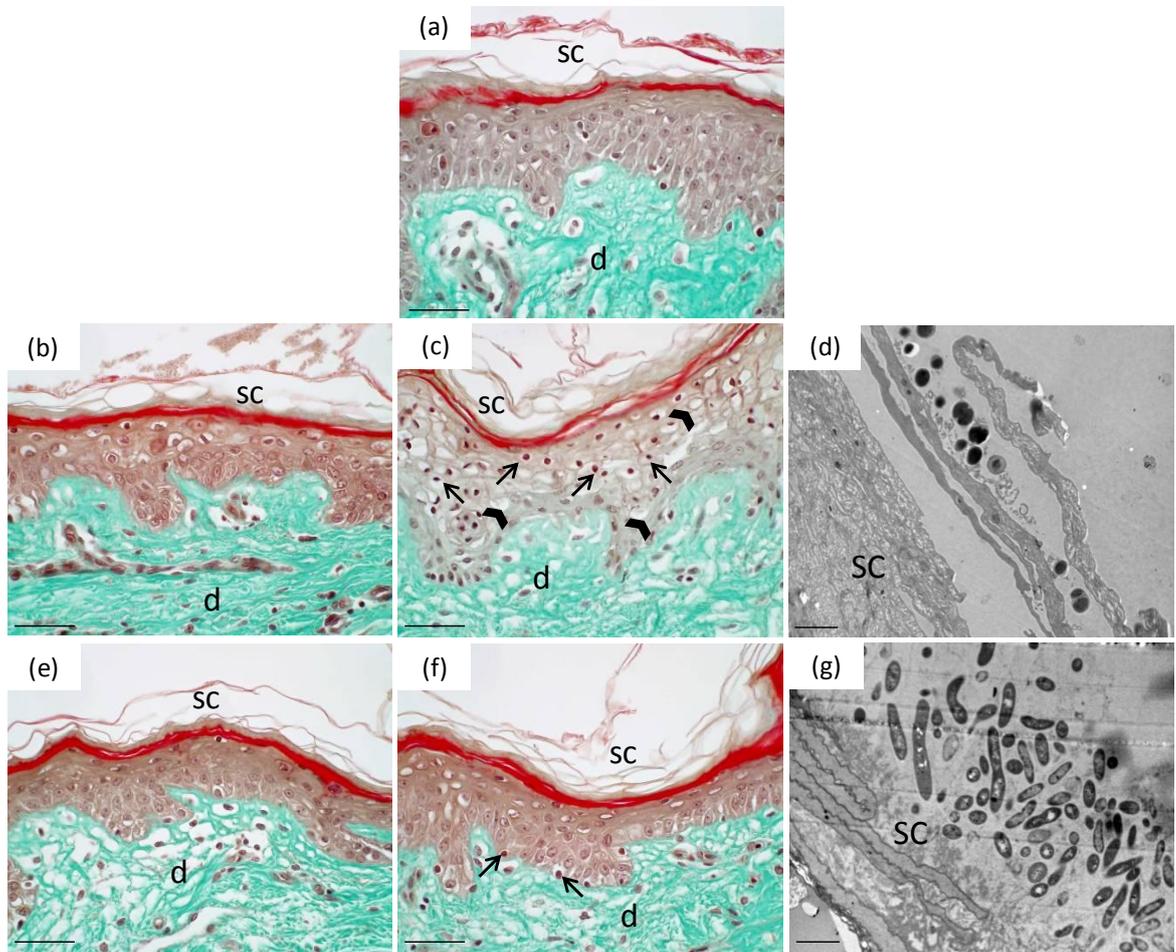
protein activity across all the epidermal layers that was proportional to the time of contact with the bacteria (Fig. S6).



**Figure 2.** Effect of bacterial exposure on the structure of, and gene expression within, human skin explants. An intact nucleus observed in the basal layer of the control sample is shown in (a). Analysis by TEM showed that *S. epidermidis* (b) induced the formation of pyknotic nuclei, especially in basal keratinocytes, and that these nuclei were characterised by condensation of the chromatin and damage of cellular content. As shown in (c) and (d), both types of bacteria increased the level of transcript that encodes hBD2 after 24 and 48 h of infection. Significant differences in the levels of transcripts that encode these cytokines IL-1α and β and IL-6 were also observed (e, f). Three different biopsies from the abdominal area of a female donor were analysed ( $n = 3$ ). For statistical analysis, T0 and the different times of exposure were compared.

C, cytoplasm; N, nucleus; Nu, nucleolus. Scale bar : a, 1 μm; b, 0.5 μm.

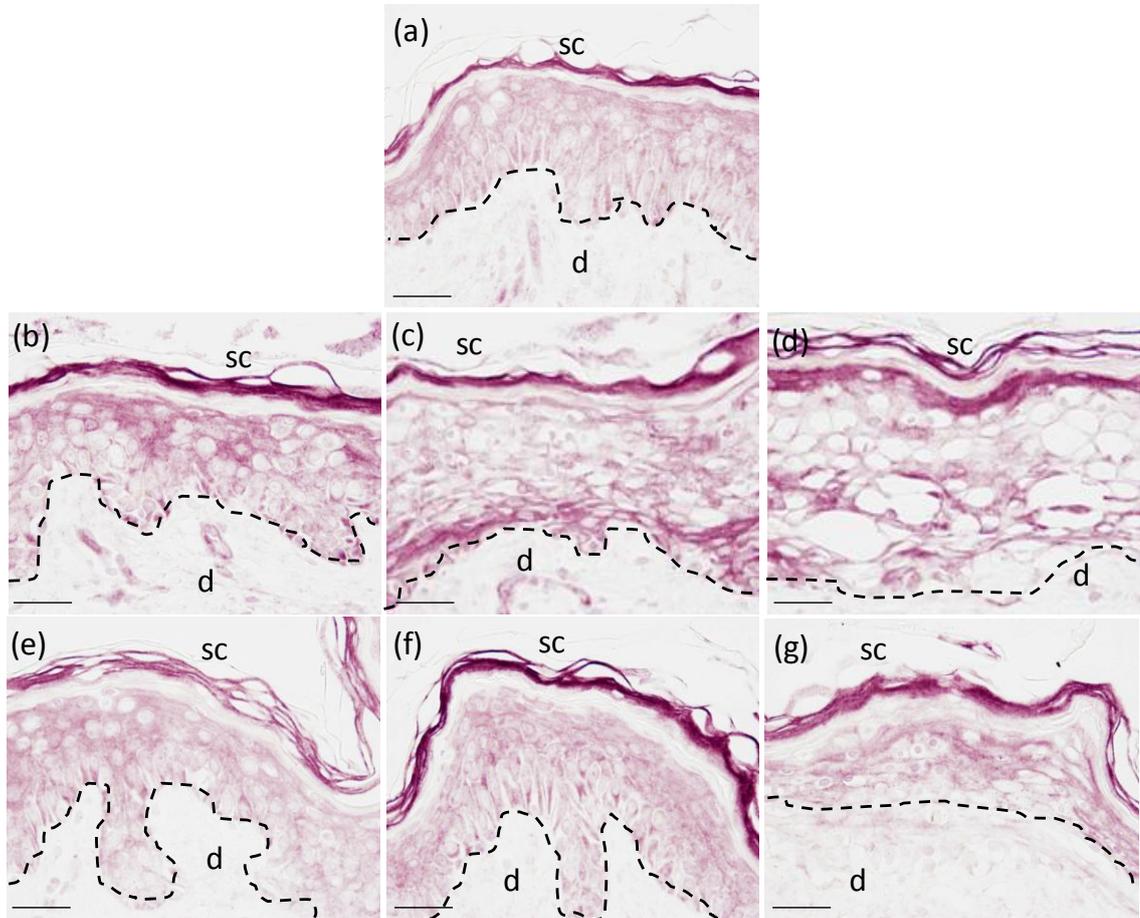
\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .



**Figure S5.** Morphological analysis of infected skin biopsy and bacteria localisation. After the application of the selected microorganisms, transversal paraffin-embedded sections were stained by Masson's trichrome Goldner protocol and observed by an optical microscope for morphological analysis. As shown in c), *S. epidermidis* since 48 h of exposure deeply altered the structure of the epidermis, by inducing a severe hyperplasia with formation of pycnotic nuclei (arrows) and perinuclear oedema (arrowheads). Less evident was the impact of *P. fluorescens* on skin explants structure. As shown by TEM analysis, both bacteria (d, *S. epidermidis*; g, *P. fluorescens*) were not able to penetrate into the living epidermis, colonizing the external *stratum corneum*.

a), T0; b), *S. epidermidis* 24 h; c) *S. epidermidis* 48 h; d) *S. epidermidis* 48 h; e) *P. fluorescens* 24 h; f) *P. fluorescens* 48 h; g) *P. fluorescens* 48 h.

d, dermis; SC, *stratum corneum*. Scale bar : a-c and e,f 50  $\mu\text{m}$ ; d, g 1  $\mu\text{m}$ .



**Figure S6.** Caspase-1 immunolabelling in infected skin explants. Caspase-1 immunostaining confirmed the negative impact of *S. epidermidis* application on skin explants. A severe induction of the immunoreactivity (in purple) was observed especially after 48 h (c) and 72 h (d) of *S. epidermidis* stimulation. Any differences was observed after *P. fluorescens* infection. a), T0; b), *S. epidermidis* 24 h; c) *S. epidermidis* 48 h; d) *S. epidermidis* 72 h; e) *P. fluorescens* 24 h; f) *P. fluorescens* 48 h; g) *P. fluorescens* 72 h.

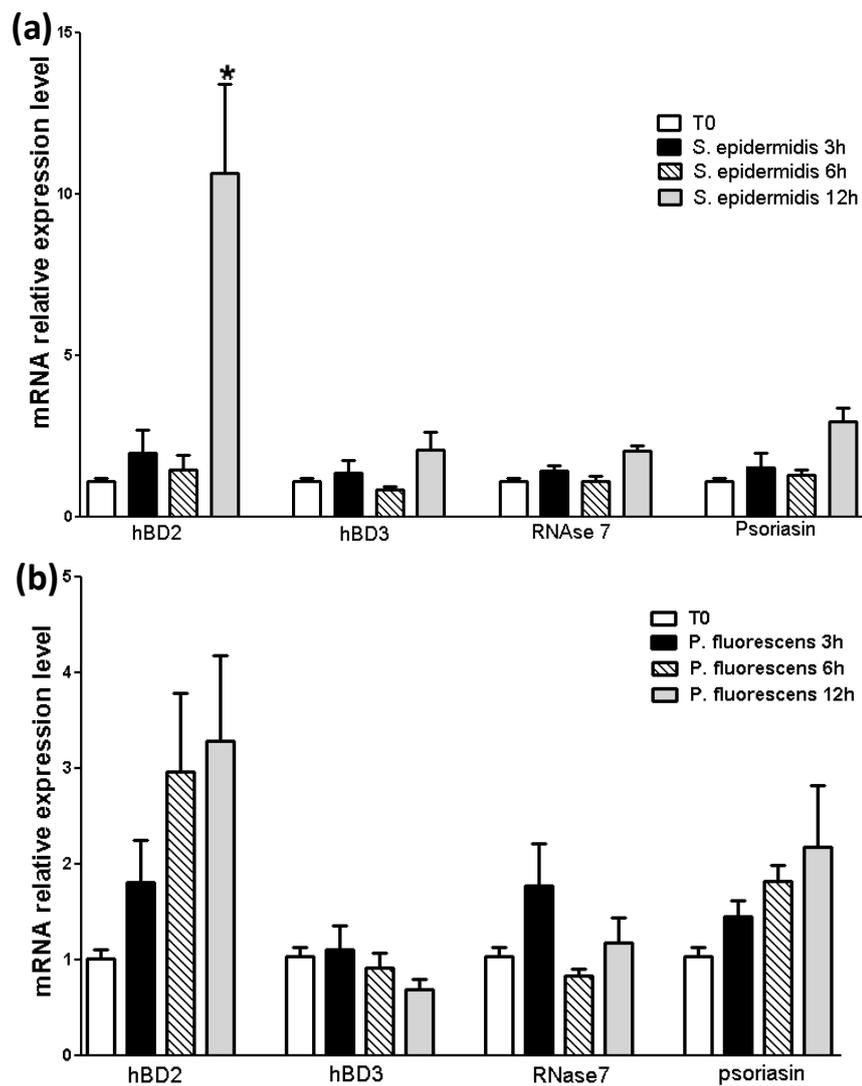
d, dermis; SC, *stratum corneum*. Scale bar : 50  $\mu$ m.

### Gene expression analysis from whole skin explants following bacterial contact

The expression of genes linked to innate immunity is the first defensive response adopted by cutaneous cells following bacterial colonisation. We analysed the regulation of AMPs and proinflammatory cytokines over time after exposure of full-thickness human skin explants to bacterial stimuli. Any significant variation in the levels of mRNAs specific for AMPs or proinflammatory cytokines during the first 12 h of treatment was observed, except for the slight induction of transcript levels that encode hBD2 (Fig. S7). Considerable changes in gene regulation were observed after 24 h and 48 h of bacterial stimulation (Fig. 2c–f), which included increased abundance of the transcript that encodes hBD2 after 24 h ( $\geq 40$ -fold) and 48 h ( $\geq 30$ -fold) of contact with *S. epidermidis* (Fig. 2c), and after 48 h ( $\geq 55$ -fold) of contact with *P. fluorescens* (Fig. 2d). Levels of transcript that encode hBD3 increased slightly ( $\geq 15$ -fold) after 48 h of exposure to either bacteria. We observed no significant variation in levels of transcripts that encode psoriasin and RNase 7, as well as for transcript that encode other genes with antimicrobial activity (hBD1, secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI), substance P, S100A8, S100A9; data not shown). Analysis by qPCR revealed that bacterial stimulation significantly increased the expression of genes that encode precursors of inflammatory ILs (Fig. 2e, f), with the exception of TNF-alpha. The concentration of IL-6 in the culture medium collected at the end of each treatment was also analysed (Table S3). Despite there was an increase over time in the amount of IL-6 released into the culture medium of control skin, the concentration of IL-6 varied significantly between the control and infected skin samples during the first 48 h after bacterial stimulation.

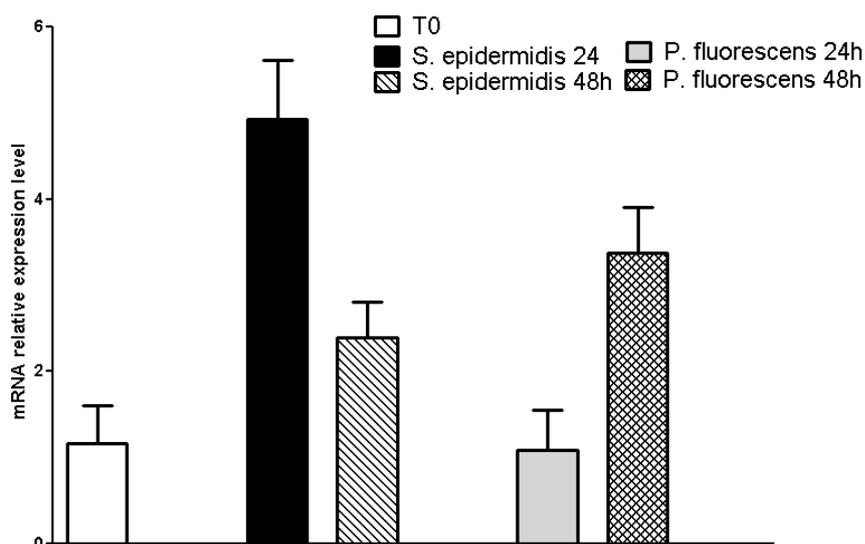
Finally, we analysed the gene expression profiles of epidermal receptors, including TLRs and NOD-like receptors (NLRs). We showed that the expression of TLR2, which plays a crucial role in cutaneous host defence (14, 21), was not upregulated in skin explants after exposure to commensal bacteria (Fig. S8). In the same way, no significant modifications were observed for any of the other genes tested that encode TLRs (TLR 1, 5, 6, 9) or NLRs (Nod 1 and 2) (data not shown).

## Résultats



**Figure S7.** Gene expression profile in full thickness skin explants over the first 12 h of bacterial treatment. Any significant variation was observed in the expression of AMPs following exposition to *S. epidermidis* (a) and *P. fluorescens* (b) during the first 12 h of the treatment.

Three different biopsies (n=3) from abdomen of a female donors were analysed.



**Figure S8.** Gene expression profile of TLR2 after bacterial stimulation. Any significant difference was observed in the expression of TLR2 following *S. epidermidis* and *P. fluorescens* treatment. n=3.

### Analysis of mRNA levels across epidermal layers by LCM

Levels of AMP expression differ significantly across epidermal layers of healthy human skin (53). We used LCM coupled to qPCR to investigate the transcript levels of a panel of genes that are linked to the innate immunity and proinflammatory response across the different layers of human epidermis following *S. epidermidis* and *P. fluorescens* stimulation (Table 1a, b). Using transcript that encode integrin  $\beta 4$  and corneodesmosin (CDNS) as internal markers for the correct isolation of a fraction enriched in keratinocytes from either the basal or granular layer (Table S4), we showed that induction of each of the specific gene analysed was regulated in a spatially dependent manner. Significant variation in levels of transcript encoding for TLR2 was observed in the granular layer after exposure to bacterial stimuli (Table 1a, b). Conversely, a slight induction over time was observed in the basal layer. Among the AMP transcripts analysed, we observed that levels of transcript encoding for hBD2 increased dramatically in the uppermost epidermis, with a  $\geq 1,462.5$ -fold and  $\geq 1,401.4$ -fold increase after 48 h of exposure to *S. epidermidis* and *P. fluorescens*, respectively. Similarly, induction of levels of transcripts encoding for hBD3 were highest in suprabasal keratinocytes, and their increased abundance in the lower epidermis was sustained ( $\geq 720$ -fold for *S. epidermidis* and  $\geq 120.1$ -fold for *P. fluorescens* after 48 h). A different pattern of expression was observed for the genes that encode the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6. These IL encoding genes were expressed at a higher level in basal keratinocytes than in

## Résultats

granular keratinocytes after bacterial exposure. After 48 h of treatment with *S. epidermidis*, the expression of gene that encode IL-1 $\beta$  and IL-6 was strongest in the SB ( $\geq 167$ -fold and  $\geq 104$ -fold higher, respectively), compared to the SG ( $\geq 58.3$ -fold and  $\geq 38.7$ -fold higher, respectively) (Table 1a). Similar changes in the expression profiles of the same genes were observed after *P. fluorescens* stimulation (Table 1b).

**Table 1.** Gene expression profiles across the epidermal layers following bacterial exposure. Two fractions enriched in keratinocytes from either the basal or the granular layer of the epidermis were isolated by LCM and the expression profiles after exposure to *S. epidermidis* (a) or *P. fluorescens* (b) were analysed by qPCR. Values are expressed as the variation in transcription between the basal and the granular layer of uninfected and infected skin samples. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Three different biopsies from the abdominal area of a female donor were analysed.

(a)	<i>S. epidermidis</i> MFP04			
	24 h		48 h	
	SB	SG	SB	SG
	(n-fold increase)			
<b>TLR2</b>	1.4 $\pm$ 1	9.3 $\pm$ 2.1	2 $\pm$ 0.7	11.7 $\pm$ 3.9
<b>hBD2</b>	117.2 $\pm$ 1.2	1144 $\pm$ 10.2	322 $\pm$ 14.5	1262.5 $\pm$ 34
<b>hBD3</b>	19.4 $\pm$ 3.6	39.9 $\pm$ 19	720 $\pm$ 13	946 $\pm$ 67
<b>IL-1 beta</b>	76.3 $\pm$ 12	41 $\pm$ 11	167 $\pm$ 12.4	58.3 $\pm$ 8.8
<b>IL-6</b>	51.9 $\pm$ 3.2	35 $\pm$ 8.2	104 $\pm$ 6.7	38.7 $\pm$ 4.3

(b)	<i>P. fluorescens</i> MFP05			
	24 h		48 h	
	SB	SG	SB	SG
	(n-fold increase)			
<b>TLR2</b>	1.9 $\pm$ 1.4	10.3 $\pm$ 3.3	1.6 $\pm$ 1.2	8.4 $\pm$ 0.3
<b>hBD2</b>	2.7 $\pm$ 1.9	60.3 $\pm$ 4.4	125.3 $\pm$ 12.1	1401.4 $\pm$ 23.4
<b>hBD3</b>	15.3 $\pm$ 3.2	65 $\pm$ 7.1	120.1 $\pm$ 9.5	455.4 $\pm$ 14
<b>IL-1 beta</b>	28.2 $\pm$ 4.5	38.4 $\pm$ 6.3	75.3 $\pm$ 7.1	38.3 $\pm$ 6
<b>IL-6</b>	31.1 $\pm$ 3.3	41.4 $\pm$ 5.3	63.3 $\pm$ 8.1	28.3 $\pm$ 3.1

## Résultats

**Table S4.** Gene expression ratio of integrin  $\beta$  4 and CDNS in the fraction isolated by LCM. In order to verify the correct isolation of the area of interest, integrin  $\beta$ 4 and CDNS were used as internal control. Three different biopsies (n=3) from abdomen of a female donors were analysed.

	Integrine beta4	CDNS
	SB/SG ratio	SG/SB ratio
T0	11.3 $\pm$ 1.1	20.3 $\pm$ 1.9
<i>S. epidermidis</i> 24 h	8.4 $\pm$ 2	32.6 $\pm$ 2.3
<i>S. epidermidis</i> 48 h	7.7 $\pm$ 0.8	26.7 $\pm$ 3.3
<i>P. fluorescens</i> 24 h	5.3 $\pm$ 0.4	14.3 $\pm$ 0.9
<i>P. fluorescens</i> 48 h	7.9 $\pm$ 1.4	22.6 $\pm$ 1.6

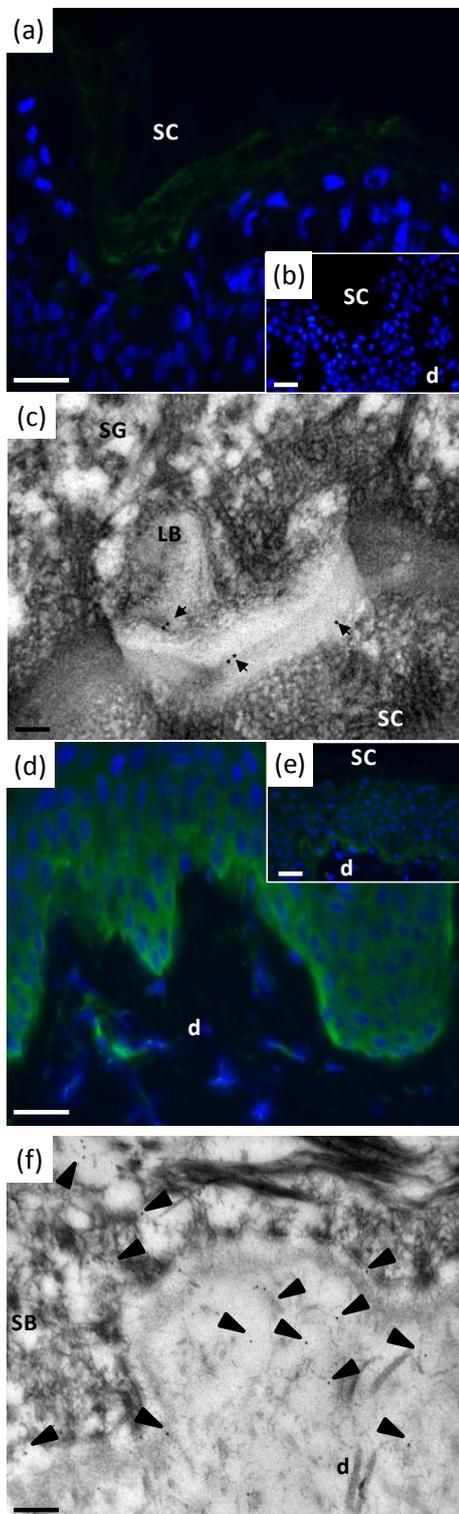
### Protein localisation in human epidermis following bacterial stimulation

To examine the distribution of relevant proteins across the epidermis in relation to bacterial exposure, skin sections were immunostained with antibodies specific for hBD2, hBD3, psoriasin, and IL-6. Under normal conditions, the expression of hBD2 depends strictly on the body site that is analysed (60). Immunolabelling using specific antibodies confirmed the absence of hBD2 throughout the epidermis from healthy abdominal skin (Fig. 3b). However, induction of hBD2 protein expression was observed by immunofluorescence (Fig. 3a) and TEM (Fig. 3c) after exposure to *S. epidermidis* particularly in the granular and horned layer. Optical observations of *P. fluorescens* exposed explants confirmed these findings (Fig. S9). Similarly, in healthy human epidermis untreated by bacteria, hBD3 was detected principally in suprabasal keratinocytes (Fig. S10). Surprisingly, after incubation with both bacteria, we observed induction of hBD3 expression in the basal layer (Fig. S10).

A completely different pattern of expression was observed for IL-6. In untreated skin, IL-6 was labelled weakly only in the inner epidermis (Fig. 3b). After application of *S. epidermidis* (Fig. S9) or *P. fluorescens* (Fig. 3a, c), induction of IL-6 expression was confined to the lower epidermis, including the basal and spinous layers. Finally, psoriasin showed specific immunoreactivity in the uppermost epidermis, especially along the SG/SC interface

## Résultats

(Fig. S11). As expected, consistent with our qPCR data, we did not observe any variation in psoriasin distribution following bacterial infection.

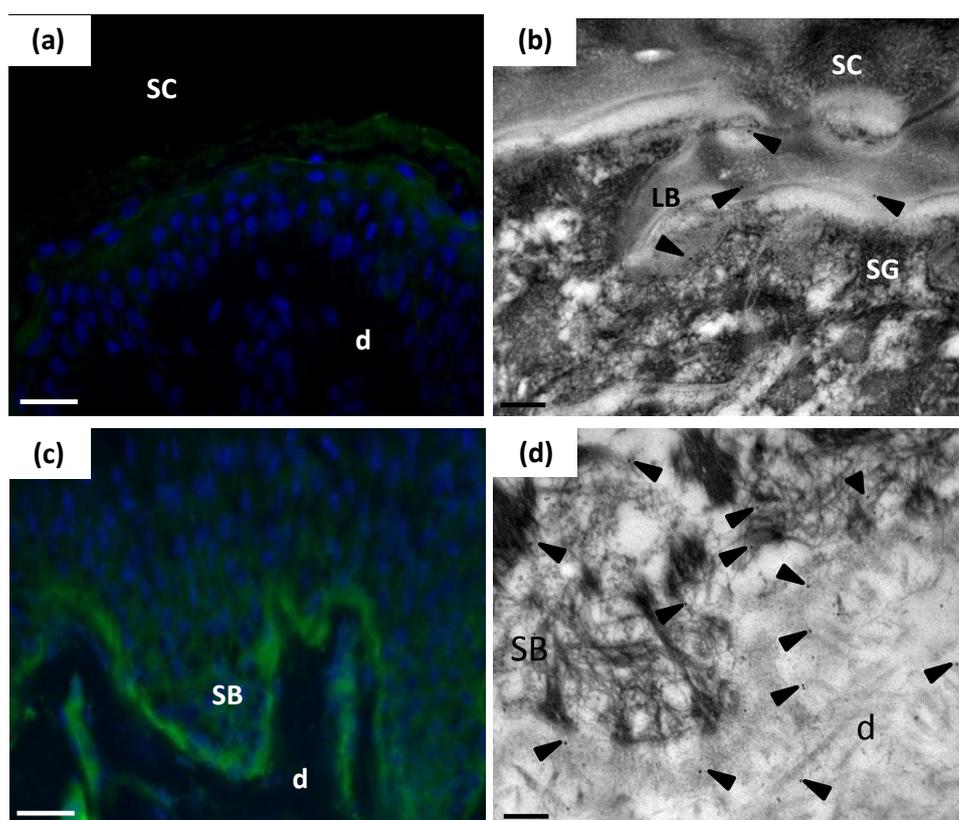


**Figure 3.** Protein localisation in human epidermis in relation to bacterial stimulation. Skin sections were immunostained and observed by TEM or optical microscopy. Increased hBD2 abundance was observed in the

## Résultats

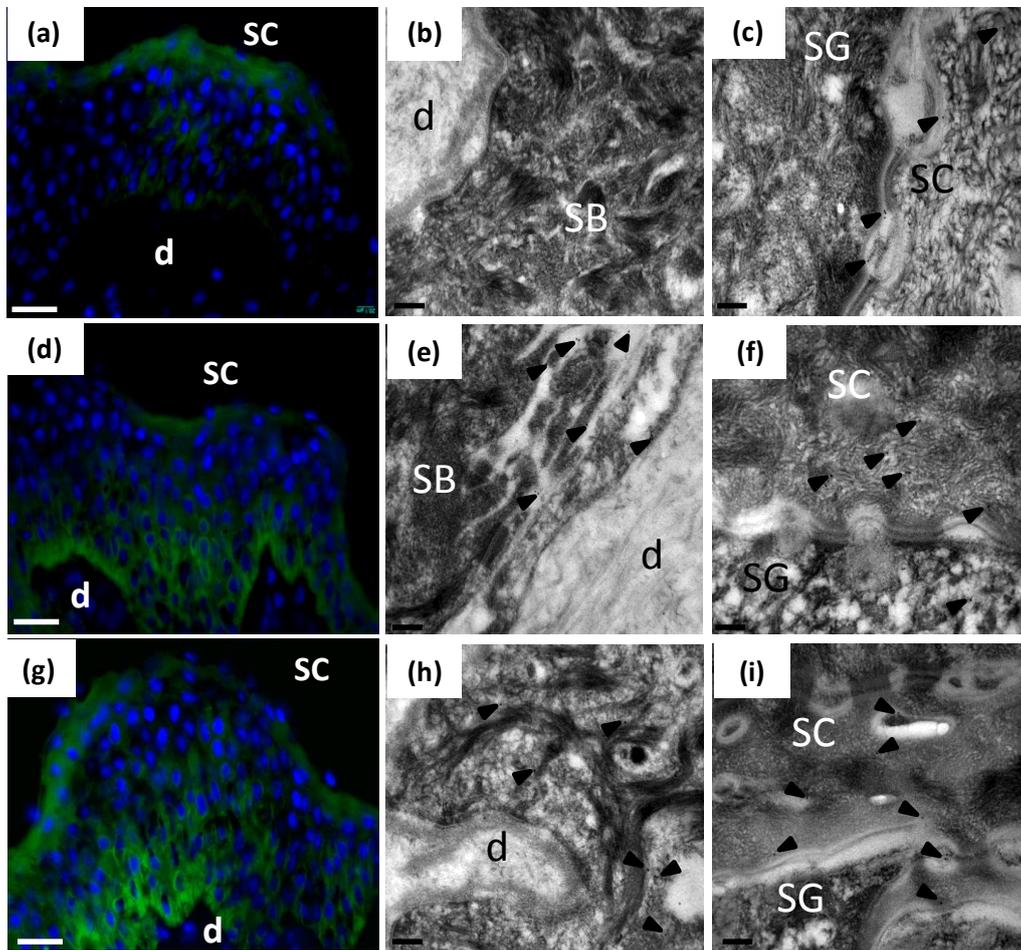
uppermost epidermis after 48 h of stimulation with *S. epidermidis* (a, c) whereas no hBD2 was detected in untreated skin epidermis (b). By contrast, IL-6 was detected in the lower epidermal layers of untreated skin (e), with an intensification of immunoreactivity observed in explants treated with *P. fluorescens* (d, f). Gold particles, which indicate the presence of the epitope, are marked by arrows.

d, dermis; LB, lamellar body; SB, stratum basale; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum. Scale bar : 0.2  $\mu\text{m}$  in c and f and 50  $\mu\text{m}$  in a, b, d, and e.



