



**HAL**  
open science

# Étude préliminaire de deux composés thérapeutiques potentiels pour le traitement du follicule pileux dans l'Hidradénite suppurée

Aubin Garcia

► **To cite this version:**

Aubin Garcia. Étude préliminaire de deux composés thérapeutiques potentiels pour le traitement du follicule pileux dans l'Hidradénite suppurée. Sciences agricoles. 2014. dumas-01081112

**HAL Id: dumas-01081112**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01081112>**

Submitted on 7 Nov 2014

**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.

AGROCAMPUS  
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



Année universitaire : 2013-2014

Spécialité :

Horticulture

Spécialisation (et option éventuelle) :

BIOTECH (Biologie, Biotechnologies, Santé)

### Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

## Etude préliminaire de deux composés thérapeutiques potentiels pour le traitement du follicule pileux dans l'Hidradénite Suppurée.

Par : Aubin GARCIA

**Soutenu à PARIS**

**le 03-09-2014**

#### **Devant le jury composé de :**

Président : Mme Dominique FOUQUES,  
maître de conférences en Biochimie

Maître de stage : Dr Sophie HÜE

Enseignant référent : Mme Annaïg LAN,  
maître de conférences en biologie et nutrition humaine

Autres membres du jury

Mme Aurélie BALIARDA,  
maître de conférences en microbiologie

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*

## Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

### Confidentialité :

Non  Oui si oui :  1 an  5 ans  10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible<sup>(1)</sup>.

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant).

Date et signature du maître de stage<sup>(2)</sup> : le 08 septembre 2014

*Stib*

### Droits d'auteur :

L'auteur<sup>(3)</sup> autorise la diffusion de son travail

Oui  Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement<sup>(4)</sup>

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

Date et signature de l'auteur : le 8-09-2014

*J. J. J.*

### Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant :

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé

Oui  Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement<sup>(4)</sup>

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

le 18/09/14

*Dominique FOUQUES*  
Agro Paris Tech

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3) Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

## **Remerciements**

*Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce stage et qui m'ont accompagné pendant cette expérience professionnelle :*

- *le Professeur Yves LEVY, directeur de l'équipe 16 de l'unité 955 de l'INSERM et actuellement directeur général de l'INSERM, pour avoir rendu possible la réalisation de ce projet en m'accueillant dans son laboratoire.*
- *le Docteur Sophie HÜE, coordinatrice de l'équipe travaillant sur la maladie de Verneuil et tutrice de mon stage, pour m'avoir encadré tout au long de ce stage de fin d'étude.*
- *Le Dr. Michele BONIOTTO, post-doctorant travaillant depuis 2 ans sur la maladie de Verneuil, qui m'a également suivi tant sur les aspects techniques que scientifiques.*
- *Le Docteur Claire HOTZ, dermatologue et doctorante en dernière année de thèse sur la maladie de Verneuil, qui m'a fait découvrir l'aspect clinique de la maladie.*
- *Les membres du laboratoire de l'équipe 16 pour leur accueil, leur soutien et leur aide tout au long de ce stage.*

## Résumé

La maladie de Verneuil, ou Hidradénite Suppurée (HS), est une maladie du follicule pileux qui provoque une inflammation cutanée. L'hypothèse d'un déficit immunitaire face à la flore commensale cutanée chez des patients ayant une susceptibilité génétique semble aujourd'hui confirmée. L'étude de la réponse des kératinocytes de la gaine externe des follicules pileux de patients face à des « Pathogen Associated Molecular Patterns » par stimulation de leurs « Pattern Recognition Receptors » a démontré une diminution de la production de peptides antimicrobiens comme la psoriasine par rapport aux individus sains. De plus, des études génétiques effectuées sur des patients ont révélé la présence de mutations de la  $\gamma$ -sécrétase, l'enzyme clé dans la voie de signalisation NOTCH. Ainsi, un défaut du signal NOTCH pourrait entraîner des problèmes de différenciation des cellules du follicule pileux. L'équipe a démontré qu'une baisse de ce signal peut induire une diminution de la production de peptides antimicrobiens après stimulation des PRRs des cellules de la gaine externe du follicule pileux. L'objectif était donc de trouver un composé pour restaurer le signal NOTCH chez les patients HS, ce qui devait permettre de restaurer la production de peptides antimicrobiens par les kératinocytes. L'étude sur des lignées cellulaires HEK293T et HaCaT de deux composés A et B sensés restaurer la voie NOTCH a démontré que le composé A pourrait restaurer la voie NOTCH mais pas le composé B. Enfin, les premiers tests de ces composés sur des cellules primaires d'individus sains indiquent que le composé A réprime la production de peptide antimicrobiens, au contraire du composé B.

**Mots clés :** Hidradénite suppurée, immunité innée, kératinocytes, peptides antimicrobiens,  $\gamma$ -sécrétase, NOTCH, Pattern Recognition Receptors

## Abstract

Verneuil's disease or Hidradenitis suppurativa (HS) is a disease of the hair follicle which causes skin inflammation. The hypothesis of an immune deficiency towards skin commensal flora in patients with a genetic susceptibility seems now confirmed. The study of the response of outer root sheath keratinocytes of patient's hair follicles against Pathogen Associated Molecular Patterns by their Pattern Recognition Receptors demonstrated a decreased production of antimicrobial peptides as psoriasin compared to healthy individuals. Moreover, genetic studies performed on patients have revealed the presence of mutations in the  $\gamma$ -secretase, a key enzyme in the Notch signaling pathway. Thus, a defect in NOTCH signal could lead to hair follicle cells differentiation problems. The team has demonstrated that this signal defect may induce a decreased production of antimicrobial peptides after stimulation of cells PRRs. The aim was to find a compound to restore the NOTCH signal in HS patients, in order to restore the production of antimicrobial peptides by keratinocytes. The study on HaCaT and HEK293T cell lines with two compounds A and B showed that compound A could restore NOTCH pathway but not compound B. Finally, preliminary results on primary cells from healthy individuals indicate that the compound A inhibits antimicrobial peptides production whereas the compound the compound B does not.

**Key words:** Hidradenitis Suppurativa, innate immunity, antimicrobial peptides,  $\gamma$ -secretase, NOTCH, Pattern Recognition Receptors

## Table des figures

Figure 1 : Stades d’Hurley dans la maladie de Verneuil. (Jemec, 2012).....	11
Figure 2 : Modèle de Berna-Serna et Berna-Mestre pour la physiopathologie de la Mamillary fistula. On suppose qu’il s’agit du même mécanisme pour la maladie de Verneuil. (Berná-Serna and Berná-Mestre, 2010).....	13
Figure 3 : Présentation des différentes couches de la peau. (Heath and Carbone, 2013). ....	14
Figure 4 : Représentation schématique de la $\gamma$ -sécrétase. (Jorissen and De Strooper, 2010). ....	15
Figure 5 : Structure d’un follicule pileux en phase anagène chez la souris. (Aubin-Houzelstein, 2012). ....	16
Figure 6 : Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le signal NOTCH. (Radtke et al., 2013) .....	16
Figure 7 : Modèle des mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie de Verneuil. (Melnik and Plewig, 2013b). ....	17
Figure 8: Expression de peptides antimicrobiens par les kératinocytes de la peau. (Hotz et al., article en préparation). ....	18
Figure 9 : Multiplication des kératinocytes de la gaine externe du follicule pileux des cheveux de personnes saines. ....	21
Figure 10 : Photo de kératinocytes prises après 6 jours de culture, observés au microscope optique inversé et grossi 50 fois(A) ou 100 fois (B).....	21
Figure 11 : Photo de kératinocytes prises après 6 jours de culture, observés au microscope optique inversé et grossi 50 fois(A) ou 100 fois (B).....	22
Figure 12 : Photo de kératinocytes prises dans une flasque après deux passages, observés au microscope optique inversé et grossi 100 fois(A) ou 200 fois (B). ....	22
Figure 13 : Expression de PAMs (HBD1, HBD2, HBD3, S100A7) dans les cellules ORS HS par rapport aux cellules ORS d’individus sains suite à une stimulation avec deux PAMPs.....	25
Figure 14 : Expression du gène <i>HES1</i> et du gène codant pour la Bêta-défensine 2 chez les cellules d’ORS HS après une stimulation avec un ligand de NOTCH. ....	27
Figure 15 : Expression du gène <i>HES1</i> et du gène codant pour la Bêta-défensine 2 chez les cellules ORS d’un patient muté après une stimulation avec un ligand de NOTCH.....	28
Figure 16 : Influence des composés A et B sur la voie de signalisation NOTCH.....	29
Figure 17 : Phénotypage des cellules de la lignée HaCaT avec un anticorps anti-NOTCH1, par cytométrie en flux. ....	30
Figure 18 : Analyse du taux de cellules mortes suite à une transfection avec différents ratios ADN/ lipofectamine, par cytométrie en flux.....	31
Figure 19 : Analyse de l’efficacité de la transfection de la GFP avec différents ratios ADN/ lipofectamine, par cytométrie en flux.....	32
Figure 20 : Résultats de la luminescence de cellules HaCaT transfectées en cocultures avec deux lignées de fibroblastes : NIH3T3 Jagged 1 (transfection permanente avec un plasmide codant pour Jagged 1) et NIH3T3 p BAGE (transfection permanente avec le vecteur vide). ....	33
Figure 21 : Influence du composé A sur la voie de signalisation NOTCH. ....	34
Figure 22 : Résultats de la luminescence de cellules HaCaT transfectées en cocultures avec deux lignées de fibroblastes : NIH3T3 Jagged 1 (transfection permanente avec plasmide codant pour Jagged 1) et NIH3T3 p BAGE (transfection permanente avec le vecteur vide), en présence du composé A. ....	35
Figure 23 : Résultats de la luminescence de cellules HaCaT transfectées en cocultures avec deux lignées de fibroblastes : NIH3T3 Jagged 1 (transfection permanente avec plasmide codant pour Jagged 1) et NIH3T3 p BAGE (transfection permanente avec le vecteur vide), en présence du composé B. ....	36
Figure 24 : Influence des composés A et B sur la production de PAMs (HBD2 et S100A7) par des cellules d’ORS de deux individus sains.....	38
Figure 25 : Influence des composés A et B sur la production de Bêta-défensine 2 par des cellules d’ORS de deux individus sains stimulés avec MDP. ....	39
Figure 26 : Importance de la voie NF $\kappa$ B dans la réponse immunitaire innée. ....	42
Figure 27 : Schéma bilan du projet sur les cellules ORS de patients HS. Réalisé avec [3] et (Jemec, 2012). ....	42

## Liste des abréviations

**APC** : Allophycocyanin  
**CMV** : Cytomegalovirus  
**DKSEFM** : Defined Keratinocytes Serum Free Medium  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**FBS** : Fœtal Bovine Serum  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**HBD1, 2, 3** : Human Beta Defensin 1, 2, 3  
**HS** : Hidradenitis Suppurativa  
**ILC** : Innate Lymphoid Cell  
**LL37** : Cathelicidine  
**LPS** : Lipopolyssacharides  
**MDP** : Muramyl Dipeptide  
**NICD** : NOTCH Intracellular Domain  
**NOD** : Nucleotide Oligomerization Domain  
**PAMs** : Peptides Antimicrobiens  
**PAM2CSK4** : Lipopetide diacylate synthétique  
**PAMPs** : Pathogen Associated Molecular Patterns  
**PRRs** : Pathogen Recognition Receptors  
**S100A7** : Psoriasin  
**S100A8** : Calgranulin A  
**S100A9** : Calgranulin B  
**TLRs** : Toll-Like Receptors

## Liste des abréviations des gènes utilisés pour cette étude

**APH** : Anterior Pharynx Defective  
**HES1** : Hairy Enhancer of Split  
**NCSTN** : Nicastrin  
**PSEN** : Presenilin  
**PSENE1** : Presenilin Enhancer

## Table des matières

Introduction générale.....	9
1. Introduction : de la clinique à la recherche.....	11
1.1 Présentation de la maladie de Verneuil .....	11
1.1.1 Clinique, symptômes et traitements.....	11
1.1.2 L'association de la maladie de Verneuil avec d'autres pathologies inflammatoires. ....	12
1.1.3 Physiopathologie de la maladie : le modèle de Berna Serna et Berna Mestre.....	13
1.2 Réponse immunitaire cutanée .....	13
1.2.1 Implication des kératinocytes dans la défense de la peau et des follicules pileux. ....	13
1.2.2 La $\gamma$ -sécrétase, une enzyme clé dans la maladie .....	15
1.2.3 Rôle potentiel de la voie NOTCH dans le développement de la maladie de Verneuil ....	16
1.2.5 Modèle des mécanismes immunitaires impliqués dans la maladie de Verneuil .....	17
1.3 Hypothèses et objectifs du stage .....	18
2 Matériels et méthodes .....	20
2.1 Prélèvements de cheveux .....	20
2.2 La culture des kératinocytes.....	20
2.2.1 Mise en culture de la gaine externe du follicule pileux.....	20
2.2.2 Culture des kératinocytes.....	20
2.2.3 Difficulté de la culture cellulaire des kératinocytes. ....	21
2.3 Stimulations des kératinocytes .....	23
2.3.1 Stimulation des kératinocytes par les PAMPs .....	23
2.3.2 Etude de l'influence du signal NOTCH dans la sécrétion des peptides antimicrobiens. ..	23
2.4 La transfection transitoire et la lecture de la luciférase.....	23
2.5 Extraction ARNm et RT-QPCR.....	24
2.6 Cytométrie en flux .....	24
2.7 Analyse statistiques .....	24
3. Résultats .....	25
3.1 Défaut de production de peptides antimicrobiens par les kératinocytes des ORS HS par rapport aux individus sains.....	25
3.2 Un signal NOTCH induit la sécrétion de peptides antimicrobiens chez les patients HS....	26
3.2.1 Stimulations d'ORS de patients HS par des ligands de NOTCH .....	26
3.2.2 Un cas particulier : stimulation de cellules d'ORS d'un patient HS qui possède une mutation de la Nicastrine .....	28
3.3 Les deux composés étudiés permettraient de donner un signal NOTCH aux cellules .....	29

3.4 Action des composés A et B sur la voie NOTCH et la production de PAMs .....	30
3.4.1 La lignée HaCaT n'exprime pas la protéine NOTCH .....	30
3.4.2 Optimisation du protocole pour la transfection des HaCaT avec la Lipofectamine.....	31
3.4.3 Le composé A induit un signal NOTCH dans les cellules HaCaT transfectées avec NOTCH 1.....	33
3.4.3 La présence d'un ligand de NOTCH potentialise l'induction du signal NOTCH par le composé A, au contraire du composé B.....	35
3.4.4 Le composé A ne permet pas de restaurer une production de peptides antimicrobiens	37
4. Discussion .....	40
Perspectives.....	43
Conclusion générale .....	44
Bibliographie.....	45
Sitographie .....	48
Annexes .....	49

## *Introduction générale*

L'équipe 16 « From Pathophysiology Towards Immune-Based Interventions in HIV Infection » appartenant à l'unité INSERM 955 est dirigée par le Pr Lévy et compte près de 25 personnes. Elle travaille sur différentes thématiques, à savoir du développement lymphocytaire T à la réponse immunitaire à différents candidats vaccins contre le VIH. L'équipe s'intéresse également à la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale des patients infectés par le VIH. En 2010, une plateforme d'immunomonitoring a été créée et permet d'effectuer des analyses à la fois génomiques et cellulaires. Elle a pour rôle d'identifier des corrélats de protection dans différentes stratégies vaccinales contre le VIH mais également la tuberculose. Enfin, une partie de l'équipe travaille sur la maladie de Verneuil. En effet, le Pr Lévy, clinicien immunologiste, s'occupe de patients présentant des déficits immunitaires innés. L'hypothèse de travail de l'équipe travaillant sur la maladie de Verneuil est justement qu'elle soit liée à une réponse immunitaire anormale dans la peau des patients.

L'équipe « Verneuil » est constituée à l'heure actuelle de quatre personnes : le Dr Sophie HÜE, médecin biologiste, spécialisée dans l'immunologie des épithéliums et responsable du secteur auto-immunité dans le département d'Immunologie Biologique de l'hôpital Henri Mondor. Elle encadre trois personnes : une doctorante en dernière année de thèse, le Dr Claire HOTZ, dermatologue à l'hôpital Henri Mondor, spécialisée dans la maladie de Verneuil. Elle travaille en collaboration avec un post-doctorant : le Dr Michele BONIOTTO, expert en génétique moléculaire. Enfin, ce dernier m'a encadré avec les docteurs HÜE et HOTZ pendant mon stage de fin d'étude.

L'équipe s'est formée il y a 4 ans avec l'arrivée en thèse du Dr HOTZ. En collaboration avec le service de dermatologie de l'hôpital Henri Mondor, l'équipe Verneuil a créé une cohorte prospective de 76 patients atteints de la maladie de Verneuil en vue d'études épidémiologiques, ainsi qu'une collection de prélèvements sanguins, cutanés et capillaires en vue des études phénotypiques et fonctionnelles mais également génétiques et transcriptomiques. Le Dr HOTZ a étudié les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> produisant l'interleukine 17 (IL-17) (Th17) et l'interleukine 22 (IL-22) (Th22), deux cytokines très importantes dans la défense antibactérienne au niveau des épithéliums. IL-17 et IL-22 induisent entre autre l'expression de peptides antimicrobiens (PAMs) par les cellules épithéliales (Wolk et al., 2006). Le Dr HOTZ s'est ainsi intéressée à la relation entre les kératinocytes et les lymphocytes. Ses résultats ont permis de mettre en évidence que l'absence de migration des lymphocytes Th17 et Th22 dans la peau des patients HS pourrait conduire à une diminution de l'expression des PAMs. Cette diminution va favoriser la prolifération de la flore microbienne et entraîner une inflammation cutanée. Par ailleurs, quand j'ai rejoint l'équipe, des premiers résultats suggéraient que les kératinocytes des patients HS présentent également un défaut de sécrétion des peptides antimicrobiens face aux bactéries, ce qui contribuerait à l'inflammation cutanée.

Le Dr. BONIOTTO a intégré l'équipe il y a deux ans. Vue son expertise dans la réponse immunitaire innée, il a commencé à étudier la reconnaissance des « Pathogens Associated Molecular Patterns » (PAMPs) par les kératinocytes et leur réponse à la stimulation de leurs « Pattern Recognition Receptors » (PRRs) en terme de production de peptides antimicrobiens. Il a donc optimisé l'isolement des différentes cellules à partir de biopsies cutanées (kératinocytes, lymphocytes, cellules dendritiques...) et a ainsi pu collaborer avec le Dr HOTZ.

Dans la mesure où la maladie de Verneuil semble affecter à l'origine le follicule pileux, il a également optimisé l'extraction des kératinocytes de cheveux de patients atteints par la maladie. Il est l'investigateur principal d'un projet financé par le laboratoire Expascience pour étudier le transcriptome de ces kératinocytes *ex vivo* suite à la stimulation par un ligand des récepteurs de la protéine NOTCH pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de la maladie. C'est ainsi qu'aujourd'hui les cellules de 8 patients atteints de la maladie de Verneuil et 8 contrôles sains sont en attente d'être analysées par la plateforme génomique de l'équipe 16. Fort de son expertise en génétique moléculaire, le Dr. BONIOTTO a également réalisé le séquençage de 20 patients de la cohorte pour trois gènes impliqués dans la maladie de Verneuil. Ce travail a permis d'identifier 6 patients portant des mutations fonctionnelles dans ces gènes.