**Figure S9.** Immunolocalisation of hBD2 and IL6 in human skin following bacterial stimuli. As observed for *S. epidermidis* (Fig. 3), *P. fluorescens* induces also the expression of hBD2 in the uppermost epidermis as revealed by immunofluorescence (a) and TEM (b) analysis. The localisation of IL-6 following *S. epidermidis* is also shown. Note the strongest immunoreactivity of IL-6 epitope in the inner epidermis as revealed by immunofluorescence (c) and TEM (d) analysis.

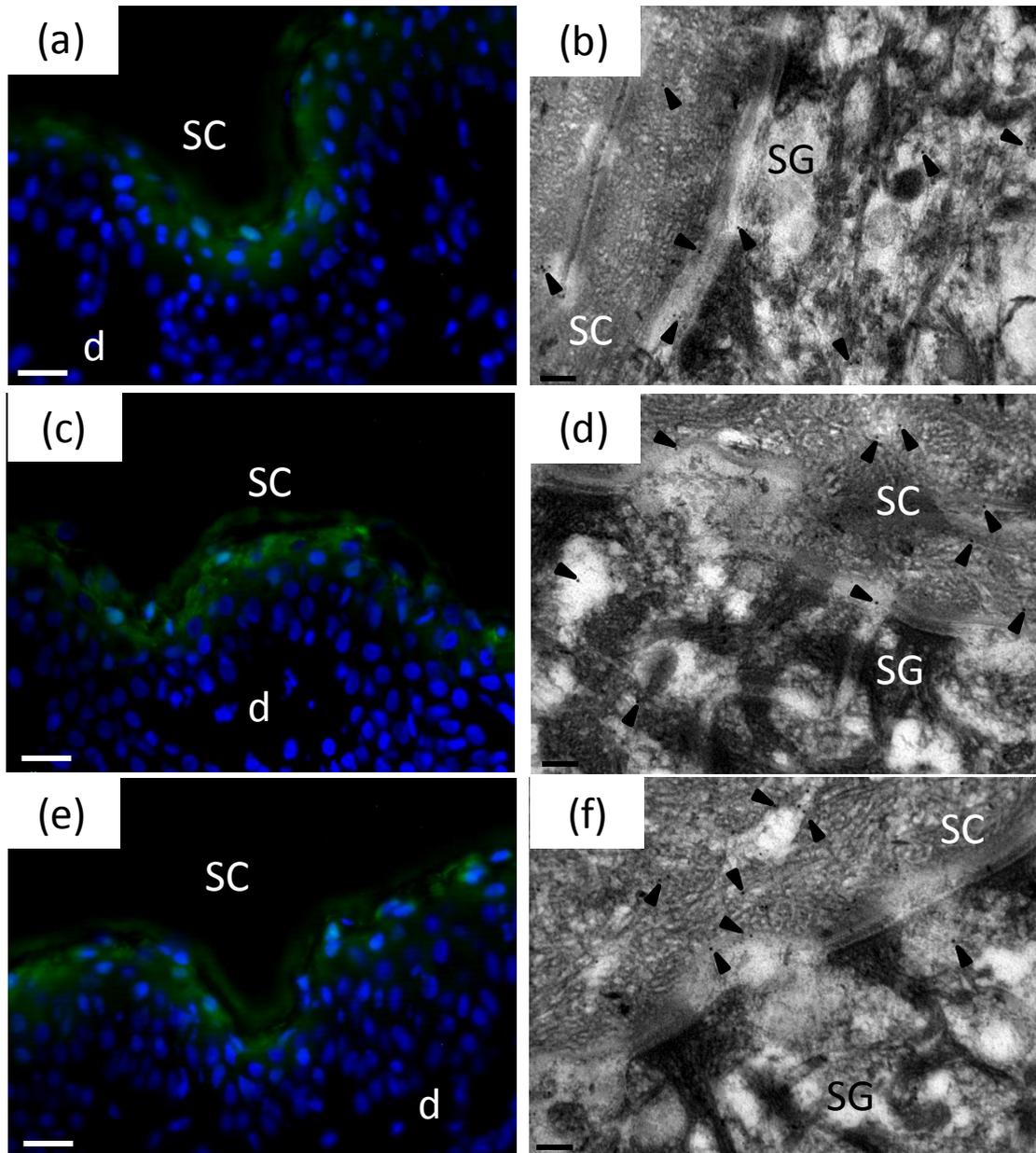
Gold particles are indicated by an arrow. d, dermis; LB, lamellar body; SB, stratum basale; SG, stratum granulosum; SC, stratum corneum. Scale bar : a, c 50  $\mu\text{m}$ . c, d 0.2  $\mu\text{m}$ .



**Figure S10.** Immunolocalisation of hBD3 in human skin following bacterial stimuli. In untreated skin (a, b and c) hBD3 was detected especially in suprabasal keratinocytes. An increase of hBD3 labelling was observed in the basal layer and across the interface SG/SC following *S. epidermidis* (d, e and f) *P. fluorescens* (g, h and i) stimulation. Gold particles are indicated by a arrow.

d, dermis; SB, stratum basale; SG, stratum granulosum; SC, stratum corneum.

Scale bar : a, d, g 50  $\mu\text{m}$ ; b, c, e, f, h, i 0.2  $\mu\text{m}$ .



**Figure S11.** Immunolocalisation of psoriasin in human skin. Psoriasin was localized at SG/SC interface. Any difference was observed between uninfected biopsy (a, b) and biopsy infected with *S. epidermidis* (c, d) and *P. fluorescens* (e, f). Gold particles are indicated by a arrow.

d, dermis; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum. Scale bar : a, c, e 20  $\mu\text{m}$ ; b, d, f 0.2  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

The aim of the present work was to describe the response of human skin explants to microbial stimulation at the morphological, gene, and protein levels. The model bacteria used were *S. epidermidis* and *P. fluorescens* that had been isolated directly from healthy human skin.

To validate our infection model, the first crucial step was to establish the optimal time for exposure of the skin samples to microbial stimuli. Explants were generated by applying a mechanical force to skin obtained during plastic surgery. As described by Sørensen *et al.* (61, 62), this manual peeling can increase the expression of genes that encode AMPs over time, in particular hBD3. In addition, we found that after 72 h of survival in DMEM, the levels of transcripts that encoded other AMPs, including hBD2 and proinflammatory cytokines, were increased substantially.

In parallel, we showed by TEM and optical microscopy that exposure to bacteria for 72 h, especially *S. epidermidis*, altered the morphology of skin biopsies greatly by inducing cellular death across the epidermis. These data suggest that 48 h should be the maximal time for exposure to bacteria, to ensure that all further data are not the result of perturbed viability of the infection model.

The expression of AMPs is a first defensive response by epidermal cells following microbial exposure. As described by Ali *et al.* (60), we found that hBD2 was not expressed in healthy human abdominal skin. After bacterial exposure, we observed upregulation of hBD2 at both the gene and protein levels in suprabasal keratinocytes, which confirmed previous findings (18, 34) that hBD2 expression at both gene and protein level is linked to the degree of differentiation of keratinocytes. Analysis of whole human skin explants, indicated that levels of transcripts that encoded hBD2 increased to levels ~40- and 60-fold higher than those in uninfected explants after stimulation with *S. epidermidis* and *P. fluorescens*, respectively. Moreover, in microdissected samples, levels of transcript that encodes hBD2 increased dramatically in relation to microbial stimulation, reaching levels ~1,200-fold and ~1,400-fold higher in the SG-enriched fraction after *S. epidermidis* and *P. fluorescens* exposure, respectively, when compared with uninfected explants. This important difference in gene regulation that was observed upon comparison of whole human skin explants and microdissected samples arises from the fact that the skin is composed of different cell types. Only a few of these, such as keratinocytes and neutrophils (63), are able to synthesize AMPs.

## Résultats

---

It should be noted that the skin surface is sterilised completely with antiseptic solution immediately before plastic surgery, which probably makes the innate immunity system more sensitive to bacterial infection.

Analysis using LCM showed that, although the gene that encodes hBD2 was induced specifically in suprabasal epidermal cells following incubation of the skin surface with *S. epidermidis* or *P. fluorescens*, expression of the gene that encodes hBD3 was stimulated uniformly across the epidermis. This finding was confirmed at the protein level by immunohistochemical analysis. This different pattern of expression is probably due to the fact that hBD3 acts specifically against *S. aureus* (22, 23), the major pathogen of the skin. Given that *S. aureus* can penetrate the living epidermis under some conditions, efficient protection across all epidermal layers is required. Induction of proinflammatory cytokines followed the exposure of human skin explants to bacteria. As described previously, interleukins, including IL-1 and IL-6, are able to stimulate the expression of AMPs (18–20, 64–67). This might explain the increase in IL synthesis that was observed in skin explants following bacterial exposure. Unlike AMPs, IL production was strongest in the lower layers of the epidermis. This opposite pattern of expression was perhaps due to the role of ILs in inducing the migration of Langerhans cells and dendritic cells in the dermis (68).

In conclusion, various advantages arise from use of the organotypic model of skin explants, including close similarity to the human organism and a cellular complexity that is typical of human skin. The results of the present work suggest that human skin explants are a valid and alternative tool that can be used to investigate how skin microflora modulate the physiology of cutaneous cells.

### **Acknowledgments**

This work was supported by ‘Le Pôle de compétitivité’ de la Cosmetic Valley and the ‘FEDER’ (Fonds Européens de Développement Régional) within the framework of the ‘Skinoflor’ project. Images and data were obtained on PRIMACEN (<http://primacen.crihan.fr>) : The Cell Imaging Platform of Normandy, SFR IRIB, Faculty of Science, University of Rouen 76821 Mont Saint Aignan, on BioEC laboratory, Lonjumeau, France and on Glyco-MEV Laboratory, UPRES EA 4358, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France. We thank Dr. F. Peno-Mezzorino (BioEC) for his help with the immunohistological analysis of skin biopsies, and S. Bernard (Glyco-MEV laboratory) for her help with TEM analysis. G. Percoco, Y. Ramdani, C. Merle, and T. Jaouen performed the research; G. Percoco, M-L. Follet-Gueye, A. Driouich, M. Feuilloley L. Lefeuvre, C. Merle, T. Jaouen, and E. Lati designed the research study; M. Bénard, C. Merle, M. Hillion, L. Mijouin, and E. Lati contributed essential reagents and tools; G. Percoco, M. Bénard, M-L. Follet-Gueye, C. Merle, and Y. Ramdani analysed the data; and G. Percoco, M-L. Follet-Gueye, C. Merle, and A. Driouich wrote the paper. The work was co-supervised by M-L Follet-Gueye and A. Driouich. The study was conducted in accordance with the ethical policies of *Experimental Dermatology*. The BioEC Laboratory possesses an authorization from the French Minister for Health.

### **Conflict of interest**

The authors have no conflicting interests.

### References

- 1 Madison K C. *J Invest Dermatol* 2003 : **121** : 231–241.
- 2 Elias P M. *Semin Immunopathol* 2007 : **29** : 3–14.
- 3 Proksch E, Brandner M J, Jensen J M. *Exp Dermatol* 2008 : **17** : 1063–1072.
- 4 Jensen J M, Procksh E G. *Ital Dermatol Venereol* 2009 : **144** : 689–700.
- 5 Nestle F O, Di Meglio P, Qin J Z, Nickoloff B J. *Nat Rev Immunol* 2009 : **9** : 679–691.
- 6 Elias P M Defensive function of the stratum corneum. In : Elias P M, Feingold K R. *Skin Barrier*. New York : Taylor and Francis; 2006 : 5–14.
- 7 De Luca C, Valacchi G. *Mediat Inflamm* 2010 : **2010** : 321494.
- 8 Roth R R, James W D. *Ann Rev Microbiol* 1988 : **42** : 441–461.
- 9 Chiller K, Selkin B A, Murakawa G J. *J Invest Dermatol* 2001 : **6** : 170–174.
- 10 Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman D A *et al.* *Nature* 2007 : **449** : 811–818.
- 11 Grice E A, Kong H H, Renaud G *et al.* *Genome Res* 2008 : **18** : 1043–1050.
- 12 Capone A A, Dowd S E, Stamatias G N, Nikolovski J. *J Invest Derm* 2011 : **131** : 1–7.
- 13 Percival S L, Emanuel C, Cutting K F, Williams D W. *Int Wound J* 2012 : **9** : 14–32.
- 14 Lai Y, Cogen A L, Radek K A *et al.* *J Invest Derm* 2010 : **130** : 2211–2221.
- 15 Cogen A L, Yamasaki K, Muto J *et al.* *PLoS One* 2010 : **5** : e8857.
- 16 Cogen A L, Yamasaki K, Sanchez M K *et al.* *J Invest Derm* 2009 : **130** : 192–200.
- 17 Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T *et al.* *Nat Med* 2009 : **15** : 1377–1388.
- 18 Liu A Y, Destoumieux D, Wong A V, Park C H, Valore E V, Liu L, Ganz T. *J Invest Dermatol* 2001 : **118** : 275–281.
- 19 Dinulos J C H, Mentele L, Fredericks L P, Dale B A, Darmstadt G L. *Clin Diagn Lab Immun* 2003 : **10** : 161–166.
- 20 Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder J M. *J Invest Dermatol* 2004 : **123** : 522–529.
- 21 Menzies B E, Kenoyer A. *Infect Immun* 2006 : **74** : 6847–6854.
- 22 Kisich K O, Howell M D, Boguniewicz M, Heizer H R, Watson N U, Leung D Y M J. *Invest Derm* 2007 : **127** : 2368–2380.
- 23 Zanger P, Holzer J, Schleucher R, Scherbaum H, Schittek B, Gabrysch S. *Inf Immun* 2010 : **78** : 3112–3117.
- 24 Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Enno Christophers E, Schröder J M. *Nat Immun* 2005 : **6** : 57–64.
- 25 Nizet V, Ohtake T, Lauth L *et al.* *Nature* 2001 : **414** : 454–457.

- 26** Braff M H, Zaiou M, Fierer J, Nizet V, Gallo R L. *Infect Immunol* 2005 : **73** : 6771–6781.
- 27** Kim J E, Kim B J, Jeong M S, Seong S J, Kim N M, Hong C K, In Ro B J. *Korean Med Sci* 2005 : **20** : 649–654.
- 28** Köten B, Simanski M, Gläser R, Podschun R, Schröder J M, Harder J. *PLoS One* 2009 : **4** : e6424.
- 29** Zanger P, Holzer J, Schleucher R, Scherbaum H, Schitteck B, Gabrysch S. *J Invest Dermatol* 2009 : **200** : 1907–1915.
- 30** Dorschener R A, Lin K H, Murakami M, Gallo R L. *Pediatr Res* 2003 : **53** : 566–572.
- 31** Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H *et al.* *Infect Immun* 2003 : **71** : 3730–3739.
- 32** Kintarak S, Whawell S A, Speight P M, Packer S, Nair S P. *Infect Immun* 2004 : **72** : 5668–5675.
- 33** Menzies B E, Kenoyer A. *Infect Immun* 2005 : **73** : 5241–5244.
- 34** Wanke I, Steffen H, Christ C, Krismer B. *J Invest Dermatol* 2011 : **131** : 382–390.
- 35** Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Sugai M R, Stanley J R J. *Invest Derm* 2002 : **118** : 845–850.
- 36** Garcia-Garcerà M, Coscollà M, Garcia-Exteberria K *et al.* *Environ Microbiol* 2012 : **14** : 2087–2098.
- 37** Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P J *et al.* *J Inv Dermatol* 2008 : **128** : 906–916.
- 38** Holland D B, Bojar R A, Farrar M D, Holland K T. *FEMS Microbiol Lett* 2009 : **290** : 149–155.
- 39** Holland D B, Bojar R A, Jeremy A H T, Ingham E, Holland K T. *FEMS Microbiol Lett* 2008 : **279** : 110–115.
- 40** Ràzc E, Kurek D, Kant M *et al.* *PLoS One* 2011 : **6** : e19806.
- 41** Grimm W A, Garner W L, Qin L, Travis T, Tan N, Han Y P. *Am J Pathol.* 2010 : **176** : 2247–2258.
- 42** Gasser P, Arnold F, Peno-Mazzarino L, Bouzoud D, Luu M T, Lati E, Mercier M. *Int J Cosmet Sci* 2011 : **33** : 366–370.
- 43** Rossetti D, Kielmanowicz M G, Vigodman S *et al.* *Int J Cosmet Sci* 2011 : **33** : 62–69.
- 44** Caron G A. *Arch Dermatol* 1968 : **97** : 575–586.
- 45** Michel B, Ko C S. *Br J Dermatol* 1977 : **96** : 295–302.
- 46** Gammon W R, Briggaman R A, Inman A O, Merritt C C, Wheeler Jr C E J. *Invest Dermatol* 1983 : **81** : 320–325.

- 47** Mouret S, Bogdanowicz P, Haure M J, Castex-Rizzi N, Cadet J, Favier A, Douki T. *Photochem Photobiol* 2011 : **87** :109–116.
- 48** Portugal-Cohen M, Soroka Y, Frušić-Zlotkin M *et al.* *Exp Dermatol* 2011 : **20** : 749–755.
- 49** Fernandez T L, Dawson R A, Van Lonkhuyzen D R, Kimlin M G, Upton Z. *Exp Dermatol* 2012 : **21** :404–410.
- 50** Sørensen O E, Thapa D R, Rosenthal A, Liu L, Roberts A A, Ganz T. *J Immunol* 2005 : **174** : 4870–4879.
- 51** Frick I M, Nordin S L, Baumgarten M *et al.* *J Immunol* 2011 : **187** : 4300–4309.
- 52** Marples R R, Richardson J F, Newton F E J. *Appl Bacteriol* 1990 : **69** : 93S–99S.
- 53** Percoco G, Bénard M, Ramdani Y, Lati E, Lefeuvre L, Driouich A, Follet-Gueye M-L. *Exp Dermatol* 2012 : **21** : 531–534.
- 54.** Studer D, Graber W, Al-Amoudi A, Eggli P. *J Microsc* 2001 : **203** : 285–294.
- 55** Chevalier L, Bernard S, Ramndani Y *et al.* *Plant J* 2010 : **64** : 977–989.
- 56** Livak K J, Schmittegen T D. *Methods* 2011 : **25** : 402–408.
- 57** Liu J Y, Burg G. *Dermatology* 2005 : **210** : 45–48.
- 58** Lebonvallet N, Jeanmaire C, Danoux L, Sibille P, Pauly G, Misery L. *Eur J Dermatol* 2010 : **20** : 671–684.
- 59** Hosomi N, Fukai K, Nakanishi T, Funaki S, Ishii M, Brit A. *J Dermatol* 2008 : **159** : 773–772.
- 60** Ali R S, Falconer A, Ikram M, Biset C E, Cerio R, Quinn A G. *J Invest Derm* 2001 : **117** : 106–111.
- 61** Sørensen O E, Cowland J B, Theilgaard-Mönch K, Liu L, Ganz T Borregaard N. *J Immunol* 2003 : **170** : 5583–5589.
- 62** Sørensen O E, Thapa D R, Roupé K M *et al.* *J Clin Invest* 2006 : **116** : 1878–1885.
- 63** Schaubert J, Gallo R L. *J Allergy Clin Immunol* 2008 : **122** : 261–266.
- 64** Hiroshima Y, Bando M, Kataoka M *et al.* *Arch Oral Biol* 2001 : **56** : 761–767.
- 65** Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M *et al.* *Immuno Cell Biol* 2007 : **85** : 532–537.
- 66** Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T. *Exp Mol Path* 2003 : **74** : 180–182.
- 67** Erdag G, Morgan J R. *Ann Surg* 2002 : **235** : 113–124.
- 68** Stoitzner P, Zanella M, Ortner U J *et al.* *Leukoc Biol* 1999 : **66** : 462–470.

### Supporting information

Additional (Supporting) Information may be found in the online version of this article :

**Table S1.** Accession numbers, primer sequences, and expected sizes of amplicons.

**Table S2.** Example of adjustment of the expression level in infected skin explants.

**Table S3.** Concentration of IL-6 in culture medium in untreated and treated human skin explants.

**Table S4.** Gene expression ratio of integrin  $\beta$ 4 and CDNS in the fraction isolated by LCM.

**Figure S1.** Amplification plot (a), standard curve (b), and dissociation curve (c) for the integrin  $\beta$ 4 gene.

**Figure S2.** Amplification plot (a), standard curve (b), and dissociation curve (c) for the IL-6 gene.

**Figure S3.** Immunolabelling of caspase-1 in untreated human skin explants.

**Figure S4.** Expression profile of skin injury-related genes.

**Figure S5.** Morphological analysis of infected skin biopsy and bacterial localisation.

**Figure S6.** Immunolabelling of caspase-1 in infected skin explants.

**Figure S7** Gene expression profile in full thickness skin explants during the first 12 h of bacterial exposure.

**Figure S8** Gene expression profile of TLR2 after bacterial stimulation.

**Figure S9** Immunolocalisation of hBD2 and IL6 in human skin following exposure to bacterial stimuli.

**Figure S10** Immunolocalisation of hBD3 in human skin following exposure to bacterial stimuli.

**Figure S11.** Immunolocalisation of psoriasin in human skin following exposure to bacterial stimuli.

## Data S1

### Immunofluorescence

Caspase-1 immunostaining was carried out on 5- $\mu$ m thick paraffin-embedded sections using a rabbit monoclonal caspase-1 antibody (Epitomix, Burlingame, CA, USA) diluted 1 :200 in PBS-1% BSA. The staining was enhanced using a streptavidine-biotin system (Epitomix, Vector PK-7200) and revealed by a VIP system (Epitomix, Vector SK-4600).

### Transmission electron microscopy (TEM) analysis

#### Chemical fixation

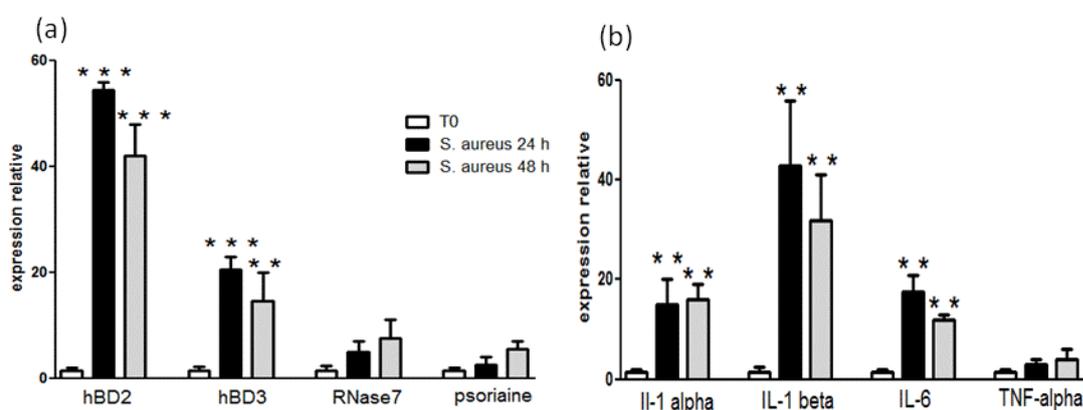
Skin biopsies were fixed in 2% PFA and 2% GA in 0.1 M Sodium Cacodylate pH 7.4 buffer for 1 h at room temperature. Successively, the dermis was removed and epidermis was excised into small disks of 3 mm<sup>3</sup> using a scalpel and a razor blade. Specimens were immersed in a fresh fixative for 1 h at room temperature, washed in PBS and post-fixed in 1% osmium tetroxide at + 4°C. After washing in distilled water, the samples were dehydrated in methanol gradient (30, 50, 70 and 2 x 100%) at room temperature. Infiltration was carried out in Spurr resin (2 :1, 1 :1, 1 :2) (Spurr Low Viscosity Embedding Kit; Biovalley, Marne la Vallée, France). Polymerization was performed at 60 °C during 24 h.

#### Test ELISA

IL-6 assay was performed using a Cayman Elisa Kit (Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA). The culture medium was collected at the end of each treatment, diluted in DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) and incubated overnight at 4°C into coated wells containing the biotinylated IL-6 antibody. Samples were then incubated with a AChE Fab conjugate secondary antibody and the reaction was revealed with Ellman's reagent (Cayman chemical) according to the manufacturer's instruction. The absorbance at 405-420 nm was measured using a M200Pro Tecan microplate reader and analysed by a Magellan7 software.

## Résultats complémentaires : impact de *S. aureus* sur la physiologie de l'explant

L'impact d'une exposition de l'explant vis-à-vis de *S. aureus* a été également exploré. Tout d'abord, nous avons effectué une analyse d'expression d'un groupe de gènes liés à l'immunité innée et à la réponse inflammatoire. Après traitement de l'explant pendant 24 h et 48 h avec *S. aureus*, les ARN totaux ont été extraits à partir d'une section de peau comprenant l'épiderme et le derme, rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) et le profil d'expression génique a été analysé par PCR en temps réel. Les résultats montrent que cette exposition, comme précédemment montré avec *S. epidermidis* et *P. fluorescens*, provoque une augmentation de l'expression des gènes correspondants aux PAMs hBD2 et hBD3 (**Fig. 39a**). Plus précisément, *S. aureus* est capable d'induire une augmentation de l'expression du gène codant pour la hBD2 de  $55 \pm 1,8$  et  $40 \pm 4,7$  fois plus élevée par rapport au témoin, respectivement après 24 h et 48 h d'exposition. Moins importante semble être l'induction du gène spécifique de la hBD3, avec une augmentation d'environ de 15 à 20 fois plus élevée par rapport au témoin. Aucune modification n'est observée pour les gènes codant pour la RNase7 et la psoriasine. Concernant les cytokines pro-inflammatoires, nous avons observé une augmentation significative des gènes codant pour l'IL-1 alpha et bêta, et l'IL-6 après la mise en contact avec la bactérie (**Fig. 39b**). En revanche, l'expression du gène codant pour le TNF-alpha ne semble pas être affectée.



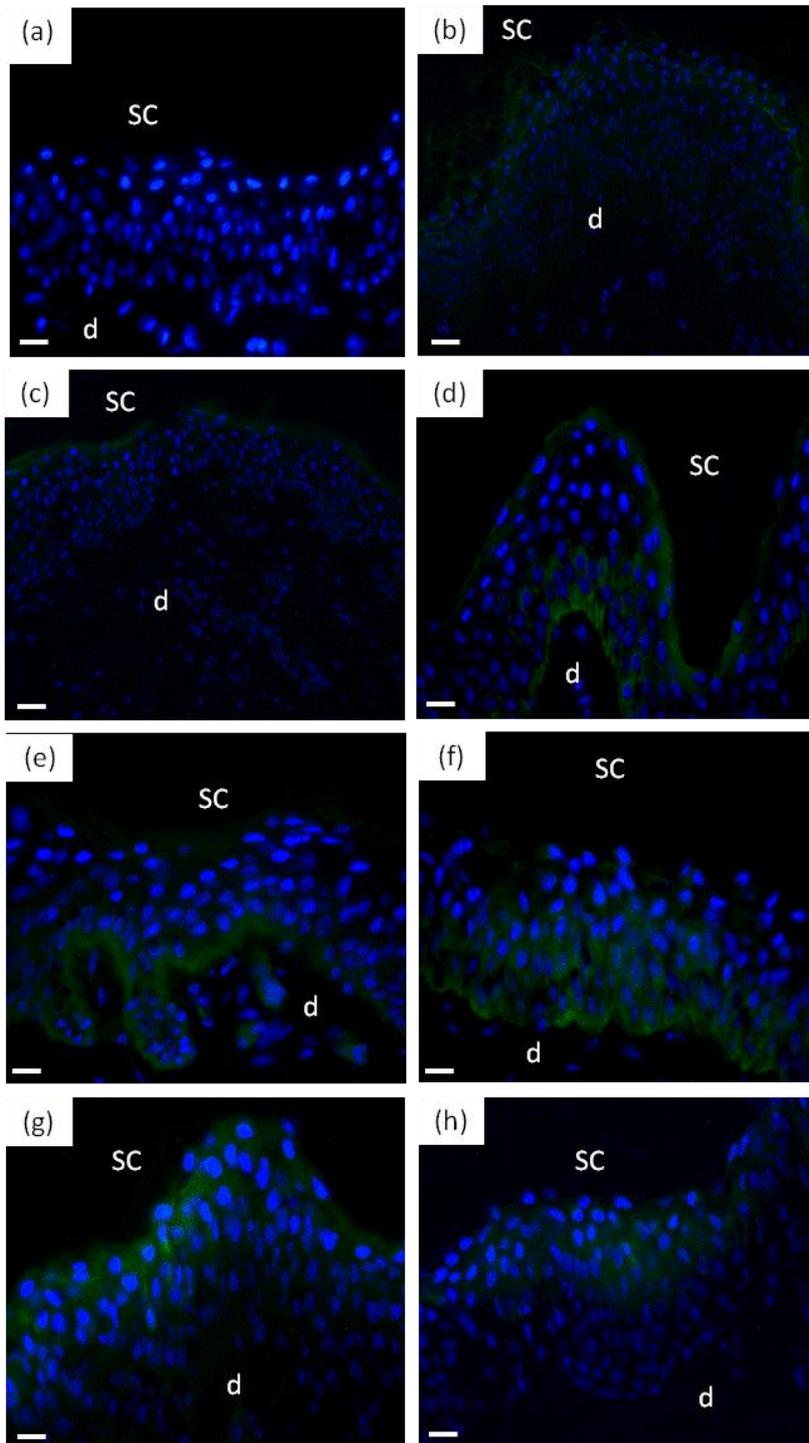
**Figure 39.** Profil d'expression génique après stimulation de l'explant avec *S. aureus*. (a) *S. aureus* augmente l'expression des gènes codant pour la hBD2 et hBD3 après 24 h et 48 h. (b) De la même manière, la bactérie stimule l'expression des gènes liés à l'immunité innée et spécifiques pour l'IL-1 alpha et bêta et l'IL-6. Aucune modification a été observée pour les gènes codant pour la RNase7, la psoriasine et le TNF-alpha.