L'équipe a donc décidé de prendre un stagiaire de 6 mois pour poursuivre le travail de culture des kératinocytes issus de cheveux et étudier la réponse de ces kératinocytes à différentes stimulations par des PAMPs ou par des ligands des récepteurs de NOTCH. Ce stage a également permis de tester deux composés qui permettraient d'envisager de nouveaux axes thérapeutiques pour la maladie de Verneuil.

A partir de septembre 2014, l'équipe travaillant sur la maladie de Verneuil poursuivra son travail sur la réponse des kératinocytes issus de cheveux aux différents PAMPs sous l'influence de la signalisation NOTCH grâce à un financement de la Société Française de Dermatologie obtenu par le Dr. BONIOTTO.

# 1. Introduction : de la clinique à la recherche

---

## 1.1 Présentation de la maladie de Verneuil

La maladie de Verneuil a été décrite par Velpeau pour la première fois en 1839. Le philosophe Karl Marx est ainsi connu pour avoir souffert de cette maladie (Wang et al., 2010). Verneuil lui donna son nom en 1854 en l'associant à un défaut des glandes sudoripares. L'Hidradénite Suppurée, Acne inversa, ou Hidrosadénite Suppurée (HS) est une maladie chronique inflammatoire du follicule pileux qui affecte également les glandes apocrines (Fimmel and Zouboulis, 2010). L'HS est une maladie orpheline dont la prévalence dans les différentes populations varie de 0.00033% à 4% (Vinding et al., 2014). Cette prévalence est assez difficile à estimer dans la mesure où la plupart des études sont souvent réalisées grâce à des questionnaires envoyés aux malades. Il n'y a donc pas toujours d'examen physiques. De plus, il y a souvent un biais à cause de la population étudiée : c'est souvent une population locale, qui ne prends pas toujours en compte toutes les ethnies (Reeder et al., 2014; Vazquez et al., 2013). Des antécédents familiaux d'HS sont retrouvés dans 30 à 40 % des cas (Jemec, 2012).

### 1.1.1 Clinique, symptômes et traitements

Cette maladie se manifeste par des lésions inflammatoires, des nodules, des abcès au niveau des zones axillaires, infra-mammaires, périnéales, inguinales et fessières. Elles sont souvent localisées au niveau des plis et des zones chaudes où la densité de poils peut être plus importante. Les lésions sont souvent accompagnées de douleurs et de suppuration pendant 7 à 10 jours (Jemec, 2012). La sévérité de la maladie est déterminée avec l'échelle d'Hurley (Figure 1). Elle compte trois stades, allant de la formation d'un simple abcès aux lésions interconnectées entre-elles. Cependant, 1% seulement des patients ont une progression jusqu'au stade 3. Le diagnostic est souvent basé sur l'histoire clinique, chronique et inflammatoire de la maladie. Certains facteurs peuvent aggraver la maladie. La cigarette est reconnue comme étant le premier facteur de risque (90% des cas), tout comme l'obésité (75% des cas). En effet, le stress mécanique semble provoquer une aggravation des lésions (Pink et al., 2013). Cette maladie se développe après la puberté. Les femmes sont souvent plus touchées que les hommes. On pense qu'il y a une influence hormonale dans la mesure où les poussées interviennent souvent au début du cycle menstruel pour les femmes (Jemec, 2012).



**Figure 1** : Stades d'Hurley dans la maladie de Verneuil. Les trois exemples ont été pris au niveau de la zone axillaire. A : formation de simples ou multiples abcès, sans cicatrices. B : abcès récurrents avec formation de fistules, cicatrices, présences de lésions mais séparées entre elles. C : abcès interconnectés, plaies sur l'ensemble de la zone (Jemec, 2012).

Cette maladie a des conséquences physiques et psychologiques importantes. Les répercussions sur la qualité de vie est majeur. Les odeurs des plaies dues aux écoulements de pus et aux suppurations font culpabiliser les malades. Elle n'est pas non plus sans conséquences sociales et économiques. On estime que 58.7% des patients ont besoin de s'arrêter 30 jours par an à cause des poussées inflammatoires (Pink et al., 2013). Globalement cette maladie affecte davantage la qualité de vie des patients que d'autres maladies de la peau bien plus répandues (psoriasis, dermatite atopique...). De plus, on note bien souvent une errance diagnostique, qui est estimée de 8 à 12 ans. Elle est confondue avec une simple infection et se développe ainsi à cause de traitements inadaptés (Dr HOTZ, communication orale).

Les traitements sont d'une efficacité inconstante, modérée mais surtout transitoire : association clindamycine et rifampicine, anti-TNF- $\alpha$ , isotrétinoïne, acitrétinoïne, acétate de cyprotérone (Mendonça and Griffiths, 2006; van Rappard et al., 2013; Zhang et al., 2014). Pour les lésions récalcitrantes, on peut procéder à l'excision chirurgicale de la zone concernée. Les techniques actuelles d'ultrasonographie peuvent permettre de déterminer l'extension des lésions avant une éventuelle opération. La thérapie par laser peut aussi donner des résultats tout à fait satisfaisants (Pink et al., 2013). L'amélioration des symptômes par un traitement antibiotique ou immunosuppresseur suggère que la flore bactérienne et la réponse immunitaire sont impliquées dans la maladie de Verneuil. A l'image de la maladie de Crohn, l'HS pourrait être liée à une rupture de l'homéostasie vis-à-vis de constituants de la flore commensale chez des patients prédisposés génétiquement (Dr HÛE, communication orale).

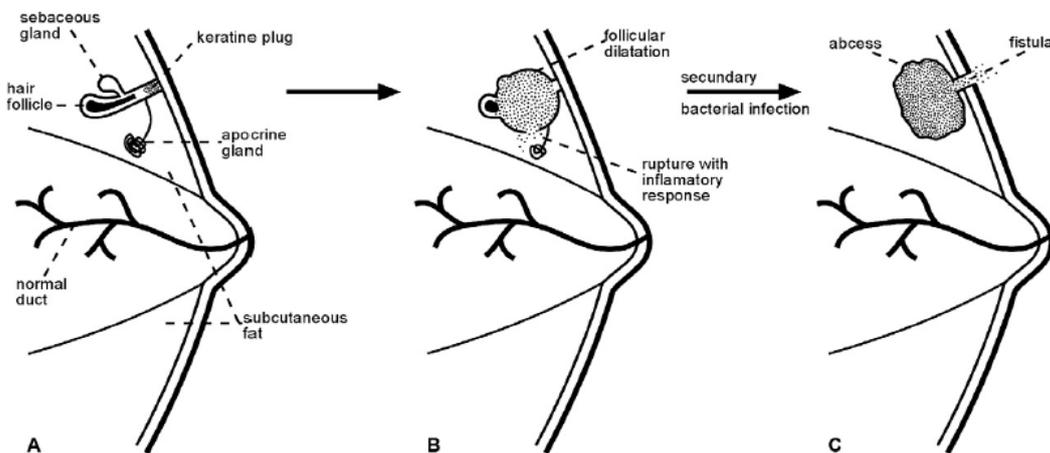
### **1.1.2 L'association de la maladie de Verneuil avec d'autres pathologies inflammatoires.**

Une étude récente sur 1093 patients atteints par la maladie de Crohn a démontré que 23% de ces malades sont également touchés par l'HS (van der Zee et al., 2014). En général, la maladie de Crohn précède l'hydradénite. En effet, il semblerait que les deux maladies aient un mécanisme physiopathologique commun (van der Zee et al., 2010). Le problème réside dans le fait que certains patients de Verneuil sont diagnostiqués comme des malades de Crohn. Cela peut conduire à des conséquences chirurgicales beaucoup plus lourde que prévue : on peut avoir une infection périnéale persistante après une proctectomie. L'erreur diagnostique peut ainsi prolonger la durée de cicatrisation. Les traitements doivent être ainsi plus adaptés en présence des deux maladies (Church et al., 1993).

Les patients développent plus souvent des cancers de la peau (Squamous Cell Carcinoma), de la bouche ou du foie. Enfin, cette maladie peut être associé à du diabète, une spondylarthrite ou certaines formes d'acnées sévères (Acne conglobata) (Fimmel and Zouboulis, 2010).

### 1.1.3 Physiopathologie de la maladie : le modèle de Berna Serna et Berna Mestre.

Le modèle physiopathologique de la maladie de Verneuil a été proposé par Berna-Serna et Berna Mestre pour Mamillary Fistula, une autre maladie provoquant l'apparition d'abcès au niveau des glandes mammaires (Berná-Serna and Berná-Mestre, 2010). Les auteurs supposent que les deux maladies ont la même origine. Une des hypothèses actuelles proposées serait ainsi une hyperkératose de l'épithélium folliculaire avec occlusion de la glande apocrine et dilatation du follicule pilosébacé. Il s'ensuit alors une rupture du follicule pileux qui entraîne la dissémination de la kératine et des bactéries dans le derme. Cela engendre la formation de fistules et d'abcès (Figure 2). On a en effet souvent une infection bactérienne qui est secondaire. En effet, des études ont montré que 25% des bactéries présentes sur la peau sont localisées dans les follicules pileux (Lange-Asschenfeldt et al., 2011). Des cultures bactériennes faites sur des biopsies de lésions HS ont montré qu'une surinfection avec des bactéries, surtout le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) peut être présente. La rupture du kyste conduit donc à une stimulation de l'immunité innée par les Toll-Like Receptor (TLRs) des kératinocytes, véritable sentinelles dans la réponse immunitaire cutanée.



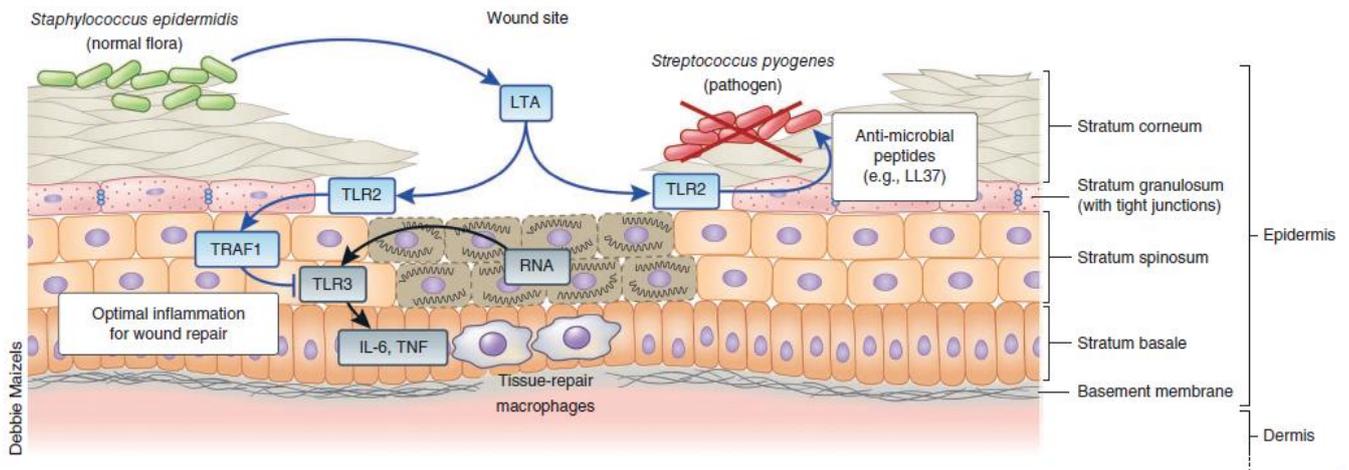
**Figure 2 :** Modèle de Berna-Serna et Berna-Mestre pour la physiopathologie de la Mamillary fistula. On suppose qu'il s'agit du même mécanisme pour la maladie de Verneuil. A : obstruction folliculaire avec bouchon de kératine. B : dilatation folliculaire avec rupture du follicule pilosébacé. C : Infection bactérienne secondaire avec apparition d'abcès et de fistules (Berná-Serna and Berná-Mestre, 2010).

## 1.2 Réponse immunitaire cutanée

### 1.2.1 Implication des kératinocytes dans la défense de la peau et des follicules pileux.

La peau contient pléthore de cellules différentes qui participent aux fonctions essentielles telles que les fonctions sensorielles, le contrôle de la température, le maintien d'une barrière physique et l'immunité. Elle est constituée d'un épiderme attaché à une membrane basale et reliée au derme. Chaque partie a sa propre complexité et comporte des follicules pileux, des glandes sudoripares, des glandes sébacées, des nerfs, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. L'épiderme et le derme contiennent ainsi une grande variété de types cellulaires différents qui sont là pour assurer la défense de cet organe contre les pathogènes.

Les kératinocytes forment l'infrastructure de la peau grâce à une superposition de couches plus ou moins différenciées. La couche la plus superficielle est constituée de cornéocytes, cellules complètement différenciées qui sont mortes : c'est le stratum corneum. En dessous, on a le stratum granulosum, barrière physique effective contre les pathogènes, puis le stratum spinosum (Figure 3). La flore commensale cutanée est constituée de bactéries, de champignons, de virus et de parasites. Le contrôle de la prolifération de ces microorganismes fait ainsi parti du rôle des kératinocytes (Heath and Carbone, 2013).



**Figure 3 :** Présentation des différentes couches de la peau. L'épiderme est constitué de plusieurs couches de kératinocytes de plus en plus différenciées, à mesure que l'on se rapproche de l'environnement extérieur. La flore commensale, ici représentée par *Staphylococcus epidermidis* profite de la défense de l'hôte vis-à-vis de bactéries pathogènes, comme *Streptococcus pyogenes*. Après une blessure, les TLRs des kératinocytes du Stratum granulosum induisent la production de peptides antimicrobiens, comme la cathélicidine (LL37), qui limiteront la prolifération des bactéries pathogènes. De même, la flore commensale peut également induire l'activation des TLRs2 par l'acide lipotéichoïque (constituant membranaire des bactéries à Gram Positif), la production de TRAF1 (TNF Receptor Associated Factor), diminuant ainsi l'activation de TLR3, la production d'interleukine 6 et de TNF- $\alpha$ , entraînant une réduction de l'inflammation (Heath and Carbone, 2013).

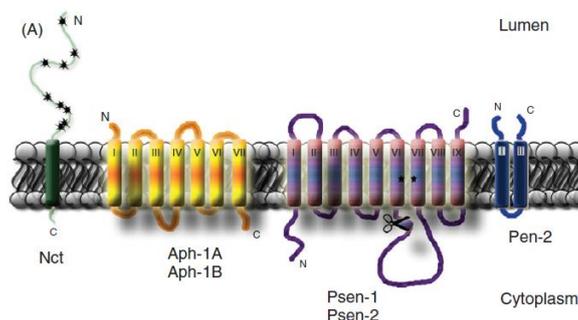
En effet, la réponse anti-bactérienne est assurée par les kératinocytes par la production de peptides anti-microbiens (PAMs) qui assurent d'une part l'élimination des bactéries par un mécanisme de perméabilisation des parois bactériennes, et d'autre part la résolution de l'inflammation. Les PAMs sont produits dans la peau (protéines S100A7 ou psoriasine, calgranuline A : S100A8, calgranuline B : S100A9,  $\alpha$  et  $\beta$ -défensines, cathélicidine) (Harder and Schröder, 2005; Hofmann et al., 2012). Ce sont des peptides chargés positivement constitués de 10 à 50 acides aminés caractérisés par une structure hydrophobe ou amphipathique, leur permettant d'interagir avec les membranes microbiennes chargées négativement. Les PAMs exercent ainsi leur effet anti-microbien en créant des pores membranaires dans les bactéries. Les principales sources cutanées de production et sécrétions de PAMs sont les kératinocytes, mastocytes, polynucléaires neutrophiles, glandes sébacées et eccrines. Outre leur fonction anti-bactérienne, certains PAMs sont de puissants chimioattractants de cellules dendritiques, lymphocytes T et monocytes, et induisent la production de cytokines. Les PAMs sont sécrétés par les kératinocytes après reconnaissance de motifs moléculaires bactériens par les PRRs (Pathogen Recognition Receptors) présents sur les kératinocytes, mais également sous l'influence des cytokines IL-6, IL-17 et IL-22 (Wolk et al., 2006, 2011).

Les PRRs permettent ainsi d'augmenter la production d'effecteurs de l'immunité innée comme les PAMs, les cytokines ou les chimiokines. Ils permettent d'élaborer une réponse rapide face aux Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs). Parmi les PRRs, on compte les Toll-Like Receptors (TLRs) et les Nod-Like Receptors (NLRs) (Di Meglio et al., 2011). Les TLRs reconnaissent certaines structures microbiennes et produits microbiens conservés comme les lipopolysaccharides (LPS) ou l'acide lipotéichoïque (LTA). Les NLRs, ou Nucleotide Oligomerization Domain (NOD) 1 et 2 répondent aux peptidoglycanes bactériens. Ces différents récepteurs contribuent à la réponse immunitaire innée qui constitue la première ligne de défense contre les pathogènes (Heath and Carbone, 2013).

### 1.2.2 La $\gamma$ -sécrétase, une enzyme clé dans la maladie

En 2010, des mutations des gènes codant pour la  $\gamma$ -sécrétase ont été identifiées dans 6 familles chinoises Han atteintes d'HS (Wang et al., 2010). La  $\gamma$ -sécrétase est une protéase qui clive de nombreuses protéines transmembranaires, incluant les précurseurs d'amyloïde que l'on retrouve dans la maladie d'Alzheimer (Panza et al., 2010), mais aussi les récepteurs NOTCH. Elle est constituée de 4 sous-unités qui sont toutes des protéines hydrophobes : la préséniline (codée par le gène *PSEN1* ou *PSEN2*), la préséniline-enhancer 2 (codée par le gène *PSENE2*), la nicastrine (codée par le gène *NCSTN*) et l'antérieur pharynx defective (codée par le gène *APH1A* ou *APH1B*) (Pink et al., 2013) (Figure 4). On a au moins quatre complexes différents chez les mammifères, avec deux gènes différents pour PSEN et APH. Ce complexe protéique reconnaît près de 60 substrats différents.

La préséniline est la sous-unité protéolytique. Les trois autres sont des cofacteurs. La préséniline enhancer-2 est quant à elle nécessaire à l'endoprotéolyse et l'activation de la préséniline. La nicastrine joue un rôle dans l'assemblage du complexe, la maturation et la stabilisation. Cette glycoprotéine de 130kDa transmembranaire possédant un large domaine extracellulaire aurait un rôle crucial dans la reconnaissance du substrat. L'ectodomaine, comportant les N-glycosylation, est très important. En effet, des mutations de cette partie de la protéine entraînent une perte de la reconnaissance du substrat et donc du clivage (Jorissen and De Strooper, 2010). A ce jour, 17 mutations ont été repérées dans le gène *NCSTN*, 3 dans le gène *PSENE2* et une dans le gène *PSEN1* (Liu et al., 2011; Pink et al., 2011). Les modèles murins ont montré que l'absence d'expression de la  $\gamma$ -sécrétase induisait une atrophie du follicule, la formation de kystes épidermiques, l'absence des glandes sébacées et une hyperplasie épidermique (Dréno et al., 2012; Melnik and Plewig, 2013a; Pan et al., 2004).