$n=3$ . \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

## Résultats

---

Des observations en immunofluorescence ont été effectuées sur coupes congelées et comme précédemment décrits, avec *S. epidermidis* et *P. fluorescens*. Suite à un traitement avec *S. aureus* pendant 48 h, nous avons observé une immunodétection plus importante des épitopes associés à la defensine hBD2 au niveau des couches les plus superficielles de la peau (**Fig. 40b**). La détection des épitopes liés à hBD3, est augmentée au niveau des couches plus profondes de l'épiderme et au niveau de l'interface SG/SC (**Fig. 40d**). Pour conclure, la détection des épitopes de l'IL-6 est plus importante au sein des couches profondes de l'épiderme suite à l'exposition avec *S. aureus* pendant 48 h (**Fig. 40f**). Aucune modification n'est observée pour la psoriasine après traitement avec *S. aureus* (**Fig. 40h**).



**Figure 40.** Immunolocalisation des épitopes associés à des PAMs et des cytokines pro-inflammatoires après exposition avec *S. aureus*. Après 48 h de contact avec *S. aureus*, les biopsies de peau sont congelées à l'isopentane, des sections de 8  $\mu\text{m}$  sont réalisées au cryostat et les protéines d'intérêt sont localisées par une approche immunocytoologique. Quatre protéines sont localisées en lien avec une exposition à *S. aureus* : la hBD2 (b), la hBD3 (d), l'IL-6 (f) et la psoriasine (h). Les témoins respectifs, réalisés à partir d'un explant de peau sans bactérie, sont montrés en a, c, e et g. Abréviations : d, derme; SC, *stratum corneum*. Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$

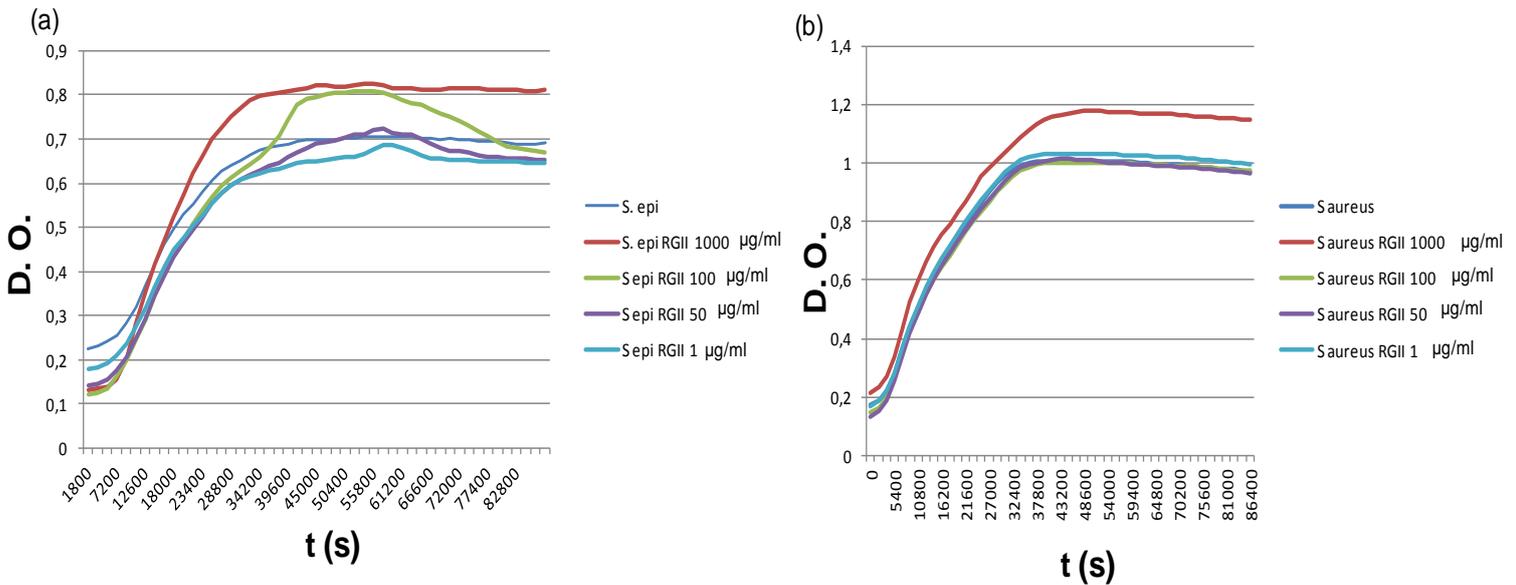
### **III Effet de biomolécules de nature polysaccharidique sur la défense cutanée innée en lien avec le microbiome**

Les effets de deux biomolécules de nature polysaccharidique sur l'expression des gènes codant les PAMs et les cytokines pro-inflammatoires au sein de l'épiderme ont été évalués en lien avec le microbiome cutané. Le composé pectique RG-II a été obtenu après extraction des pectines de feuilles de tabac. C'est le polysaccharide le plus complexe à avoir été caractérisé chez les végétaux. La présence de plusieurs sucres rares dans sa structure lui confère un grand intérêt. Le Téflose, glycomolécule produite par fermentation, a été sélectionné pour sa richesse en résidus de rhamnose, sucre avec des propriétés très intéressantes pour des applications en dermo-cosmétique. Enfin, nous avons aussi analysé la réponse de l'explant à l'Eau thermale d'Uriage et au produit P 385.02 en lien avec la microflore cutanée.

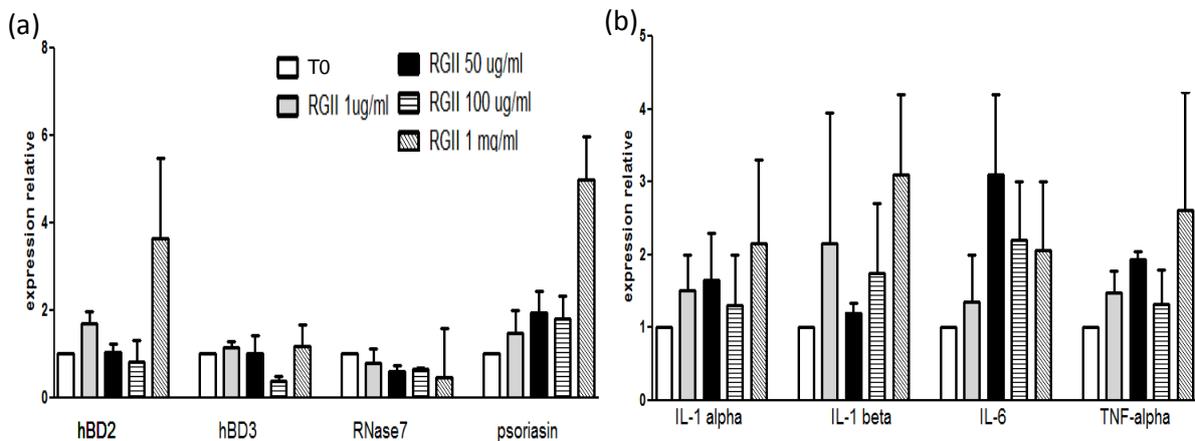
#### **III.I Biomolécule végétale : polysaccharide pectique, le rhamnogalacturonane II**

Une gamme de concentration de RG-II (1 µg/mL, 50 µg/mL 100 µg /mL, 1 mg/µL) a été mise en contact pendant 24 h avec les germes *S. epidermidis* et *S. aureus*, dans le but d'étudier d'éventuelles propriétés antimicrobiennes du composé. Les résultats montrent que cette molécule, aux concentrations testées, n'affecte pas la croissance des deux bactéries (**Fig. 41**). En parallèle, nous avons étudié l'impact d'un dépôt de RG-II (1 µg/mL, 50 µg/mL 100 µg /mL, 1 mg/mL) à la surface de l'explant sur le profil d'expression des gènes liés à la défense par PCR en temps réel. Les résultats révèlent que l'application de RG-II n'a aucun impact sur la régulation de l'expression des gènes analysés (**Fig. 42**).

## Résultats



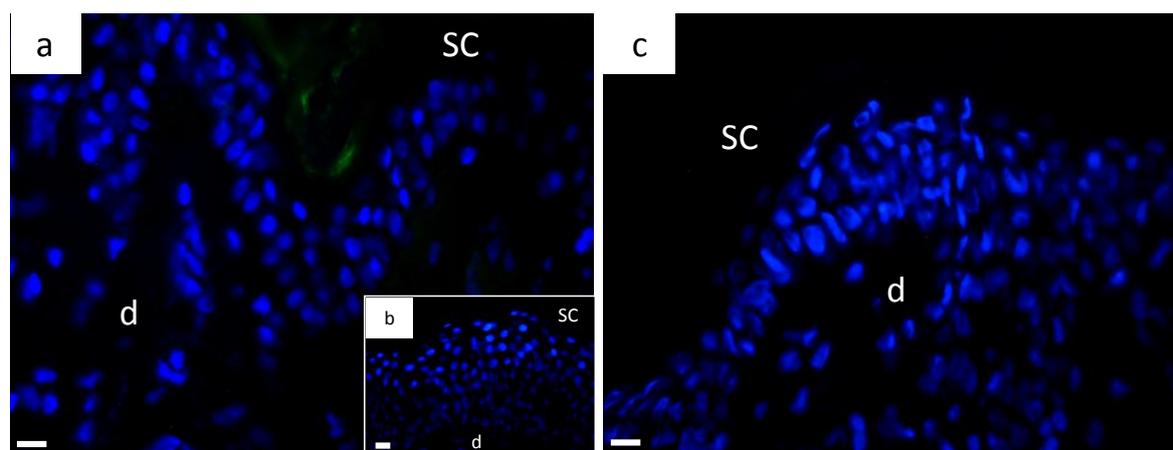
**Figure 41. Impact du RG-II sur la croissance bactérienne.** Les deux germes, *S. epidermidis* et *S. aureus* ont été pré-incubés avec différentes concentrations de RG-II (1 µg/mL, 50 µg/mL 100 µg /mL, 1 mg/µL). Après 24 h, la croissance bactérienne de *S. epidermidis* (a) et *S. aureus* (b) a été mesurée en suivant la densité optique à 580 nm en fonction du temps exprimé en secondes. Aucune modification n'a été observée.  $n=3$ .



**Figure 42. Effet du RG-II sur le profil d'expression des gènes de défense cutané.** Différentes concentrations de RG-II sont appliquées durant 24h sur l'explant. Les effets du RG-II sur l'expression de gènes liés à l'immunité innée (a) et à une réponse inflammatoire (b) au sein de l'explant ont été testés par PCR en temps réel. Les résultats montrent l'absence de modulation de l'expression de tous les gènes.  $n=3$ . \*\*\*  $P<0,001$ ; \*\*  $P<0,01$ ; \*  $P<0,05$ .

De plus, par une approche immunocytologique, nous avons montré que la molécule de RG-II ne pénètre pas dans l'épiderme vivant, et reste sur les couches les plus superficielles du *stratum corneum* (Fig .43).

## Résultats



**Figure 43. Immunolocalisation du RG-II au sein de l'explant.** Après application superficielle, la molécule a été localisée par immunocytochimie après 24 h d'incubation avec l'explant. Un anticorps dirigé vers des épitopes associés au RG-II a été utilisé (Match *et al.*, 2000) (a). En (b) le contrôle négatif réalisé en absence de la glycomolécule et en (c) le contrôle négatif réalisé sans anticorps primaire. Abréviations : d, derme; SC, *stratum corneum*. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

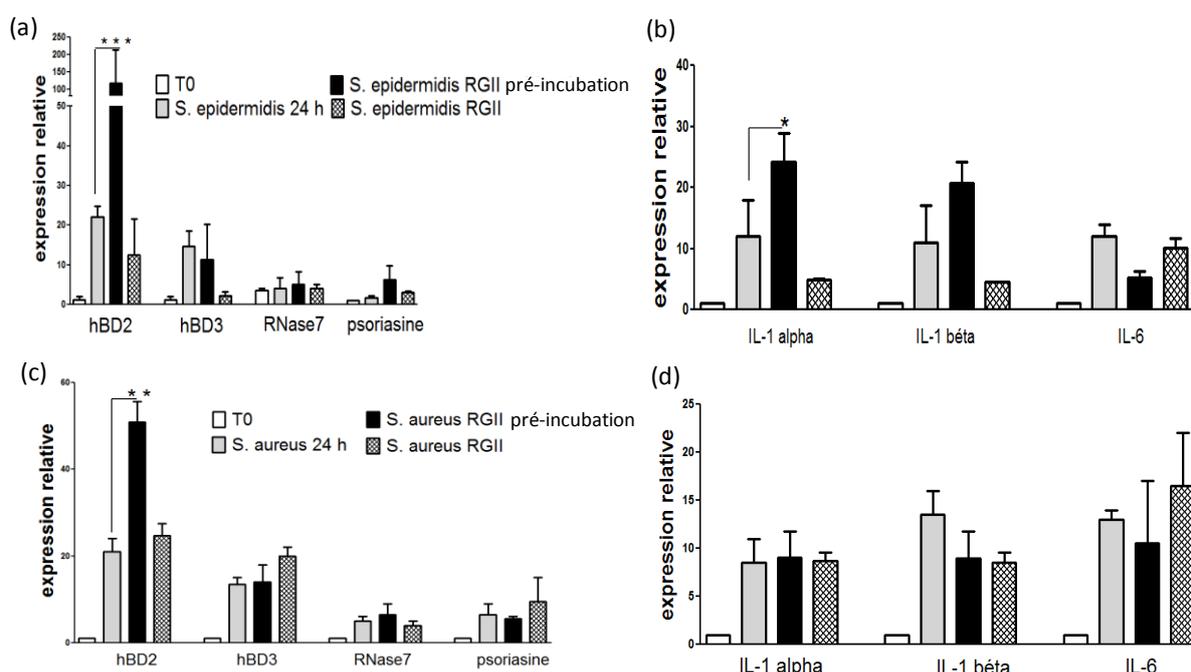
Cependant, malgré l'absence d'une modulation directe de l'expression génique, nous avons testé les effets potentiels du RG-II sur l'explant en lien avec la microflore cutanée en pré-incubant *S. epidermidis* et *S. aureus* avec ce composé pendant 24 h; les bactéries pré-incubées avec le RG-II ont été rincées en eau physiologique avant leur application sur l'explant. Dans un deuxième cas un mélange contenant les bactéries et le RG-II a été appliqué sur la couche cornée. En s'appuyant sur des résultats obtenus au sein du laboratoire Glyco-MEV concernant les propriétés immunostimulantes d'extraits pectiques, le RG-II a été utilisé à une concentration de 50  $\mu$ g/mL (Thèse de doctorat de Aboughe Angone S., 2008).

L'analyse des données de PCR en temps réel révèle une augmentation significative de l'expression du gène *hBD2* au sein d'explants traités avec *S. epidermidis* et *S. aureus* pré-incubés au préalable avec le RG-II (Fig. 44a et c). Aucune modification, en terme d'expression, n'a été observée pour les autres gènes analysés et codant pour des protéines impliquées dans le système de défense de l'immunité innée (*hBD3*, *RNase7* et *psoriasine*).

En ce qui concerne l'expression de gènes codant pour les interleukines pro-inflammatoires IL-1 alpha et bêta et l'IL-6, nous avons observé une induction de l'expression de l'IL-1 alpha chez des explants traités avec *S. epidermidis* pré-incubés avec le RG-II (Fig. 43b).

En revanche, aucune modification n'a été observée en appliquant les germes et la glycomolécule de façon simultanée à la surface de l'explant (Fig. 44).

## Résultats

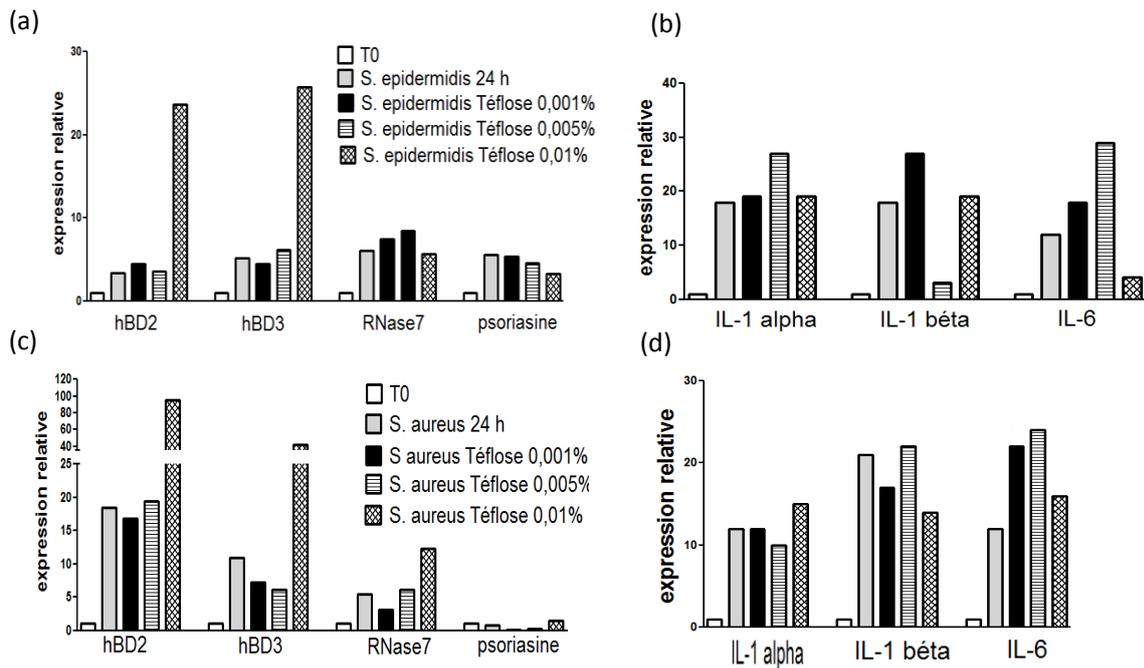


**Figure 44.** Impact du RG-II sur l'expression génique au sein des tissus de l'explant en lien avec la microflore cutanée. Après une pré-incubation avec une solution à 50 µg/mL de RG-II, les germes sélectionnés ont été appliqués sur la surface de l'explant et le profil d'expression a été analysé par PCR en temps réel. Une augmentation significative de l'expression du gène *hBD2* à partir d'explants traités avec les deux bactéries pré-incubées avec un extrait de RG-II est observée (a et c). Une augmentation de l'expression de l'IL-1 alpha suite à l'incubation de l'explant avec *S. epidermidis* pré-incubé avec le RG-II est également observée (b).  $n=3$ . \*\*\*  $P<0,001$ ; \*\*  $P<0,01$ ; \*  $P<0,05$ .

### III.II Biomolécule polysaccharidique riche en rhamnose: le Téflose

Dans le cadre de ce projet, nous avons étudié les effets d'un actif cosmétique, le Téflose, sur l'expression des gènes de défense au sein des explants en lien avec la microflore cutanée. Tout d'abord nous avons étudié l'impact d'une pré-incubation de *S. epidermidis* et *S. aureus* avec du Téflose à différentes concentrations. Les résultats montrent qu'une pré-incubation des deux bactéries avec du Téflose 0,01% provoque une induction importante de l'expression des gènes *hBD2* et *hBD3* (Fig. 45a et c). En revanche, aucune modification des niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires analysées n'a été observée suite à ce traitement (Fig. 45b et d). Il est à noter que pour des raisons pratiques cette expérience a été réalisée qu'une seule fois ce qui explique l'absence d'analyse statistique sur cette partie.

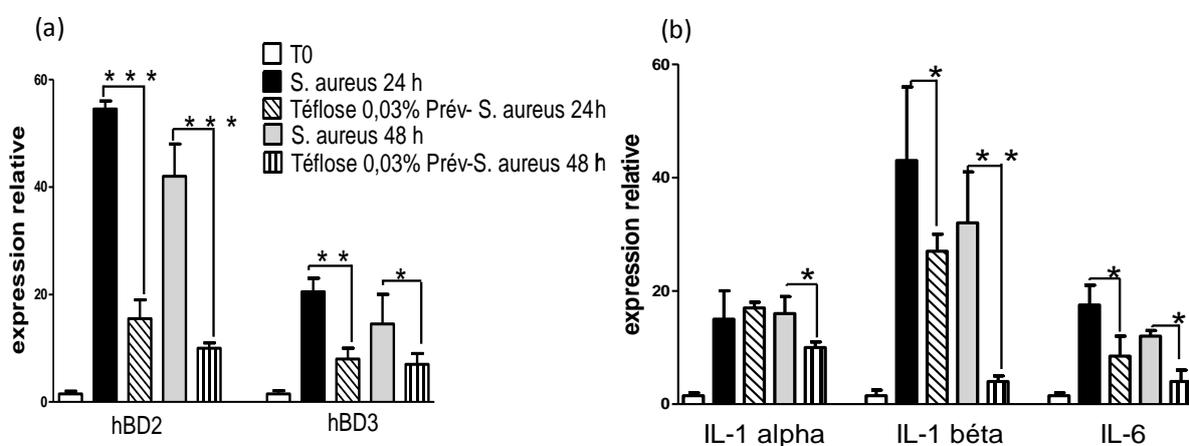
## Résultats



**Figure 45.** Impact du Téflose sur l'expression des gènes de défense de l'explant en lien avec la microflore cutanée. Après une pré-incubation avec du Téflose 0,001%, 0,005% et 0,01%, les germes sélectionnés ont été appliqués sur la surface de l'explant et les niveaux d'expression des gènes de défense cutanée et à la réponse inflammatoire ont été suivis par qPCR. Une augmentation significative de l'expression des gènes *hBD2* et *hBD3* à partir d'explants traités avec les deux bactéries pré-incubées avec du Téflose 0,01% est observée (a et c). Aucune augmentation de l'expression des gènes analysés codant les cytokines n'est observée.  $n=1$ .

Nous avons ensuite étudié l'effet « préventif » du Téflose vis-à-vis d'une infection par *S. aureus*. Pour cela, les échantillons de peau ont été traités avec une solution de Téflose 0,03% pendant 30 minutes puis infectés avec *S. aureus*. Les résultats montrent que, dans cette condition, le Téflose est capable d'induire une modulation négative de l'expression génique en lien avec une exposition au *S. aureus* (Fig. 46). Plus en détail, nous avons observé une diminution significative de l'expression du gène codant pour la *hBD2* : malgré l'exposition à la bactérie, en présence du Téflose l'expression du gène *hBD2* reste faible (entre 5 et 10 fois plus élevé par rapport au témoin). Des résultats similaires ont été obtenus pour l'autre PAM analysé, la *hBD3* et les cytokines pro-inflammatoires IL-1 alpha et bêta et l'IL-6.

## Résultats

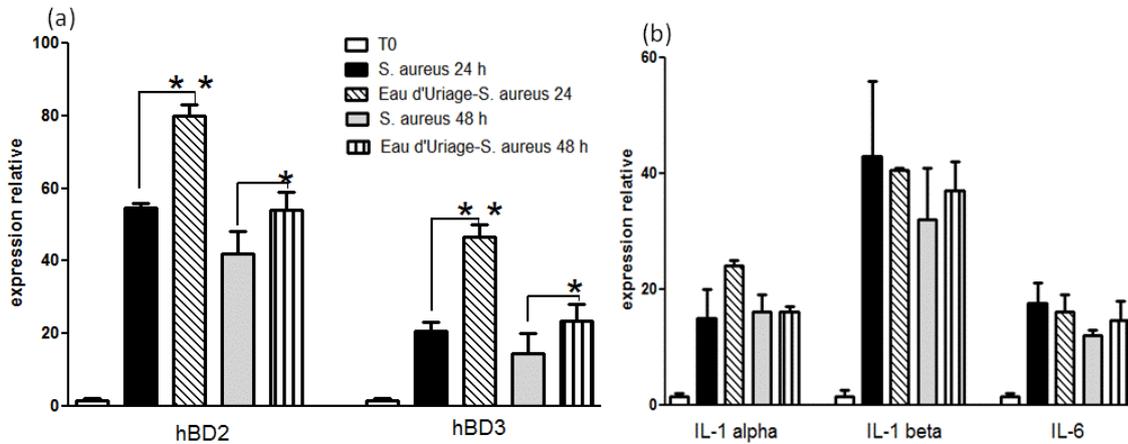


**Figure 46. Action « préventive » du Téflose.** L'application préventive du Téflose sur la surface de l'explant induit une régulation négative de l'expression des gènes codant pour les PAMs hBD2 et hBD3 et les cytokines pro-inflammatoires IL-1 alpha et bêta et l'IL-6.  $n=3$ . \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

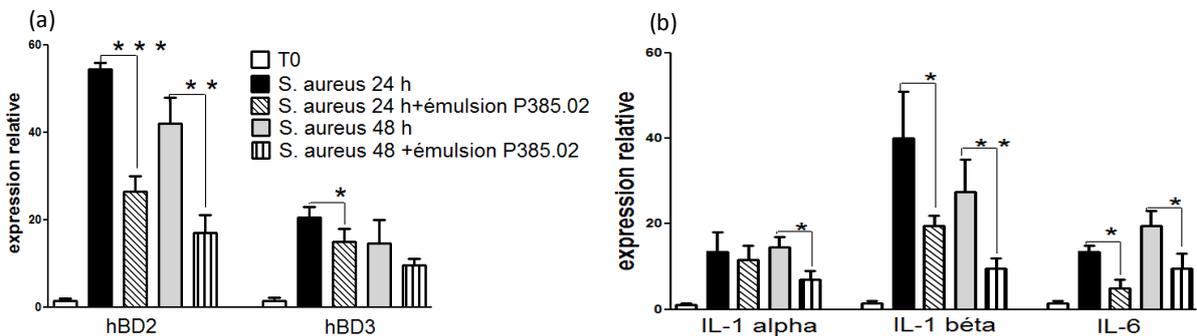
Par ailleurs, les effets « curatifs » de l'Eau d'Uriage pure et d'une émulsion contenant de l'eau d'Uriage à 30 % et du Téflose 0,03% (produit P 385.02), sur des explants infectés au préalable avec *S. aureus* ont été également étudiés. L'Eau d'Uriage semble renforcer l'expression des gènes codant les PAMs en lien avec *S. aureus* (**Fig. 47**). Une augmentation significative est en effet observée pour le gène *hBD2*, avec une induction de l'expression d'environ  $80 \pm 4,3$  fois plus élevée par rapport aux témoins, alors qu'elle atteignait une valeur d'environ  $60 \pm 2,8$  fois plus élevée en présence de la bactérie seule après 24 h de mise en contact (**Fig. 47a**). Une induction similaire est observée après exposition pendant 48 h avec *S. aureus*. De la même manière, l'Eau d'Uriage renforce l'expression du gène *hBD3* en lien avec la bactérie (**Fig. 47a**). En revanche, aucune augmentation n'est observée pour les gènes codant les cytokines pro-inflammatoires analysées (IL-1 alpha et bêta et l'IL6) (**Fig. 47b**).

Enfin, l'action de l'émulsion P 385.02 sur l'expression des gènes de défense de l'explant en lien avec une exposition prolongée avec *S. aureus*, a été également explorée. L'émulsion semble réduire l'expression des gènes codant pour la hBD2 et la hBD3 induite par *S. aureus* (**Fig. 48a**). De manière similaire, l'expression des gènes spécifiques pour les interleukines induite par la bactérie, est réduite en présence de l'émulsion (**Fig. 48b**).

## Résultats

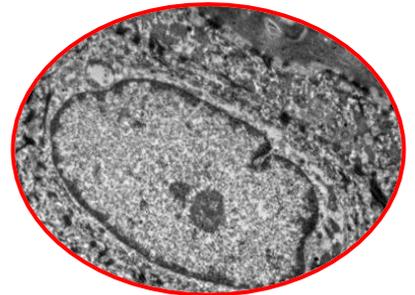
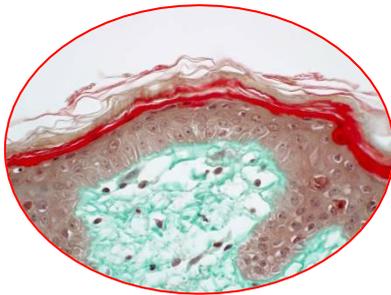
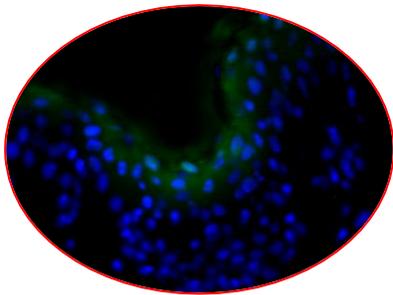


**Figure 47.** Impact de l'Eau d'Uriage sur l'expression des gènes de défense en lien avec *S. aureus*. Après stimulation de l'explant par *S. aureus*, 10 µL d'Eau d'Uriage pure sont ajoutés sur l'explant. Les résultats suggèrent que l'eau d'Uriage est capable de renforcer l'expression des gènes codant la hBD2 et la hBD3 chez des explants traités pendant 24 h et 48 h avec *S. aureus* (a). Aucune modification de l'expression des gènes spécifiques pour les cytokines pro-inflammatoires analysées, n'est observée (b).  $n=3$ . \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .