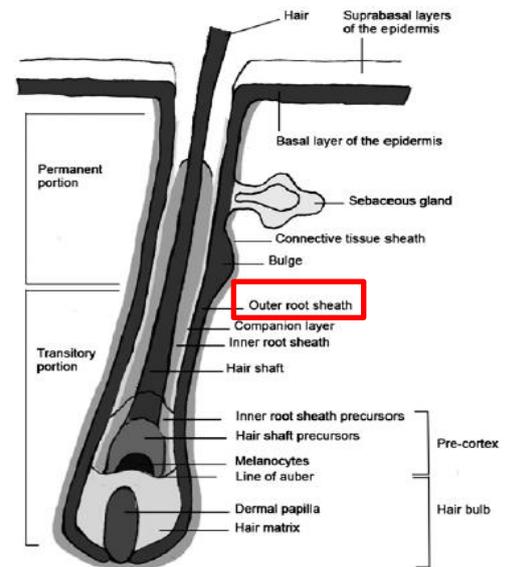


**Figure 4** : Représentation schématique de la  $\gamma$ -sécrétase. C'est une protéine constituée de 4 sous-unités : la Nicastrine (Nct), l'Anterior pharynx defective (Aph-1A ou Aph-1B), la préséniline (Psen-1 ou Psen-2) et la presenilin enhancer 2 (Pen-2). La préséniline constitue l'unité catalytique et les trois autres sous-unités sont des cofacteurs. La Nicastrine est connue pour porter de nombreuses mutations chez les patients HS, en particulier sur l'ectodomaine (A) constitué de N-glycosylation, qui a un rôle très important dans la reconnaissance du substrat (Jorissen and De Strooper, 2010).

### 1.2.3 Rôle potentiel de la voie NOTCH dans le développement de la maladie de Verneuil

Parmi les substrats de la  $\gamma$ -sécrétase, on compte les récepteurs NOTCH. Ils jouent un rôle essentiel dans l'embryogenèse et le développement de l'organisme. Rien que pour le système immunitaire, ils régulent le développement des lymphocytes T, des lymphocytes B, l'activation des lymphocytes T, la différenciation des cellules T CD4+ mais aussi les cellules de l'immunité innée comme les Innate Lymphoid Cells (ILCs). Cette protéine intervient donc aussi bien dans l'immunité innée que dans l'immunité acquise (Hu et al., 2008; Radtke et al., 2013).

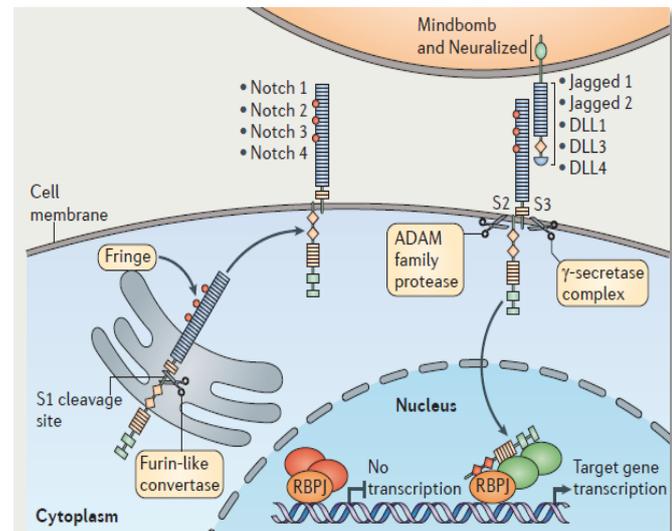
De la même façon, le développement postnatal du follicule pileux requiert un signal NOTCH intact dans le bulbe et dans les cellules ORS (Outer Root Sheath)(Figure 5), les cellules de la gaine externe du follicule pileux, semblables à un épithélium stratifié de kératinocytes. Dans le bulbe, NOTCH contrôle le passage des cellules souches ou de leur progéniteurs en cellules différenciées. Chaque passage permet d'avoir une succession de cellules à différents stades de différenciation (Aubin-Houzelstein, 2012; Pan et al., 2004).



**Figure 5 :** Structure d'un follicule pileux en phase anagène chez la souris. Localisation des ORS en rouge (Aubin-Houzelstein, 2012).

#### Mécanisme de la voie NOTCH (Figure 6) :

La voie NOTCH compte 4 récepteurs : NOTCH 1-4. Tous sont reconnus par 5 ligands : Delta-like 1, 3 et 4 (DLL1, 3 et 4) et Jagged (1 et 2). Ces ligands viennent se fixer sur la protéine et modifient légèrement sa conformation. La voie NOTCH est mieux caractérisée en agissant de cellules à cellules (mode juxtacrine), avec des signaux entre cellules adjacentes. Elle peut alors être clivée par la protéine ADAM, de la famille des métalloprotéases, qui va couper la partie extracellulaire. La partie intracellulaire sera alors clivée par la  $\gamma$ -sécrétase. Cette dernière, aussi appelée NICD (NOTCH Intracellular Domain) va être transloquée dans le noyau, va éliminer les corépresseurs et va s'assembler au complexe RBPJ en recrutant des cofacteurs. Ceci va permettre la transcription des gènes cibles de NOTCH, qui varient suivant le type cellulaire (Borggreffe and Oswald, 2009; Radtke et al., 2013). Parmi ces gènes, on compte HES1 (Hairy and Enhancer of Split) et HEY1 (Hairy and Enhancer of Split Related). Ces gènes interviendront dans la régulation immunitaire et dans la différenciation des cellules épidermiques (Bray and Bernard, 2010; Hu et al., 2008).

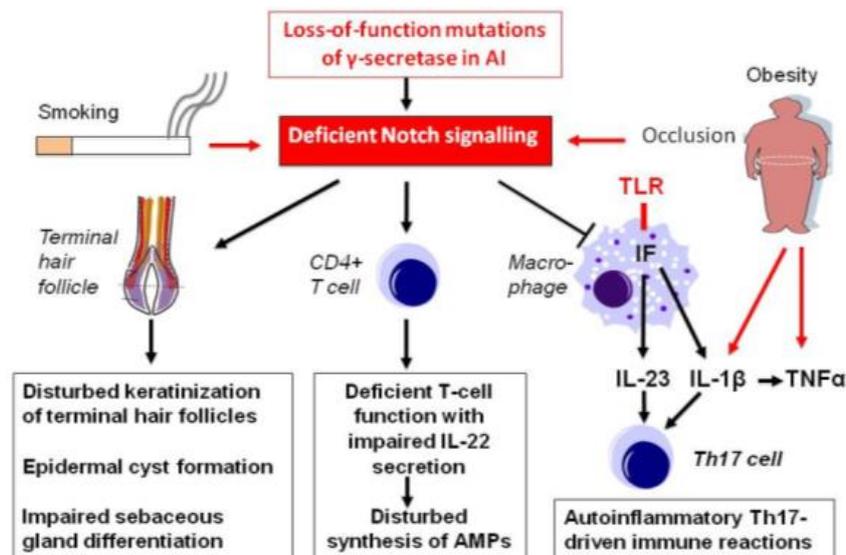


**Figure 6 :** Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le signal NOTCH. La protéine NOTCH doit être clivée trois fois pour être effective. Elle est clivée une première fois au niveau de l'appareil de Golgi lors de sa maturation (S1), avant de migrer au niveau de la membrane. Elle comporte alors une partie intramembranaire et une partie extramembranaire. Lorsque cette dernière est en contact avec un des ligands de NOTCH (J1, J2, DLL1, DLL3 ou DLL4), la conformation de la protéine NOTCH change, ce qui permet le second clivage par la protéine ADAM (S2) qui va couper la partie extracellulaire. La gamma-sécrétase pourra alors cliver la partie intracellulaire de NOTCH qui sera transloquée dans le noyau au niveau du complexe RBPJ (Radtke et al., 2013).

### 1.2.5 Modèle des mécanismes immunitaires impliqués dans la maladie de Verneuil

La découverte des mutations des gènes de la  $\gamma$ -sécrétase a conduit à développer un nouveau modèle physiopathologique (Figure 7). L'altération du signal NOTCH dans la physiopathologie de l'HS pourrait avoir 3 conséquences majeures :

- Une hyperkératose du follicule pileux, avec la possibilité de formation de kystes épidermiques et une différenciation altérée des glandes apocrines.
- Une différenciation réduite des lymphocytes T CD4+ en lymphocytes Th22. En effet, il a été montré que la voie NOTCH est impliquée dans la différenciation des lymphocytes Th22 . Par ailleurs, *Wolk et al.* a montré une diminution des transcrits de l'IL-22 dans les lésions HS, associé à un déficit partiel de production de peptides antimicrobiens (Sabat et al., 2014; Wolk et al., 2011).
- Un déséquilibre entre le signal des TLRs et le signal NOTCH : le signal NOTCH déficient ne permet pas de limiter la réponse inflammatoire des cellules présentatrices d'antigènes suite à la stimulation de leurs PRRs. Cette réponse inflammatoire excessive provoque ainsi des dégâts caractéristiques au niveau des tissus comme c'est le cas pour l'HS. En plus de cela, les macrophages présents dans les lésions produiraient de l'IL-23 et de IL-1 $\beta$  de façon massive, ce qui générerait la différenciation de cellules T naïves en lymphocytes Th17. Ces derniers entretiendraient l'inflammation en générant à leur tour de l'IL-17, qui va permettre le recrutement des neutrophiles. (Kelly et al., 2014; Melnik and Plewig, 2013b)



**Figure 7** : Modèle des mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie de Verneuil. AI : Acne inversa (Melnik and Plewig, 2013b).

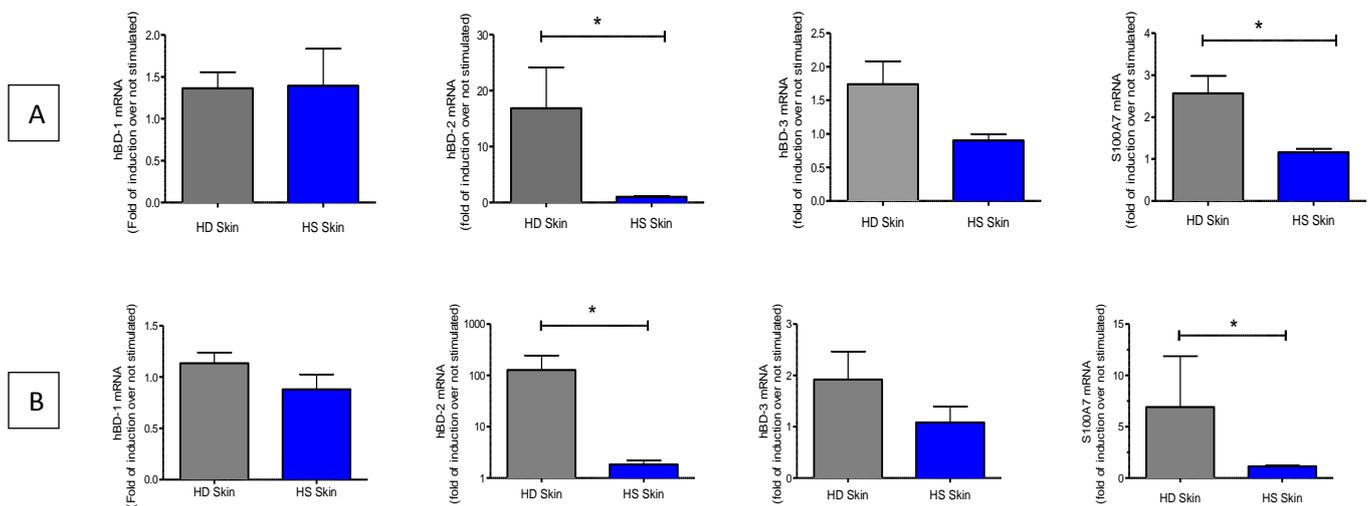
Le Dr HOTZ a étudié le rôle des lymphocytes Th17 et Th22 dans la réponse immunitaire durant sa thèse sur l'Hidradénite suppurée. L'étude in situ par RT-qPCR, immunohistochimie et par cytométrie en flux a permis de caractériser l'inflammation des lésions cutanées. Dans les peaux des patients HS, une augmentation significative de l'expression des transcrits IL-17 et IFN- $\gamma$  (Hotz et al., article en préparation) a été observée. Cependant, une diminution de l'expression des transcrits de peptides antimicrobiens, acteurs fondamentaux dans une bonne réponse antimicrobienne cutanée, ainsi qu'une diminution de chimiokines ont été observées. Les PAMs et les chimiokines permettent le recrutement des lymphocytes T, donc ces cellules n'ont pas de signal pour migrer dans les lésions.

Les résultats ont également montré que l'inflammation n'est pas secondaire à la présence de Th17 et/ou Th22. En effet, après 5 jours de cocultures de lymphocytes T de donneurs sains avec des kératinocytes HS, on observe une diminution de la transcription d'IL-17 et d'IL-22. Pourtant, l'analyse des PBMC a montré chez les patients HS une augmentation de la production des cytokines IL-17 et IL-22 après une stimulation non spécifique polyclonale. Il existe également une augmentation de la sécrétion de l'IL-22, IL-17 et de l'IFN- $\gamma$ , dans les surnageants de cultures des PBMC des patients HS après stimulation par les produits microbiens *Staphylococcus aureus* et la flagelline par rapport à des témoins sains. L'absence de recrutement de lymphocytes T, par manque de chimioattractants (PAMs et chimiokines), peut participer au défaut de production des peptides antimicrobiens, et contribuer ainsi à la prolifération bactérienne et à l'inflammation.

Ces premiers résultats suggèrent qu'il existe un cercle vicieux dans l'HS, où l'absence de chimioattractants induit un défaut de recrutement des Th17/Th22 dans la peau des patients HS et conduit alors à une diminution d'expression des PAMs. Cela participe à la prolifération de la flore microbienne et à l'absence de migration de cellules Th17 et Th22.

### 1.3 Hypothèses et objectifs du stage

Afin d'étudier la production des PAMs par les kératinocytes en dehors d'un contexte inflammatoire, le Dr. BONIOTTO a isolé les kératinocytes de sujets sains et de patients HS à partir de la peau. Il a étudié la réponse des kératinocytes à différents produits microbiens en l'occurrence MDP (agoniste de NOD2) et PAM2CSK4 (agoniste des récepteurs TLRs2/6) en étudiant l'expression de trois Bêta-défensines : hBD1, hBD2 et hBD3, ainsi que l'expression de la psoriasine : S100A7. Les résultats sont montrés dans la figure 8 (Hotz et al., article en préparation). L'expression des PAMs étudiés par RT-qPCR montre que les kératinocytes HS ont une expression fortement réduite pour la Bêta-défensine 2 et la psoriasine, et ce de façon significative. En revanche, l'expression des Bêta-défensines 1 et 3 ne varient pas entre les patients HS et les individus sains.



**Figure 8:** Expression de peptides antimicrobiens par les kératinocytes de la peau. Les cellules ont été stimulées avec 100ng/mL de PAM2CSK4 pendant 6h (A) ou par 10µg/mL de MDP pendant 6h (B). L'expression de l'ARNm des gènes étudiés a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport au gène de référence *OAZ1*. L'expression relative a été mesurée par rapport à l'expression des gènes d'intérêts pour des échantillons non traités. Les données sont montrées comme la moyenne + SD de triplicats techniques et proviennent de 5 personnes différentes pour les peaux saines et de trois personnes différentes pour les peaux HS. (Hotz et al., article en préparation).

Dans la mesure où les premières cellules affectées dans la maladie sont les cellules du follicule pileux, nous avons optimisé un protocole pour l'isolement des cellules de la gaine externe des follicules pileux de malades et d'individus sains. Elles ont été stimulées pour étudier la production de PAMs.

Par ailleurs, suite au séquençage réalisé sur une partie de la cohorte, le Dr. BONIOTTO a constaté que 6 des 20 patients étudiés présentaient des mutations fonctionnelles dans une des 4 sous-unités de la  $\gamma$ -sécrétase. L'équipe a alors supposé que la voie NOTCH était impliquée dans la production des PAMs par les kératinocytes. Si cette hypothèse se vérifiait, des composés pouvant ainsi rétablir un signal NOTCH pourrait rétablir un signal correct chez les patients HS et augmenter l'expression des PAMs par les kératinocytes. De plus, une augmentation du signal NOTCH pourrait éviter l'hyperkératose du follicule pileux, donc sa rupture et l'inflammation qui s'ensuit.

Nous avons choisi de tester deux composés que nous nommerons composé A et composé B. Tous deux sont des composés secondaires issus de plantes de la famille des brassicacées (cresson, raifort, choux). Ces molécules interviennent dans la défense des plantes contre les ravageurs, notamment par leurs propriétés anti-appétante. Elles sont depuis quelques années étudiées pour leur propriété anticancéreuses.

#### **Composé A :**

Le composé A a été étudié sur des cellules cancéreuses de cancer du cerveau (médulloblastome) ou pour le carcinome de la thyroïde anaplastique. Dans les deux cas on constate que cette molécule induit une augmentation de la production de NOTCH 1 dans le cytoplasme des cellules. On aurait ainsi une inhibition de la croissance cellulaire et une redifférentiation des cellules concomitante à une augmentation de NOTCH intracellulaire (NICD).

#### **Composé B :**

Pour le cancer de la prostate, le composé B permet de cliver les formes actives de NOTCH1 et de NOTCH2. Le traitement permet également l'induction de la transcription des ligands de NOTCH, à savoir ici Jagged1 et Jagged2. On constate une surexpression des composants de la  $\gamma$ -sécrétase, à savoir la préséniline 1 et la nicastrine. Cela confère un effet antimétastatique à ce composé. Combiné à un inhibiteur, on obtient un traitement intéressant : l'activation de NOTCH 2 mais la suppression de NOTCH 1 conduit à l'apoptose de la cellule. Dans tous les cas, on a une inhibition de la migration cellulaire avec cette molécule.

***La problématique de ce stage résidait donc dans l'étude détaillée de la production des peptides antimicrobiens par les kératinocytes issus de la gaine externe du follicule pileux afin d'envisager de nouveaux axes thérapeutiques.***

Les missions étaient donc les suivantes :

- Optimisation de l'isolement des cellules de la gaine externe du follicule pileux à partir de cheveux de patients ou d'individus sains, avec une amplification *in vitro* de ces cellules pour une étude *ex vivo*.
- Etude de la réponse des kératinocytes issus d'ORS suite à la stimulation de leurs PRRs : production de PAMs.
- Etude de la réponse de ces cellules après stimulation de leurs récepteurs NOTCH.
- Optimisation de protocoles afin d'évaluer l'influence des composés A et B sur le signal NOTCH, permettant de déterminer s'ils pourraient augmenter le signal déficient chez les patients HS.

## 2 Matériels et méthodes

---

### 2.1 Prélèvements de cheveux

En collaboration avec le service de dermatologie de l'hôpital Henri Mondor, l'équipe « Verneuil » a créé une cohorte prospective de 76 patients HS. Cette cohorte de 76 patients est constituée de 59 femmes et de 17 hommes, soit un sexe ratio de 3,5. L'âge moyen à l'inclusion était de 34,3 ans. 60,5% des patients avaient un tabagisme actif. Un patient avait une maladie de Crohn concomitante à l'HS, et un autre patient une spondylarthropathie ankylosante. 33% des patients HS inclus avaient au moins un antécédent familial d'HS.

Des cheveux de 6 patients HS issus de la cohorte et de 5 individus sains ont été collectés au département Dermatologie de l'hôpital Henri Mondor après avoir obtenu un consentement par écrit. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital Henri Mondor, en accord avec des principes de la déclaration d'Helsinki.

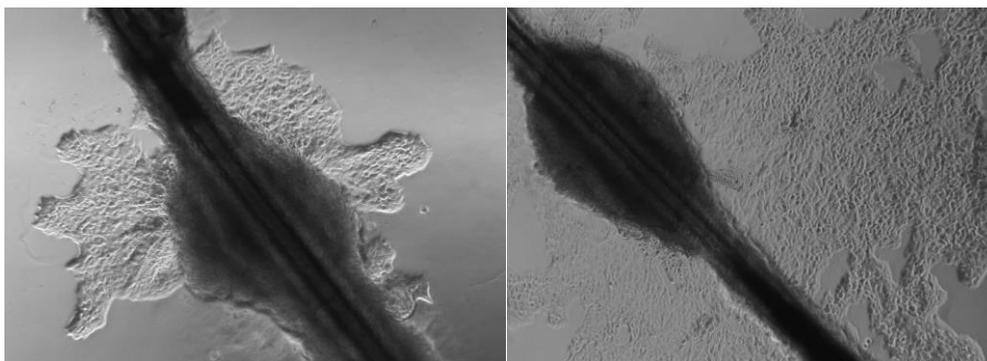
### 2.2 La culture des kératinocytes.

#### 2.2.1 Mise en culture de la gaine externe du follicule pileux.

Les cellules de l'ORS (Outer Root Sheath cells) sont isolées dans le laboratoire de l'unité 955 de l'INSERM, en suivant le protocole décrit par Aasen et Belmonte (Aasen and Izipisúa Belmonte, 2010) avec quelques modifications mineures. Ainsi, 10 à 15 cheveux en phase de croissance anagène sont arrachés au niveau des régions occipitales et temporales de chaque donneur. Ils sont conservés dans du milieu pour kératinocytes : Defined Keratinocyte Serum Free Medium (DKSFM) (Invitrogen, Carlsbad, CA). La partie racinaire du cheveu contenant le follicule pileux et le bulbe est coupée et mise à incuber dans de la dispase (1mg/ml ; Stemcell Technologies, Grenoble, France) pendant 5 minutes à température ambiante. Puis on ajoute le même volume de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen) avec 15% de Fœtal Bovine Serum (FBS) décomplémenté par la chaleur, afin d'inhiber la dispase. Chaque racine capillaire est ensuite placée sur du Matrigel (BD Bioscience, Le pont de Claix, France) à raison d'une à deux racines par puits dans une plaque 24 puits. Enfin, 60µL de DMEM contenant 15% de FBS (Invitrogen) sont ajoutés et l'ensemble est placé dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est alors renouvelé tous les jours.

#### 2.2.2 Culture des kératinocytes

Selon le donneur, les colonies de kératinocytes épithéliaux sont visibles après une semaine et le milieu est changé avec de l'Epilife (Invitrogen) pour favoriser la multiplication cellulaire (Figure 9). Pour éviter la différenciation des cellules ORS, avant que le puits ne soit arrivé à confluence, les cellules sont décollées par un traitement avec une solution contenant 0.1% de trypsine et 0.05% d'EDTA (Invitrogen) et passées dans une plaque 6 puits. Une fois ce dernier arrivé à confluence, on passe en flasque de 25cm<sup>2</sup>, avant de passer en flasque de 75cm<sup>2</sup>. On peut ainsi arriver à trois ou quatre passages. A chaque passage, ils sont centrifugés à 90g pendant 7 minutes à température ambiante afin d'éliminer la trypsine.



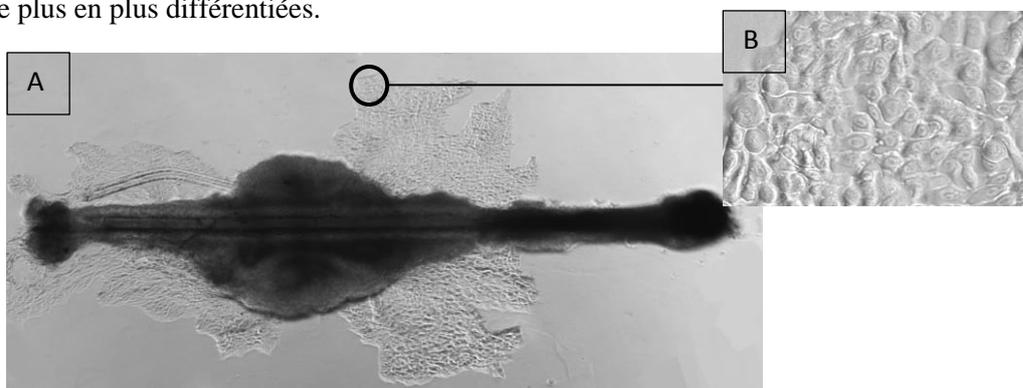
**Figure 9** : Multiplication des kératinocytes de la gaine externe du follicule pileux des cheveux de personnes saines. Les ORS commencent à se multiplier après 3 jours de culture. A : Photo de kératinocytes prises après 5 jours de culture, observés au microscope optique inversé et grossi 50 fois. B : Photo de kératinocytes prises après 9 jours de culture, observés au microscope optique inversé et grossi 50 fois. L'aspect des cellules est le même pour les patients HS, à la différence près que le développement correspondant à la photo A peut être obtenu en trois jours.

### 2.2.3 Difficulté de la culture cellulaire des kératinocytes.

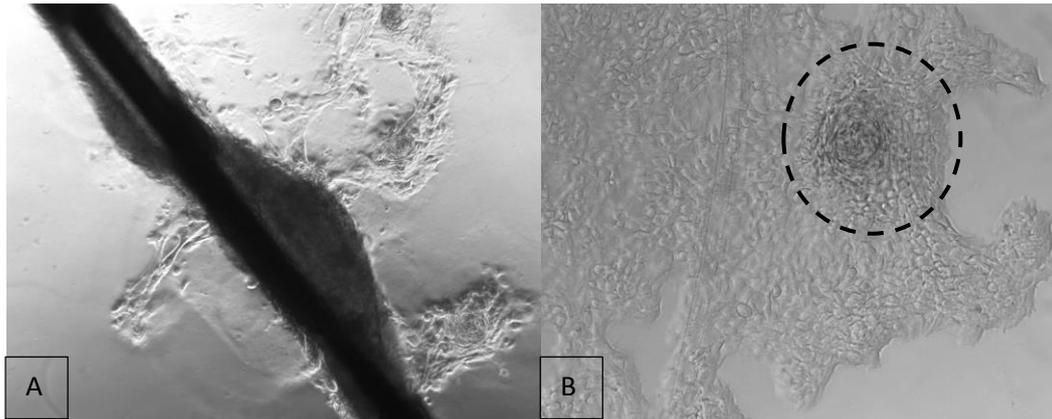
La culture des kératinocytes issus d'ORS comporte de nombreuses étapes clés pour permettre leur multiplication, étapes critiques qui réduisent fortement le nombre de kératinocytes que l'on pourra utiliser à la fin de la culture pour les différentes stimulations.

Tout d'abord, lorsqu'on met la partie racinaire du cheveu dans le matrigel et qu'on la fixe avec un mélange de matrigel et de DMEM, il peut arriver que les cheveux se détachent lors du changement de milieu quotidien (pendant les 4 à 5 premiers jours, jusqu'à l'apparition des premiers kératinocytes). Dans ce cas, le cheveu est perdu : en effet les kératinocytes ne se multiplient que si le cheveu est adhérent.

En revanche, si les kératinocytes de l'ORS se multiplient, alors le cheveu est bien maintenu et il ne risque plus de se détacher. Il faut alors surveiller que les cellules ne se différencient pas. On peut parfois perdre le cheveu de cette manière. La culture doit former un ensemble homogène de petites cellules collées les unes aux autres mais bien distinctes (Figure 10). Une observation quotidienne au microscope optique inversé est donc nécessaire. Pour certains cheveux, les kératinocytes se multiplient à peine et se différencient tout de suite (Figure 11A). Pour ceux qui ne se différencient pas, il faut veiller à détacher le cheveu dès que l'on voit les premiers amas de cellules différenciées. Ceux-ci sont reconnaissables par la formation d'amas de couleur jaunâtre (Figure 11B, couleur non visible ici). En effet les cellules de l'ORS du cheveu continuent à produire des kératinocytes, mais ceux-ci n'ont plus assez de place pour pouvoir s'étaler en surface et se multiplie donc en épaisseur, ce qui a pour conséquence de reproduire les conditions de la peau dans lesquelles on a une superposition de couches avec des cellules de plus en plus différenciées.



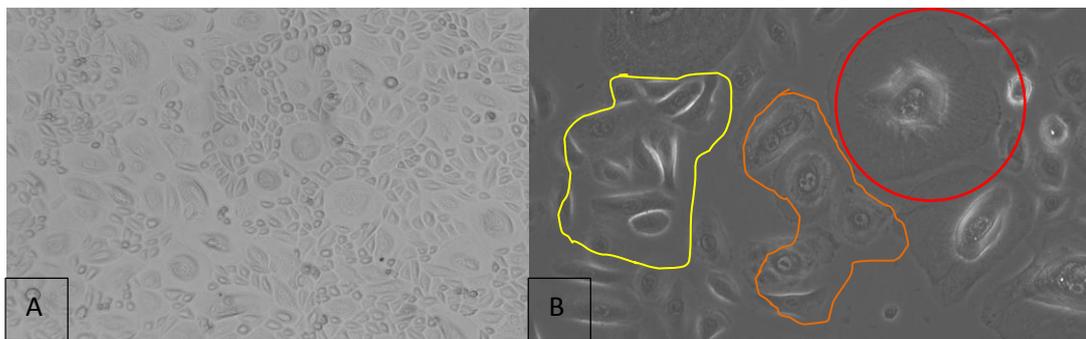
**Figure 10** : Photo de kératinocytes prises après 6 jours de culture, observés au microscope optique inversé et grossi 50 fois(A) ou 100 fois (B). Les cellules sont de petites tailles et forment un ensemble bien homogène.



**Figure 11** : Photo de kératinocytes prises après 6 jours de culture, observés au microscope optique inversé et grossi 50 fois(A) ou 100 fois (B). A : Les cellules forment des amas et sont déjà différenciées. Elles sont donc en train de mourir. Ce bulbe de cheveu ne pourra pas donner des kératinocytes viables et utilisables pour les différentes stimulations. B Les cellules sont de petites tailles et forment un ensemble bien homogène mais on remarque l'apparition d'un amas de cellules plus sombre (en pointillé) : ces cellules sont en phase de différenciation. Il est donc urgent de décoller le cheveu pour arrêter la production de kératinocytes par les cellules de l'ORS.

Lorsque le puits ou la flasque contenant les kératinocytes est plein(e), il faut ajouter de la trypsine pour les détacher et les diviser. L'idéal est de le faire à 70% de confluence. Au delà, il est beaucoup plus difficile de les détacher. La trypsine doit donc être laissée plus longtemps, ce qui a pour conséquence la mort d'un plus grand nombre de cellules.

Le passage des kératinocytes dans un autre contenant est une étape assez délicate. Les kératinocytes ont pour particularité de rentrer en apoptose lorsqu'ils sont à une faible densité. Inversement, lorsqu'ils sont à confluence, ils rentrent dans une phase de sénescence et de différenciation (Aasen and Izpisúa Belmonte, 2010)(figure12). Ils ne supportent donc pas un nombre de passages trop important : pendant le stage, nous nous sommes limités au maximum à quatre passages.



**Figure 12** : Photo de kératinocytes prises dans une flasque après deux passages, observés au microscope optique inversé et grossi 100 fois(A) ou 200 fois (B). A : on remarque la présence de cellules beaucoup plus grandes au milieu des petites cellules, résultats de la différenciation des kératinocytes en cornéocytes. B : on remarque ici trois stades de différenciations : les petites cellules qui se divisent encore assez vite (rond jaune), les cellules en train de se différencier (rond orange) et les cellules complètement différenciées, étalées dans l'espace et mortes (rond rouge).

Enfin, en plus de la perte des cellules liée à la différenciation des kératinocytes s'ajoute la perte des cellules liée aux contaminations par les bactéries. Les cellules des ORS de patients HS sont en général en contact avec de nombreuses bactéries. Malgré le bain de dispase contenant des antibiotiques avant la mise en culture du bulbe, il peut arriver que des bactéries subsistent et contaminent le milieu. Les cellules sont alors inutilisables. L'utilisation d'antibiotiques pour la culture des cellules d'ORS est quant à elle proscrite, provoquant une baisse du taux de division et une différenciation prématurée des kératinocytes (Dr. BONIOTTO, communication orale).

## 2.3 Stimulations des kératinocytes

### 2.3.1 Stimulation des kératinocytes par les PAMPs

Après 2 à 4 passages,  $4 \times 10^4$  kératinocytes sont répartis dans des plaques de 48 puits et sont laissés pour que la confluence atteigne 100%. Ils sont ensuite stimulés pendant 6 heures pour une extraction d'ARNm avec 10 $\mu$ g/ml de Muramyl Dipeptide (MDP) (InvivoGen, San Diego, CA) et 100ng/ml de PAM2CSK4 (InvivoGen). Nous utilisons ces PAMPs puisque les expériences préliminaires du Dr. BONIOTTO ont montré que les kératinocytes isolés d'individus sains ne répondent pas aux agonistes des TLR4 (LPS; InvivoGen), TLR5 (Flagellin purifiée de *S.typhimurium*; InvivoGen) et NOD-1 ( $\gamma$ -D-Glu-mDAP, dipeptides présents dans les peptidoglycanes des bactéries Gram négatif et certaines bactéries Gram positif; InvivoGen). A la fin des 6h, les cellules sont lysées avec un tampon de lyse.

### 2.3.2 Etude de l'influence du signal NOTCH dans la sécrétion des peptides antimicrobiens.

Les cellules ont été stimulées en présence ou en absence d'un ligand purifié de NOTCH, fusionné avec la région Fc d'un anticorps IgG : Delta Like 4 à 10 $\mu$ g/mL. Les stimulations ont été réalisées selon le protocole décrit par Karanu (Karanu et al., 2001). Après 18 heures de stimulation par les ligands de NOTCH, elles sont stimulés avec des agonistes des PRRs, à savoir PAM2CSK4 ou MDP. Pour inhiber la voie de signalisation NOTCH, le composé E (Santa Cruz Biotechnology) a été utilisé dès le début de la stimulation de NOTCH à une concentration d'1 $\mu$ M. Le contrôle de ce composé est le DMSO. Après 6 heures de stimulation, les cellules sont lysées pour l'extraction de leur ARNm.

## 2.4 La transfection transitoire et la lecture de la luciférase

Lignées cellulaires : les lignées cellulaires HaCaT (lignée de kératinocytes), NIH3T3 Jagged 1, NIH3T3 p BABE (lignée de fibroblastes murins) et HEK293T (lignée de cellules embryonnaires de reins) (Hôpital Henri Mondor, Créteil, France) ont toutes été cultivées dans du DMEM+10% FBS.

Pour les HEK293T,  $4,5 \times 10^5$  cellules ont été mises en plaque 6 puits la veille de la transfection. Le lendemain, elles ont été transfectées en utilisant le kit FuGENE 6 (Promega, Charbonnières, France). Les vecteurs utilisés pour la transfection sont : pcDNA3-NOTCH1 (1.2 $\mu$ g), codant pour le récepteur NOTCH1 ; un vecteur rapporteur contenant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur activé par le complexe de transcription de NICD (plasmide codant pour la Firefly : p6XCBS-luc, 1.2 $\mu$ g) et un vecteur exprimant la luciférase de façon constitutive sous le contrôle du promoteur fort du cytomégalovirus (CMV) (plasmide codant pour la Renilla : pTK, 100ng). La luciférase est une enzyme qui, en présence du substrat, approprié émet de la lumière. La luminescence est ainsi proportionnelle à la quantité d'enzymes, qui est elle-même proportionnelle à l'activité des promoteurs. La Renilla et la Firefly sont deux luciférases qui possèdent deux structures différentes et ont donc deux substrats différents. On peut ainsi déterminer la luminescence de chacune des enzymes. Après 24h,  $4 \times 10^4$  cellules ont été transférées dans une plaque 48 puits pour réaliser les stimulations avec le composé A (10 $\mu$ M et 50 $\mu$ M) et le composé B (5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M) en triplicats. Le DMSO a été utilisé comme contrôle. Puis les cellules ont été lysées par le tampon PLB (Promega) avant d'être analysées au luminomètre (Tristar, Berthold Technologies) avec le Dual Reporter Assay System (Promega). Les résultats ont été obtenus en normalisant la luminescence de la Firefly par rapport à la Renilla.

Pour les HaCaT,  $5 \cdot 10^5$  cellules ont été mises en plaques la veille de la transfection dans une plaque 6 puits. Le lendemain, elles ont été transfectées en utilisant le kit Lipofectamine 3000 (Invitrogen) avec les mêmes plasmides utilisés pour les HEK293T. Le jour suivant, elles ont été mises en cocultures avec des fibroblastes dans une plaque 48 puits avec un ratio de 5 : 1. Puis elles ont été stimulées pendant 24 heures avec le composé A (10 $\mu$ M et 50 $\mu$ M) ou le composé B (10 $\mu$ M ou 20 $\mu$ M) en triplicats avant d'être lysées par le tampon PLB (Promega) et analysées au luminomètre. Le contrôle des deux composés a été effectué avec le DMSO.

## 2.5 Extraction ARNm et RT-QPCR

L'ARNm a été extrait avec le kit Qiagen RNeasy Mini-kit (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France) en suivant le protocole du fournisseur. L'ADNc a été synthétisé grâce au kit « Affinity Script Multi Temperature cDNA Synthesis Kit » (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France) en suivant le programme suivant le protocole du fournisseur. Les PCR quantitative ont été réalisées en utilisant le kit « Brilliant II SYBR green QPCR master mix » (Agilent Technologies) sur un thermocycleur MX3005P (Stratagène) en suivant le protocole du fournisseur. Les primers utilisés, à une concentration de 0.3 pmol/ $\mu$ L sont donnés dans l'annexe 1. *OAZI* a été utilisé comme gène de référence et l'expression relative des gènes d'intérêts a été calculée en utilisant la méthode comparative des  $\Delta\Delta C_t$  [1].

## 2.6 Cytométrie en flux

Afin de déterminer le meilleur ratio ADN/réactif lipofectamine pour la transfection de la lignée HaCaT avec le kit Lipofectamine 3000, nous avons testé quatre ratios différents, en suivant les protocoles des fournisseurs, qui sont : 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 (quantité d'ADN : quantité de lipofectamine). Les cellules ont été transfectées avec un plasmide contenant un gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP). La fluorescence a été mesurée au cytomètre en flux afin de déterminer l'efficacité maximale de transfection suivant les ratios. Sachant que la lipofectamine peut tuer les cellules, elles ont été traitées avec le produit LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies), que l'on appellera produit LD. Le produit LD est un composé qui a la particularité de se fixer sur les protéines. Si les cellules sont mortes, la membrane est beaucoup plus perméable que les cellules vivantes. Ce composé rentre alors dans la cellule et se fixe sur toutes les protéines intracellulaires. Par conséquent, une cellule morte marquée avec le produit LD aura une fluorescence beaucoup plus forte qu'une cellule vivante marquée avec ce même produit.