**Figure 48.** Impact de l'émulsion P 385.02 sur l'expression des gènes de défense en lien avec *S. aureus*. Après stimulation de l'explant par *S. aureus*, l'émulsion P 385.02 contenant du Téflose 0,03% et de l'Eau d'Uriage à 30% est appliquée. Nous avons observé une diminution de l'expression des gènes *hBD2* et *hBD3* en présence de l'émulsion chez des explants stimulés par la bactérie pendant 24 h et 48 h. L'émulsion semble réduire également l'expression des gènes codant pour l'IL-1 alpha et bêta et l'IL-6.  $n=3$ .\*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

# Discussion et Perspectives





### Chapitre Quatrième : Discussion et Perspectives

La peau est un organe hétérogène, comprenant trois compartiments différents : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. L'épiderme, couche la plus superficielle de la peau, est également constitué de plusieurs couches cellulaires distinctes, les couches basale, épineuse, granuleuse et cornée. A l'heure actuelle, un vaste choix de modèles expérimentaux est offert à la communauté scientifique qui s'intéresse à l'étude de l'épiderme. Des cultures monocellulaires, telles que la lignée cellulaire immortalisée de kératinocytes HaCat et les lignées primaires de kératinocytes, ainsi que des modèles organotypiques comme les explants de peau humaine et les épidermes reconstitués sont les principaux supports qui ont été développés. Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé comme modèle d'étude l'explant de peau humaine, maintenu en survie. Nous avons montré que ce support expérimental est particulièrement adapté à des analyses d'expression génique des cellules épidermiques. Le suivi d'expression génique par PCR en temps réel peut être envisagé de façon globale sur l'ensemble de l'épiderme mais est également réalisable sur des couches épidermiques isolées par microdissection laser. La combinaison de ces différentes approches méthodologiques a été appliquée dans ce travail à l'étude des mécanismes de défense cutanée en lien avec le microbiome et a permis d'évaluer l'effet de biomolécules sur les processus étudiés.

#### **I Microdissection laser des couches épidermiques d'explants de peau humaine : application à l'étude d'expression génique par PCR en temps réel**

Au sein de l'épiderme, chaque assise cellulaire est caractérisée par la présence de kératinocytes à des stades de différenciation variable. De la couche la plus profonde, le *stratum basale*, les kératinocytes vont migrer vers les couches les plus superficielles, en activant un programme de différenciation très complexe. En dermatologie, un des axes de recherche le plus important, vise à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ce programme de différenciation ultime.

Une des problématiques liée aux méthodes de séparation des tissus cutanés (séparation derme/épiderme; isolement des assises épidermiques, etc..) réside dans la difficulté de préserver les molécules cellulaires en vue d'études protéiques et (ou) géniques. Dans ce dernier cas, une préservation optimale des acides nucléiques est un aspect crucial. Plusieurs

protocoles, comme par exemple l'utilisation du thiocyanate d'ammonium (Clemmensen *et al.*, 2009) ou la digestion enzymatique de l'explant par de la trypsine (Toulza *et al.*, 2007), ont été développés avec succès pour effectuer la séparation entre le derme et l'épiderme au niveau de la jonction dermo-épidermique ou pour isoler une partie de l'épiderme. Dans le cadre de ce projet, nous avons optimisé une méthode efficace et rapide pour l'isolement de deux fractions enrichies en kératinocytes de la couche basale ou de la couche granuleuse par microdissection laser à partir d'explants de peau humaine maintenus en survie (Percoco *et al.*, 2012). Les explants de peau sont fixés à froid dans de l'isopentane. Ce protocole garantit à la fois une bonne morphologie structurale du tissu et une préservation optimale des acides ribonucléiques.

En mettant en œuvre cette méthodologie le profil d'expression génique au sein des différentes couches de l'épiderme a été déterminé. Nous avons montré que l'expression de certains gènes codants pour des protéines structurales ou liées à l'immunité innée était associée au degré de différenciation des kératinocytes. Les gènes *intégrine bêta4/intégrine alpha6* (Sonnenberg *et al.*, 1988) et *FLG-2* (Rice et Green, 1980), */CDNS* (Serre *et al.*, 1991) ont été choisis comme « marqueurs » des fractions enrichies respectivement en kératinocytes des couches basale et granuleuse. Nous avons montré que les niveaux de transcrits correspondant à la psoriasine, aux bêta-defensines hBD2 et hBD3, à la RNase7, aux récepteurs TLR2 et Nod1 sont significativement plus élevés au sein des couches les plus superficielles de la peau. Pour d'autres gènes codant pour des protéines impliquées dans la défense innée, à savoir les gènes *TLR5* et *Nod2*, aucune différence d'expression au sein de l'épiderme n'a été observée.

En perspective, cette méthode pourrait être utilisée pour analyser le transcriptome, *via* une analyse de type « *microarray* », des deux fractions enrichies en kératinocytes. Mattiuzzo *et al.* (2011), ont identifié par « *microarray* » 49 nouveaux gènes surexprimés lors du processus de différenciation terminale des kératinocytes à partir d'une fraction cellulaire enrichie en kératinocytes de la couche granuleuse. Cette démarche pourrait contribuer à caractériser des nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans le programme de différenciation épidermique. De plus, toujours dans le but de trouver des gènes exprimés de manière différentielle au sein de l'épiderme, une troisième fraction enrichie en kératinocytes de la couche épineuse pourrait être isolée et le profil d'expression génique être analysé par des techniques transcriptomiques. Très récemment, Shapiro *et al.* (2012) ont comparé le profil protéomique, en utilisant la microdissection laser couplée à la spectrométrie de masse, de

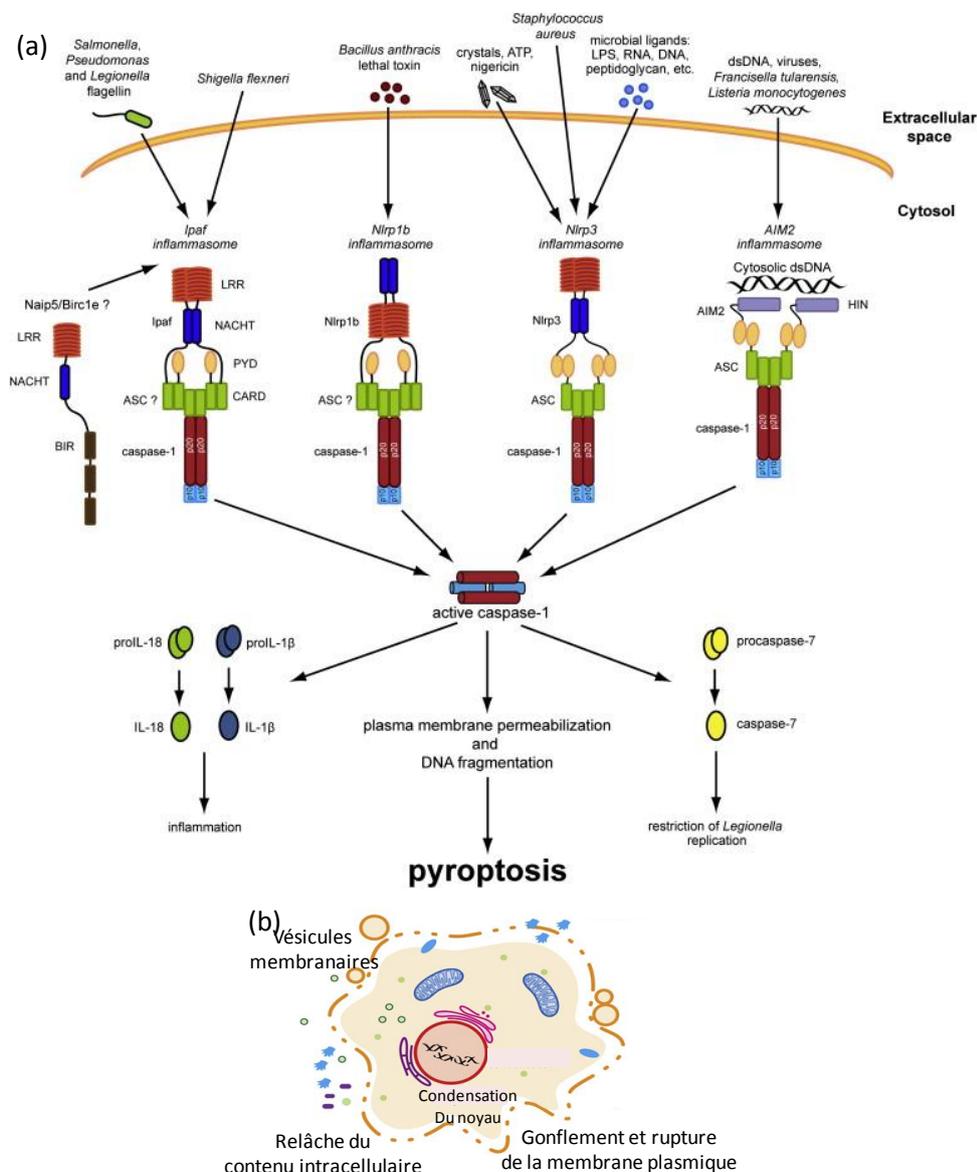
kératinocytes microdisséqués à partir de zones épidermiques blessées ou non blessées. Par cette approche très originale, les auteurs ont pu mettre en évidence la surproduction de protéines comme la desmocolline-2, la kératine 8 ou encore les protéines S1008 et S1009 au sein des sites de blessure. Une telle analyse protéique pourrait être appliquée après isolement des couches épidermiques comme développé dans le cadre de ce projet. Il serait très intéressant d'étudier le protéome de deux fractions enrichies en kératinocytes de la couche basale ou de la couche granuleuse, d'analyser le profil protéomique au sein des différentes couches épidermiques en lien avec des stress environnementaux ou encore le protéome au sein de peaux affectées par des pathologies cutanées.

## **II Expression des gènes de défense et de l'inflammation en lien avec le microbiome cutané**

La peau, et l'épiderme plus particulièrement, sont en lien très étroit avec le monde externe. Le modèle expérimental de type explant a été largement utilisé pour élucider les mécanismes impliqués dans la cicatrisation cutanée (Yan *et al.*, 2010; Ràcz *et al.*, 2011), le vieillissement de la peau (Gasser *et al.*, 2011; Rossetti *et al.*, 2011), l'étude de certaines pathologies cutanées (Caron, 1968; Michel et Ko, 1977; Gammon *et al.*, 1983) ou encore pour étudier l'impact des facteurs environnementaux, notamment les radiations UV, sur les cellules cutanées (Mouret *et al.*, 2011; Portugal-Cohen, *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2012). Cependant, jusqu'alors, l'utilisation des explants pour l'étude de l'interaction entre les cellules cutanées et la flore microbienne est limitée (Sørensen *et al.*, 2005; Kisich *et al.*, 2007; Zanger *et al.*, 2009; Zanger *et al.*, 2010; Frick *et al.*, 2011). Ainsi, le rôle protecteur de la bêta defensine hBD3 (Kisich *et al.*, 2007; Zanger *et al.*, 2010) et de la RNase 7 (Zanger *et al.*, 2009) vis-à-vis de *S. aureus* a été montré en utilisant l'explant de peau humaine comme modèle expérimental. Sørensen *et al.* (2005) ont étudié l'impact des molécules d'origine bactérienne sur l'expression des gènes codant pour les peptides antimicrobiens hBD1, hBD2 et hBD3 en utilisant des explants obtenus à l'issue d'une opération chirurgicale. Enfin, Frick *et al.* (2011) ont décrit la réponse défensive de l'épiderme suite à une exposition avec les microorganismes pathogènes *Streptococcus pyogenes* et *Fingoldia magna*.

Dans le cadre du projet Skinoflor, nous avons analysé l'expression de gènes de défense et de l'inflammation ainsi que les caractéristiques morphologiques des cellules épidermiques à partir d'explants de peau humaine en survie en lien avec une exposition à des agents microbiens. Trois microorganismes ont été sélectionnés : *S. epidermidis*, *S. aureus* et

*P. fluorescens*. L'exposition à la bactérie *S. epidermidis* modifie la morphologie des cellules épidermiques au sein des explants en induisant plusieurs symptômes liés à la pyroptose (programme de mort cellulaire déclenchée lors d'une infection bactérienne) (**Fig. 49**). Des noyaux pycnotiques et des œdèmes cellulaires (Percoco *et al.* soumis) (**Fig. 2** et **Fig. S5 Publication n. ° 2**) sont observés au niveau des cellules du *stratum basale* et du *stratum spinosum*. De plus, par une approche immunocytologique, nous avons noté une forte augmentation des épitopes spécifiques de la caspase-1, un marqueur de la pyroptose (**Fig. 6S Publication n. ° 2**), au sein de l'épiderme (Percoco *et al.*, soumis).



**Figure 49. Mécanismes moléculaires de la pyroptose.** L'activation des récepteurs TLRs ou des récepteurs NLRs *via* l'interaction avec les PAMPs, conduit à l'assemblage du complexe de l'inflammasome **(a)**. Quatre

## Discussion et Perspectives

complexes différents ont été décrits : L'inflammasome *IPAF* (Mariathasan *et al.*, 2004), les complexes *Nlrp1b* (Boyden et Dietrich, 2006) et *Nlrp3* (Sutterwala *et al.*, 2006) et le complexe AIM2 activé par *Francisella tularensis* ou par *Listeria monocytogenes* (Sauer *et al.*, 2010). La protéine ASC coordonne l'interaction entre les différents complexes et la caspase-1. L'activation de la caspase-1 détermine le clivage des pro-interleukines IL-1 bêta et IL-18 vers leurs formes actives. Ceci déclenche la réponse inflammatoire. En parallèle (b), l'activation de la caspase-1 a comme effet la dégradation de l'ADN via des endonucléases, la formation de pores au niveau de la membrane plasmique, le passage de fluides vers le cytoplasme et le gonflement cellulaire.

Abréviations : AIM2, *Cytosolic double-stranded DNA sensor absent in melanoma*; ASC, *apoptotic speck protein*; CARD, *caspase-recruitment domain*; IPAF, *Apaf-1-related protein*; LRR, *leucin rich repeat*; Nlrp, *Nucleotide-binding oligomerization domain*; PYD, *pyrin domain*. D'après Lamkanfi et Dixit, 2010.

Le déclenchement de la pyroptose pourrait être lié à la charge bactérienne déposée sur l'explant. *In vivo*, le nombre de bactéries totales cutanées chez un individu adulte est estimé entre  $10^2$  et  $10^7$  par  $\text{cm}^2$  (Rosebury, 1969; Fredricks, 2001). Dans ce travail, chaque bactérie a été déposée sur la surface cutanée avec une concentration finale d'environ  $10^7$  bactéries par  $\text{cm}^2$ . Cette concentration, très élevée par rapport à ce qu'on observe *in-vivo* pourrait être à la base de ce phénomène. De plus, les trois souches bactériennes utilisées, possèdent plusieurs activités enzymatiques (**Tableau 6**) qui pourraient être impliquées dans la mort des cellules épidermiques.

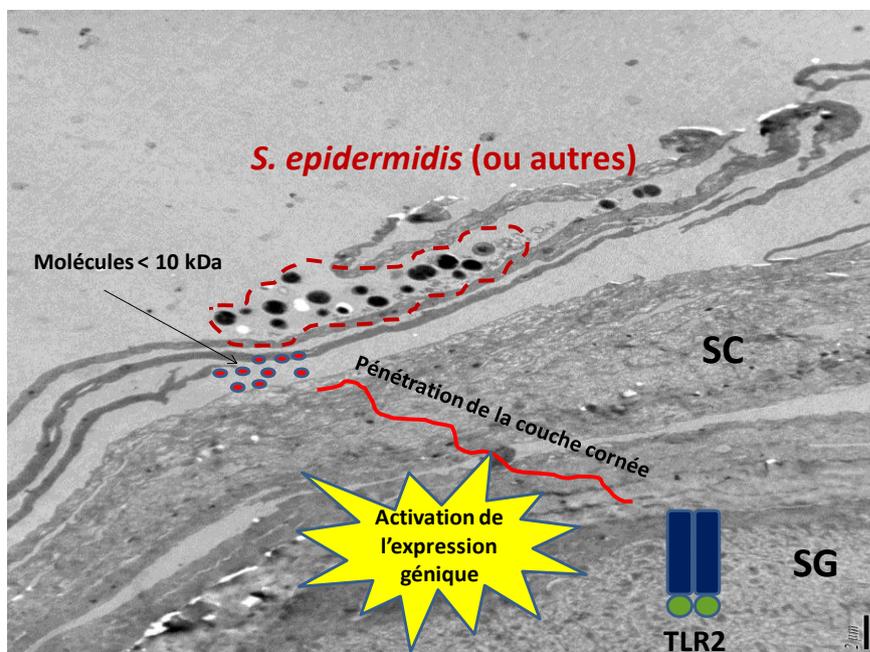
**Tableau 6. Activités enzymatiques des germes sélectionnés**

Légende : +, résultats positifs; -, résultats négatifs. Résultats obtenus au sein du laboratoire LSM (Laboratoire de Microbiologie du Froid-Signaux et Microenvironnement, EA2123).

Souche	Léchantinase	Lipoprotéinase	Caséinase	Estérase	Elastase
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	-
<i>S. epidermidis</i>	-	+	+	+	-
<i>P. fluorescens</i>	+	+	+	-	-

Un point important à souligner réside dans le fait que nous n'avons pas observé de pénétration des bactéries dans les zones vivantes de l'épiderme. En effet, dans les conditions expérimentales, les microorganismes sont exclusivement présents au niveau des couches les plus superficielles du *stratum corneum* (Percoco *et al.*, 2012) (**Fig. S5 Publication n. ° 2**). Le SC est composé exclusivement de cellules mortes, biologiquement inactives. **Comment expliquer alors la régulation positive des gènes codant pour les PAMs hBD2 et hBD3 et**

**les cytokines pro-inflammatoires IL-1 alpha et bêta et IL-6 que nous avons décrite ?** Récemment Lai *et al.* (2010) ont montré que *S. epidermidis* peut sécréter des molécules de faible masse moléculaire (inférieure à 10 kDa). Ces auteurs révèlent que chez la souris, ces molécules, *via* leur interaction avec le récepteur TLR2, contribuent à renforcer l'expression des gènes codant pour les PAMs, notamment les  $\beta$ -défensines hBD2 et hBD3. Ces observations pourraient expliquer l'activation de l'expression génique observée dans nos conditions expérimentales. De la même manière, *S. aureus* et *P. fluorescens* pourrait produire des molécules, de petite taille, capables de pénétrer vers la couche granuleuse où elles seraient reconnues par des récepteurs de types TLRs (**Fig. 50**).



**Figure 50.** Mécanismes possibles activant l'expression génique des couches non-superficielles de l'épiderme suite à l'exposition bactérienne. Comme montré par Lai *et al.* (2010) chez la souris, la pénétration dans la couche cornée de molécules de petite taille produites par *S. epidermidis*, pourrait activer la transduction du signal, *via* le récepteur TLR2, avec modulation positive de l'expression des gènes codant pour les PAMs hBD2 et hBD3.

L'augmentation de l'expression des transcrits codant pour les précurseurs des interleukines IL-1 alpha, bêta et IL-6 a été également observée (Percoco *et al.*, soumis) (**Tableau 1** et **Fig. 2 Publication n. ° 2**). Ces résultats sont en accord avec des données indiquant que l'IL-1 bêta a la capacité d'induire l'expression des gènes codant pour les PAMs hBD2 et hBD3 (Harder *et al.*, 2001; Harder *et al.*, 2004). Son induction, observée ici au sein d'explants traités, pourrait donc être directement liée à l'exposition bactérienne, afin de renforcer la production des bêta-défensines hBD2 et hBD3. Niyonsaba *et al.* en 2006

## Discussion et Perspectives

---

montrent également que les bêta-défensines hBD2 et hBD3 sont capables d'induire l'expression de l'IL-6, cytokine directement impliquée dans la réponse inflammatoire (Jones, 2006). L'augmentation d'expression du gène codant pour l'IL-6, que nous avons observé au niveau des couches inférieures de l'épiderme (Percoco *et al.*, soumis) (**Tableau 1** et **Fig. 3, Publication n. ° 2**), pourrait être une conséquence directe de l'action des PAMs hBD2 et hBD3.

Un certain nombre de travaux décrivent le rôle clé dans l'interaction microflore-cellules cutanées, de la bactérie *S. epidermidis*. *S. epidermidis* est une bactérie commensale de la peau, qui peut sélectivement inhiber le développement de bactéries pathogènes, notamment celui des agents bactériens *S. aureus* et *Streptococcus* du groupe A. Cette inhibition repose sur la production de deux protéines à activité antimicrobienne, les modulines gamma et delta (Cogen *et al.*, 2010a; Cogen *et al.*, 2010b). Ces deux molécules, produites par *S. epidermidis*, sont capables de se lier aux lipides de la membrane de certaines bactéries pathogènes, à savoir *S. aureus* et le streptocoque du groupe A. Cette interaction, similairement aux mécanismes d'action des PAMs d'origine eucaryote, provoque la formation de pores au sein de la membrane bactérienne et la lyse cellulaire. Cet agent bactérien commensal présente une résistance vis-à-vis des peptides antimicrobiens cutanés importante comparée notamment à *S. aureus* (Dinulos *et al.*, 2003; Gläser *et al.*, 2005). Dans deux travaux publiés par Chung et Dale (2004) et Wanke *et al.* (2011), il a été montré que *S. epidermidis* et la bactérie pathogène *S. aureus* utilisent deux voies différentes de signalisation pour induire l'expression des gènes codant pour des peptides antimicrobiens, suggérant ainsi que les cellules cutanées ont la capacité de distinguer bactéries commensales et pathogènes. Wanke *et al.* (2011) ont montré qu'une pré-incubation de lignées de kératinocytes avec *S. epidermidis* pouvait renforcer leur réponse défensive vis-à-vis de *S. aureus*. Il serait très intéressant de pouvoir confirmer ces résultats sur le modèle explant de peau humaine. L'étude des effets d'une pré-incubation avec une souche de *S. epidermidis* avant exposition à *S. aureus* ou d'autres microorganismes pathogènes tels que *P. aeruginosa*, *P. acnes* ou *C. albicans*, pourrait être menée. Il serait aussi intéressant d'étudier la réponse des cellules cutanées à une infection bactérienne chez des explants dont la fonction barrière est perturbée, en reproduisant le phénotype de peaux atopiques.

La peau est colonisée par un grand nombre de microorganismes différents. Ces bactéries sont capables de communiquer entre elles par l'échange de nombreuses molécules, principalement des peptides cycliques chez les bactéries à Gram + et des molécules de type

acyl-homosérine lactine pour les Gram -, phénomène connu sur le non de *Quorum Sensing* et décrit pour la première fois par Williams *et al.* (1992). Ces molécules sont impliquées dans différents processus, dont la synchronisation des facteurs de virulence. Dans ce contexte, l'étude des effets d'applications simultanées de deux ou plusieurs bactéries sur les explants en culture pourrait être entreprise.

### III Impact de biomolécules sur les mécanismes de défense cutanée

Dans le cadre du projet Skinoflor, nous avons également étudié l'impact de deux glycomolécules sur l'expression des gènes de défense et de l'inflammation en lien avec le microbiome cutané. Les deux molécules étudiées sont le Rhamnogalacturonane de type-II, polysaccharide extrait de feuilles de tabac et le Téflose, polysaccharide riche en rhamnose produit par le laboratoire Bio-Europe.

Nous avons tout d'abord focalisé nos travaux sur les effets du Téflose. Afin d'explorer les actions « préventives » du Téflose vis-à-vis des mécanismes de défense cutanée, un apport préalable de Téflose à 0,03% au traitement par la bactérie *S. aureus* à la surface des explants a été réalisé. Nous n'avons observé dans ces conditions expérimentales aucune modification de l'expression des gènes codant les PAMs hBD2 et hBD3 et les cytokines pro-inflammatoires IL-1 alpha et bêta et IL-6 contrairement aux résultats obtenus sur les explants témoins exposés 24 h et 48 h à *S. aureus* sans application de Téflose (**Fig. 45**). Il est probable que le Téflose ait la capacité de former une barrière physique à la surface de l'épiderme, et d'empêcher ainsi le contact direct entre *S. aureus* et les cellules cutanées. Grâce à ces propriétés, le Téflose pourrait être utilisé pour le traitement de peaux atopiques, caractérisées dans la plupart des cas par une forte colonisation de l'agent microbien *S. aureus* (Mempel, 1998).

Au cours de ce travail nous avons également mis en évidence la capacité de l'eau thermale d'Uriage à renforcer l'expression des gènes *hBD2* et *hBD3* en lien avec une exposition à *S. aureus*, sans modification de l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. De plus, d'autres expériences réalisées dans le cadre du projet Skinoflor au sein du laboratoire LMSM, montrent que l'eau thermale d'Uriage pure inhibe complètement la croissance de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *P. fluorescens*.

L'application de l'émulsion P 385.02 (contenant du Téflose 0,03% et de l'eau d'Uriage à 30% dans une base lamellaire) quelques minutes après le dépôt de l'agent bactérien *S. aureus* (**Condition C, Fig. 33c**) provoque une baisse significative du niveau d'expression de tous les gènes étudiés (**Fig. 48**) comparativement aux valeurs enregistrées

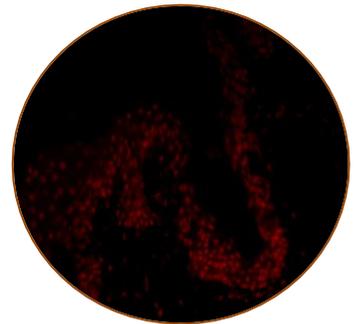
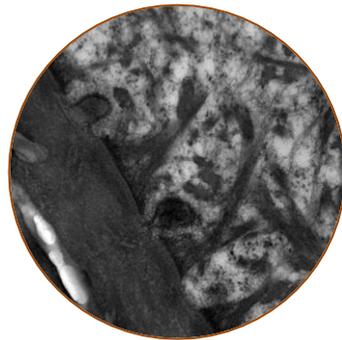
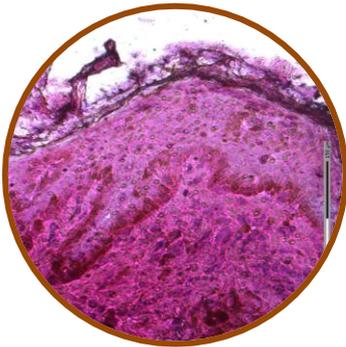
dans les témoins non traités par l'émulsion. Ceci suggère que l'émulsion P 385.02 appliquée en soins dermo-cosmétique sur une peau sensible saine préviendrait l'apparition de symptômes inflammatoires.

Le laboratoire Glyco-MEV focalise ses recherches sur l'étude des mécanismes de défense des plantes vis-à-vis de stress biotiques et abiotiques. Dans ce contexte, il s'intéresse à l'extraction et la caractérisation structurale de glycomolécules (polysaccharides, glycoprotéines et protéoglycannes) d'origine végétale. Nous nous sommes ici intéressés au RG-II qui s'avère être un polysaccharide majeur pour la survie des plantes et qui renferme dans sa structure plusieurs sucres rares (Darvill *et al.*, 1978; Delmas *et al.*, 2008; Séveno *et al.*, 2009). C'est le polysaccharide le plus complexe à avoir été caractérisé chez les végétaux. Le traitement des explants par ce polymère ne modifie pas les profils d'expression géniques étudiés (**Fig. 42**). Parallèlement, par approche immunocytologique, nous avons mis en évidence que le composé RG-II reste à la surface épidermique de l'explant; aucun épitope associé à cette glycomolécule n'est détecté dans les couches profondes de l'épiderme vivant (**Fig. 43**), ce que pourrait expliquer l'absence de modulation de l'expression génique. Cependant, le RG-II a une taille moléculaire estimée à environ 5 kDa, taille qui permettrait la pénétration de la couche cornée. En perspective, il serait envisageable de prolonger le temps d'incubation de l'explant avec une solution aqueuse contenant du RG-II afin de favoriser la pénétration de la glycomolécule vers l'épiderme vivant. De plus, le RG-II ne semble pas altérer la croissance des bactéries *S. epidermidis* et *S. aureus* (**Fig. 41**). En revanche, une augmentation de l'expression des gènes *hBD2* et *hBD3* a été observée en traitant les explants avec des souches bactériennes de *S. epidermidis* et *P. fluorescens* pré-incubées avec du RG-II à une concentration de 50 µg/mL (**Fig. 44**). Ces résultats sont très similaires à ceux observés lors de la pré-incubation de ces germes avec le « Téflose » à une concentration de 0.01%. Ces pré-incubations pourraient avoir augmenté la production des PAMPs par les bactéries et par conséquent la réponse défensive des cellules cutanées. L'étude des propriétés d'adhésion des bactéries et de leur virulence en présence du RG-II aiderait à la compréhension de ces observations.

En perspective, nous suggérons d'étudier l'impact d'autres glycomolécules d'origine végétale, notamment le Rhamnogalacturonane de type-I et les arabinogalactane protéines, sur les expressions géniques en lien avec la défense innée et les réactions pro-inflammatoires à la fois sur des kératinocytes en culture et des explants de peau humaine en survie. Le RG-I est un polysaccharide riche en résidus de alpha-L-Rhamnose. Il est connu que des résidus de

alpha-L-Rhamnose sont capables d'inhiber l'expression de certains gènes codant pour des facteurs de croissance impliqués dans des activités pro-tumorales (Faury *et al.*, 2008) ou encore d'induire l'expression de collagène chez les fibroblastes en culture (Ravelojaona *et al.*, 2008). Les arabinogalactane protéines (AGPs) sont des protéoglycannes appartenant à la famille des protéines riches en hydroxyproline (HRGP). La portion oligosaccharidique, très riche en L-arabinose et D-galactose, représente environ 90% de la masse du protéoglycanne alors que le squelette protéique n'en constitue que 2 à 10 %. Les glycanes, reliés à la portion protéique par des résidus d'hydroxyproline, sont caractérisés par une chaîne centrale de bêta-(1,3)-D-galactane et des chaînes latérales de galactose liées en bêta-D-(1,6). Les AGPs sont impliquées dans différents processus cellulaires chez les plantes (Nguema-Ona *et al.*, 2012). Leur activité antimicrobienne vis-à-vis d'un phytopathogène a été récemment décrite par des travaux réalisés au sein du laboratoire « Glyco-MEV » (Cannesan *et al.*, 2012). C'est pourquoi, nous envisageons d'étudier l'impact du dépôt d'AGPs ou de fragments oligosaccharidiques issus de ces AGPs sur l'expression des gènes de défense dans les kératinocytes en lien avec le microbiome cutané. Par ailleurs, il a été montré que ces protéines peuvent faciliter la cicatrisation en induisant la prolifération des kératinocytes en culture (Zippel *et al.*, 2009a; Zippel *et al.*, 2009b). Il serait intéressant de confirmer ces résultats sur le modèle explant de peau humaine.

# Références Bibliographiques





### Références bibliographiques

#### A

Aboughe Angone S. (2008). Polysaccharides pariétaux de trois plantes africaines : caractérisation structurale et activité biologique. Thèse soutenue le 29 Septembre 2008 à l'Université de Rouen.

Abtin A., Eckhart L., Mildner M., Ghannadan M., Harder J. et Schröder J. M. (2009). Degradation by *stratum corneum* proteases prevents endogenous RNase inhibitor from blocking antimicrobial activities of RNase 5 and RNase 7. *J Invest Dermatol.* **129**, 2193–2201.

Agerberth B., Gunne H., Odeberg J., Kogner P., Boman H. G. et Gudmundsson G. H. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 195–199.

Aiba S., Nakagawa S., Ozawa H., Miyake K., Yagita H. et Tagami H. (1993). Up-Regulation of alpha 4 integrin on activated Langerhans cells : analysis of adhesion molecules on Langerhans cells relating to their migration from skin to draining lymph nodes. *J Invest Dermatol.* **100**, 143–147.

Akira S. et Takeda K. (2004). Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* **4**, 499–511.

Akkol E. K., Süntar I., Erdoğan T. F., Keleş H., Gonenç T. M. et Kıvçak B. (2012). Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus* : a comparative study. *J Ethnopharmacol.* **139**, 478–484.

Albersheim P., Darvill A. G., O'Neill M. A., Schols H. A. et Voragen A. G. J. (1996). An hypothesis : the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: Visser J., Voragen (Eds). *Pectine and Pectinase*, Elsevier Science, Amsterdam. pp, 47–55.

Alexopoulou L., Holt A. C., Medzhitov R. et Flavell R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* **413**, 732–738.

Ali R. S., Falconer A., Ikram M., Bissett C. E., Cerio R. et A. G. Quinn (2001). Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Inv Dermatol.* **117**, 106–111.

Allaker R. P., Zihni C. et Kapas S. (1999). An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **23**, 289–293.

Alkemade J. A., Molhuizen H. O., Ponc M., Kempenaar J. A., Zeeuwen P. L., de Jongh G. J., van Vlijmen-Willems I. M., van Erp P. E., van de Kerkhof P. C. et Schalkwijk J. (1994).

## Références bibliographiques

---

SKALP/elafin is an inducible proteinase inhibitor in human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci.* **107**, 2335–2342.

Allen J., Schomberg K. et Wojnarowska F. (1997). Physicochemical characterization and differentiation of the components of the cutaneous basement membrane zone. *Br J Dermatol.* **137**, 907–915.

Aly R., Maibach H. I., Rahman R., Shinefield H. R. et Mandel A. D. (1975). Correlation of human *in vivo* and *in vitro* cutaneous antimicrobial factors. *J Infect Dis.* **131**, 579–583.

Ament W., Huizenga J. R., Mook G. A., Gips C. H. et Verkerke G. J. (1997). Lactate and ammonial concentration in blood and sweat during incremental cycle ergometer exercise. *Int J Sports Med.* **18**, 35–39.

Andersen C. L., Jensen J. L. et Ørntoft T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data : a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245–5250.

Andrès E., Molinari J., Péterszegi G., Mariko B., Ruszova E., Velebny V., Faury G. et Robert L. (2006). Pharmacological properties of rhamnase-rich polysaccharides, potential interest in age-dependent alterations of connective tissues. *Pathol Biol.* **54**, 420–425.

Andreu D. et Rivas L. (1998). Animal antimicrobial peptides : an overview. *Biopolymers.* **47**, 415–433.

Anttila H. S., Reitamo S., Erkko P., Miettinen A., Didierjean L. et Saurat J. H. (1990). Membrane and cytosolic interleukin-1 alpha and beta in normal human epidermal cells : variability of epitope exposure in immunohistochemistry. *J Invest Dermatol.* **95**, 31–38.

Araújo L. U., Reis P. G., Barbosa L. C., Saúde-Guimarães D. A., Grabe-Guimarães A., Mosqueira V. C., Carneiro C. M. et Silva-Barcellos N. M. (2012). *In vivo* wound healing effects of *Symphytum officinale* L. leaves extract in different topical formulations. *Pharmazie.* **267**, 355–360.

### **B**

Baker B. S., Ovigne J. M., Powles A. V., Corcoran S. et Fry L. (2003). Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5 : modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol.* **148**, 670–679.

Bals R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* **1**, 141–150.

Barrandon Y. et Green H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA.* **84**, 2302–2306.

## Références bibliographiques

---

- Bastian A. et Schafer H. (2001). Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul Pept.* **101**, 157–161.
- Baumann G. et Mueller P. (1974). A molecular model of membrane excitability. *J Supramol Struct.* **2**, 538–557.
- Bell J. K., Mullen G. E., Leifer C. A., Mazzoni A., Davies D. R. et Segal D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* **24**, 528–533.
- Benko S., Philpott D. J. et Girardin S. E. (2008). The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors. *Cytokine.* **43**, 368–373.
- Bensch K. W., Raida M., Mägert H. J., Schulz-Knappe P. et Forssmann W. G. (1995). hBD-1 : a novel beta-defensin from plasma. *FEBS Lett.* **368**, 331–335.
- Bibel D. J., Miller S. J., Brown B. E., Pandey B. B., Elias P. M., Shinefield H. R. et Aly R. (1989). Antimicrobial activity of *stratum corneum* lipids from normal and essential fatty acid-deficient mice. *J Invest Dermatol.* **92**, 632–638.
- Bick R. J., Poindexter B. J., Buja L. M., Lawyer C. H., Milner S. M. et Bhat S. (2007). Nuclear localization of hBD-1 in human keratinocytes. *J Bur Wound.* **7**, 25–32.
- Biragyn A., Ruffini P. A., Leifer C. A., Klyushnenkova E., Shakhov A., Chertov O., Shirakawa A. K., Farber J. M., Segal D. M., Oppenheim J. J. et Kwak L.W. (2002). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science.* **298**, 1025–1029.
- Bizzozero G. (1864). Delle cellule cigliate, del reticolo Malpighiano de l'epidermide. *Ann. Univ. Med.* **190**, 110–118.
- Boman H. G., Agerberth B. et Boman A. (1993). Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun.* **61**, 2978–2984.
- Boulais N. et Misery L. (2008). The epidermis : a sensory tissue. *Eur J Dermatol.* **18**, 119–127.
- Boyden E.D. et Dietrich W. F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet.* **38**, 240–244.
- Braff M. H., Zaiou M., Fierer J., Nizet V. et Gallo R. L. (2005). Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect Immun.* **73**, 6771–6781.
- Braff M. H., Di Nardo A. et Gallo R. L. (2004). Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J Invest Dermatol.* **124**, 394–400.

## Références bibliographiques

---

Brandner J. M. et Proksch E. (2006). Epidermal barrier function : Role of tight junctions. In Elias P. M. and Feingold K. R. *Skin Barrier*. New York : Taylor and Francis. pp, 191–210.

Brenner M. et Healing V. J. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* **84**, 539–549.

Brightbill H. D., Libraty D. H., Krutzik S. R., Yang R. B., Belisle J. T., Bleharski J. R., Maitland M., Norgard M. V., Plevy S. E., Smale S. T., Brennan P. J., Bloom B. R., Godowski P. J. et Modlin R. L. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* **285**, 732–736.

Brogden K. A. (2005). Antimicrobial peptides : pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews.* **3**, 238–250.

Brotz H., Bierbaum G., Leopold K., Reynolds P. E. et Sahl H. G. (1998). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents.* **42**, 154–160.

Bruggemann H., Henne A., Hoster F., Liesegang H., Wiezer A., Strittmatter A., Hujer S., Dürre P. et Gottschalk G. (2004). The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science* **305**, 671–673.

Bulet P. et Stöcklin R. (2005). Insect antimicrobial peptides : structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett.* **12**, 3–11.

Bulet P., Stöcklin R. et Menin L. (2004). Anti-microbial peptides : from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* **198**, 169–184.

Burns K., Clatworthy J., Martin L., Martinon F., Plumpton C., Maschera B., Lewis A., Ray K., Tschopp J. et Volpe F. (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nature Cell Biol.* **2**, 346–351.

### C

Cai S. C., Chen H., Koh W. P., Common J. E., van Bever H. P., McLean W. H., Lane E. B., Giam Y. C. et Tang M. B. (2012). Filaggrin mutations are associated with recurrent skin infection in Singaporean Chinese patients with *atopic dermatitis*. *Br J Dermatol.* **166**, 200–203.

Cammue B. P., De Bolle M. F., Terras F. R., Proost P., Van Damme J., Rees S. B., Vanderleyden J. et Broekaert W. F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J Biol Chem.* **267**, 2228–2233.

Candi E., Schmidt R. et Melino G. (2005). The cornified envelope : a model of cell death in the skin. *Nature Rev Mol Cell Biol.* **6**, 329–340.

## Références bibliographiques

---

- Cannesan M. A., Durand C., Burel C., Gangneux C., Lerouge P., Ishii T., Laval K., Follet-Gueye M. L., Driouich A. et Vicié-Gibouin M. (2012). Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of *Pisum sativum* and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiol.* **159**, 1658–1670.
- Capone K. A., Dowd S. E., Stamatias G. N. et Nikolovski J. (2011). Diversity of the human skin microbiome early in life. *J Invest Dermatol.* **131**, 2026–2032.
- Cao Z., Henzel, W. J. et Gao X. (1996a). IRAK : a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science.* **271**, 1128–1131.
- Cao Z., Xiong J., Takeuchi M., Kurama T. et Goeddel D. V. (1996b). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature.* **383**, 443–446.
- Caron G. A. (1968). Organ culture of normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol.* **97**, 575–586.
- Carrino D. A., Calabro A., Darr A. B., Dours-Zimmermann M.T., Sandy J. D., Zimmermann D. R., Sorrell J. M., Hascall V. C. et Caplan A. I. (2011). Age-related differences in human skin proteoglycans. *Glycobiology.* **21**, 257–268.
- Carrino D. A., Sorrell J. M. et Caplan A. I. (2000). Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys.* **373**, 91–101.
- Castells-Rodellas A., Castell J. V., Ramirez-Bosca A., Nicolas J. F., Valcuende-Cavero F. et Thivolet J. (1992). Interleukin-6 in normal skin and psoriasis. *Acta Derm Venereol.* **72**, 165–168.
- Chadebech P., Goidin D., Jacquet C., Viac J., Schmitt D. et Staquet M. G. (2003). Use of reconstructed epidermis to analyze the regulation of hBD1, hBD2 et hBD3 expression in response to LPS. *Cell Biol Toxicol.* **19**, 313–324.
- Chamaillard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L., Ogura Y., Kawasaki A., Fukase K., Kusumoto S., Valvano M. A., Foster S. J., Mak T. W., Nuñez G. et Inohara N. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat immunol.* **4**, 702–707.
- Chertov O., Michiel D. F., Xu L., Wang J. M., Tani K., Murphy W. J., Longo D. L., Taub D. D. et Oppenheim J. J. (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem.* **271**, 2935–2940.
- Chevalier L., Bernard S., Ramdani Y., Lamour R., Bardor M., Lerouge P., Follet-Gueye M. L. et Driouich A. (2010). Subcompartment localization of the side chain xyloglucan-synthesizing enzymes within Golgi stacks of tobacco suspension-cultured cells. *Plant J.* **64**, 977–989.
- Cho J. S., Xuan C. et Miller L. S. (2010). Lucky number seven : RNase 7 can prevent *Staphylococcus aureus* skin colonization. *J Invest Dermatol.* **130**, 2703–2706.

## Références bibliographiques

---

- Chompoo J., Upadhyay A., Fukuta M. et Tawata S. (2012). Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. *BMC Complement Altern Med.* **12**, 106–111.
- Chronnell C. M., Ghali L. R., Ali R. S., Quinn A. G., Holland D. B., Bull J. J., Cunliffe W. J., McKay I. A., Philpott M. P. et Müller-Röver S. (2001). Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units : upregulation in *acne vulgaris* lesions. *J Invest Dermatol.* **117**, 1120–1125.
- Chung W. O. et Dale B. A. (2004). Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. *Infect Immun.* **72**, 352–358.
- Clark R. et Kupper T. (2005). Old meets new : the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* **125**, 629–637.
- Clark R. A., An J. Q., Greiling D., Khan A. et Schwarzbauer J. E. (2003). Fibroblast migration on fibronectin requires three distinct functional domains. *J Invest Dermatol.* **121**, 695–705.
- Clayton E., Doupe D. P., Klein A. M., Winton D. J., Simons B. D. et Jones P. H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature.* **446**, 185–189.
- Clemmensen A., Thomassen M., Clemmensen O., Tan Q., Kruse T. A., Petersen T. K., Andersen F. et Andersen K. E. (2009). Extraction of high-quality epidermal RNA after ammonium thiocyanate-induced dermo-epidermal separation of 4 mm human skin biopsies. *Exp Dermatol.* **18**, 979–984.
- Cogen A. L., Yamasaki K., Sanchez K. M., Dorschner R. A., Lai Y., MacLeod D. T., Torpey J. W., Otto M., Nizet V., Kim J. E. et Gallo R. L. (2010a). Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J Invest Dermatol.* **130**, 192–200.
- Cogen A. L., Yamasaki K., Muto J., Sanchez K. M., Crotty A. L., Tanios J., Lai Y., Kim J. E., Nizet V. et Gallo R. L. (2010b). *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial  $\delta$ -toxin (phenol-soluble modulin- $\gamma$ ) cooperates with host antimicrobial peptides to kill Group A *Streptococcus*. *PLoS ONE.* **5**, e8557.
- Cosgrove D.J. (2005). Growth on the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 850–861.
- Costello E. K., Lauber C. L., Hamady M., Fierer N., Gordon J. I. et Knight R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science.* **326**, 1694–1697.
- Curry J. L., Qin J. Z., Bonish B., Carrick R., Bacon P., Panella J., Robinson J. et Nickoloff B. J. (2003). Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol Lab Med.* **127**, 178–186.

### D

Darvill A. G., McNeil M. et Albersheim P. (1978). Structure of plant cell walls VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.* **62**, 418–422.

Delmas F., Séveno M., Northey J. G. B., Hernould M., Lerouge P., McCourt P. et Chevalier C. (2008). The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. *J Exp Bot.* **59**, 2639–2647

Denda M., Sato J., Masuda Y., Tsuchiya T., Koyama J., Kuramoto M., Elias P. M. et Feingold K. R. (1998). Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol.* **111**, 858–863.

Denecker G., Ovaere P., Vandenabeele P. et Declercq W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol.* **180**, 451–458.

Didierjean L., Salomon D., Mérot Y., Siegenthaler G., Shaw A., Dayer J. M. et Saurat J. H. (1989). Localization and characterization of the interleukin 1 immunoreactive pool (IL-1 alpha and beta forms) in normal human epidermis. *J Invest Dermatol.* **92**, 809–816.

Dinarello C. A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* **77**, 1627–1652.

Dinulos J. G. H., Mentele L., Fredericks L. P., Dale B. A. et Darmstadt G. L. (2003). Keratinocyte expression of human beta-defensin 2 following bacterial infection : role in cutaneous host defense. *Clin Diagn Lab Immun.* **10**, 161–166.

Donnarumma G., Buommino E., Baroni A., Auricchio L., De Filippis A., Cozza V., Msika P., Piccardi N. et Tufano M. A. (2007). Effects of AV119, a natural sugar from avocado, on *Malassezia furfur* invasiveness and on the expression of HBD-2 and cytokines in human keratinocytes. *Exp Dermatol.* **16**, 912–919.

Dorschner R. A., Lopez-Garcia B., Massie J., Kim C. et Gallo R. L. (2004). Innate immune defense of the nail unit by antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol.* **50**, 343–348.

Dorschner R. A., Lin K. H., Murakami M. et Gallo R. L. (2003). Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides : innate immunity during development of the adaptive response. *Pediatr Res.* **53**, 566–572.

Dorschner R. A., Pestonjamas V. K., Tamakuwala S., Ohtake T., Rudisill J., Nizet V., Agerberth B., Gudmundsson G. H. et Gallo RL. (2001). Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J Invest Dermatol.* **117**, 91–97.

Drake D. R., Brogden K. A., Dawson D. V. et W. Wertz P. W. (2008). Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res.* **49**, 4–11.

### E

Elias P. M. (2005). *Stratum corneum* defensive functions : an integrated view. *J Invest Dermatol.* **125**, 183–200.

Elias P. M., Brown B. E., Fritsch P., Goerke J., Gray G. M. et White R. J. (1979). Localization and composition of lipids in neonatal mouse *stratum granulosum* and *stratum corneum*. *J Inv Dermatol.* **73**, 339–348.

Elias P. M. (1975). The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol.* **65**, 180–191.

Escalas-Taberner J., González-Guerra E. et Guerra-Tapiac A. (2011) Sensitive Skin : A Complex Syndrome. *Acta Dermosifiliogr.* **102**, 563–571.

Espina V., Wulfkühle J. D., Calvert V. S., VanMeter A., Zhou W., Coukos G., Geho D. H., Petricoin E. F. et Liotta L. A. (2006). Laser-capture microdissection. *Nat Protoc.* **1**, 586–603.

### F

Faury G., Ruszova E., Molinari J., Mariko B., Raveaud S., Velebny V. et Robert L. (2008). The alpha-L-Rhamnose recognizing lectin site of human dermal fibroblasts functions as a signal transducer : modulation of Ca<sup>2+</sup> fluxes and gene expression. *Biochim Biophys Acta.* **12**, 1388–1394.

Feingold K. R. (1991). The regulation and the role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lip Res.* **24**, 57–82.

Fernandez T. L., Dawson R. A., Van Lonkhuyzen D. R., Kimlin M. G. et Upton Z. (2012). A tan in a test tube - in vitro models for investigating ultraviolet radiation-induced damage in skin. *Exp Dermatol.* **21**, 404–410.

Ferris L. K., Mburu Y. K., Mathers A. R., Fluharty E. R., Larregina A. T., Ferris R. L. et Falo L. D. Jr. (2012). Human Beta-Defensin 3 induces maturation of human Langerhans Cell-Like dendritic cells : an antimicrobial peptide that functions as an endogenous adjuvant. *J Invest Dermatol.* In press.

Fitzgerald K. A., Palsson-McDermott E. M., Bowie A. G., Jefferies C. A., Mansell A. S., Brady G., Brint E., Dunne A., Gray P., Harte M. T., McMurray D., Smith D. E., Sims J. E., Bird T. A. et O'Neill L. A. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* **413**, 78–83.

Franchi L., Warner N., Viani K. et Nuñez G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev.* **227**, 106–128.

Fredricks D. N. (2001). Microbial ecology of human skin in health and disease. *J Investig Dermatol Symp Proc.* **6**, 167–169.

## Références bibliographiques

---

Frick I. M., Nordin S. L., Baumgarten M., Mörgelin M., Sørensen O. E., Olin A. I. et Egesten A. (2011). Constitutive and inflammation-dependent antimicrobial peptides produced by epithelium are differentially processed and inactivated by the commensal *Fingoldia magna* and the pathogen *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol.* **187**, 4300–4309.

Fritz J. H., Ferrero R. L., Philpott D. J. et Girardin S. E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol.* **7**, 1250–1257.

Fritz H. (1988). Human mucus proteinase inhibitor (human MPI). Human seminal inhibitor (HUSI-I), antileukoprotease (ALP), secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI). *Biol Chem Hoppe Seyler.* **369**, 79–82.

Frohm M., Agerberth B., Ahangari G., Stahle-Backdahl M., Liden S., Wigzell H. et Gudmundsson G. H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory. *J Biol Chem.* **272**, 15258–15263.

Fuchs E. (2008). Skin stem cells : rising to the surface. *J Cell Biol.* **180**, 273–284.

Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A. et Tsukita S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier : lesson from claudin-1 deficient mice. *J Cell Biol.* **156**, 1099–1111.

### G

Gall Y. (2010) Hyaluronic acid : structure, metabolism and implication in cicatrisation. *Ann Dermatol Venereol.* **137**, 30–39.

Gammon W. R., Briggaman R. A., Inman A. O., Merritt C. C. et Wheeler C. E. Jr. (1983). Evidence supporting a role for immune complex-mediated inflammation in the pathogenesis of bullous lesions of systemic *lupus erythematosus*. *J Invest Dermatol.* **81**, 320–325.

Ganz T. (2001). Defensins : Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev.* **3**, 710–720.

Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D., Harwig S. S., Daher K., Bainton D. F. et Lehrer R. I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* **76**, 1427–1435.

García J. R., Krause A., Schulz S., Rodríguez-Jiménez F. J., Klüver E., Adermann K., Forssmann U., Frimpong-Boateng A., Bals R. et Forssmann W. G. (2001a). Human beta-defensin 4 : a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**, 1819–1821.

García J. R., Jaumann F., Schulz S., Krause A., Rodríguez-Jiménez J., Forssmann U., Adermann K., Klüver E., Vogelmeier C., Becker D., Hedrich R., Forssmann W.G. et Bals R. (2001b). Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with

## Références bibliographiques

---

specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res*, **306**, 257–264.

Gasser P., Arnold F., Peno-Mazzarino L., Bouzoud D., Luu M. T., Lati E. et Mercier M. (2011). Glycation induction and antiglycation activity of skin care ingredients on living human skin explants. *Int J Cosmet Sci*. **33**, 366–370.

Ghohestani R. F., Li M., Rousselle P. et Uitto J. (2001). Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. *Clin Dermatol*. **19**, 551–562.

Giampieri F., Alvarez-Suarez J. M., Tulipani S., Gonzàles-Paramàs A. M., Santos-Buelga C., Bompadre S., Quiles J. L., Mezzetti B. et Battino M. (2012). Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria × ananassa*) extract against UV-A irradiation damage on human fibroblasts. *J Agric Food Chem*. **60**, 2322–2327.

Girard R., Pedron T., Uematsu S., Balloy V., Chignard M., Akira S. et Chaby R. (2003). Lipopolisaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via toll-like receptor 2. *J Cell Sci*. **116**, 293–302.

Girardin S. E., Boneca I. G., Carneiro L. A., Antignac A., Jehanno M., Viala J., Tedin K., Taha M. K., Labigne A., Zähringer U., Coyle A. J., Di Stefano P. S., Bertin J., Sansonetti P. J. et Philpott D. J. (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. **300**, 1584–1587.

Gläser R., Meyer-Hoffert U., Harder J., Cordes J., Wittersheim M., Kobliakova J., Fölster-Holst R., Proksch E., Schröder J.M. et Schwarz T. (2009a). The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in *atopic dermatitis* and after experimental skin barrier disruption. *J Invest Dermatol* **129**, 641–649.

Gläser R., Harder J., Lange H., Bartels J., Christophers E. et Schröder J. M. (2005). Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol*. **6**, 57–64.

Gray J. (1928). The role of water in the evolution of the terrestrial vertebrates. *J Exp Biol*. **6**, 26–31.

Green K. J. et Simpson C. L. (2007). Desmosomes : new perspective of a classic. *J Invest Dermatol*. **127**, 2499–2515.

Grellner W., Georg T. et Wilske J. (2000). Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. *Forensic Sci Int*. **113**, 251–264.

Gribbon E. M., Cunliffe W. J. et Holland, K. T. (1993). Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids *in vitro*. *J Gen Microbiol*. **139**, 1745–1751.

## Références bibliographiques

---

Grice E. A., Kong H. H., Renaud G., Young A. C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard G. G., Blakesley R. W., Wolfsberg T. G., Turner M. L. et Segre J. A. (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* **18**, 1043–1050.

Grice E. A., Kong H. H., Conlan S., Deming C. B., Davis J., Young A. C., NISC Comparative Sequencing program, Bouffard G. G., Blakesley R. W., Murray P. R., Green E. D., Turner M. L., et Segre J. A. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science.* **324**, 1190–1192.

Grossman R. M., Krueger J., Yourish D., Granelli-Piperno A., Murphy D. P., May L. T., Kupper T. S., Sehgal P. B. et Gottlieb A. B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**, 6367–6371.

Grubauer G., Feingold K. R., Harris R. M. et Elias P. M. (1989). Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. *J Invest Dermatol.* **30**, 89–96.

Güvenç A., Akkol E. K., Hürkul M. M., Süntar I. et Keleş H. (2012). Wound healing and anti-inflammatory activities of the *Michauxia L'Hérit* (Campanulaceae) species native to Turkey. *J Ethnopharmacol.* **139**, 401–408.

### H

Haass N. K., Smalley K. S. M., Liand L. et Meenhard H. (2005). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* **18**, 150–159.

Hallock K. J., Lee D. K. et Ramamoorthy A. (2003). MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. *Biophys J.* **84**, 3052–3060.

Hancock R. E. et Diamond G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**, 402–410.

Hansen C. J., Burnell K. K. et Brogden K. A. (2006). Antimicrobial activity of Substance P and Neuropeptide Y against laboratory strains of bacteria and oral microorganisms. *J Neuroimmunol.* **177**, 215–218.

Harder J., Dressel S., Wittersheim M., Cordes J., Meyer-Hoffert U., Mrowietz U., Fölster-Holst R., Proksch E., Schröder J. M., Schwarz T. et Gläser R. (2010). Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *J Invest Dermatol.* **130**, 1355–1364.

Harder J., Meyer-Hoffert U., Wehkamp K., Schwichtenberg L. et Schröder J. M. (2004). Differential gene induction of human b-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol.* **123**, 522–529.

## Références bibliographiques

---

- Harder J. et Schröder J. M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem.* **277**, 46779–4684.
- Harder J., Bartels J., Christophers E. et Schröder J. M. (2001). Isolation and characterization of human beta defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* **276**, 5707–5713.
- Harder J., Bartels J., Christophers E. et Schröder J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* **387**, 861.
- Hardman M. J., Sisi P., Banbury D. N. et Byrne C. (1998). Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development.* **125**, 1541–1552.
- Hashimoto C., Hudson K. L. et Anderson K. V. (1988). The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal–ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* **52**, 269–279.
- Hashmi S. et Marinkovich M. P. (2011). Molecular organization of the basement membrane zone. *Clin Derm.* **29**, 398–411.
- Hauser C., Saurat J. H., Schmitt A., Jaunin F. et Dayer J. M. (1986). Interleukin 1 is present in normal human epidermis. *J Immunol.* **136**, 3317–3323.
- Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akirak S., Underhill D. M. et Aderem A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Lett Nature.* **410**, 1099–1102.
- He K., Ludtke S. J., Huang H. W. et Worcester D. L. (1995). Antimicrobial peptide pores in membranes detected by neutron in-plane scattering. *Biochemistry* **34**, 15614–15618.
- Heil F., Hiroaki H. H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H. et Bauer S. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science.* **303**, 1526–1529.
- Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K. et Akira S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Lett Nature.* **408**, 740–745.
- Hiemstra P. S., Maasen R. J., Stolk J., Heinzal W. R., Steffens G. et Dijkman J. H. (1996). Antibacterial activity of anti-leukoprotease. *Inf Immunol.* **64**, 4520–4524.
- Hirschfeld M., Weis J. J., Toshchakov V., Cindy A., Salkowski M., Cody J., Ward D. C., Qureshi N. M., Michalek S. M. et Vogel S. N. (2001). Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun.* **69**, 1477–1482.

## Références bibliographiques

---

Hirschfeld M., Kirschning C. J., Schwandner R., Wesche H., Weis J. H., Wooten R. M. et Weis J. J. (1999). Cutting edge : inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by Toll-like receptor 2. *J Immunol.* **163**, 2382–2386.

Hoover D. M., Wu Z., Tucker K., Lu W. et Lubkowski J. (2003). Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**, 2804–2809.

Horng T., Barton G. M. et Medzhitov R. (2001). TIRAP : an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nature Immunol.* **2**, 835–841.

Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda, K. et Akira S. (1999). Cutting edge : Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide : evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* **162**, 3749–3752.

Huang H. W. (2006). Molecular mechanism of antimicrobial peptides : the origin of cooperativity. *Biochim Biophys Acta.* **1758**, 1292–1302.

Humann J. et Lenz L. (2010). Activation of naive NK cells in response to *Listeria monocytogenes* requires IL-18 and contact with infected dendritic cells. *J Immunol.* **184**, 5172–5178.

### I

Iwanaga S. et Lee B. L. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol.* **38**, 128–150.

Izadpanah A. et Gallo R. L. (2005). Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol.* **52**, 381–390.

### J

Jia H. P., Schutte B. C., Schudy A., Linzmeier R., Guthmiller J. M., Johnson G. K., Tack B. F., Mitros J. P., Rosenthal A., Ganz T. et McCray P.B. Jr. (2001). Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene.* **263**, 212–218.

Johnston A., Xing X., Guzman A. M., Riblett M., Loyd C. M., Ward N. L., Wohn C., Prens E. P., Wang F., Maier L. E., Kang S., Voorhees J. J., Elder J. T., Gudjonsson J. E. (2011). IL-1F5, -F6, -F8, and -F9 : a novel IL-1 family signaling system that is active in psoriasis and promotes keratinocyte antimicrobial peptide expression. *J Immunol.* **186**, 2613–22.

Jones S. A. (2006). Directing transition from innate to acquired immunity : defining a role for IL-6. *J Immunol.* **175**, 3463–3468.