De la même manière, un marquage a été effectué pour déterminer si la lignée cellulaire HaCaT exprimait la protéine NOTCH1. Pour ce faire, un marquage avec anticorps anti-NOTCH1 couplé avec le fluorochrome Allophycocyanin (APC)(Biolegends, London, U.K) a été effectué.

## 2.7 Analyse statistiques

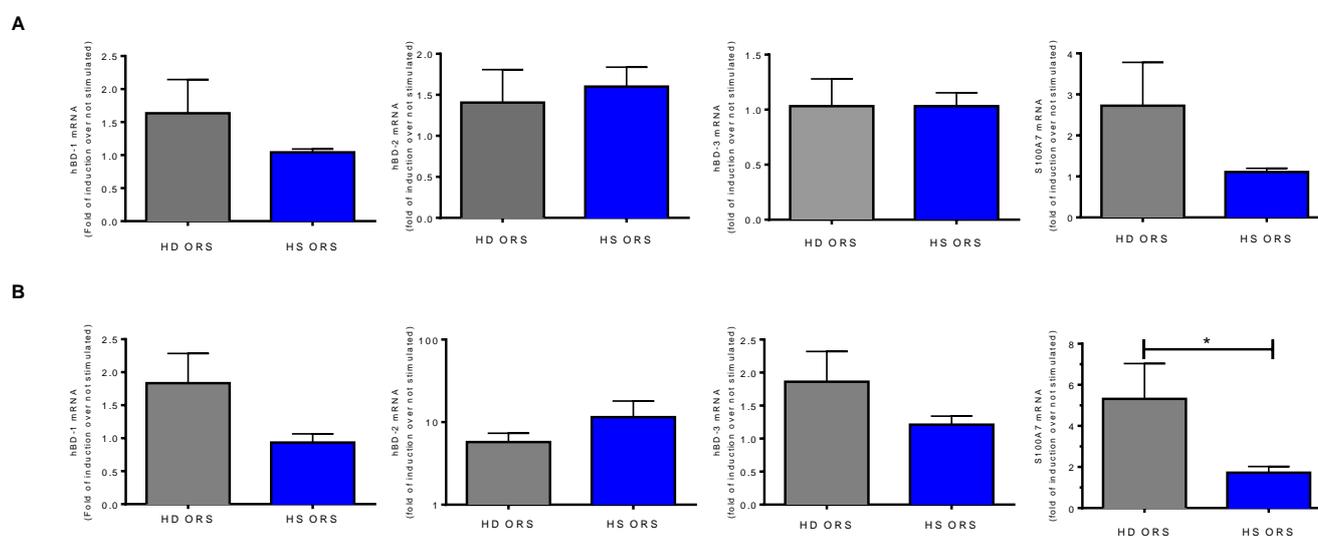
L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prism. La comparaison entre les groupes ou entre les moyennes a été réalisée en utilisant un test t. Une différence significative a été notée lorsqu'on avait une p-value inférieure à 0.05.

### 3. Résultats

#### 3.1 Défaut de production de peptides antimicrobiens par les kératinocytes des ORS HS par rapport aux individus sains.

Dans la maladie de Verneuil, les principales zones atteintes sont les follicules pileux, donc les poils. L'équipe a donc décidé d'étudier la réponse des kératinocytes de cellules d'ORS provenant de patients Verneuil et d'individus sains. De la même manière que les kératinocytes de la peau, ils ont été stimulés par des PAMPs pendant 6 heures : Muramyl Dipeptide (MDP) (agoniste de NOD2) et PAM2CSK4 (agoniste des TLRs 2/6) en étudiant l'expression de trois bêta-défensines : HBD1, HBD2 et HBD3, ainsi que l'expression de la psoriasine : S100A7 grâce à leur ARNm.

La régulation des trois Bêta-défensines étudiées après stimulation de NOD2 et des TLR2/6 n'est pas significativement différente entre les contrôles sains et les patients HS, avec toutefois une légère tendance à la baisse pour la Bêta-défensine 1 chez les patients HS (figure 13). En revanche, une diminution significative de la psoriasine est observée pour les patients HS avec MDP (pour PAM2CSK4, HD vs. HS  $p = n.s$  ; pour MDP HD vs. HS  $p = 0.049$ ). Les surnageants de culture ont été isolés après 24h de stimulation pour analyser les chimiokines et les cytokines avec les mêmes stimulations. Les échantillons sont en attente d'être analysés et les résultats ne sont donc pas présentés dans ce rapport.



**Figure 13** : Expression de PAMPs (HBD1, HBD2, HBD3, S100A7) dans les cellules ORS HS par rapport aux cellules ORS d'individus sains suite à une stimulation avec deux PAMPs. Les cellules ont été stimulées avec 100 ng/mL de PAM2CSK4 pendant 6h (A) ou par 10 µg/mL de MDP pendant 6h (B). L'expression de l'ARNm des gènes étudiés a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport au gène de référence *OAZ1*. L'expression relative a été mesurée par rapport à l'expression des gènes d'intérêts pour des échantillons non traités. Les données sont montrées comme la moyenne + SD de triplicats techniques et proviennent de 6 individus pour les ORS HS et de 5 individus pour les ORS sains.

## 3.2 Un signal NOTCH induit la sécrétion de peptides antimicrobiens chez les patients HS

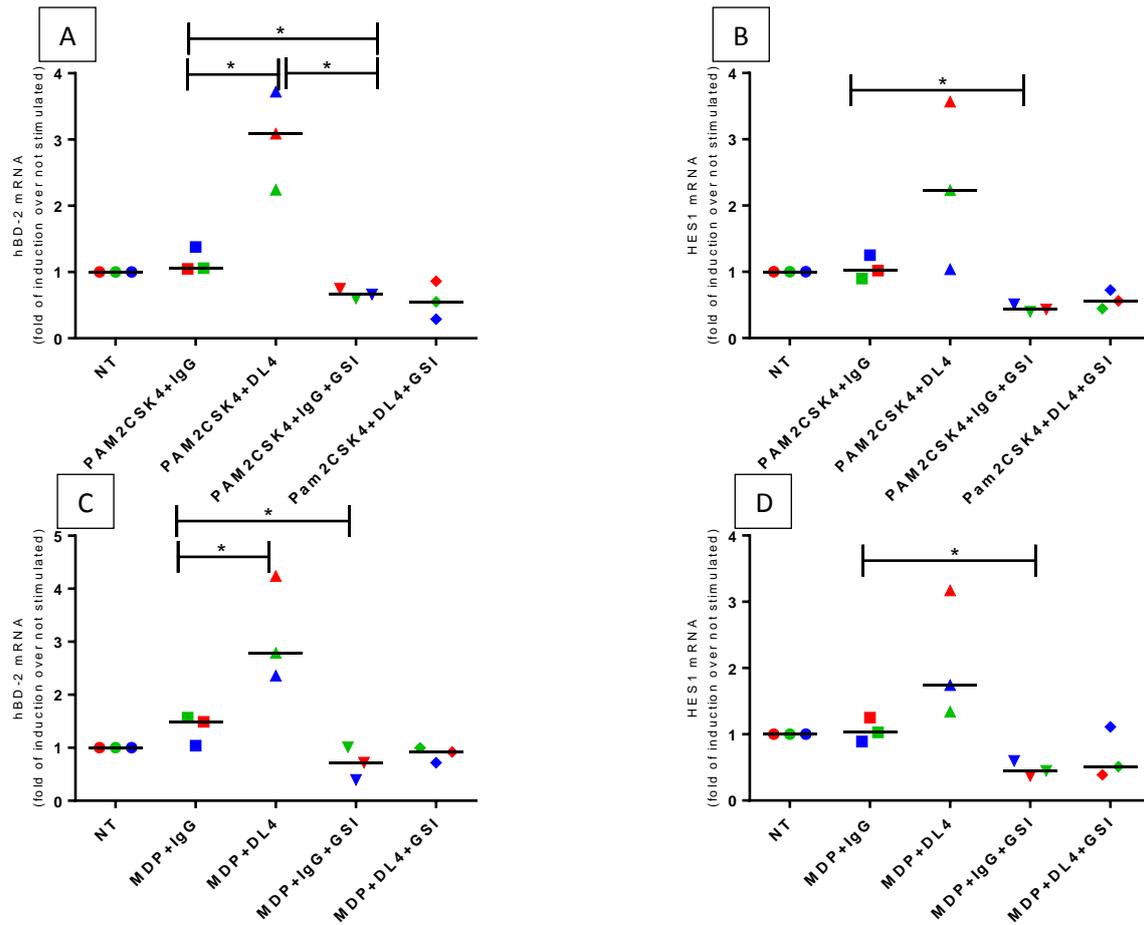
### 3.2.1 Stimulations d'ORS de patients HS par des ligands de NOTCH

Nous avons supposé qu'un signal NOTCH pourrait rétablir la synthèse de PAMs chez les patients HS. Pour tester notre hypothèse, les cellules d'ORS de patients HS ont été traitées pendant 24 heures avec ou sans ligand purifié de NOTCH : Delta Like 4 à 10µg/mL. Pour cette stimulation, le protocole de Karanu a été suivi (voir 2.3.2). Afin d'inhiber la voie de signalisation NOTCH, nous avons utilisé le composé E (appelé ici GSI : Gamma Secretase Inhibitor) à une concentration d'1µM. Après 18h de traitement, les cellules ont été stimulées avec 100 ng/mL de PAM2CSK4 pendant 6h ou 10 µg/mL de MDP pendant 6h. L'expression de l'ARNm des gènes étudiés a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport au gène de référence *OAZ1*.

Afin de suivre l'activation de la voie NOTCH à la suite de l'addition du ligand, la régulation du gène *HES1* a été étudiée. En présence d'un signal NOTCH, on observe une induction d'*HES1* pour les 2 stimulations (MDP ou PAM2CSK4) (Figures 14B et 14D). Par ailleurs, en présence de GSI, on observe une diminution de l'expression du gène *HES1* chez les 3 patients. Ces résultats indiquent donc que le système est fonctionnel.

En présence de PAM2CSK4, les cellules ORS traitées avec le ligand de NOTCH expriment 3 fois plus d'ARNm de Bêta-défensine 2 par rapport aux cellules traitées avec l'IgG ( $p=0.0425$ ) (Figures14A). En présence de MDP, le signal NOTCH triple également la production d'ARNm de Bêta-défensine 2 ( $p=0.0408$ ). Par ailleurs, en présence de l'inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase, on observe une diminution de la production d'ARNm de Bêta-défensine 2 de trois fois avec PAM2CSK4 ou MDP. Cette différence est significative pour la stimulation avec PAM2CSK4 ( $p=0.0187$ ).

La figure 14 suggère qu'un signal NOTCH chez les patients HS permet d'augmenter l'expression de Bêta-défensine 2 par les kératinocytes. Augmenter le signal NOTCH au niveau des kératinocytes pourrait donc être un axe thérapeutique pour limiter le déficit de production d'AMP. L'équipe s'est alors demandé s'il existait des composés pouvant donner un signal NOTCH aux cellules afin d'activer cette production de PAMs.

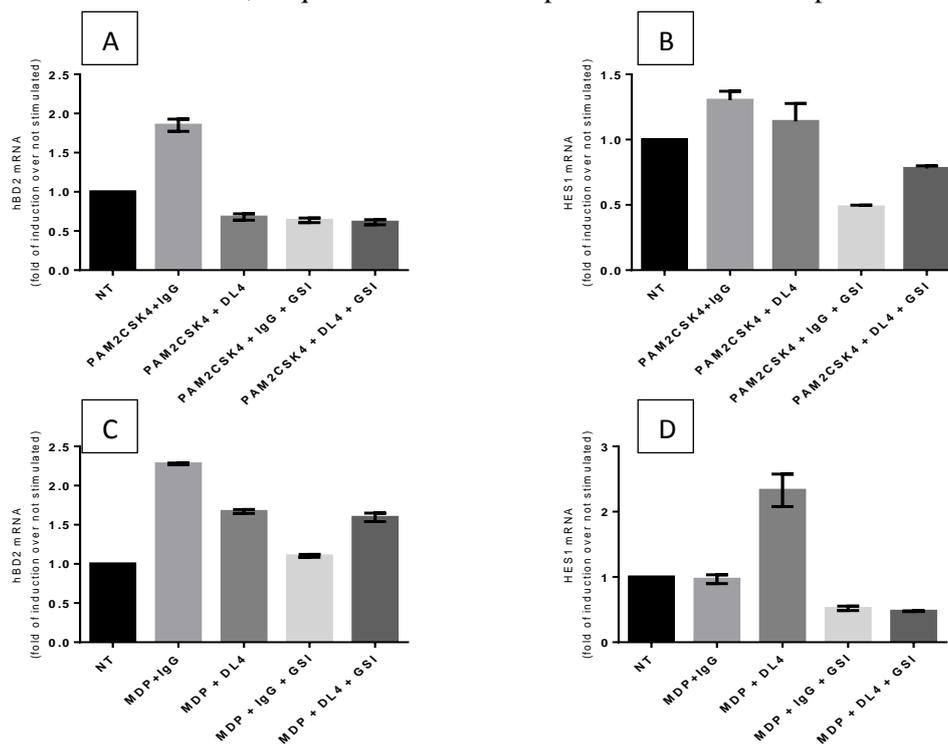


**Figure 14 :** Expression du gène *HES1* et du gène codant pour la Bêta-défensine 2 chez les cellules d'ORS HS après une stimulation avec un ligand de NOTCH. Les cellules ont été traitées pendant 18 heures avec ou sans ligand purifié de NOTCH Delta Like 4 à 10µg/mL. Ce ligand est fusionné avec la région Fc d'un anticorps IgG. L'IgG a donc été utilisé comme contrôle de DLL4 à une concentration de 10µg/mL. Pour inhiber la voie de signalisation NOTCH, le composé E a été utilisé (appelé ici GSI : Gamma Secretase Inhibitor) à une concentration d'1µM. Le contrôle de ce composé est le DMSO (résultats non montrés ici). Après 18h de traitement, les cellules ont été stimulées avec 100 ng/mL de PAM2CSK4 pendant 6h (A, B) ou par 10 µg/mL de MDP pendant 6h (C, D). L'expression de l'ARNm des gènes étudiés a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport au gène de référence *OAZ1*. L'expression relative a été mesurée par rapport à l'expression des gènes d'intérêts pour des échantillons non traités. Les données sont montrées comme la médiane de triplicats techniques et proviennent de 3 patients HS représentés par trois couleurs différentes.

### 3.2.2 Un cas particulier : stimulation de cellules d'ORS d'un patient HS qui possède une mutation de la Nicastrine

Le Dr. BONIOTTO a séquencé 3 gènes, dont les mutations ont été associées à l'HS, chez 20 patients de la cohorte créée par le Dr HOTZ. Il a ainsi démontré la présence de mutations de la  $\gamma$ -sécrétase pour 6 patients HS. Nous nous sommes intéressés ici au cas particulier d'un patient qui possède une mutation de la Nicastrine, une des quatre sous-unités de la  $\gamma$ -sécrétase. De la même manière que les trois patients précédents, les kératinocytes ont été stimulés avec deux PAMPs : MDP (agoniste de NOD2) et PAM2CSK4 (agoniste des TLRs2/6) en étudiant l'expression de la Bêta-défensine 2 et du gène *HES1*.

L'expression d'*HES1* ne semble pas varier en présence ou en absence de ligand si les cellules sont stimulées avec PAM2CSK4 (Figure 15B). En revanche, son expression double en présence du ligand DLL4 avec le Muramyl Dipeptide (Figure 15 D). De plus, l'ajout de l'inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase induit une baisse de l'expression d'*HES1*, que ce soit en présence de DLL4 ou en absence de ligand (avec IgG). L'expression d'*HES1* est ainsi réduite de moitié avec la stimulation PAM2CSK4 en présence de GSI. Pour la stimulation bactérienne avec le MDP, l'ajout de GSI provoque une diminution d'un facteur 4 de l'expression d'*HES1*. L'expression de la Bêta-défensine 2 ne semble pas varier avec ou sans ligand DLL4 en présence de PAM2CSK4 ou de MDP (Figure 15 A-C). Cependant, on constate que l'IgG en présence de PAM2CSK4 ou de MDP induit l'expression de l'ARNm de la Bêta-défensine 2 d'un facteur 2, ce qui rend les résultats plus difficilement interprétables.



**Figure 15 :** Expression du gène *HES1* et du gène codant pour la Bêta-défensine 2 chez les cellules ORS d'un patient muté après une stimulation avec un ligand de NOTCH. Les cellules ont été traitées pendant 18 heures avec ou sans ligand purifié DLL4 de NOTCH à 10 $\mu$ g/mL. Ce ligand est fusionné avec la région Fc d'un anticorps IgG. L'IgG a donc été utilisé comme contrôle de DLL4 à une concentration de 10 $\mu$ g/mL. Pour inhiber la voie de signalisation NOTCH, le composé E a été utilisé (appelé ici GSI : Gamma Secretase Inhibitor) à une concentration de 1 $\mu$ M. Le contrôle de ce composé est le DMSO (résultats non montrés ici). Après 18h de traitement, les cellules ont été stimulées avec 100 ng/mL de PAM2CSK4 pendant 6h (A, B) ou par 10  $\mu$ g/mL de MDP pendant 6h (C, D). L'expression de l'ARNm des gènes étudiés a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport au gène de référence *OAZ1*. L'expression relative a été mesurée par rapport à l'expression des gènes d'intérêts pour des échantillons non traités. Les données sont montrées comme la moyenne de triplicats techniques +SD et proviennent d'un patient HS possédant une mutation de la Nicastrine.

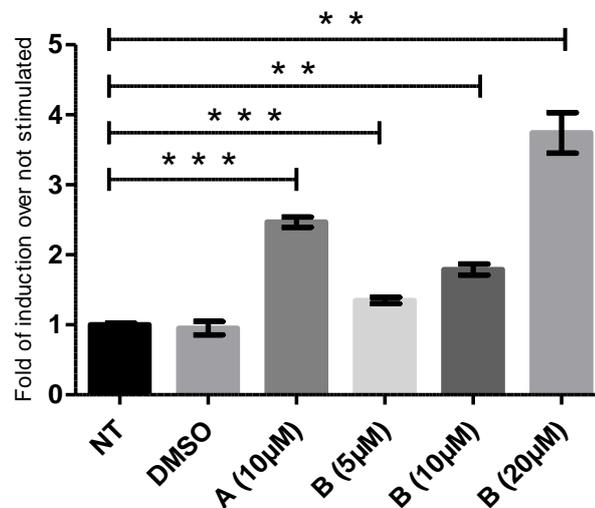
### 3.3 Les deux composés étudiés permettraient de donner un signal NOTCH aux cellules

Nous avons donc testé deux composés, notés A et B qui d'après la bibliographie augmentaient le signal NOTCH. Dans un premier temps, nous avons voulu reproduire les résultats de ces articles. Ces deux composés ont donc été testés sur un modèle simple en transfectant la lignée HEK293T avec un plasmide codant pour le récepteur NOTCH1, un plasmide rapporteur avec le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur dépendant du complexe NICD/RBPJ et un vecteur exprimant constitutivement le gène d'une autre luciférase comme contrôle interne de l'efficacité de transfection.