Jones P. H., Harper S. et Watt F.M. (1995). Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell.* **80**, 83–93.

## Références bibliographiques

---

Junqueira L. C. U., Montes G. S., Martins J. E. C. et Joazeiro P. P. (1983) Dermal collagen distribution : a histochemical and ultrastructural study. *Histochemistry*. **79**, 397–403.

### K

Kaisho T., Takeuchi O., Kawai T., Hoshino K. et Akira S. (2001). Endotoxin-induced maturation of Myd88-deficient dendritic cells. *J Immunol*. **166**, 5688–5694.

Kawai K. (2003). Expression of functional toll-like receptors on cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. **121**, 217–218.

Kawai K., Shimura H., Minagawa M., Ito A., Tomiyama K. et Ito M. (2002). Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. **30**, 185–194.

Kelsell D. P., Dunlop J. et Hodgkins M. B. (2001). Human disease : clues to cracking the connexin code ? *Trends Cell biol*. **11**, 2–6.

Kennedy-Crispin M., Billick E., Mitsui H., Gulati N., Fujita H., Gilleaudeau P., Sullivan-Whalen M., Johnson-Huang L. M., Suárez-Fariñas M. et Krueger J. G. (2011). Human keratinocytes response to injury upregulates CCL20 and other genes linking innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*. **132**, 105–113.

Kestler D. P., Agarwal S., Cobb J., Goldstein K. M. et Hall R. E. (1995). Detection and analysis of an alternatively spliced isoform of interleukin-6 mRNA in peripheral blood mononuclear cells. *Blood*. **86**, 4559–4567.

Kim D. H., Moon Y. S., An B. J. et Son J. H. (2012). Potent anti-aging activity of *Aruncus dioicus*, a native plant of Ulleung-do, South Korea, in CCD-986sk fibroblasts via suppression of matrix metalloproteinases. *J Nat Med*. **66**, 631–636.

Kisich K. O., Howell M. D., Boguniewicz M., Heizer H. R., Watson N. U. et Leung D. Y. (2007). The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3. *J Invest Dermatol*. **127**, 2368–2380.

Kitano Y. et Okada N. (1983). Separation of the epidermal sheet by dispase. *Br J Dermatol*. **108**, 555–560.

Klenha J. et Krs V. (1967). Lysozyme in mouse and human skin. *J Invest Dermatol*. **49**, 396–399.

Kligman A. M., Sadiq I., Zhen Y. et Crosby M. (2006). Experimental studies on the nature of sensitive skin. *Skin Res Techn*. **12**, 217–222.

Kobayashi M., Match T. et Azuma J. (1996). Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol*. **110**, 1017–1020.

## Références bibliographiques

---

- Köck A., Schwarz T., Kirnbauer R., Urbanski A., Perry P., Ansel J. C. et Luger T. A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha : evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med.* **172**, 1609–1614.
- Kollisch G., Kalali B. N., Voelcker V., Wallich R., Behrendt H., Ring J., Bauer S., Jakob T., Mempel M. et Ollert M. (2005). Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology.* **114**, 531–541.
- Kong H. H. (2011). Skin microbiome : genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. *Trends Mol Med.* **17**, 320–328.
- Korać R. R. et Khambholja KM. (2012). Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacogn Rev.* **5**, 164–173.
- Korting H. C., Hubner K., Greiner K., Hamm G. et Braun-Falco O. (1990). Difference in the skin surface pH and bacterial microflora due to the long-term application of synthetic detergent preparation of pH 5.5 and 7.0 Results of a cross over trial in healthy volunteers. *Acta derm Venereal.* **70**, 429–431.
- Köten B., Simanski M., Gläser R., Podschun R., Schröder J. M. et Harder J. (2009). RNase 7 contributes to the cutaneous defense against *Enterococcus faecium*. *PLoS One.* **4**, e6424.
- Kowalska K., Carr D. B. et Lipkowski A. W. (2002). Direct antimicrobial properties of substance P. *Life Sci.* **71**, 747–50.
- Krieg P., Schuppler M., Koester R., Mincheva A., Lichter P. et Marks F. (1997). Repetin (Rptn), a new member of the ‘fused gene’ subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics.* **43**, 339–348.
- Krien P. M. et Kermici M. (2000). Evidence for the existence of a self-regulated enzymatic process within the human *stratum corneum*. An unexpected role of urocanic acid. *J Inv Dermatol.* **115**, 414–420.
- Kulka M. et Metcalfe D. D. (2006). TLR3 activation inhibits human mast cell attachment to fibronectin and vitronectin. *Mol Immunol.* **43**, 1579–1586.
- Kumar A., Zhang J. et Yu F. S. X. (2006). Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells. *Microbes Infect.* **8**, 380–389.
- Kupper T. S., Min K., Sehgal P., Mizutani H., Birchall N., Ray A. et May L. (1989). Production of IL-6 by keratinocytes. Implications for epidermal inflammation and immunity. *Ann N Y Acad Sci.* **557**, 454–564.

## Références bibliographiques

---

Kupper T. S., Chua A. O., Flood P., McGuire J. et Gubler U. (1987). Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J Clin Invest.* **80**, 430–436.

Kupper T. S., Ballard D. W., Chua A. O., McGuire J. S., Flood P. M., Horowitz M. C., Langdon R., Lightfoot L. et Gubler U. (1986). Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. *J Exp Med.* **164**, 2095–2100.

### L

Lafforgue C. (2008). Epidermal lipids and *stratum corneum*. *Réalités thérapeutiques en dermatol-vénérologie.* **2**, 6–8.

Lai Y., Cogen A. L., Radek K. A., Park H. J., Macleod D. T., Leichtle A., Ryan A. F., Di Nardo A. et Gallo R. L. (2010). Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *J Invest Dermatol.* **130**, 2211–2221.

Lai Y. et Gallo R. L. (2009). AMPed up immunity : how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* **30**, 131–141.

Lai Y., Di Nardo A., Nakatsuji T., Leichtle A., Yang Y., Cogen A. L., Wu Z. R., Lora V., von Aulock S., Radek K. A., Huang C. M., Ryan A. F. et Gallo R. L. (2009). Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3–dependent inflammation after skin injury. *Nat Med.* **15**, 1377–1382.

Lambert R. W., Campton K., Ding W., Ozawa H. et Granstein R. D. (2002). Langerhans cell expression of neuropeptide Y and peptide YY. *Neuropeptides.* **36**, 246–251.

Lamkanfi M. et Dixit V. M. (2010). Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe.* **8**, 44–54.

Landar A., Caddell G., Chessher J. et Zimmer D.B. (1996). Identification of an S100A1/S100B target protein : phosphoglucomutase. *Cell Calcium.* **20**, 279–285.

Larsen C., Zachariae C., Mukaida N., Anderson A., Yamada M., Oppenheim J. et Matsushima K. (1990). Proinflammatory cytokines interleukin 1 and tumor necrosis factor induce cytokines that are chemotactic for neutrophils, T cells and monocytes. *Prog Clin Biol Res.* **349**, 419–431.

Lebre M. C., van der Aar A. M., van Baarsen L., van Capel T. M., Schuitemaker J. H., Kapsenberg M. L. et de Jong E. C. (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol.* **127**, 331–341.

## Références bibliographiques

---

- Lebre M. C., Antons J. C., Kalinski P., Schuitemaker J. H., van Capel T. M., Kapsenberg M. L. et de Jong E. C. (2003). Double-stranded RNAexposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a type-1 polarized phenotype in dendritic cells : role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18. *J Invest Dermatol.* **120**, 990–997.
- Lechler T. et Fuchs E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature.* **437**, 275–280.
- Lee M. T., Chen F. Y. et Huang H. W. (2004). Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry.* **43**, 3590–3599.
- Leeming J. P., Holland K. T. et Cunliffe W. J. (1984). The microbial ecology of pilosebaceous units isolated from human skin. *J Gen Microbiol.* **130**, 803–807.
- Leher R. I. et Ganz T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol.* **11**, 23–27.
- Lehrer R. I., Barton A., Daher K. A., Harwig S. S., Ganz T. et Selsted M. E. (1989). Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest.* **84**, 553–561.
- Leontiadou H., Mark A. E. et Marrink S. J. (2006). Antimicrobial peptides in action. *J Am Chem Soc.* **128**, 12156–12161.
- Leyden J. J., McGinley K. J., Mills O. H. et Kligman A. M. (1975). Age-related changes in the resident bacterial flora of the human face. *J Invest Dermatol.* **65**, 379–381.
- Li G., Satyamoorthy K. et Herlyn M. (2001). N-Cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* **61**, 3819–3825.
- Liang Y., Faik A., Kieliszewski M., Tan L., Xu W. L. et Showalter A. M. (2010). Identification and characterization of in vitro galactosyltransferase activities involved in arabinogalactan-protein glycosylation in tobacco and Arabidopsis. *Plant Physiol.* **154**, 632–642
- Lien E., Means T. K., Heine H., Yoshimura A., Kusumoto S., Fukase K., Fenton M. J., Oikawa M., Qureshi N., Monks B., Finberg R. W., Ingalls R. R. et Golenboch D. T. (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin Invest.* **105**, 497–504.
- Lien E., Sellati T. J., Yoshimura A., Flo T. H., Rawadi G., Finberg R. W., Carroll J. D., Espevik T., Ingalls R. R., Radolf J. D. et Golenbock D. T. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.* **274**, 33419–33425.

## Références bibliographiques

---

Liu A. Y., Destoumieux D., Wong A. V., Park C. H., Valore E. V., Liu L. et Ganz T. (2002). Human b-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol.* **118**, 275–281.

Livak K. J. et Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**, 402–408.

Lousberg E. L., Diener K. R., Fraser C. K., Phipps S., Foster P. S., Chen W., Uematsu S., Akira S., Robertson S. A., Brown M. P. et Hayball J. D. (2011). Antigen-specific T-Cell responses to a recombinant fowlpox virus are dependent on MyD88 and interleukin-18 and independent of Toll-Like Receptor 7 (TLR7)- and TLR9-mediated innate immune recognition. *J Virol.* **85**, 3385–3396.

Ludtke S. J., He K., Heller W. T., Harroun T. A., Yang L. et Huang H. W. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry.* **35**, 13723–13728.

### **M**

Mackenzie I. C. (1997). Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J Invest Dermatol.* **109**, 377–383.

Magin T. M., Reichelt J. et Chen J. (2006). The role of keratins in epithelial homeostasis. In Elias P. M. and Feingold K. R. *Skin Barrier*. New York : Taylor and Francis. pp, 191–210.

Maintz L. et Novak N. (2011). Modifications of the innate immune system in *atopic dermatitis*. *J Innate Immun.* **3**, 131–141.

Maisetta G., Batoni G., Esin S., Luperini F., Pardini M., Bottai D., Florio W., Giuca M. R., Gabriele M. et Campa M. (2003). Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**, 3349–3351.

Man M., Hupe M., Mackenzie D., Kim H., Oda Y., Crumrine D., Lee S. H., Martin-Ezquerria G., Trullas C., Mauro T. M., Feingold K. R., Elias P. M. et Man M. Q. (2011). A topical Chinese herbal mixture improves epidermal permeability barrier function in normal murine skin. *Exp Dermatol.* **20**, 285–288.

Mariathasan S., Newton K., Monack D.M., Vucic D., French D.M., Lee W. P., Roose-Girma M., Erickson S. et Dixit V. M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature.* **430**, 213–218.

Maricich S. M., Wellnitz S. A., Nelson A. M., Lesniak D. R., Gerling G. J., Lumpkin E. A. et Zoghbi H. Y. (2009). Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science.* **324**, 1580–1582.

Marples R. R. (1982). Sex, constancy, and skin bacteria. *Arch Dermatol Res.* **272**, 317–320.

## Références bibliographiques

---

- Martinez A., Elsasser T. H. , Muro-Cacho C., Moody T. W., Miller J., Macri C. J. et Cuttitta F. (1997). Expression of adrenomedullin and its receptor in normal and malignant human skin : a potential pluripotent role in the integument. *Endocrinology*. **138**, 5597–5604.
- Masson F. (2010). Skin hydration and hyaluronic acid. *Ann Dermatol Venereol*. **137**, 23–25.
- Masukawa Y, Narita H., Shimizu E., Kondo N., Sugai Y., Oba T., Homma R., Ishikawa J., Takagi Y., Kitahara T., Takema Y. et Kita K. (2008). Characterization of overall ceramide species in human *stratum corneum*. *J Lipid Res*. **49**, 1466–1476.
- Matoh T., Takasaki M., Kobayashi M. et Takabe K. (2000). Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. III. Characterization of the boron-rhamnogalacturonan II complex in cells acclimated to low levels of boron. *Plant Cell Physiol*. **41**, 363–366.
- Matsuura H., Momota Y., Murata K., Matsushima H., Suzuki N., Nomizu M., Shinkai H. et Utani A. (2004). Localization of the laminin alpha4 chain in the skin and identification of a heparin-dependent cell adhesion site within the laminin alpha4 chain C-terminal LG4 module. *J Invest Dermatol*. **122**, 614–620.
- Matsuzaki K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense ? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta*. **1462**, 1–10.
- Matsuzaki K., Sugishita K., Ishibe N., Ueha M., Nakata S., Miyajima K. et Epand R. M. (1998). Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry*. **37**, 11856–11863.
- Matsuzaki K., Sugishita K., Harada M., Fujii N. et Miyajima K. (1997). Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. **1327**, 119–130.
- Matsuzaki K., Murase O., Fujii N. et Miyajima K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*. **35**, 11361–11368.
- Matter K. et Balda M. S. (1999). Occludin and the functions of tight junctions. *Int Rev Cytol*. **186**, 117–146.
- Mattiuzzo N. R., Toulza E., Jonca N., Serre G. et Guerrin M. (2011). A large-scale multi-technique approach identifies forty-nine new players of keratinocyte terminal differentiation in human epidermis. *Exp Dermatol*. **20**, 113–118.
- May L. T., Helfgott D. C. et Sehgal P. B. (1986). Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts : structural studies of the beta 2 interferon involved. *Proc Natl Acad Sci USA*. **83**, 8957–8961.

## Références bibliographiques

---

- McBride M. E., Duncan W. C. et Knox J. M. (1977). The environment and the microbial ecology of human skin. *Appl Environ Microbiol.* **33**, 603–608.
- McGrath J.A. et Uitto J. (2010). Anatomy and Organization of Human Skin. Chapitre 3. In Rook's Textbook of Dermatology, Volume 1, 8<sup>th</sup> Edition Edited by Burns T., Breathnach S., Cox N. et Griffiths C.
- Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* **1**, 135–145.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S. et Janeway C. A. Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell.* **2**, 253–258.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. et Janeway, C. A. Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* **388**, 394–397.
- Mempel M., Voelcker V., Kollisch G., Plank C., Rad R., Gerhard M., Schnopp C., Fraunberger P., Walli A. K., Ring J., Abeck D. et Ollert M. (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.
- Mempel A. (1998). *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Brit Journ Dermatol.* **139** (s53), 13–16.
- Menton D. N. et Eisen A. Z. (1971). Structure and organization of mammalian *stratum corneum*. *J Ultrastruct Res.* **35**, 247–264.
- Menzies B. M. et Kenoyer A. (2006). Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect Immun.* **74**, 6847–6854.
- Meyer-Hoffert U., Wichmann N., Schwichtenberg L., White P. C. et Wiedow O. (2003). Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific antibiotic elafin in human keratinocyte. *Exp Derm.* **12**, 418–425.
- Miao E. A., Alpuche-Aranda C. M., Dors M., Clark A. E., Bader M. W., Miller S. I. et Aderem A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 beta via Ipaf. *Nat Immunol.* **7**, 549–551.
- Michel B. et Ko C. S. (1977). An organ culture model for the study of pemphigus acantholysis. *Br J Dermatol.* **96**, 295–302.
- Midorikawa K., Ouhara K., Komatsuzawa H., Kawai T., Yamada S., Fujiwara T., Yamazaki K., Sayama K., Taubman M. A., Kurihara H., Hashimoto K. et Sugai M. (2003).

## Références bibliographiques

---

*Staphylococcus aureus* susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun.* **71**, 3730–3739.

Miller L. S., Sorensen O. E., Liu P. T., Jalian H. R., Eshtiaghpour D., Behmanesh B. E., Chung W., Starner T. D., Kim J., Sieling P. A., Ganz T. et Modlin R. L. (2005). TGF- $\alpha$  regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol.* **174**, 6137–6143.

Mizutani H., Black R. et Kupper T. S. (1991). Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. *J Clin Invest.* **87**, 1066–1071.

Moore J. P., Nguema-Ona E., Chevalier L., Lindsey G. G., Brandt W. F., Lerouge P., Farrant J. M. et Driouich A. (2006). Response of the leaf cell wall to desiccation in the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*. *Plant Physiol.* **141**, 651–662.

Morita K. et Miyachi Y. (2003). Tight junctions in the skin. *J Derm Sci.* **31**, 81–89.

Morita K., Miyachi Y. et Furuse M. (2011). Tight junctions in epidermis : from barrier to keratinization. *Eur J Dermatol.* **21**, 12–17.

Mouret S., Bogdanowicz P., Haure M. J., Castex-Rizzi N., Cadet J., Favier A. et Douki T. (2011). Assessment of the photoprotection properties of sunscreens by chromatographic measurement of DNA damage in skin explants. *Photochem Photobiol.* **87**, 109–116.

Murakami M., Lopez-Garcia B., Braff M., Dorschner R. A. et Gallo R. L. (2004). Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol.* **172**, 3070–3077.

Murakami M., Ohtake T., Dorschner R. A., Schitteck B., Garbe C. et Gallo R. L. (2002). Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol.* **119**, 1090–1095.

### N

Nestle F. O., Di Meglio P., Qin J.-Z. et Nickoloff B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immun.* **9**, 679–691.

Nguema-Ona E., Coimbra S., Vicré-Gibouin M., Mollet J. C. et Driouich A. (2012). Arabinogalactan proteins in root and pollen tube cells : distribution and functional aspects. *Ann Bot.* **110**, 383–404.

Nguyen T. X., Cole A. M. et Lehrer R. I. (2003). Evolution of primate theta-defensins : a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides.* **24**, 1647–1654.

## Références bibliographiques

---

- Niebuhr M., Lutat C., Sigel S. et Werfel T. (2009). Impaired TLR-2 expression and TLR-2-mediated cytokine secretion in macrophages from patients with atopic dermatitis. *Allergy*. **64**, 1580–1587.
- Niessen C. M. (2007). Tight junctions/Adherens junctions : basic structure and function. *J Inv Derm*. **127**, 2252–2532.
- Nishimura M. T. et Dangl J. L. (2010). Arabidopsis and the plant immune system. *Plant J*. **61**, 1053–1066.
- Niyonsaba F., Ushio H., Nakano N., Ng W., Sayama K., Hashimoto K., Nagaoka I., Okumura K. et Ogawa H. (2006). Antimicrobial peptides human b-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol*. **127**, 594–604.
- Niyonsaba F., Ushio H., Nagaoka I., Okumura K. et Ogawa H. (2005). The human  $\beta$ -defensins (hBD-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce interleukin- 18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol*. **175**, 1776–1784.
- Niyonsaba F., Ogawa H. and Nagaoka I. (2004). Human b-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor- $\alpha$ -treated human neutrophils. *Immunology*. **111**, 273–81.
- Niyonsaba F., Iwabuchi K., Matsuda H., Ogawa H. et Nagaoka I. (2002). Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol*. **14**, 421–426.
- Niyonsaba F., Someya A., Hirata M., Ogawa H. et Nagaoka I. (2001). Evaluation of the effects of peptide antibiotics human  $\beta$ -defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D2 production from mast cells. *Eur J Immunol*. **31**, 1066–1075.
- Nomura Y. (2006). Structural change in decorin with skin aging. *Connect Tissue Res*. **47**, 249–255.
- North A. J., Bardsley W. G. et Hyam J. (1999). Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci*. **112**, 4325–4336.
- Nylander-Lundqvist E. et Egelrud T. (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.
- Q**
- O'Neill M. A., Ishii T., Albersheim P. et Darvill A. G. (2004). Rhamnogalacturonan II : structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu Rev Plant Biol*. **55**, 109–139.

## Références bibliographiques

---

Odland G. et Reed T. (1974). Epidermis. In : Zelickson A., ed. Ultrastructure of Normal and abnormal skin. Philadelphia : Lea et Febiger. pp, 54–75.

Ohman H. et Vahlquist A. (1994). *In vivo* studies concerning a pH gradient in human *stratum corneum* and upper epidermis. *Acta Derm Venereol.* **74**, 375–379.

Okamura Y., Watari M., Jerud E. S., Young D., W., Ishizaka S. T., Rose J., Chow J. C. et Strauss J. F. (2001). The extra domain A of fibronectine activate toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* **276**, 10229–10233.

Ong P. Y., Ohtake T., Brandt C., Strickland I., Boguniewicz M., Ganz T., Gallo R. L., Leung D. Y. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in *atopic dermatitis*. *N Engl J Med.* **347**, 1151–1160.

Oren A., Ganz T., Liu L. et Meerloo T. (2003). In human epidermis,  $\beta$ -defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol.* **74**, 180–182.

Otvos L. Jr. (2000). Antibacterial peptides isolated from insects. *J Pept Sci.* **10**, 497–511.

Otvos L. Jr., Insug O., Rogers M. E., Consolvo P.J., Condie B. A., Lovas S., Bulet P. et Blaszczyk-Thurin M. (2000). Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry.* **39**, 14150–14159.

Oxholm A., Oxholm P., Staberg B. et Bendtzen K. (1988). Immunohistological detection of interleukin I-like molecules and tumour necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation *in vivo*. *Br J Dermatol.* **118**, 369–376.

Ozaslan M. (2011). Herbal remedies : a good source of treatment against fungal skin infections. *Pak J Biol Sci.* **14**, 1072–1073.

### P

Padovan L., Scocchi M. et Tossi A. (2010). Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci.* **11**, 210–219.

Park G., Jang D. S. et Oh M. S. (2012). *Juglans mandshurica* leaf extract protects skin fibroblasts from damage by regulating the oxidative defense system. *Biochem Biophys Res Commun.* **421**, 343–348.

Park C. B., Kim H. S. et Kim S. C. (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II : buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun.* **244**, 253–257.

Patrzykat A., Friedrich C. L., Zhang L., Mendoza V. et Hancock R. E. (2002). Sublethal concentrations of pleurocidin derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**, 605–614.

## Références bibliographiques

---

- Percoco G., Bénard M., Ramdani Y., Lati E., Lefeuvre L., Driouich A. et Follet-Gueye M. L. (2012). Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection : application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR. *Exp Dermatol.* **2**, 531–534.
- Pérez S., Rodríguez-Carvajal M. A. et Doco T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie.* **85**, 109–121.
- Pernet I., Reymermier C., Guezennec A., Branka J. E., Guesnet J., Perrier E., Dezutter-Dambuyant C., Schmitt D. et Viac J. (2003). Calcium triggers beta-defensin (hBD-2 and hBD-3) and chemokine macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3alpha/CCL20) expression in monolayers of activated human keratinocytes. *Exp Dermatol.* **12**, 755–760.
- Pfeiffer S., Vielhaber G., Vietzke J. P., Wittern K. P., Hintze U. et Wepf R. (2000). High-pressure freezing provides new information on human epidermis : simultaneous protein antigen and lamellar lipid structure preservation. Study on human epidermis by cryoimmobilization. *J Invest Dermatol.* **114**, 1030–1038.
- Pillai S., Bikle D. D., Eessalu T. E., Aggarwal B. B. et Elias P. M. (1989). Binding and biological effects of tumor necrosis factor alpha on cultured human neonatal foreskin keratinocytes. *J Clin Invest.* **83**, 816–821.
- Pivarcsi A., Koreck A., Bodai L., Szell M., Szeg C., Belso N., Kenderessy-Szabo A., Bata-Csorgo Z., Dobozy A. et Kemeny L. (2004). Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* **296**, 120–124.
- Pivarcsi A., Bodai L., Rethi B., Kenderessy-Szabo A., Koreck A., Szell M., Beer Z., Bata-Csorgo Z., Magocsi M., Rajnavolgyi E., Dobozy A. et Kemeny L. (2003). Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol.* **15**, 721–730.
- Poindexter B. J., Bhat S., Buja L. M., Bick R. J. et M. Milner S. M. (2006). Localization of antimicrobial peptides in normal and burned skin. *Burns.* **32**, 402–407.
- Portugal-Cohen M., Soroka Y., Frušić-Zlotkin M., Verkhovsky L., Brégégère F. M., Neuman R., Kohen R. et Milner Y. (2011). Skin organ culture as a model to study oxidative stress, inflammation and structural alterations associated with UVB-induced photodamage. *Exp Dermatol.* **20**, 749–755.
- Potten C. S. (1974). The epidermal proliferative unit : the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet.* **7**, 77–88.
- Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P. et Shai Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry.* **31**, 12416–12423.

## Références bibliographiques

---

Pozdnyakov N., Margulis A. et Sitaramayya A. (1998). Identification of effector binding sites of S100B : studies with guanylate cyclase and p80, a retinal phosphoprotein. *Biochemistry*. **37**, 10701–10708.

Presland R. B., Bassuk J. A., Kimball J. R. et Dale B. A. (1995). Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *J Invest Dermatol*. **104**, 218–222.

Price A. A., Cumberbatch M., Kimber I. et Ager A. (1997). Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J Exp Med*. **186**, 1725–1735.

Proksch E., Brandner J. M. et Jensen J. M. (2008). The skin : an indispensable barrier. *Exp Derm*. **17**, 1063–1072.

Proost P., Verpoest S., Van de B. K., Schutyser E., Struyf S., Put W., Ronsse I., Grillet B., Opendakker G. et Van D. J. (2004). SyneRG-Istic induction of CXCL9 and CXCL11 by Toll-like receptor ligands and interferon-gamma in fibroblasts correlates with elevated levels of CXCR3 ligands in *septic arthritis* synovial fluids. *J Leukoc Biol*. **75**, 777–784.

Proost P., Vynckier A. K., Mahieu F., Put W., Grillet B., Struyf S., Wuyts A., Opendakker G. et Van D. J. (2003). Microbial Toll-like receptor ligands differentially regulate CXCL10/IP-10 expression in fibroblasts and mononuclear leukocytes in synergy with IFN gamma and provide a mechanism for enhanced synovial chemokine levels in *septic arthritis*. *Eur J Immunol*. **33**, 3146–3153.

Puhvel S. M., Reisner R. M. et Sakamoto M. (1975). Analysis of lipid composition of isolated human sebaceous gland homogenates after incubation with cutaneous bacteria. Thin-layer chromatography. *J Inv Dermatol*. **64**, 406–411.

### Q

Quayle A. J., Porter E. M. , Nussbaum A. A. , Wang Y. M., Brabec C., Yip K.P. et Mok S. C. (1998). Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol*. **152**, 1247–1258.

### R

Rácz E., Kurek D., Kant M., Baerveldt E. M., Florencia E., Mourits S., de Ridder D., Laman J. D., van der Fits L. et Prens E. P. (2011). GATA3 expression is decreased in psoriasis and during epidermal regeneration; induction by narrow-band UVB and IL-4. *PLoS One*. **6**, e19806.

Radek K. A., Lopez-Garcia B., Hupe M., Niesman I. R., Elias P. M., Taupenot L., Mahata S. K., O'Connor D. T. et Gallo R. L. (2008). The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol*. **128**, 1525–1534.

## Références bibliographiques

---

- Ravelojaona V., Robert A. M. et Robert L. (2008). Expression of senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-Gal) by human skin fibroblasts, effect of advanced glycation end-products and fucose or rhamnose-rich polysaccharides. *Arch Gerontol Geriatr.* **48**, 151–154.
- Ren T., Zamboni D. S., Roy C. R., Dietrich W. F. et Vance R. E. (2006). Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1 and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathogens.* **2**, e18.
- Renn C. N., Sanchez D. J., Ochoa M. T., Legaspi A. J., Oh C. K., Liu P. T., Krutzik S. R., Sieling P. A., Cheng G. et Modlin R. L. (2006). TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J Immunol.* **177**, 298–305.
- Rice R. H. et Green H. (1980). Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope : activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* **18**, 681–694.
- Richard G. (2005). Connexion disorders of the skin. *Clin Dermatol.* **23**, 23–32.
- Ristow H. J. (1987). A major factor contributing to epidermal proliferation in inflammatory skin disease appears to be interleukin 1 or a related protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* **84**, 1940–1944.
- Rivas-Santiago B., Hernandez-Pando R., Carranza C., Juarez E., Contreras J. L., Aguilar-Leon D., Torres M. et Sada E. (2008). Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect Immun.* **76**, 935–941.
- Rock F. L., Hardiman G., Timans J. C., Kastelein R. A. et Bazan J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**, 588–593.
- Romani N., Clausen B. E. et Stoitzner P. (2010). Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev.* **234**, 120–141.
- Romero L. I., Ikejima T. et Pincus S. H. (1989). *In situ* localization of interleukin-1 in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* **93**, 518–522.
- Rosebury T. (1969). *Life on Man*. Secker and Warburg edition, London.
- Rossetti D., Kielmanowicz M. G., Vigodman S., Hu Y. P., Chen N., Nkengne A., Oddos T., Fischer D., Seiberg M. et Lin C. B. (2011). A novel anti-ageing mechanism for retinol : induction of dermal elastin synthesis and elastin fibre formation. *Int J Cosmet Sci.* **33**, 62–69.
- Roth R. R. et James W. D. (1988). Microbial ecology of the skin. *Annu Rev Microbiol.* **42**, 441–464.

## Références bibliographiques

---

Rothman S. (1954). *Physiology and Biochemistry of the skin*. Chicago, IL : University of Chicago Press. Vol. **64**. pp, 27–31.

Rubartelli A., Cozzolino F., Talio M. et Sitia R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* **9**, 1503–1510.

### **S**

Sabbah A., Chang T. H., Harnack R., Frohlich V., Tominaga K., Dube P. H., Xiang Y. et Bose S. (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol.* **10**, 1073–1080.

Salomon R. A. et Farias R. N. (1992). Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **174**, 7428–7435.

Sato M., Sano H., Iwaki D., Kudo K., Konishi M., Takahashi H., Takahashi T., Imaizumi H., Asai Y. et Kuroki Y. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol.* **171**, 417–425.

Sauer J. D., Witte C. E., Zemansky J., Hanson B., Lauer P. et Portnoy D. A. (2010). *Listeria monocytogenes* triggers AIM2-mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol. *Cell Host Microbe.* **7**, 412–419.

Scheller H. V. et Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol.* **61**, 263–289.

Schnare M., Barton G. M., Holt A. C., Takeda K., Akira S. et Medzhitov R. (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* **2**, 947–950.

Schröder B. O., Wu Z., Nuding S., Groscurth S., Marcinowski M., Beisner J., Buchner J., Schaller M., Stange E. F., Wehkamp J. (2011). Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature.* **469**, 419–423.

Schwandner R., Dziarski R., Wesche H., Rothe M., Kirschning C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem.* **274**, 17406–17409.

Selsted M. E. et Ouellette A. J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol.* **6**, 551–557.

Selsted M. E., Novotny M. J., Morris W. L., Tang Y. Q., Smith W. et Cullor J. S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem.* **267**, 4292–4295.

Selsted M. E. et Harwing S. S. (1989). Determination of the sulfide array in the human defensin HNP-2. A covalent cyclized peptide. *J Biol Chem.* **265**, 4003–4007.

## Références bibliographiques

---

- Serre G., Mils V., Haftek M., Vincent C., Croute F., Réano A., Ouhayoun J. P., Bettinger S. et Soleilhavoup J. P. (1991). Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol.* **97**, 1061–1072.
- Séveno M., Voxeur A., Rihouey C., Wu A. M., Ishii T., Chevalier C., Ralet M. C., Driouich A., Marchant A. et Lerouge P. (2009). Structural characterisation of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II using an acidic fingerprinting methodology. *Planta.* **230**, 947–957.
- Shamova O., Kim A., Brogden K. A., Zhao C., Nguyen T., Kokryakov V. N., Robert I. et Lehrer R. I. (1999). Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infect Immun.* **67**, 4106–4111.
- Shan S. J., Xiao T., Chen J., Geng S. L., Li C. P., Xu X., Hong Y., Ji C., Guo Y., Wei H., Liu W., Li D. et Chen H. D. (2012). Kanglaite attenuates UVB-induced down-regulation of aquaporin-3 in cultured human skin keratinocytes. *Int J Mol Med.* **29**, 625–629.
- Shapiro J. P., Biswas S., Merchant A. S., Satoskar A., Taslim C., Lin S., Rovin B. H., Sen C. K., Roy S. et Freitas M. A. (2012). A quantitative proteomic workflow for characterization of frozen clinical biopsies : Laser capture microdissection coupled with label-free mass spectrometry. *J Proteomics.* In press.
- Shi J., Ross C. R., Chengappa M. M., Sylte M. J., McVey D. S. et Blecha F. (1996). Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline–aRG-Inine-rich neutrophil antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**, 115–121.
- Simpson A. J., Maxwell A. I., Govan J. R. W., Haslett C. et Sallenave J.-M. (1999). Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against Gram-positive and Gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett.* **452**, 309–313.
- Slack J. L., Schooley K., Bonnert T. P., Mitcham J. L., Qwarnstrom E. E., Sims J. E. et Dower S. K. (2000). Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem.* **275**, 4670–4678.
- Somerville C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**, 53–58.
- Somerville D. (1969). The normal flora of the skin in different age groups. *Br J Dermatol.* **81**, 248–258.
- Song P. I., Park Y. M., Abraham T., Harten B., Zivony A., Neparidze N., Armstrong C. A. et Ansel J. C. (2002). Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol.* **119**, 424–432.

## Références bibliographiques

---

- Sonnenberg A., Hogervorst F., Osterop A. et Veltman F. E. (1988). Identification and characterization of a novel antigen complex on mouse mammary tumor cells using a monoclonal antibody against platelet glycoprotein Ic. *J Biol Chem.* **263**, 14030–14038.
- Sørensen O. E., Thapa D. R., Roupé K. M., Valore E. V., Sjöbring U., Roberts A. A., Schmidtchen A. et Ganz T. (2006). Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest.* **116**, 1878–1885.
- Sørensen O. E., Thapa D. R., Rosenthal A., Liu L., Roberts A. A. et Ganz T. (2005). Differential regulation of {beta}-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol.* **174**, 4870–4879.
- Sørensen O. E., Cowland J. B., Theilgaard-Mönch K., Liu L., Ganz T. et Borregaard N. (2003). Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol.* **170**, 5583–5589.
- Sorrell M. J. et Caplan A. I. (2004). Fibroblast heterogeneity : more than skin deep. *J Cell Sci.* **117**, 667–675.
- Spaar A., Munster C. et Salditt T. (2004). Conformation of peptides in lipid membranes studied by X-ray grazing incidence scattering. *Biophys J.* **87**, 396–407.
- Staley J. T. et Konopka A. (1985). Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* **39**, 321–346.
- Stotz H. U., Thomson J. G. et Wang Y. (2009). Plant defensins : defense, development and application. *Plant Signal Behav.* **11**, 1010–1012.
- Studer D., Graber W., Al-Amoudi A. et Eggli P. (2001). A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *J Microsc.* **203** : 285–294.
- Subbalakshmi C. et Sitaram N. (1998). Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett.* **160**, 91–96.
- Sule A., Ahmed Q. U., Latip J., Samah O.A, Omar M. N., Umar A. et Dogarai B. B. (2012). Antifungal activity of *Andrographis paniculata* extracts and active principles against skin pathogenic fungal strains in vitro. *Pharm Biol.* **50**, 850–856.
- Sutterwala F. S., Mijares L. A., Li L., Ogura Y., Kazmierczak B. I. et Flavell R. A. (2007). Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med.* **204**, 3235–3245.
- Sutterwala F. S., Ogura Y., Szczepanik M., Lara-Tejero M., Lichtenberger G. S., Grant E. P., Bertin J., Coyle A. J. Galan J. E., Askenase P. W. et Flavell R. A. (2006). Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity.* **24**, 317–327.

## Références bibliographiques

---

### T

Taga T. et Kishimoto T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* **15**, 797–819.

Takasao N., Tsuji-Naito K., Ishikura S., Tamura A. et Akagawa M. (2012). Cinnamon extract promotes type I collagen biosynthesis via activation of IGF-I signaling in human dermal fibroblasts. *J Agric Food Chem.* **60**, 1193–1200.

Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K. et Akira S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11**, 443–451.

Tang Y. Q. et Selsted M. E. (1993). Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin from bovine neutrophils. *J Biol Chem.* **268**, 6649–6653.

Tang Y. Q., Yaun J., Osapay G., Osapay C., Tran D., Miller C., OJ. uellette A. et Selsted E. M. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science.* **286**, 498–502.

Tasiemski A., Hammad H., Vandenbulcke F., Breton C., Bilfinger T. J., Pestel J. et Salzet M. (2002). Presence of chromogranin-derived antimicrobial peptides in plasma during coronary artery bypass surgery and evidence of an immune origin of these peptides. *Blood.* **100**, 553–559.

Thibault J. F., Renard C. M., Axelos M. A. V., Roger P. et Crépeau M. J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohy Res.* **238**, 271–286.

Tomee J. F., Wierenga A. T., Hiemstra P. S. et Kauffman H. K. (1997). Protease from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Inf Dis.* **176**, 300–303.

Toulza E., Mattiuzzo N. R., Galliano M. F., Jonca N., Dossat C., Jacob D., de Daruvar A., Wincker P., Serre G. et Guerrin M. (2007). Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biol.* **8** : R107.

Tsuji T., Kawada Y., Kai-Murozono M., Komatsu S., Han S. A., Takeuchi K. I., Mizushima H., Miyazaki K. et Irimura T. (2002). Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and alpha3beta1 integrin (VLA-3). *Clin Exp Med.* **19**, 127–134.

Tsukita S., Furuse M. et Itoh M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 285–293.

Turnbaugh P. J., Ley R. E., Hamady M., Fraser-Liggett C. M., Knight R. et Gordon J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature.* **449**, 804–810.

## Références bibliographiques

---

Tzou P., Ohresser S., Ferrandon D., Capovilla M., Reichhart J. M., Lemaitre B., Hoffmann J. A. et Imler J. L. (2000). Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunology*. **13**, 737–748.

### U

Underhill D. M., Ozinsky A., Hajjar A. M., Stevens A., Wilson C. B., Bassetti M. et Aderem A. (1999). The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosome and discriminates between pathogens. *Nature*. **401**, 811–815.

Urbanski A., Schwarz T., Neuner P., Krutmann J., Kirnbauer R., Köck A. et Luger T. A. (1990). Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J Invest Dermatol*. **94**, 808–811.

Ushijima T., Takahashi M. et Ozaki Y. (1984). Acetic, propionic, and oleic acid as the possible factors influencing the predominant residence of some species of *Propionibacterium* and coagulase-negative *Staphylococcus* on normal human skin. *Can J Microbiol*. **30**, 647–652.

### V

Valore E. V., Park C. H., Quayle A. J., Wiles K. R., McCray P. B. et Ganz T. (1998). Human beta-defensin-1 : an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*. **101**, 1633–1642.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. et Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. **3**, 1–11.

Vicré M., Santaella C., Blanchet S., Gateau A. et Driouich A. (2005). Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiol*. **138**, 998–1008.

Vilcek J. et Lee T. H. (1991). Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*. **266**, 7313–7316.

Volz A., Korge B. P., Compton J. C., Ziegler A., Steinert P. M. et Dietmar M. (1993). Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics*. **18**, 92–99.

Voss E., Wehkamp J., Wehkamp K., Stange E. F., Schröder J. M. et Harder J. (2006). NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem*. **281**, 2005-2011.

### W

Wang X. P., Schunck M., Kallen K. J., Neumann C., Trautwein C., Rose-John S. et Proksch E. (2004). The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* **123**, 124–131.

Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G. R., Inoue J. et Chen Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* **412**, 346–351.

Wanke I., Steffen H., Christ C., Krismer B., Götz F., Peschel A., Schaller M. et Schitteck B. (2011). Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol.* **131**, 382–390.

Warashina T., Umehara K. et Miyase T. (2012). Constituents from the roots of *Taraxacum platycarpum* and their effect on proliferation of human skin fibroblasts. *Chem Pharm Bull.* **60**, 205–212.

Warfel K. A. et Hull M. T. (1984). Migration of lymphocytes through the cutaneous basal lamina in normal skin : An ultrastructural study. *Anat Rec.* **208**, 349–355.

Watt F. et Green H. (1982). Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature.* **295**, 434–436.

Werts C., Tapping R. I., Mathison J. C., Chuang T. H., Kravchenko V., Saint G., Haake I. D. A., Godowski P. J., Hayashi F., Ozinsky A., Underhill D. M., Kirshnning C. J., Wagner H., Aderem A., Tobias P. S. et Ulevetich R. J. (2001). *Leptospiral* lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol.* **2**, 346–352.

Wertz P. et Norlen L. (2003). Confidential interval for the “true” lipid composition of the human skin barrier ? In : Forslin B., Lindberg M., eds. *Skin, Hair, and Nails., Structure and Function.* New York : Marcel Dekker Inc. pp., 85–106.

Wesche H., Henzel W. J., Shillinglaw W., Li S. et Cao Z. (1997). MyD88 : an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* **7**, 837–847.

Wiedow O., Harder J., Bartels J., Streit V. et Christophers E. (1998). Antileukoprotease in human skin : an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **248**, 904–909.

Wiesner J. et Vilcinskas A. (2010). Antimicrobial peptides : The ancient arm of the human immune system. *Virulence.* **5**, 440–464.

Wilder P. T., Rustandi R. R., Drohat A.C. et Weber D. J. (1998). S100B(bétabéta) inhibits the protein kinase C-dependent phosphorylation of a peptide derived from p53 in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Protein Scien.* **7**, 794–798.

## Références bibliographiques

---

Willats W. G., McCartney L., Mackie W. et Knox J. P. (2001). Pectin : cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol.* **47**, 9–27.

Williams P., Bainton N. J., Swift S., Chhabra S. R., Winson M. K., Stewart G. S., Salmond G. P. C. et Bycroft B. W. (1992). Small molecule-mediated density-dependent control of gene expression in prokaryotes : bioluminescence and the biosynthesis of carbapenem antibiotics. *FEMS Microbiol Lett.* **100**, 161–168.

Willsted E. M., Bhogal B. S., Das A., Bekir S. S., Wojnarowska F., Black M. M. et Mckee P. H. (1991). An ultrastructural comparison of dermo-epidermal separation techniques. *J Cutan Pathol.* **18**, 8–12.

Wingens M., van Bergen B. H., Hiemstra P. S., Meis J. F., van Vlijmen-Willems I. M., Zeeuwen P. L., Mulder J., Kramps H. A., van Ruissen F. et Schalkwijk J. (1998). Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **111**, 996–1002.

Wood L. C., Elias P. M., Calhoun C., Tsai J. C., Grunfeld C. et Feingold K. R. (1996). Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol.* **106**, 397–403.

### Y

Yan C., Grimm W. A., Garner W. L., Qin L., Travis T., Tan N. et Han Y.-P. (2010). Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2. *Am J Pathol.* **176**, 2247–2258.

Yang D., Biragyn A., Kwak L. W. et Oppenheim J. J. (2002). Mammalian defensins in immunity : more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**, 291–296.

Yang L., Harroun T. A., Weiss T. M., Ding L. et Huang H. W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model ? A case study on melittin pores. *Biophys J.* **81**, 1475–1485.

Yang D., Chertov O., Bykovskaia S. N., Chen Q., Buffo M. J., Shogan J., Anderson M., Schröder J. M., Wang J. M., Howard O. M. et Oppenheim J. J. (1999). Beta-defensins : linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* **286**, 525–528.

Yoo N. J., Park W. S., Kim S. Y., Reed J. C., Son S. G., Lee J. Y. et Lee S. H. (2003). Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1 beta processing through the interaction with procaspase-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **299**, 652–658.

Yoshimura A., Lien E. and Ingalls R. R., Toumanen E., Dziarski R. et Golenbock D. (1999). Cutting edge : Recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via toll-like 2 receptors. *J Immunol.* **163**, 1–5.

## Références bibliographiques

---

Yosipovitch G., Maayan-Metzger A., Merlob P. et Sirota L. (2000). Skin barrier properties in different body area in neonates. *Pediatrics*. **106**, 105–108.

Yuki T., Yoshida H., Akazawa Y., Komiya A., Sugiyama Y. et Inoue S. (2011). Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. *J Immunol*. **187**, 3230–3237.

### Z

Zang Y., Yang J. et Showalter A. (2011). AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis thaliana*, functions in plant growth and development as a putative co-receptor for signal transduction. *Plant Sign Behav*. **6**, 855–857.

Zanger P., Holzer J., Schleucher R., Scherbaum H., Schittek B. et Gabrysch S. (2010). Severity of *Staphylococcus aureus* infection of the skin is associated with inducibility of human-defensin 3 but not human-defensin 2. *Infect Immun*. **78**, 3112–3117.

Zanger P., Holzer J., Schleucher R., Steffen H., Schittek B. et Gabrysch S. (2009). Constitutive expression of the antimicrobial peptide RNase 7 is associated with *Staphylococcus aureus* infection of the skin. *J Infect Dis*. **200**, 1907–1915.

Zasloff M. (2009). Antimicrobial RNases of Human Skin. *J Invest Dermatol*. **129**, 2091–2093.

Zasloff M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. **415**, 389–395.

Zasloff M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin : isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*. **84**, 5449–5453.

Zhao C., Wang I. et Lehrer R. I. (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*. **396**, 319–322.

Zhao X.Q., Naka M., Muneyuki M. et Tanaka T. (2000). Ca<sup>2+</sup>-dependent inhibition of actin-activated myosin ATPase activity by S100C (S100A11), a novel member of the S100 protein family. *Biochem Biophys Res Commun*. **267**, 77–79.

Zimmer D.B. et Van Eldik L.J. (1986). Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100 : fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem*. **261**, 11424–11428.

Zimmermann G. R., Lagault P., Selsted M. E. et Pardi A. (1995). Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12 is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry*. **34**, 13663–13671.

Zippel J., Deters A. et Hensel A. (2009a). Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties : specific enhancement of

## Références bibliographiques

---

dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. *J Ethnopharmacol.* **124**, 391–396.

Zippel J., Deters A., Pappai D. et Hensel A. (2009b). A high molecular arabinogalactan from *Ribes nigrum L.* : influence on cell physiology of human skin fibroblasts and keratinocytes and internalization into cells via endosomal transport. *Carbohydr Res.* **344**, 1001–1008.

### Sites internet

<http://www.infovisual.info>

<http://www.netzwerk-eb.de>.

<http://fr-fr.invitrogen.com>

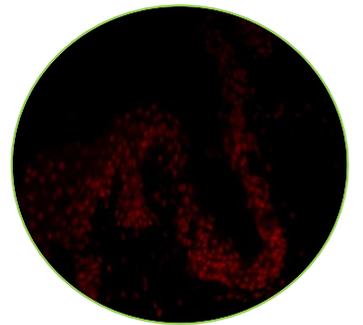
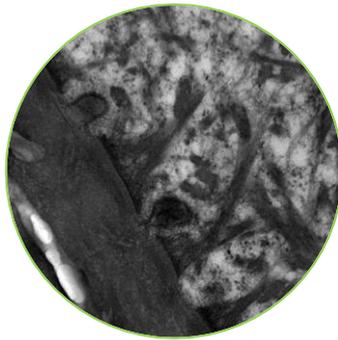
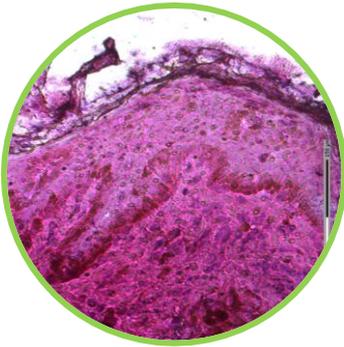
<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial>

<http://www.graphpad.com>



# Annexes





---

# Annexes

---

## Curriculum vitae de Giuseppe Percoco

---

### Coordonnées personnelles :

5, rue de la Glacière  
76000, Rouen  
Tél. : 0737121475

### Coordonnées professionnelles :

Laboratoire GlycoMEV-EA4358  
Bât. Henry Gadeau de Kerville  
Rue Tesnière  
76821 Mont Saint Aignan  
Tél. 0235146051

E-mail : giuseppe.percoco@univ-rouen.fr

giuseppe\_percoco@libero.it

Né le 11 Juin 1982 à Terracina (Italie)

Nationalité italienne

---

## Situation Professionnelle

---

Déc. 2009-Nov. 2012 **Doctorat** au laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV) EA4358, Université de Rouen, sous la co-direction du Pr Azeddine Driouich et du Dr Marie-Laure Follet-Gueye.

Titre du mémoire de thèse de doctorat :

« Biomolécules et Immunité cutanée en lien avec l'écologie microbienne de la peau »

---

## Formation universitaire

---

2009-2012 : **Thèse de Doctorat** à l'Université de Rouen, laboratoire « Glyco-MEV » EA4358

2007-2008 **Master 2** en Biotechnologies pour la Santé Humaine. Option Biotechnologies agro-alimentaires. Université de Sienne (Italie)/Université de Rouen. Mention : 110/100 L.

2006-2007 **Master 1** en Biotechnologie pour la santé Humaine. Université de Sienne (Italie).

2002-2005 **Licence** en Biotechnologie. Université de Sienne

---

## Stages

---

2009 : Stage (3 mois) à l'Université de Massachusetts (UMass, Amherst, USA) dans le laboratoire du Pr. Tobias Baskin.

2008 : Stage de M2 (7 mois) au laboratoire Glyco-MEV EA4358 (Université de Rouen) : « Caractérisation du mutant *fla7* chez *A. thaliana* » sous la direction du Pr. Azeddine Driouich.

2007 : Stage (moins) au laboratoire Glyco-MEV EA 4358 (Université de Rouen) dans le cadre du projet Erasmus « Etude de l'interaction entre le pathogène *Pythium myriotylum* et *Xanthosoma sagittifolium* » sous la direction du Pr. Azeddine Driouich et du Dr. Thaddée Boudjeko.

---

## Communications des travaux de recherche

---

### Communications orales

**Giuseppe Percoco**, Yasmina Ramdani, Magalie Bénard, Chloé Merle, Thomas Jaouen, Elian Lati, Marc Feuilloley, Luc Lefeuvre, Azeddine Driouich et Marie-Laure Follet-Gueye. Human skin explant : a model to study the interaction between epidermal cells and the cutaneous microbiota. 10th Meeting of European Epidermal Barrier Research Network. 19 Septembre 2012, Venise, Italie.

**Giuseppe Percoco**, Yasmina Ramdani, Sophie Bernard, Magalie Bénard, Elian Lati, Luc Lefeuvre, Azeddine Driouich et Marie-Laure Follet-Gueye. Human skin explants : a powerful model to study the interaction between epidermal cells and the cutaneous microbiota. 15<sup>ème</sup> Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISe). 27 Mars 2012, Université de Rouen.

### Communications par affiche

**Giuseppe Percoco**, Yasmina Ramdani, Magalie Bénard, Chloé Merle, Thomas Jaouen, Elian Lati, Marc Feuilloley, Luc Lefeuvre, Azeddine Driouich et Marie-Laure Follet-Gueye. Human skin explant : a model to study the interaction between epidermal cells and the cutaneous microbiota. 42th European Society for Dermatological Research Meeting. 19-22 Septembre 2012. Venise, Italie. *J Invest Dermatol.* **132** (S2), p. S115.

**Giuseppe Percoco**, Yasmina Ramdani, Sophie Bernard, Magalie Bénard, Elian Lati, Luc Lefeuvre, Azeddine Driouich et Marie-Laure Follet-Gueye. Gene expression profile across the human epidermal layers: a laser capture microdissection study 14<sup>ème</sup> Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISe). 6 Juin 2011, Université de Caen.

**Giuseppe Percoco**, Yasmina Ramdani, Magalie Bénard, Elian Lati, Luc Lefeuvre, Azeddine Driouich et Marie-Laure Follet-Gueye. Defensive genes expression profile across the human epidermal layers : a laser capture microdissection study. 42th European Society for Dermatological Research Meeting. 7-10 September 2011, Barcelona, Spain. *J Investig Dermatol.* **131** (S2), p. S63.

**Giuseppe Percoco**, Yasmina Ramdani, Magalie Bénard, Elian Lati, Luc Lefeuvre, Azeddine Driouich et Marie-Laure Follet-Gueye. Ultrastructural characterization and transcriptomal analysis of human skin. 2<sup>nd</sup> Skin Physiology International Meeting (SPIM). 17-19 November 2010. Vichy, France.

Merle C., Peno-Mazzarino L., **Percoco G.**, Ramdani Y., Follet-Gueye M. L., Lati E. and Driouich Z. Transcriptomal to morphological modification induced by bacteria on human skin explants. 27<sup>ème</sup> International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC) meeting. 15-18 October 2012, Johannesburg, South Africa.

---

## Publications scientifiques

---

**Giuseppe Percoco**, Chloé Merle, Thomas Jaouen, Yasmina Ramdani, Magalie Bénard, Mélanie Hillion, Lily Mijouin, Elian Lati, Marc Feuilloley, Luc Lefeuvre, Azeddine Driouich et Marie-Laure Follet-Gueye. Human skin explants : a model to study the interaction between cutaneous cells and the epidermal microbiota. Soumis chez *Experimental Dermatology*.

**Giuseppe Percoco**, Magalie Bénard, Yasmina Ramdani, Elian Lati, Luc Lefeuvre, Azeddine Driouich and Marie-Laure Follet-Gueye (2012). Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection : application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR. *Experimental Dermatology.* **21**, 531-534.

Guénin S, Mareck A, Rayon C, Lamour R, Assoumou Ndong Y, Domon JM, Sénéchal F, Fournet F, Jamet E, Canut H, **Percoco G**, Mouille G, Rolland A, Rustérucci C, Guérineau F, Van Wuytswinkel O, Gillet F, Driouich A, Lerouge P, Gutierrez L, Pelloux J. (2011) Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist.* **192**, 114-126.

Driouich A, Durand C, Cannesan M. A., **Percoco G**, Vicré-Gibouin M. (2010). Border cells versus border-like cells : are they alike? *Journal of Experimental Botany.* **61**, 3827-3831.

---

## Activités académiques

---

Membre du comité d'organisation de la 15<sup>ème</sup> Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISe). 27 Mars 2012, Université de Rouen.

Encadrement de deux stagiaires de L3 dans le cadre d'un stage d'observation en 2012 (Mathilde Lebas) et 2011 (Farid Zaoui).

---

## Domaine de Compétences

---

**Techniques de biologie cellulaire** : Microdissection laser, culture de plante *in vitro*

**Techniques de microscopie** : microscopie optique, microscopie à épifluorescence, microscopie électronique à transmission, congélation sous haute pression (HPF), cryosubstitution, ultramicrotomie, immunomarquage.

**Techniques de biochimie** : Extraction et dosage protéique, extraction et dosage de polysaccharides d'origine végétale, électrophorèse, chromatographie en phase gazeuse.

**Techniques de biologie moléculaire** : PCR en temps réel, *design* d'amorces, microdissection laser.

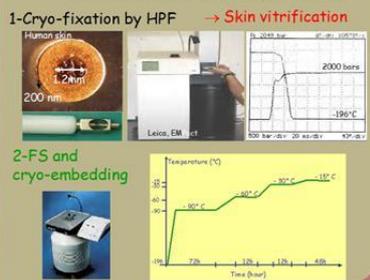
**Logiciels de bureautique** : Word, Excel, Power Point, Primer 3, Primer Express.

1-Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (GlycoMEV), UPRES EA 4358, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France. 2-Plate-forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute Normandie (PRIMACEN), France. 3-Laboratoire BIO EC, 91165 Longjumeau, France. 4-Laboratoires Dermatologiques d'Uriage (LDU), BP50, 92404 Courbevoie Cedex, France.

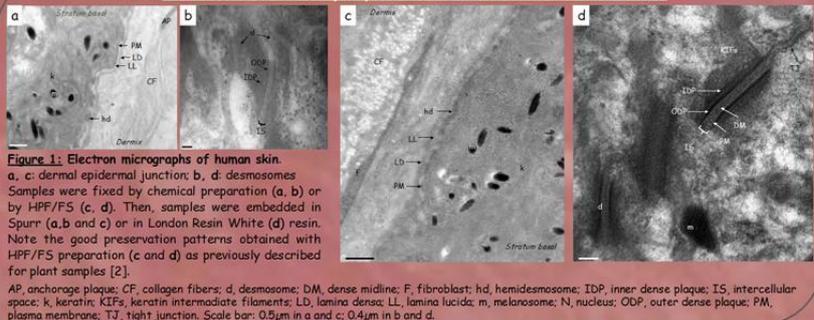
**INTRODUCTION:** Human skin is a natural barrier between a hostile environment and the organism. We present here the efficiency of High Pressure Freezing [1] (HPF) coupled to Freeze Substitution (FS) preparation method on human skin analysis by Transmission Electronic Microscopy (TEM) for both ultrastructural and immunocytochemical studies. We also perform a transcriptional analysis of human skin epidermis explants using Laser Capture Microdissection (LCM) and real-time PCR.

## I. Transmission Electron Microscopy analysis

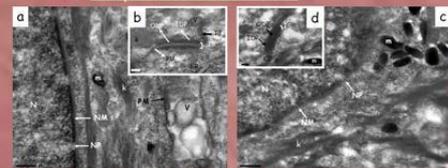
### I-1. High Pressure Freezing and Freeze substitution (HPF-FS) method



### I-2. Classical chemical preparation versus HPF-FS method



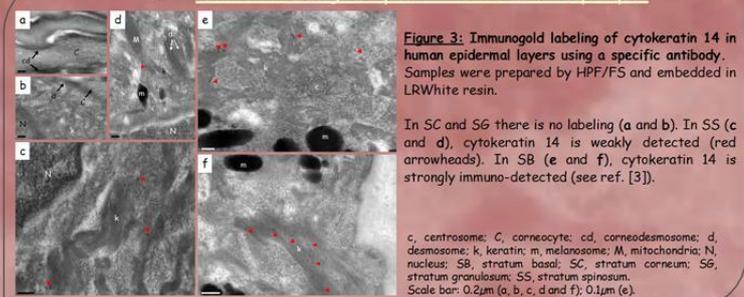
### I-3. Impact of FS medium



**Figure 2:** Electron micrographs of Stratum Basal. Samples were fixed by HPF, freeze substituted in a medium containing methanol / 0.5% uranyl acetate (a and b) or acetone / 0.5% uranyl acetate (c and d), and embedded in LRWhite resin. Note that the ultrastructure preservation is higher in a than in c samples.

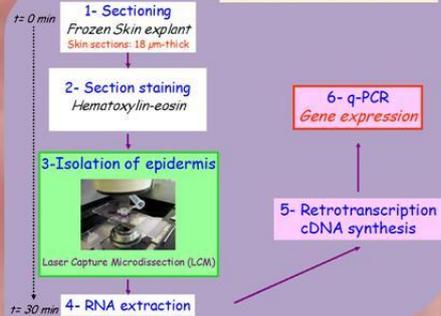
d, desmosome; DM, dense midline; ER, endoplasmic reticulum; IDP, inner dense plaque; IS, intercellular space; k, keratin; KIFs, keratin intermediate filaments; m, melanosome; N, nucleus; NM, nuclear membrane; NP, nuclear pore; ODP, outer dense plaque; PM, plasma membrane; TJ, tight junction; V, vesicles. Scale bar: 100nm (b and d); 0.2µm (a and c).