En présence du composé A à une concentration de 10 $\mu$ M, la luminescence des cellules traitées est 2.468 ( $\pm$ 0.0423) plus élevée que les cellules non traitées (NT vs A (10 $\mu$ M) :  $p= 0.0010$ ). (Figure 16). Les cellules ont également été mises en présence du composé A à une concentration de 50 $\mu$ M mais sont mortes.

Pour le composé B, l'augmentation de la concentration peut être corrélée à une augmentation de l'efficacité de ce composé pour l'activation du signal NOTCH, grâce à l'augmentation de la luminescence. Ainsi, à une concentration de 10 $\mu$ M, le signal NOTCH est 1.790 ( $\pm$ 0.0452) fois plus élevé que pour les cellules non traitées (NT vs B(10 $\mu$ M) :  $p = 0.00014$ ). A 20 $\mu$ M, le signal NOTCH est 3.742 ( $\pm$ 0.1673) fois plus élevé que pour les cellules non traitées (NT vs B (20 $\mu$ M) :  $p = 0.003$ ).

L'expérience valide donc bien la littérature pour les deux composés, à savoir qu'ils induisent un signal NOTCH.



**Figure 16** : Influence des composés A et B sur la voie de signalisation NOTCH. Les cellules de la lignée cellulaire HEK293T ont été transfectées avec le kit FuGENE 6 avec un plasmide codant pour NOTCH1 ainsi que deux autres plasmides codant pour la Renilla et la Firefly. Un jour après la transfection, elles ont été stimulées pendant 24h avec le composé A (10 $\mu$ M) ou le composé B (5, 10 et 20 $\mu$ M). Le contrôle est le DMSO. Les résultats ont été traités en normalisant l'activité de la luciférase et de la Firefly par rapport à l'échantillon non traité. Ils sont présentés ici comme la moyenne + SD de triplicats techniques.

### 3.4 Action des composés A et B sur la voie NOTCH et la production de PAMs

#### 3.4.1 La lignée HaCaT n'exprime pas la protéine NOTCH

Dans la mesure où les cellules primaires représentaient des échantillons précieux, l'équipe a décidé de tester les composés au préalable sur une lignée cellulaire de kératinocytes : la lignée HaCaT. Cela permettait de se rapprocher des conditions physiologiques. Les cellules HaCaT ont ainsi été mises en présence du composé A avec du MDP, afin de voir si la production de peptides antimicrobiens était restaurée. En effet, le composé A était censé donner un signal NOTCH permettant de restaurer la production de PAMs, d'après les hypothèses précédemment évoquées. Les résultats de l'analyse par RT-qPCR n'ont pas été concluants, dans la mesure où les gènes des Bêta-défensines 1, 2 et 3 n'étaient pas exprimés. L'équipe a alors décidé de vérifier si la lignée cellulaire HaCaT exprimait bien la protéine NOTCH à sa surface, grâce à un marquage au FACS.

La figure 17 démontre clairement que les cellules HaCaT n'expriment pas la protéine NOTCH puisque le signal mesuré en présence de l'anticorps anti-NOTCH est similaire au contrôle isotypique (0.272% de différence) (Figure 17C). Une transfection des HaCaT avec *NOTCH1* est donc nécessaire.

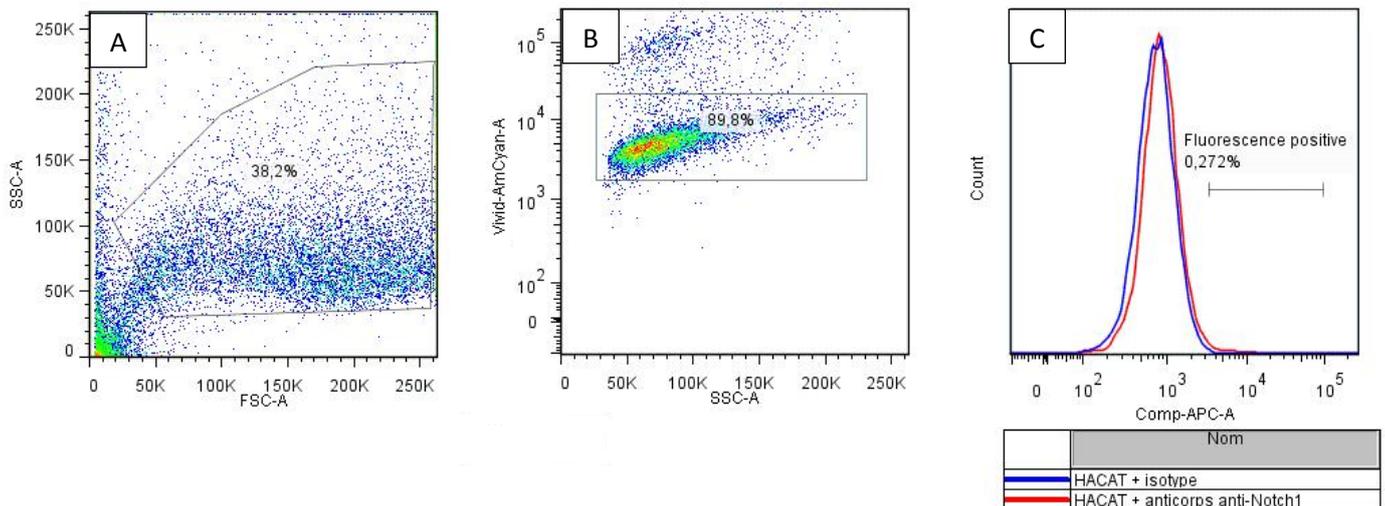
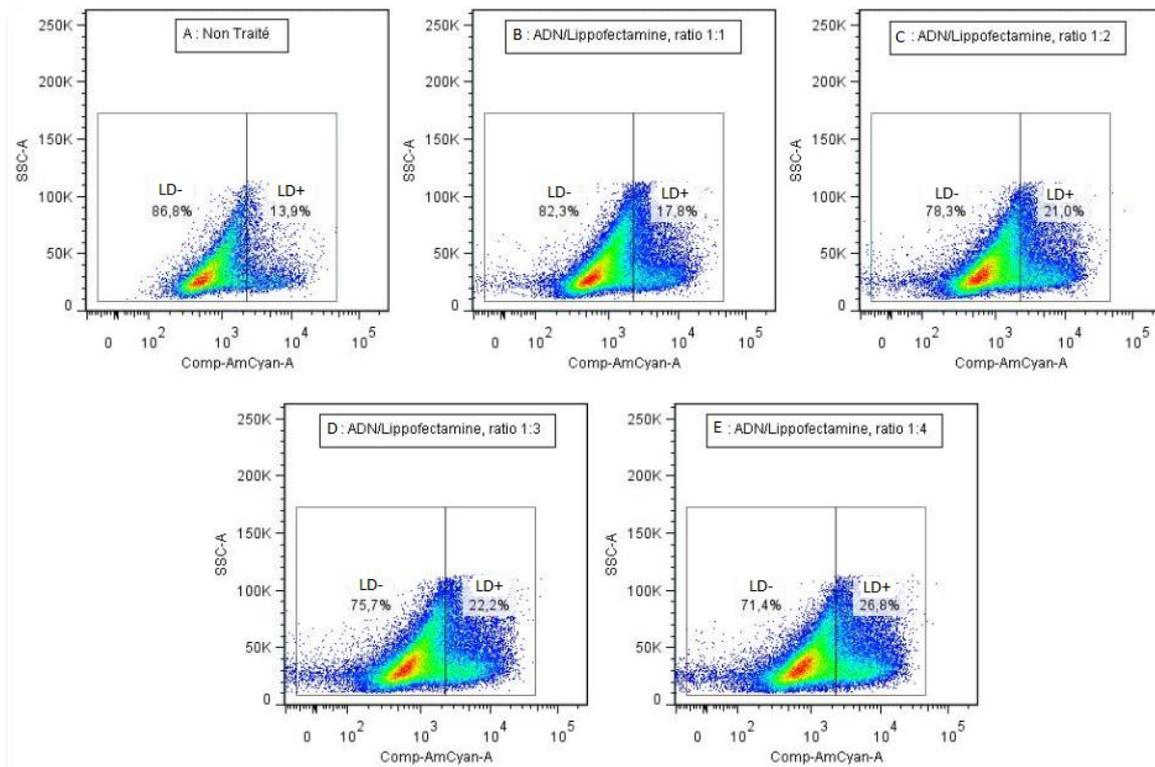


Figure 17 : Phénotypage des cellules de la lignée HaCaT avec un anticorps anti-NOTCH1, par cytométrie en flux. Les cellules ont été réparties en trois échantillons : un échantillon avec les cellules seules a servi à déterminer l'autofluorescence des cellules (non montré ici). Un deuxième échantillon a été marqué avec l'isotype de l'anticorps anti-NOTCH1, afin de soustraire la fluorescence non spécifique de l'anticorps NOTCH1. Les cellules du dernier échantillon ont été marquées avec l'anticorps anti-NOTCH1. A : Population de cellules HaCaT. B : HaCaT vivantes après ajout de Vivid. C : Histogramme comparant la fluorescence des cellules marquées avec l'isotype et des cellules marquées avec l'anticorps anti-NOTCH1.

### 3.4.2 Optimisation du protocole pour la transfection des HaCaT avec la Lipofectamine

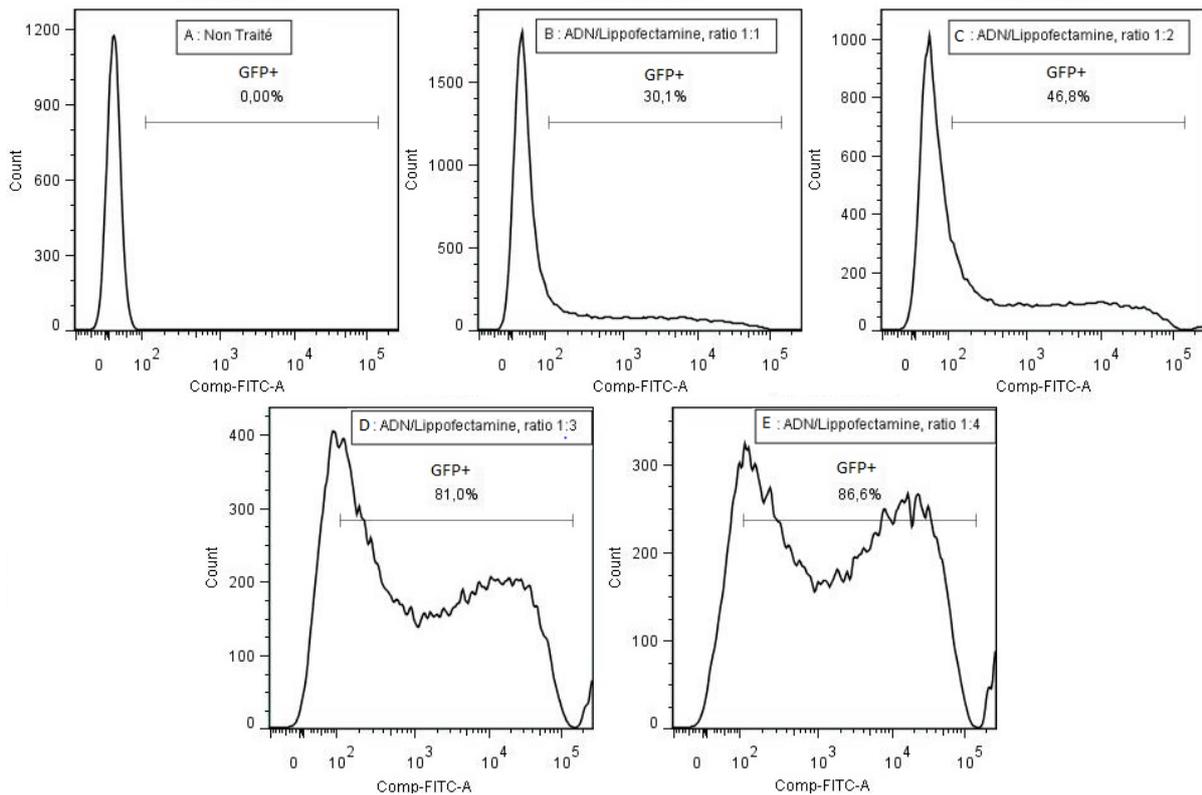
Le kit Lipofectamine 3000 Transfection Reagent a été utilisé pour transfecter la lignée cellulaire HaCaT avec les mêmes plasmides que pour la transfection des HEK293T. Cependant, la transfection a été optimisée en déterminant le meilleur ratio ADN/Lipofectamine pour une transfection optimale. Ainsi, 4 ratios ont été testés : 1:1 (2.5µg d'ADN plasmidique pour 2.5µL de Lipofectamine), 1:2, 1:3 et 1:4. Pour déterminer l'efficacité de la transfection, la Green Fluorescent Protein (GFP) a été transfectée. Les cellules ont été ensuite analysées par cytométrie en flux pour déterminer le ratio qui permettait la meilleure transfection, à savoir un haut rendement en termes de cellules transfectées avec toutefois le minimum de cellules mortes possible. En effet, une forte concentration en Lipofectamine peut affecter la viabilité des cellules. Un marquage avec le produit LD (voir 2.6) a ainsi été effectué.

D'après la figure 18, plus la quantité de lipofectamine utilisée pour la transfection augmente, plus le taux de cellules mortes augmente. Ainsi, pour un ratio 1 :4, on obtient un maximum de 26.8% de cellules ayant assimilé le produit LD, donc 26.8% de cellules mortes. Afin de trouver le meilleur ratio, l'efficacité de la transfection avec la GFP a été déterminée dans chaque condition pour les cellules vivantes, donc qui n'ont pas assimilé le produit LD.



**Figure 18 :** Analyse du taux de cellules mortes suite à une transfection avec différents ratios ADN/ lipofectamine, par cytométrie en flux. Les cellules ont été transfectées avec le kit Lipofectamine 3000 Transfection Reagent avec la GFP en testant 5 conditions différentes. Les cellules ont été marquées avec le produit LD. A : cellules non transfectées B : ratio ADN /Lipofectamine 1 :1 (2.5µg d'ADN plasmidique : 2.5µL de Lipofectamine). C : ratio 1 :2. D : ratio 1 :3. E : ratio 1 :4. La population de cellules vivantes a été repérée par l'annotation LD- (cellules n'ayant pas assimilé le produit) et les cellules mortes par LD+ (cellules dont la membrane perméable a permis l'entrée du composé : la fluorescence est donc plus élevée).

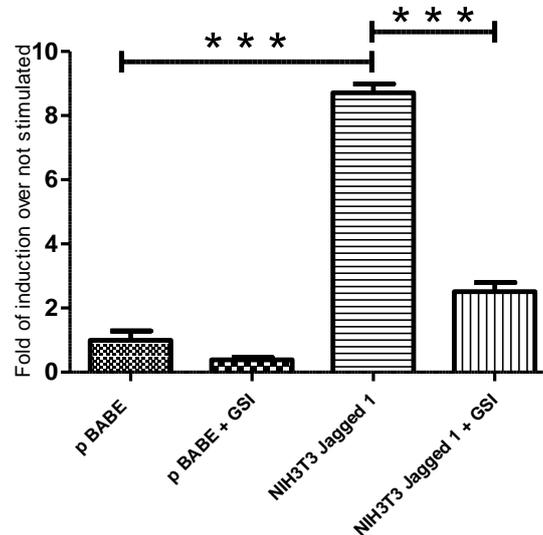
Plus la quantité de lipofectamine utilisée pour la transfection est importante, plus la transfection est efficace : on obtient 86.6% de cellules vivantes transfectées avec le ratio 1 :4 (figure 19). Cependant, une comparaison de la figure 19 avec la figure 18 démontre qu'avec le ratio 1 :2, on a 21.0% de cellules mortes pour 46.8% de cellules vivantes transfectées. Avec le ratio 1 :3, 22.2% des cellules sont mortes et 81.0% des cellules vivantes ont été transfectées. Enfin avec le ratio 1 :4, 26.8% des cellules sont mortes et 86.6% des cellules vivantes ont été transfectées. Le ratio 1 :3 semble donc le meilleur ratio en terme d'efficacité de la transfection par rapport au nombre de cellules mortes.



**Figure 19** : Analyse de l'efficacité de la transfection de la GFP avec différents ratios ADN/ lipofectamine, par cytométrie en flux. Les cellules ont été transfectées avec le kit Lipofectamine 3000 Transfection Reagent avec la GFP en testant 5 conditions différentes. Seules les cellules n'ayant pas assimilé le produit LD ont été sélectionnées (voir figure 18 : cellules LD-). A : cellules non transfectées B : ratio ADN /Lipofectamine 1 :1 (2.5µg d'ADN plamisdique : 2.5µL de Lipofectamine. C : ratio 1 :2. D : ratio 1 :3. E : ratio 1 :4. La fluorescence de la GFP a été déterminée en prenant comme référence les cellules non transfectées (A).

### 3.4.3 Le composé A induit un signal NOTCH dans les cellules HaCaT transfectées avec NOTCH 1.

Afin de vérifier si la transfection avait été effective, les cellules HaCaT ont été stimulées avec un ligand de NOTCH. Cette expérience sert ainsi de contrôle positif.

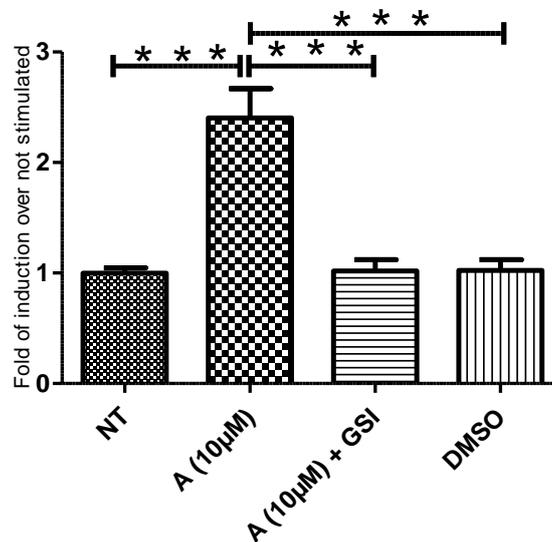


**Figure 20 :** Résultats de la luminescence de cellules HaCaT transfectées en cocultures avec deux lignées de fibroblastes : NIH3T3 Jagged 1 (transfection permanente avec un plasmide codant pour Jagged 1) et NIH3T3 p B A B E (transfection permanente avec le vecteur vide). Les cellules de la lignée cellulaire HaCaT ont été transfectées avec le kit Lipofectamine 3000 Transfection Reagent avec un plasmide codant pour NOTCH1, la Renilla et la Firefly. Un jour après la transfection, elles ont été placées en cocultures avec les lignées de fibroblastes pendant 24h ainsi qu'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase (composé E : GSI à 1 $\mu$ M). Les résultats ont été traités en normalisant l'activité de la Renilla et de la Firefly par rapport à l'activité des HaCaT en cocultures avec les pB A B E sans GSI. Ils sont présentés ici comme la moyenne + SD de triplicats.

En présence des fibroblastes de la lignée NIH3T3 Jagged 1, exprimant ainsi le ligand de NOTCH, Jagged-1, la luminescence des HaCaT est 8.714 ( $\pm$ 0.2718) fois plus élevée qu'en absence de ligand, avec la lignée NIH3T3 p B A B E. Cette différence est significative ( $p < 0.0001$ ) (figure20).