### I-4. Immunolabeling of epidermal structural epitopes

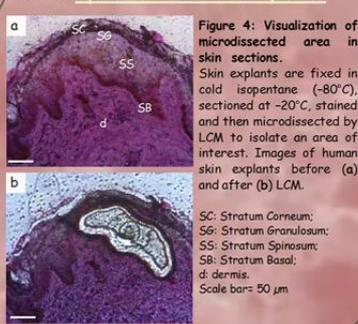


## II. Transcriptional analysis of human epidermis

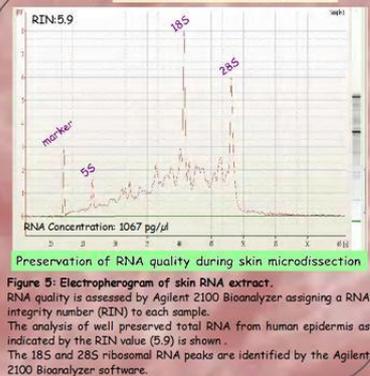
### II-1. LCM and real time-PCR



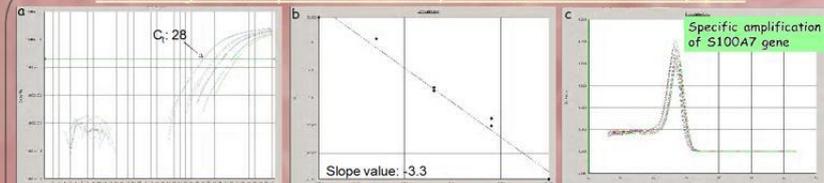
### II-2. Epidermis isolation by LCM



### II-3. Control of RNA Quality



### II-4. Psoriasis gene is expressed in healthy human skin as revealed by qPCR



## CONCLUSION:

>The cryo-preparation by HPF/FS is an efficient and suitable method to preserve ultrastructure of human skin samples and to immunogold-label structural epitopes.

>LCM coupled to qPCR is a valid and alternative tool to isolate human epidermis from a tissue and to study the expression level of a gene of interest from human skin explants.

## References

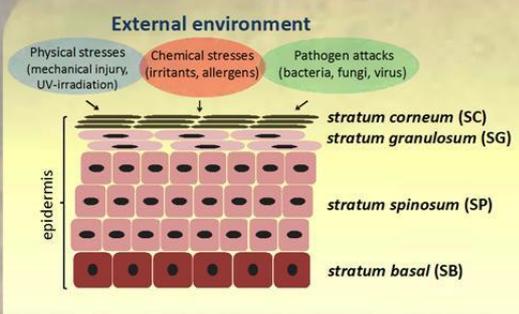
- 1-Studer et al., (2001) *J. Microscopy* 203: 285-294
- 2-Chevalier et al., (2010) *TPJ*, in press
- 3-Moll et al., (2008) *Histochem Cell Biol* 129:705-733.

# Defensive genes expression profile across the human epidermal layers: a laser capture microdissection study

Percoco Giuseppe<sup>1\*</sup>, Ramdani Yasmina<sup>1</sup>, Bénard Magalie<sup>2</sup>, Bernard Sophie<sup>1,2</sup>, Lati Elian<sup>3</sup>, Lefeuvre Luc<sup>4</sup>, Driouich Azeddine<sup>1,2</sup> and Follet-Gueye Marie-Laure<sup>1,2</sup>

1-Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (GlycoMEV), UPRES EA 4358, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France. 2-Plate-forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute Normandie (PRIMACEN), France. 3-Laboratoire BIO EC, 91165 Longjumeau, France. 4-Laboratoires Dermatologiques d'Uriage (LDU), BP50, 92404 Courbevoie Cedex, France.

\*author correspondence: giuseppe.percoco@univ-rouen.fr



## I - Introduction

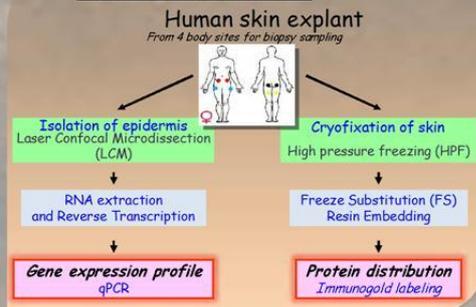
The skin is continuously exposed to a large number of external stressful factors. In response to these **environmental stimuli**, the skin synthesized various molecules, like antimicrobial peptides (AMPs) implicated in **cutaneous defense**.

### AIM OF THIS WORK

Investigate the spatial distribution of **defensive gene expression** within epidermal layers using laser-capture microdissection (LCM) coupled to real-time quantitative PCR (qPCR).

Examine the **defensive protein distribution** across the epidermal layers by transmission electron microscopy (TEM) coupled to immunogold labeling.

## II - Material and methods



## III - Results

### III.1 - Epidermal layers isolation by LCM



Figure 1: Visualization of microdissected area in skin section. Skin explants are fixed in dry-ice cooled isopentane (-80°C), sectioned at -20°C, stained with classical hematoxylin eosin protocol and then microdissected by LCM to isolate a basal and a granular layer-enriched fraction. Images of human skin explants before (A) and after (B) LCM.

SC: Stratum Corneum; SG: Stratum Granulosum; SP: Stratum Spinosum; SB: Stratum Basal; di: dermis. Scale bar= 50 µm.

Isolation of SB and SG enriched fractions

### III.2 - Gene expression analysis by qPCR

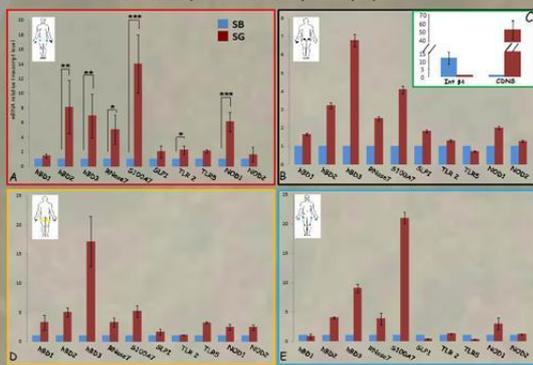


Figure 2: Defensive gene expression profile across human epidermal layers. Graphics showing the mRNA level of defensive-related genes from four different body sites: abdomen (A), buttock (B) and internal (D) and external (E) thigh. As shown in C, Integrin  $\beta$ -4 and CDNS were used as markers of basal and granular layers respectively. Data were normalized to the reference genes RPL0 and B2M transcript levels. Note that hBD2, hBD3, RNase7, S100A7 (Psoriasis), and NOD1 are upregulated in stratum granulosum enriched fraction.

For abdomen area (A) three different women biopsies were analyzed. Statistical analysis was performed with unpaired T-test. \* p<0.05, \*\* p<0.005, \*\*\* p<0.0005.

SB: stratum basal; SG: stratum granulosum; Int: internal thigh; CDNS: Comedogenic; hBD: human Beta Defensin; SLP: Saucyberry Leucocyte Protease Inhibitor; TLR: Toll-Like Receptor; NOD1: Nucleotide Oligomerization Domain; RPL0: Large ribosomal protein; B2M: beta-2-microglobulin.

Some defensive genes are up-regulated in the SG fraction

### III.3 - Protein localization by Immunogold labeling

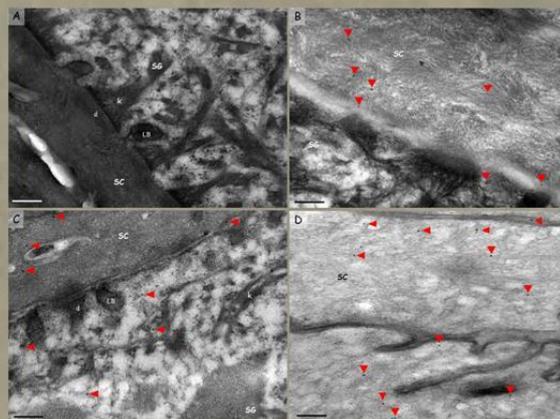


Figure 3: Immunogold labeling of defensive proteins in human epidermal layers. Samples were fixed by HPF, freeze substituted in a medium containing methanol/uranyl acetate 0.5% and embedded in LRWhite resin. hBD3 (B), RNase7 (C) and S100A7 (Psoriasis, D), were immunodetected (red arrowheads) in SC and in SC/SG interface. LL37 (A) is not detected in healthy human skin.

h: desmosomic X; keratin; LB: lamellar body; AMPs: antimicrobial peptides; SC: stratum corneum; SG: stratum granulosum. Scale bar= 0.5 µm.

TEM analysis confirms gene expression profile data

## IV - CONCLUSION

LCM coupled to qPCR show that:

- epidermal cells constitutively express different AMPs
- hBD2 and 3, RNase 7, S100A7 (Psoriasis) and NOD1, are up regulated in suprabasal layers of epidermis.

TEM analysis confirms these findings.

# Gene expression profile across the human epidermal layers: a laser capture microdissection study



Percoco Giuseppe<sup>1</sup>, Ramdani Yasmina<sup>1</sup>, Bernard Sophie<sup>1,2</sup>, Bénard Magalie<sup>2</sup>, Lati Elian<sup>3</sup>, Lefeuvre Luc<sup>4</sup>, Driouch Azeddine<sup>1,2</sup> and Follet-Gueye Marie-Laure<sup>1,2</sup>

1-Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (GlycoMEV), UPRES EA 4358, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan Cedex, France. 2-Plate-forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute Normandie (PRIMACEN), France. 3-Laboratoire BIO EC, 91165 Longjumeau, France. 4-Laboratoires Dermatologiques d'Uriage (LDU), BP50, 92404 Courbevoie Cedex, France.

**I-INTRODUCTION:** The skin is a natural barrier between the environment and the organism, providing a first line of defense against physical and chemical stress and microbial pathogens. The aim of our research is to characterize the gene expression *in vivo* in relation with the protective function of selected plant molecules on the skin barrier. To this end we adopted a rapid and efficient method allowing the isolation of skin layers using laser-capture microdissection (LCM) to analyse gene expression by *real-time* quantitative PCR (*real-time* qPCR). In addition, we have examined the ultrastructure and protein distribution across the epidermal layers by transmission electron microscopy (TEM) and immunogold labeling.

## II- MATERIAL AND METHODS

### II.1- Epidermis layers isolation and control of RNA quality

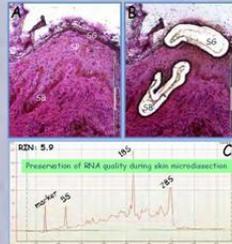
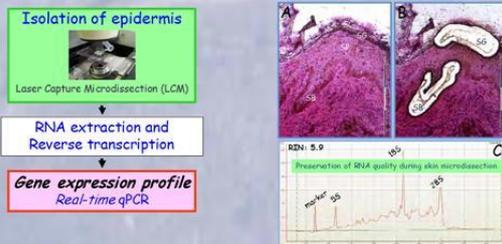


Figure 1: Visualization of microdissected area in skin section (A-B) and chromatogram of epidermal layers extract (C). Skin explants are fixed in cold isopentane (-80°C), sectioned at -20°C, stained and then microdissected by LCM to isolate an area of interest, a stratum granulosum and stratum basal enriched fractions. In these pictures human skin explants before (A) and after (B) LCM. (C) RNA quality is assessed by Agilent 2100 Bioanalyzer assigning a RNA integrity number (RIN) to each sample. The analysis of well preserved total RNA from human epidermis as indicated by the RIN value (5.9) is shown. The 18S and 28S ribosomal RNA peaks are identified by the Agilent 2100 bioanalyzer software.

### II.2- Cryo-preparation of epidermis for TEM analysis

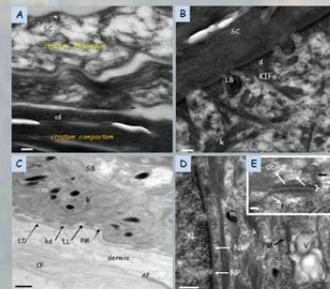


Figure 2: Electron micrographs of human skin. Samples were cryo-fixed by High Pressure Freezing (HPF, Leica EMPACT 1), freeze substituted (FS) in methanol containing 0.5% uranyl acetate and embedded in LRWhite resin. SC (A), the SC/SB (B) and dermal/epidermal (C) junctions are well preserved. In D and E, ultrastructural organization of spinosum keratinocyte is presented. Note the excellent preservation of desmosome (E).

AP, anchorage plaque; CF, collagen fibers; cd, corneodesmosome; d, desmosome; ER, endoplasmic reticulum; hd, hemidesmosome; IDP, inner dense plaque; IS, intercellular space; k, keratin; KIFs, keratin intermediate filaments; LB, lamellar body; LD, lamina densa; LL, lamina lucida; m, melanosome; N, nucleus; NM, nuclear membrane; NP, nuclear pore; ODP, outer dense plaque; PM, plasma membrane; SB, Stratum Basale; SC, Stratum Corneum; S6, Stratum Granulosum; SP, Stratum Spinosum; TJ, tight junction. Scale bars: 100nm (E); 0.5µm (A, B, C and D).

## III- RESULTS

### III.1- *In vivo* gene expression profile

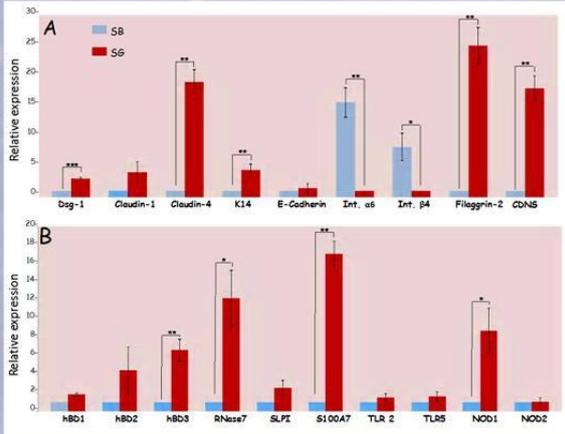


Figure 3: Gene expression analysis within different layers of human epidermis. Graphics showing the mRNA level of structural related (A) and defensive-related (B) genes using *real-time* qPCR. Data were normalized to RPL0 and B2M transcript level. Note that hBD3, RNase7, S100A7 and NOD1 are upregulated in the stratum granulosum enriched fraction.

Statistical analysis was performed with the two tail t-student test. \* p<0.05, \*\* p<0.025, \*\*\* p<0.01. Dsg-1, desmoglein-1; K14, Cytokeratin 14; Int., integrin; CDNS, corneodesmosin; hBD, human Beta Defensin; SLP2, Secretory Leucocyte Protease Inhibitor; TLR, Toll-Like Receptor; NOD, Nucleotide Oligomerization Domain

### III.2- Protein localization by Immunogold labeling

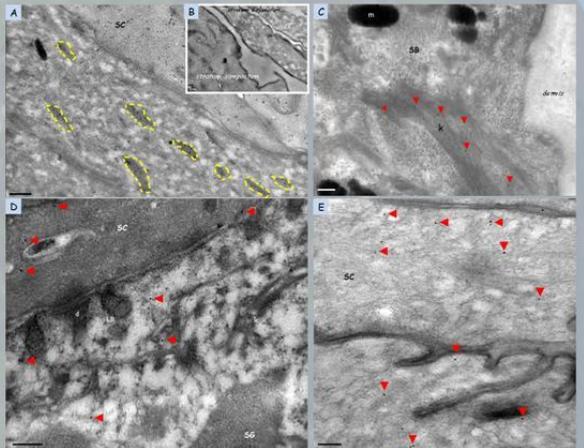


Figure 4: Immunogold labeling of structural (A-B-C) and defensive (D-E) proteins in human epidermal layers. Samples were prepared by HPP/FS and embedded in LRWhite resin. As shown in A, Filaggrin is stocked in keratoyline grains (yellow lines) before to be released in SC. Note the strongest immunolabeling in the stratum compactum, a compartment of the SC. Cytokeratin 14 is weakly detected (red arrowheads) in SB (B). RNase7 (D) and Psoriasin (S100A7) (E) were weakly immunodetected in SC and in the interface SC/S6. LL37 is not detected in healthy human skin (data not shown). These results are consistent with gene expression profile data. d, desmosome; k, keratin; LB, lamellar body; m, melanosome; SC, stratum corneum; S6, stratum granulosum. Scale bar: 0.2µm.

## IV- CONCLUSION:

In this study we showed that laser-capture microdissection coupled to *real-time* qPCR is a rapid and efficient tool to study the gene expression profile within the human epidermis. Understanding the gene expression profile of epidermal layers is crucial to elucidate the skin barrier function.



# Human skin explants: a model to study the interaction between epidermal cells and the cutaneous microbiota



Giuseppe Percoco<sup>1</sup>, Chloé Merle<sup>2</sup>, Thomas Jaouen<sup>3</sup>, Yasmina Ramdani<sup>1</sup>, Magalie Bénard<sup>4</sup>, Elian Lati<sup>2</sup>, Marc Feuilloley<sup>3</sup>, Luc Lefeuvre<sup>5</sup>, Azeddine Driouch<sup>1,4</sup> and Marie-Laure Follet-Gueye<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Glycobiology and Plant Extracellular Matrix (GlycoMEV) Laboratory; <sup>2</sup>BIO-EC Laboratory; <sup>3</sup>Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironnement; <sup>4</sup>The Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN) <sup>5</sup>Laboratoires Dermatologiques d'Uriage (LDU)

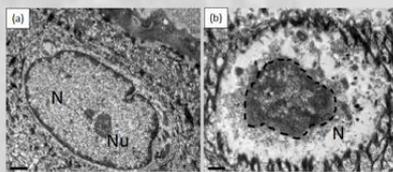


## I. Introduction

The **skin** is a natural barrier between the body and the environment, colonized by a large number of **microorganisms**. During recent years, a large number of studies have been devoted to investigate the interaction between bacteria and **cutaneous cells** in order to elucidate the role of the **epidermal microbiota** in the physiopathology of the skin. Most of them have been carried out using keratinocyte cell lines or animals as models to perform the research, but the use of **skin explants** in the field of the microbiology of the skin is still limited.

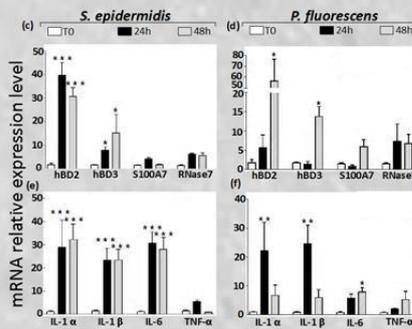
**THE AIM OF THE PRESENT WORK** was to investigate the molecular response to microbial stimuli of this less-used model, the human skin explants. Two bacteria, largely represented in the epidermal microbiota, were selected for our study: one gram-positive coccus, *Staphylococcus epidermidis* and one gram-negative bacillus, *Pseudomonas fluorescens*.

## II.II Bacterial exposition causes cellular death and amplify the expression of AMPs and pro-inflammatory cytokines



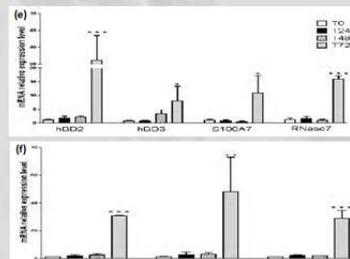
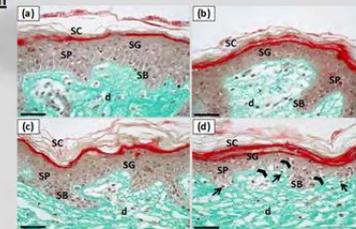
**Figure 2 Impact of bacterial exposition on the structure of human skin explants and gene expression profile from whole skin explants following bacterial stimulation.**

*S. epidermidis* and in a minor way *P. fluorescens* induced the formation of pycnotic nuclei (b) characterized by condensation of the chromatin and damage of cellular content. A living nucleus is shown in (a). As shown in (c) and (d), both bacteria are able to modulate the expression of hBD2 and hBD3 after 24 and 48 h of infection. Statistically significant differences in the expression of IL-1 alpha and beta and IL-6 were also observed (e, f). Three different biopsies from abdominal area of a female donor were analyzed (N=3). For statistical analysis T0 and the different times of exposition were compared. \*\*\*P < 0.001; \*\*P < 0.01; \*P < 0.05. N, nucleus; Nu, nucleolus. Scale bar: 0.5 µm.



## II. Results

### II.I Explant morphology and gene expression are perturbed after 72 h of survival



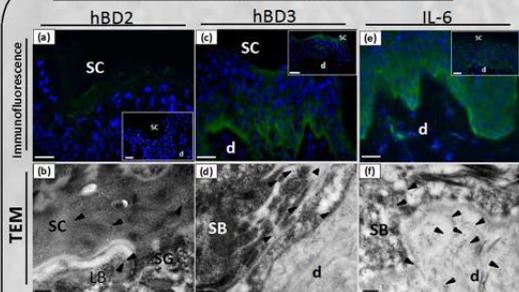
**Figure 1 Impact of growth condition on skin explants morphology and gene expression profile** Paraffin-embedded sections of healthy human skin from abdomen were stained by Masson's trichrome Goldner protocol. A good morphology of the explants was observed in the control (T0) (a), after 24 h (b) and 48 h (c) of survival in DMEM medium. After 72 h (d) of culture we noticed the presence of pycnotic nuclei (arrow) and cellular oedema (arrowheads) especially in the lower epidermis. The expression profile of genes related to innate immunity (e) and pro-inflammatory cytokines (f) was also investigated. A significant upregulation of all the genes analyzed was observed since 72 h of survival in DMEM medium. d, dermis; SB, stratum basale; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SP, stratum spinosum. Scale bar: 50 µm.

### II.III AMPs are overexpressed in the upper epidermis after bacterial stimulation whereas pro-inflammatory cytokines are upregulated in the inner epidermis

<i>S. epidermidis</i> MFPO4						<i>P. fluorescens</i> MFPOS					
24 h		48 h		24 h		48 h		24 h		48 h	
SB	SG	SB	SG	SB	SG	SB	SG	SB	SG	SB	SG
TLR2	1.4 ± 1	9.3 ± 2.1	2.6 ± 0.71	11.7 ± 3.9	1.9 ± 1.4	10.3 ± 3.1	1.6 ± 1.2	8.4 ± 0.3			
hBD2	117.2 ± 2.2	1184 ± 0.2	319.1 ± 6.5	1262.5 ± 34	2.7 ± 0.2	60.3 ± 4.4	105.2 ± 10.1	1601.4 ± 28			
hBD3	18.4 ± 2.4	39.9 ± 19	720 ± 23	366 ± 87	15.3 ± 3.2	69 ± 7.1	120.1 ± 5.5	470 ± 14			
IL-1 beta	76.4 ± 12	41 ± 11	167 ± 22.4	58.3 ± 8.8	IL-1 beta	28.2 ± 4.5	38.4 ± 8.3	79.2 ± 7.1	38.3 ± 6		
IL-6	51.9 ± 8.2	35 ± 8.2	104 ± 6.7	38.7 ± 4.3	IL-6	31.1 ± 3.52	41.4 ± 5.3	63.3 ± 6.1	38.3 ± 3.1		

**Figure 3 Gene expression profile across epidermal layer following bacterial stimulation.** Two fractions enriched in keratinocytes from either the basal or the granular layer of the epidermis were isolated by LCM and the expression profile following *S. epidermidis* (a) and *P. fluorescens* (b) stimulation was analyzed by qPCR. Values are expressed as transcriptional variation between the basal and the granular layer of uninfected and infected skin samples. Data are expressed as mean ± SEM of three independent experiments. Three different biopsies from abdominal area of a female donor were analyzed (N=3).

## II.IV Immunohistochemical analysis confirm qPCR data



**Figure 4 Protein localization in human skin explants.** An induction of hBD2 expression was observed in the uppermost epidermis after stimulation for 48 h with *S. epidermidis* (a and b) and *P. fluorescens* (data not shown). In healthy human skin we detected hBD3 especially in suprabasal keratinocytes. An increase in protein expression was observed in the basal layer and across the interface SG/SC following *S. epidermidis* (c and d) stimulation. Finally, IL-6 was detected especially in the inner epidermis of untreated skin and an intensification of immunoreactivity in the basal layer of infected skin was observed after *S. epidermidis* (e and f) and *P. fluorescens* exposition (data not shown). Nano-gold particles, indicating the presence of the proteins, are marked by an arrow. Untreated skin are shown in small panels. d, dermis; SB, lamellar bodies; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum. Scale bar: 0.2 µm in b, d and f and 50 µm a, c and e.

### II.V TLR2 blocking reduces the expression of hBD2 and RNase7 across all epidermal layers

<i>S. epidermidis</i> 48h				TLR2 blocked receptor				<i>P. fluorescens</i> 48h				TLR2 blocked receptor			
SB		SG		SB		SG		SB		SG		SB		SG	
hBD2	189 ± 4.3	106 ± 4.8	36.2 ± 3.3	175 ± 1.6	76.2 ± 3.7	101.8 ± 4.4	21.9 ± 2.1	32.4 ± 0.9	189 ± 4.3	106 ± 4.8	36.2 ± 3.3	175 ± 1.6	76.2 ± 3.7	101.8 ± 4.4	
RNase7	38 ± 3.3	54 ± 3.7	12 ± 2.1	29 ± 6.7	44 ± 3.3	721.0 ± 3.7	145 ± 4.9	53 ± 1.3	38 ± 3.3	54 ± 3.7	12 ± 2.1	29 ± 6.7	44 ± 3.3	721.0 ± 3.7	
IL-1 beta	181.0 ± 2.7	61.0 ± 5.2	181.0 ± 2.7	61.0 ± 5.2	181.0 ± 2.7	61.0 ± 5.2	181.0 ± 2.7	61.0 ± 5.2	181.0 ± 2.7	61.0 ± 5.2	181.0 ± 2.7	61.0 ± 5.2	181.0 ± 2.7	61.0 ± 5.2	
IL-6	79 ± 3.0	42 ± 3.3	79 ± 3.0	42 ± 3.3	79 ± 3.0	42 ± 3.3	79 ± 3.0	42 ± 3.3	79 ± 3.0	42 ± 3.3	79 ± 3.0	42 ± 3.3	79 ± 3.0	42 ± 3.3	

**Figure 5 Gene expression profile across epidermal layer in skin explants pre-treated with TLR2 antibody prior bacterial stimulation.** Values are expressed as transcriptional variation between the basal and the granular layer of uninfected and infected skin samples with or without TLR2 blocking step. Data are expressed as mean ± SEM of three independent experiments (N=3).

## III. Conclusion

- human skin explant is a valid model to study the role of the epidermal microflora
- hBD2 is overexpressed in the uppermost epidermis after bacterial stimulation
- hBD3 is upregulated in suprabasal keratinocytes and in the lower epidermis as well
- IL-6 expression is upregulated in the inner epidermal layers following bacterial infection



**Résumé.** Interface entre l'organisme et l'environnement, la **peau** est le plus grand organe qui assure une fonction « barrière » vis-à-vis des stress biotiques ou abiotiques. Elle est constituée de trois couches cellulaires superposées: l'hypoderme, le derme, et l'épiderme. **L'épiderme** renferme également quatre couches cellulaires distinctes: la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Les kératinocytes issus de la couche basale, constituent le type cellulaire le plus abondant au sein de l'épiderme.

Dans ce projet, nous avons analysé l'expression de nombreux gènes (gènes structuraux et gènes de défense) par **PCR quantitative en temps réel**, au sein des différentes couches épidermiques isolées d'explant de peau humaine saine par **microdissection laser** (*Laser Capture Microdissection*, LCM). Nous avons ensuite évalué les effets de bactéries du **microbiome cutané** sur l'expression de gènes de défense. La distribution des produits de ces gènes a également été examinée par une approche immunocytochimique.

Les résultats majeurs obtenus sont décrits ci-après. **1)** Nous avons optimisé le protocole de LCM pour isoler deux fractions épidermiques respectivement enrichies en kératinocytes de la couche basale et de la couche granuleuse (Percoco et al., 2012. *Experimental Dermatology* **21**, 531-534). Cet outil prometteur est maintenant aisément applicable à la recherche en Dermatologie. **2)** Nous avons montré, que dans une peau humaine saine, les gènes responsables de l'**immunité innée**, codant notamment pour les **bêta-défensines** humaines de type 2 et 3 (human beta-defensin, hBD), sont exprimés de façon différentielle au sein des couches épidermiques. **3)** Nous avons observé que les trois bactéries *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas fluorescens* sont capables de moduler positivement l'expression des gènes codant pour des beta-défensines (hBD2 et hBD3) et des **cytokines pro-inflammatoires** (IL-1 alpha et bêta et IL-6). **4)** En utilisant des anticorps spécifiques, nous avons localisé les produits de ces gènes dans les différentes couches épidermiques, à l'échelle cellulaire par microscopie à épifluorescence, et à l'échelle ultrastructurale par microscopie électronique à transmission (Percoco et al., Soumis).

**Mots clé:** bêta-défensines; cytokines pro-inflammatoires; épiderme; immunité innée; microdissection laser; microbiome cutané; PCR en temps réel; peau.

**Abstract.** The **skin** is the largest organ of the body. It is a natural barrier between the environment and the organism that plays a key role in the protection of the body against abiotic or biotic stress. The skin is made up of three different cell layers, namely the hypodermis, the dermis and the epidermis. The **epidermis** is, in turn, composed of four different layers, the basal, the spinous, the granular and the horny layer. In the epidermis, keratinocytes is the major cell type known to originate from basal cells.

In the present work, we have studied the expression of a number of genes (**antimicrobial peptide** genes and **pro-inflammatory cytokine** genes) in different layers of healthy human epidermis using **quantitative real-time PCR** coupled to **Laser Capture Microdissection** (LCM). Using the same approach, we have also investigated the effect of bacteria belonging the human **epidermal microbiota** on the expression of the same genes within the epidermal layers. In addition, the spatial distribution of gene products has also been examined using immunocytochemistry.

The major findings are: **1)** We have developed an optimized LCM protocol for the isolation of human epidermal layers. We have been able to isolate two fractions highly enriched in keratinocytes from the basal and the granular layers (Percoco et al. 2012. *Experimental Dermatology*. **21**, 531-534).

Such a method can now be easily applied in dermatological research. **2)** We have found that, in healthy human epidermis, innate immunity-related genes including human beta-defensin genes are differentially expressed within different layers. **3)** We have found that the three bacteria *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens* induce a significant increase in the expression of beta-defensin (*hBD2* and *hBD3*) and pro-inflammatory cytokines (*IL-1* alpha, *IL-1* beta and *IL-6*) genes. **4)** We have localized the gene products within different cell layers using specific antibodies in conjunction with immunofluorescence and immunogold-electron microscopy (Percoco et al., Submitted).

**Key words:** epidermis; skin; laser capture microdissection; real time PCR; innate immunity; epidermal microbiota; antimicrobial peptides; pro-inflammatory cytokines.