En présence d'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase et du ligand Jagged1, la luminescence des cellules est 2.514 ( $\pm$ 0.2857) plus élevée que les cellules en cocultures avec NIH3T3 p B A B E. Elle est donc 4 fois moins importante que les cellules stimulées avec Jagged 1 ( $p < 0.0001$ ). Sachant que la  $\gamma$ -sécrétase intervient dans la voie de signalisation NOTCH, cette diminution significative indique que la luminescence est due au signal NOTCH, en l'occurrence au clivage de la protéine NOTCH1 intracellulaire qui va migrer dans le noyau et permettre l'expression du gène codant pour la Firefly. Ainsi notre système de transfection de NOTCH1 est bien effectif avec la lignée cellulaire HaCaT.

Suite aux expériences préliminaires effectuées sur la lignée cellulaire HEK293T, nous avons décidé de tester le composé A sur la lignée cellulaire HaCaT, transfectée avec *NOTCH1*. La figure 21 montre l'influence du composé A sur la voie de signalisation NOTCH. La luminescence est multipliée par 2.4 ( $\pm 0.2631$ ) en présence du composé A à une concentration de 10 $\mu$ M par rapport aux cellules non traitées (NT vs A (10 $\mu$ M) :  $p < 0.0001$ ). Si on rajoute la GSI, on constate une diminution significative de la luminescence à 1.018 ( $\pm 0.1039$ ) (A (10 $\mu$ M) vs A (10 $\mu$ M) +GSI :  $p = 0.0002$ ). Donc le composé A induit bien un signal NOTCH. Sachant que le composé A et la GSI sont dilués dans le DMSO, une partie des cellules a également été traitée avec le DMSO. La luminescence mesurée en présence de DMSO seul est similaire à celle mesurée en absence de traitement (NT), démontrant l'absence d'effet du DMSO sur le signal NOTCH. De plus, la différence de luminescence entre le composé A et le DMSO est significative ( $p = 0.0002$ ). Le composé A induit donc un signal NOTCH dans la lignée cellulaire HaCaT.



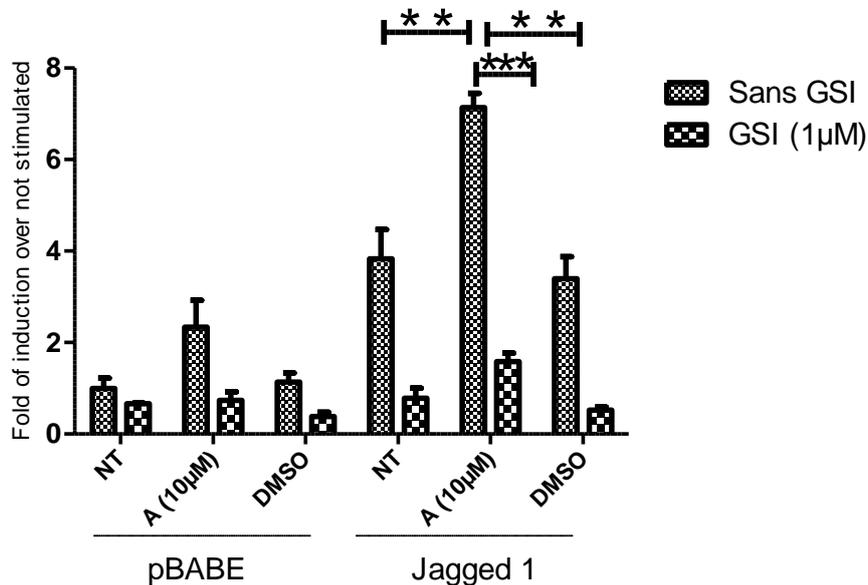
**Figure 21** : Influence du composé A sur la voie de signalisation NOTCH. Les cellules de la lignée cellulaire HaCaT ont été transfectées avec le kit Lipofectamine 3000 Transfection Reagent avec un plasmide codant pour NOTCH1, la Renilla et la Firefly. Un jour après la transfection, elles ont été stimulées pendant 24h avec le composé A (10 $\mu$ M), avec le composé A (10 $\mu$ M) et un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase (composé E : GSI à 1 $\mu$ M). Le contrôle des composés A et du composé E est le DMSO. Les résultats ont été traités en normalisant l'activité de la Renilla et de la Firefly par rapport à l'échantillon non traité. Ils sont présentés ici comme la moyenne + SD de triplicats. L'expérience a été répétée trois fois.

### 3.4.3 La présence d'un ligand de NOTCH potentialise l'induction du signal NOTCH par le composé A, au contraire du composé B.

Afin de se rapprocher au plus des conditions physiologiques, l'équipe a décidé de faire des cocultures de cellules HaCaT transfectées avec NOTCH1 en présence de lignées de fibroblastes produisant le ligand Jagged1. Le témoin utilisé était la lignée de fibroblastes pBABE ne produisant aucun ligand. La lignée de kératinocytes a ainsi été stimulée par chacun des deux composés à différentes concentrations.

La figure 22 montre l'influence du composé A sur la voie de signalisation NOTCH. En coculture avec les pBABE, donc en absence de ligand, on peut constater que la luminescence des cellules HaCaT en présence du composé A est multipliée par 2.338 ( $\pm 0.5852$ ) par rapport aux cellules non traitées. A nouveau, le DMSO dans lequel est dissous le composé A n'a pas d'influence sur les cellules. Avec l'ajout d'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase, malgré la présence du composé A avec les pBABE, la luminescence est de 0.7385 ( $\pm 0.1865$ ). Ce composé agit donc exclusivement sur la voie NOTCH.

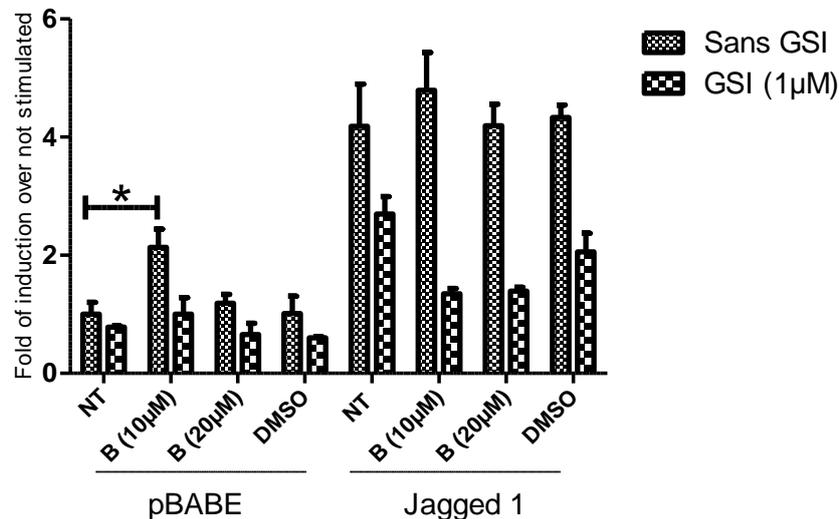
L'utilisation de la lignée NIH3T3 Jagged 1 a permis de se replacer dans des conditions physiologiques. La luminescence est donc plus élevée chez les HaCaT non traitée en présence de ligand par rapport aux HaCaT en cocultures avec les pBABE : elle est de 3.831 ( $\pm 0.6401$ ). Cependant, avec l'ajout du composé A, on augmente le signal NOTCH de façon significative jusqu'à 7.138 ( $\pm 0.3123$ ), soit près de deux fois plus que des cellules non traitées et stimulées par le ligand Jagged 1 (pour les cocultures avec Jagged 1 : NT vs. A (10 $\mu$ M) :  $p = 0.0097$ ). Le DMSO n'a encore une fois aucun effet par rapport aux cellules traitées avec A à 10 $\mu$ M, et ce de façon significative ( $p = 0.0028$ ). La présence de ligand permet donc de potentialiser l'effet du composé A et d'accroître son efficacité.



**Figure 22 :** Résultats de la luminescence de cellules HaCaT transfectées en cocultures avec deux lignées de fibroblastes : NIH3T3 Jagged 1 (transfection permanente avec plasmide codant pour Jagged 1) et NIH3T3 p B A B E (transfection permanente avec le vecteur vide), en présence du composé A. Les cellules de la lignée cellulaire HaCaT ont été transfectées avec le kit Lipofectamine 3000 Transfection Reagent avec un plasmide codant pour NOTCH1, la Renilla et la Firefly. Un jour après la transfection, elles ont placées en cocultures avec les lignées de fibroblastes avec ou sans le composé A à 10 $\mu$ M pendant 24h ainsi qu'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase (composé E : GSI à 1 $\mu$ M). Le DMSO a été utilisé comme contrôle. Les résultats ont été traités en normalisant l'activité de la luciférase et de la Firefly par rapport à l'activité des HaCaT en cocultures avec les pBABE sans GSI. Ils sont présentés ici comme la moyenne + SD de triplicats.

La figure 23 montre l'influence du composé B sur la voie de signalisation NOTCH. En coculture avec les pBABE, donc en absence de ligand, on peut constater qu'en présence du composé B à une concentration de 10µM, la luminescence des cellules HaCaT est multipliée par 2.132 ( $\pm 0.3085$ ) par rapport aux cellules non traitées ( $p = 0.0378$ ). En revanche, à une concentration de 20µM, le composé ne semble plus avoir d'effets. L'ajout d'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase diminue la luminescence des cellules en présence du composé B à 10µM de moitié par rapport aux cellules traitées avec B à 10µM et sans GSI. Le DMSO quant à lui n'a aucun effet. Le composé B semble donc agir également sur la voie NOTCH.

En cocultures avec la lignée NIH3T3 Jagged 1, la luminescence est sensiblement identique pour les cellules non traitées, les cellules traitées avec le composé B à 10µM et 20µM ainsi que les cellules traitées avec le DMSO. L'ajout d'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase diminue fortement cette luminescence : celle-ci semble même être plus faible en présence du composé B à 10µM ( $1.346 \pm 0.09243$ ) qu'avec les cellules non traitées ( $2.698 \pm 0.2972$ ). Si le composé B semble activer le signal NOTCH s'il est utilisé seul et à faible dose, la présence de ligand ne permet pas de potentialiser son effet. En se rapprochant des conditions physiologiques, on s'aperçoit que le composé B n'a aucun effet sur le signal NOTCH.



**Figure 23 :** Résultats de la luminescence de cellules HaCaT transfectées en cocultures avec deux lignées de fibroblastes : NIH3T3 Jagged 1 (transfection permanente avec plasmide codant pour Jagged 1) et NIH3T3 p BABE (transfection permanente avec le vecteur vide), en présence du composé B. Les cellules de la lignée cellulaire HaCaT ont été transfectées avec le kit Lipofectamine 3000 Transfection Reagent avec un plasmide codant pour NOTCH1, la Renilla et la Firefly. Un jour après la transfection, elles ont placées en cocultures avec les lignées de fibroblastes avec ou sans le composé B à 10µM et 20µM pendant 24h ainsi qu'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase (composé E : GSI à 1µM). Le DMSO a été utilisé comme contrôle. Les résultats ont été traités en normalisant l'activité de la luciférase et de la Firefly par rapport à l'activité des HaCaT en cocultures avec les pBABE sans GSI. Ils sont présentés ici comme la moyenne + SD de triplicats.

### 3.4.4 Le composé A ne permet pas de restaurer une production de peptides antimicrobiens

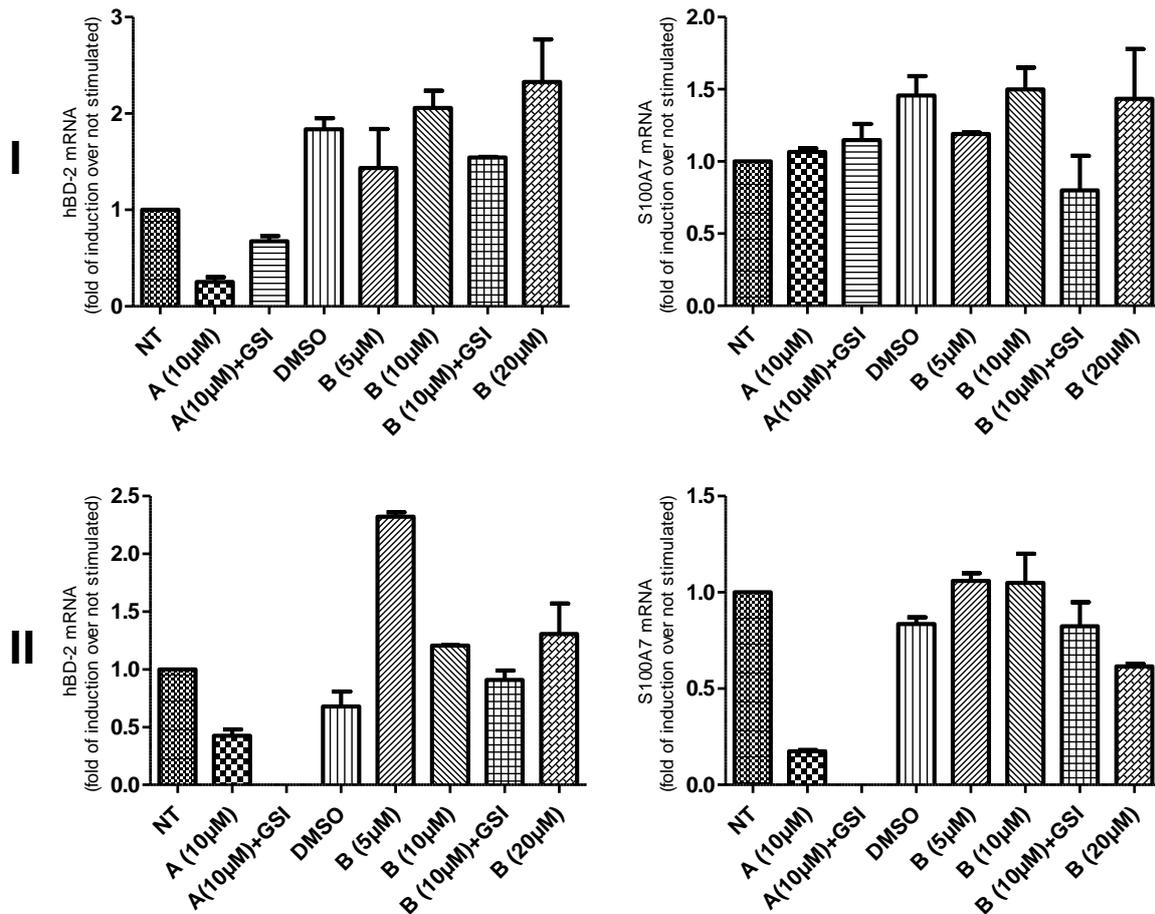
L'équipe a décidé de tester ces composés sur des cellules primaires d'individus sains, en regardant s'ils permettaient la production de peptides antimicrobiens. En effet, selon notre hypothèse, la restauration d'un signal NOTCH devrait permettre la production de PAMs. Dans l'expérience précédente, nous avons constaté que le composé A à une concentration de 10 $\mu$ M permettait d'augmenter le signal NOTCH. Les cellules primaires de deux individus sains (notés I et II) ont donc été stimulées avec les deux composés pendant 24h. Puis l'ARNm a été extrait afin d'analyser l'expression des gènes codants pour la bêta-défensine 2 (HBD2) ainsi que la psoriasine (S100A7).

La figure 24 démontre une inhibition de la production de Bêta-défensine 2 pour les deux individus sains par le composé A : sa production est diminuée de 50% à 80%. Pour l'individu II, l'expression du gène codant la psoriasine est également réprimée.

Le composé B quant à lui semble avoir un effet sur la production de Bêta-défensine 2 de l'individu II. L'expression de l'ARNm codant pour cette protéine est multipliée par deux avec la stimulation du composé B à 5 $\mu$ M par rapport aux cellules non traitées. En revanche, pour l'individu I, même si le composé B semble agir et augmenter de près de deux fois l'expression de la Bêta-défensine 2, le contrôle avec le DMSO indique que ces résultats semblent davantage provenir de la présence du DMSO plutôt que du composé B lui-même. Le composé B n'a par ailleurs aucun effet sur la production de psoriasine des deux individus.

L'ajout de GSI devait permettre à l'équipe de visualiser l'influence du signal NOTCH avec la production de PAMs et les composés à tester. Pour l'individu II, aucune donnée n'est disponible à cause de la mort des cellules, sans doute due à une erreur de manipulation. L'expérience est donc à réitérer pour être mieux interprétée. Pour l'individu I, la GSI diminue l'expression de HBD2 et de S100A7 en présence du composé B, mais pas en présence du composé A. Ceci est certainement dû à la présence du DMSO.

Ces résultats suggèrent que le composé A diminue la production de PAMs pour les cellules d'ORS d'individus sains : il ne permettra donc pas de restaurer cette production pour les individus HS. Le composé B quant à lui semble restaurer au moins la production d'HBD2, mais cela dépend des individus.



**Figure 24 :** Influence des composés A et B sur la production de PAMs (HBD2 et S100A7) par des cellules d'ORS de deux individus sains. Les cellules ont été stimulées pendant 24 heures avec le composé A (10µM) ou B (5µM, 10µM et 20µM). Pour inhiber la voie de signalisation NOTCH, la GSI a été utilisée à une concentration d'1µM. Le contrôle de ce composé est le DMSO. L'expression de l'ARNm des gènes étudiés a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport au gène de référence *OAZI*. L'expression relative a été mesurée par rapport à l'expression des gènes d'intérêts pour des échantillons non traités. Les données sont montrées comme la moyenne de triplicats techniques +SD et proviennent de deux individus sains notés I et II.

Pour finir, afin d'étudier l'efficacité de ces deux composés en cas de stimulations bactériennes, l'équipe a testé ces composés pendant 18h sur les cellules primaires des deux individus sains décrits précédemment. Puis les PRRs des cellules des ORS ont été stimulés pendant 6 h par du MDP. L'ARNm a été extrait pour étudier la production de Bêta-défensine 2 par RT-QPCR.

La figure 25 démontre que le composé A diminue la production de Bêta-défensine 2 pour les deux individus. Le résultat est flagrant pour l'individu II pour qui la production de Bêta défensine est divisée par trois avec ce composé.

Le composé B semble améliorer la production de Bêta-défensine 2 pour l'individu 2. Les cellules seules produisent 4 fois plus de Bêta-défensine en présence MDP par rapport aux cellules non traitées. Avec l'ajout du composé B 5µM, la production d'ARNm codant pour la Bêta-défensine est multipliée par 6 par rapport aux cellules non traitées. On note donc une amélioration d'un facteur 1.5. En revanche pour l'individu II, la production d'ARNm de Bêta-défensine 2 avec les cellules seules en présence de MDP par rapport aux cellules non traitées est multipliée 35. Avec l'ajout du composé B à 5µM, cette production est multipliée 19. Le composé B semble donc inhiber les défenses « naturelles » des cellules. Pour les deux patients, le DMSO a une forte influence et induit une production de Bêta-défensine similaire à celle du composé B.

Ces résultats confirment l'inhibition de la production de Bêta-défensine 2 par le composé A. Le composé B quant à lui augmente la production de Bêta-défensine 2 pour un seul des deux individus. Si les défenses « naturelles » des cellules sont déjà élevées, il n'a aucun intérêt. Pour les malades en revanche, il pourra peut-être augmenter légèrement la production de PAMs. Les expériences sont à répéter pour confirmer ces résultats préliminaires dans la mesure où ils peuvent être faussés par le DMSO présent lors de la stimulation avec les composés.

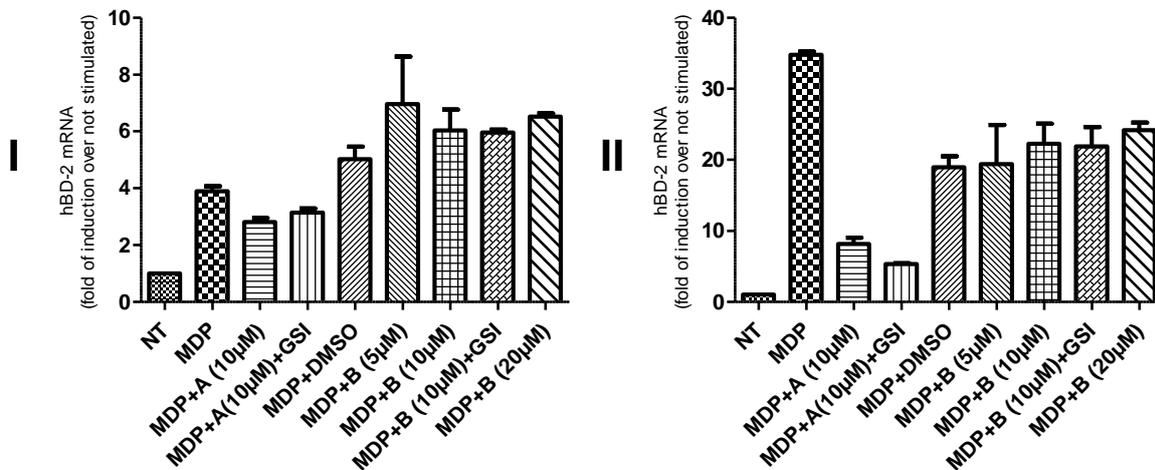


Figure 25 : Influence des composés A et B sur la production de Bêta-défensine 2 par des cellules d'ORS de deux individus sains stimulés avec MDP. Les cellules ont été stimulées pendant 18 heures avec le composé A (10µM) ou B (5µM, 10µM et 20µM) puis le MDP a été rajouté pendant 6 heures à une concentration de 10µg/mL. Pour inhiber la voie de signalisation NOTCH, la GSI a été utilisée à une concentration d'1µM. Le contrôle de ce composé est le DMSO. L'expression de l'ARNm des gènes étudiés a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport au gène de référence *OAZ1*. L'expression relative a été mesurée par rapport à l'expression des gènes d'intérêts pour des échantillons non traités. Les données sont montrées comme la moyenne de triplicats techniques +SD et proviennent de deux individus sains notés I et II.

## 4. Discussion

---

Le rôle des PAMs dans l'HS est très controversé. Certaines études ont démontré qu'il y avait une augmentation de la production de peptides antimicrobiens dans les lésions de patients HS par rapport aux individus sains (Schlapbach et al., 2009) tandis que d'autres études ont montré une déficience de la production de certains PAMs. En particulier Wolk et al. (2011) a démontré par qPCR sur les biopsies de patients que les lésions de patients HS produisaient moins de PAMs que les lésions de personnes atteintes de psoriasis ou de dermatite atopique. Il a observé un défaut de production d'IL-22 et a donc associé le défaut de sécrétion de PAMs à un défaut de leur induction par l'IL-22.

Pour sortir de l'influence du contexte inflammatoire sur la production de PAMs par les kératinocytes, nous avons décidé d'isoler les cellules et de les stimuler par des agonistes de différents PRRs. Les expériences précédentes du Dr BONIOTTO ont démontré que les kératinocytes isolés de la peau produisaient moins de PAMs, en l'occurrence moins de Bêta-défensine 2 (HBD2) et de psoriasine (S100A7). Dans la mesure où l'HS est décrite comme une maladie du follicule pileux, l'équipe a optimisé un protocole d'isolement des cellules de la gaine externe du follicule pileux pour étudier leurs réponses aux PAMPs. Ces cellules produisent significativement moins de psoriasine que les individus sains après stimulation de récepteurs extracellulaires comme les TLRs 2/6 ou des récepteurs intracellulaires comme NOD2. La psoriasine, codée par le gène *S100A7*, est une protéine de petite taille avec un poids moléculaire de 11kDa. Elle a une activité antimicrobienne majeure contre les bactéries Gram négatif comme *Escherichia coli*. A plus forte concentration, elle a une activité bactéricide contre *Staphylococcus aureus* (Gläser et al., 2005). Enfin, elle participe également au recrutement des lymphocytes T CD4+ et des neutrophiles (Jinquan et al., 1996). Ce défaut de production de psoriasine par les kératinocytes d'ORS pourrait influencer la colonisation bactérienne des follicules pileux (Jahns et al., 2014). Dans le modèle de Berna-Serna et Berna-Mestre, lors de la rupture du follicule pileux et de l'invasion du derme par les bactéries, cela pourrait causer l'inflammation typique que l'on retrouve chez les patients HS. Il reste à déterminer si et comment le microbiome de la peau des patients HS est influencé par la production réduite de certains PAMs. Cette modification de la flore commensale pourrait également modifier la réponse immunitaire adaptative dans cette maladie. Des études sur des modèles murins ont montré que les souris knock-out pour *defb14* (homologue du gène codant pour HBD3 chez les humains) ont en effet montré que certaines bactéries présentes sur la peau de ces souris ne sont pas retrouvées chez les souris « sauvages » (Dr. BONIOTTO, communication orale).

Par ailleurs, d'après le travail du Dr HOTZ sur l'interaction entre les kératinocytes et les lymphocytes T, il semblerait que les kératinocytes des patients HS ne donnent pas de signal chimioattractant pour que les lymphocytes T migrent et produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 (HOTZ et al., article en préparation). Comme les interleukines IL-17 et IL-22 sont deux cytokines très importantes pour induire la production de PAMs par les kératinocytes, ce déficit va entretenir le défaut de sécrétion de peptides antimicrobiens par les kératinocytes.

Puisque dans l'HS, les mutations génétiques de la  $\gamma$ -sécrétase semblent réduire la signalisation des récepteurs NOTCH (Pink et al., 2013), l'équipe a voulu tester si cette voie pouvait être impliquée dans la sécrétion de PAMs par les kératinocytes. Les résultats suggèrent qu'un signal NOTCH donné aux cellules HS pourrait restaurer la production de peptides antimicrobiens, notamment la production de Bêta-défensine 2. Ainsi, une stimulation NOTCH peut contribuer à augmenter la réponse des cellules face à une stimulation de leurs PRRs. Il faudrait donc tester si cette même stimulation sur des cellules d'ORS de patients HS possédant une mutation fonctionnelle des gènes de la  $\gamma$ -sécrétase permettrait aussi d'augmenter la production de PAMs.

Dans le cas contraire, un test génétique avec une thérapie personnalisée devra être proposé aux patients HS. Nous avons justement étudié un patient porteur d'une mutation dans la  $\gamma$ -sécrétase. Les résultats sont difficiles à interpréter puisqu'il s'agit d'une étude sur un seul patient. L'étude sur les autres patients mutés donnera plus de résultats. L'hypothèse la plus probable est que nous ayons été confrontés à un problème technique à cause de l'Immunoglobuline qui augmente la production des PAMs alors qu'elle ne devrait pas. L'hypothèse d'une contamination de l'ADN lors de la qPCR a été écartée par vérification et répétition de l'expérience. Le problème semble donc provenir de la stimulation elle-même. L'idéal serait ainsi de refaire l'expérience. Cependant, l'obtention de nombreuses cellules issues de la gaine externe du follicule pileux de patients est un long processus de plusieurs semaines. La difficulté de la culture des cellules primaires a ainsi restreint le nombre de répétitions à cause des problèmes évoqués dans la partie matériel et méthode (partie 2.2.3).

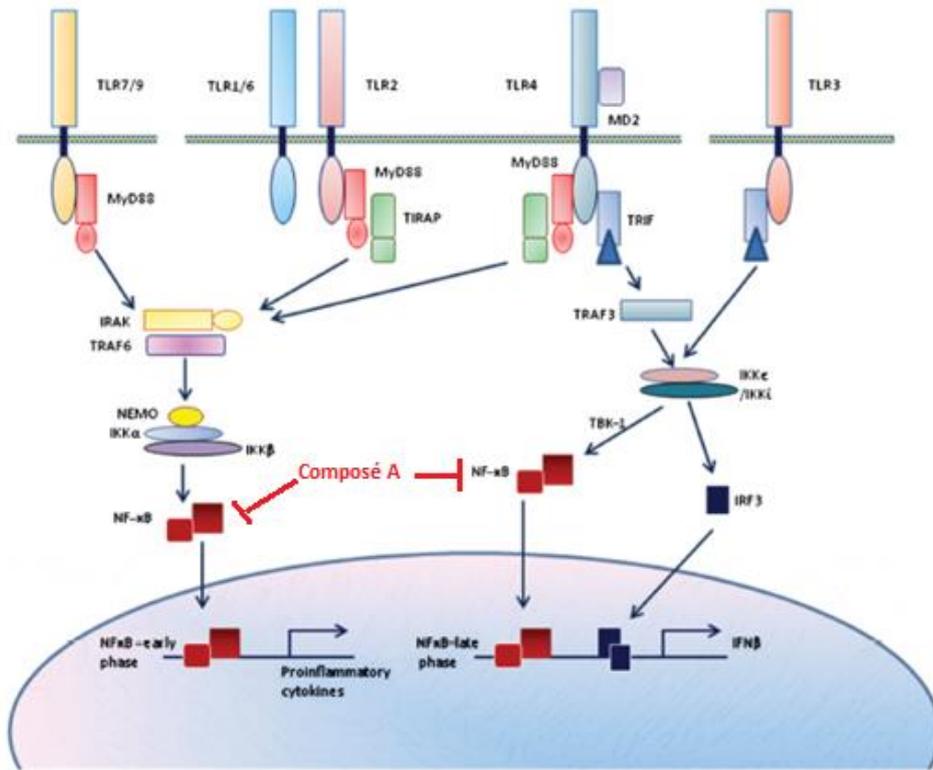
Un signal NOTCH déficient pourrait ainsi être la cause de la maladie. Cela pourrait conduire à un problème de différenciation des cellules souches présentes dans la gaine externe du follicule pileux. Un traitement permettant d'augmenter le signal NOTCH dans le follicule pileux pourrait permettre de soigner l'HS.

Deux composés capable d'augmenter le signal NOTCH pour d'autres pathologies ont été testés (bibliographie non citée pour des raisons de confidentialité). L'étude de ces composés a permis de démontrer qu'ils permettaient de d'augmenter le signal des récepteurs NOTCH. Les résultats de l'étude sur la lignée cellulaire HEK293T ont été très encourageants. En revanche, lorsque l'équipe s'est rapprochée des conditions physiologiques en effectuant des cocultures de cellules HaCaT avec les lignées de fibroblastes, le composé B s'est avéré moins intéressant que le composé A. S'il permet d'augmenter le signal NOTCH avec les HaCaT et les fibroblastes n'exprimant pas le ligand, la présence de ligand montre que ce dernier a plus d'effet que le composé B. En revanche, l'action du composé A est potentialisée par le ligand, ce qui permet d'obtenir près du double de l'effet des cellules non traitées et mises simplement en cocultures avec les fibroblastes exprimant Jagged 1.

Si le composé A permet de restaurer la voie NOTCH, il n'en est pas de même pour la production de peptides antimicrobiens. Dans la mesure où l'équipe avait suffisamment de cellules primaires au moment de tester les composés, les composés ont été testés directement sur ces dernières sans faire d'expérience sur la lignée HaCaT. Les études préliminaires réalisées sur des cellules primaires avec le composé A ont démontré une diminution de la production de peptides antimicrobiens. Par rapport aux cellules non traitées, le composé A diminue de près de 80% la production de bêta-défensine 2 ou de psoriasine.

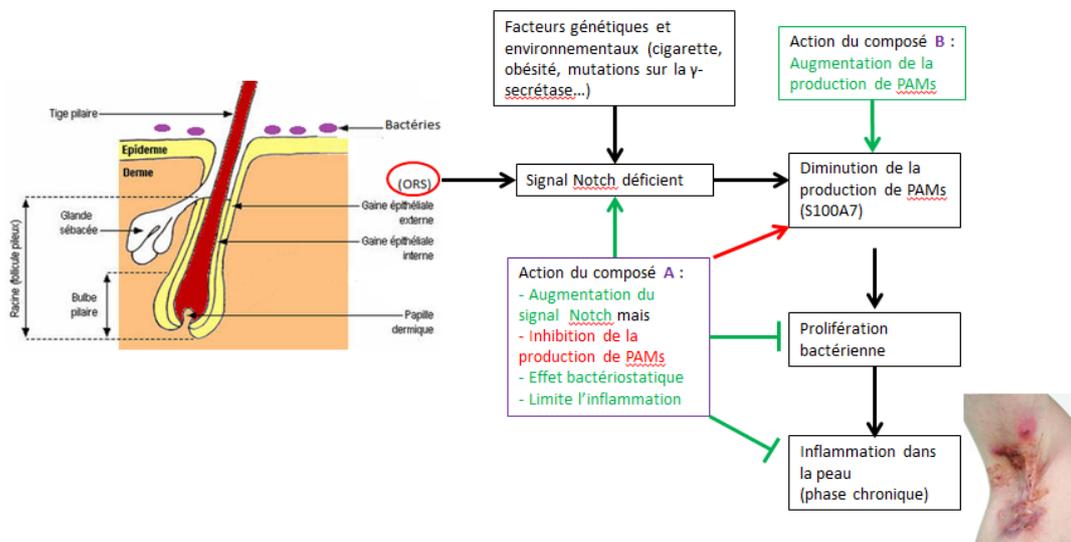
Pourtant ce composé est utilisé pour le traitement d'Acne vulgaris. Il a en effet une activité antibiotique naturelle contre certaines bactéries comme *Propionibacterium acnes*. Ainsi, il pourrait avoir un effet bactériostatique pour les bactéries présentes dans les follicules pileux des patients HS. De plus, il a été démontré qu'il agirait également comme inhibiteur sur la voie NF $\kappa$ B, protéine impliquée dans la production de facteurs proinflammatoires comme les cytokines (Figure 26). Dans la mesure où le composé A permet d'induire un signal NOTCH, de diminuer l'inflammation et d'avoir un effet bactériostatique sur certaines bactéries, on peut considérer qu'il peut être un bon candidat pour une thérapie pour la maladie de Verneuil.

Le composé B quant à lui semble activer la production de peptides antimicrobiens, surtout à faible concentration : 5 $\mu$ M. Il permettrait d'activer la production de PAMs sans passer directement par la voie NOTCH. Ce composé B, d'après la bibliographie, permettrait également d'augmenter la production de ligand par les cellules, en l'occurrence Jagged 1. Il permettrait ainsi d'augmenter le signal NOTCH des cellules entre elles en favorisant son induction. Dans tous les cas l'étude des deux composés doit être poursuivie pour évaluer leur efficacité.



**Figure 26 :** Importance de la voie NFκB dans la réponse immunitaire innée. La voie NFκB permet de faire le lien entre les PRRs, en l'occurrence ici les TLRs et la réponse de la cellule face aux PAMPs. Cette protéine va être transloquée dans le noyau et va activer certains gènes permettant la production de facteurs proinflammatoires comme les cytokines. Ces cytokines permettront entre autre le recrutement des neutrophiles et des macrophages (adapté de Pandey et al., 2013). Par conséquent, le composé A, en inhibant la voie de signalisation NFκB, diminuera le phénomène inflammatoire. L'action du composé A est représentée en rouge

La figure 27 présente un schéma bilan des résultats de ce projet. Les kératinocytes de la gaine externe du follicule pileux de patients HS auraient un signal NOTCH déficient qui entrainerait une diminution de la production de peptides antimicrobiens. Cela permettrait ainsi à la flore commensale cutanée de proliférer et provoquerait ainsi l'inflammation caractéristique de la maladie de Verneuil. Le composé A semble agir sur la voie NOTCH mais inhibe la production de peptides antimicrobiens. Le composé B quant à lui semble augmenter la production de peptides antimicrobiens.



**Figure 27 :** Schéma bilan du projet sur les cellules ORS de patients HS. Réalisé avec [3] et (Jemec, 2012).

## *Perspectives*

Après avoir travaillé sur les lignées cellulaires HaCaT et HEK293T, l'équipe a commencé à optimiser le protocole de transfection des cellules primaires pour pouvoir étudier l'action des deux composés sur la voie de signalisation NOTCH. C'est ainsi que le Dr. BONIOTTO a commencé à optimiser un protocole de nucléofection des cellules primaires de personnes saines. L'électroporation de cellules primaires a pour l'instant un rendement de 2%, ce qui ne permet pas d'envisager d'expériences sur les cellules après transfection.

Une étude transcriptomique des cellules d'ORS stimulées par le ligand DLL4 des récepteurs NOTCH est en cours (projet Expascience). Ce projet permettra éventuellement de découvrir les nouvelles voies métaboliques responsables la rupture du follicule pileux dans l'HS. Il serait intéressant d'étudier si le composé A peut corriger les défauts de ces voies de signalisation. De plus, l'étude des différents gènes régulés chez les patients HS avec ou sans mutation fonctionnelle d'une sous unité la  $\gamma$ -sécrétase par rapport aux individus sains permettrait d'envisager une nouvelle thérapie à suivre en fonction du patient.

Ensuite, l'étude avec le Luminex des surnageants de cellules stimulées avec des PAMPs (figure 13) permettra d'étudier la production de cytokines et de chemokines des kératinocytes de la gaine externe du follicule pileux chez les patients HS.

Enfin le composé B pourrait être testé sur des cellules d'ORS de malades, afin de déterminer s'il permet réellement d'augmenter la production de peptides antimicrobiens. Il existe à ce titre de nombreux autres peptides antimicrobiens importants pour l'homéostasie du follicule pileux comme la calgranuline A (S100A8) ou la RNase 7 et leur expression devrait être caractérisée pour proposer une thérapie efficace (Reithmayer et al., 2009).

## *Conclusion générale*

La maladie de Verneuil étant une maladie orpheline, il est difficile d'obtenir de nombreux échantillons. Grâce à la cohorte créée par le Dr. HOTZ, nous avons pu avoir accès à des prélèvements réguliers qui ont permis de multiplier le nombre de patients dont les cheveux ont été mis en culture. Cependant, la culture primaire des kératinocytes d'ORS est assez longue et comporte de nombreuses étapes délicates. Toutes les cellules des patients HS ou des individus sains n'ont pas pu être multipliées pendant assez longtemps pour nous permettre de faire des expériences. Elles se différencient en effet assez vite et donc mourraient. L'apprentissage de la culture de cellules d'ORS est un long processus qui nécessite un suivi quotidien des cellules (passage dans un contenant plus grand au bon moment, observation du nombre de cellules en cours de différenciation) et une grande adaptabilité des expériences à effectuer dans le temps suivant « l'état de santé » des cellules primaires. Par conséquent, certaines expériences ont été très longues à réaliser. A titre d'exemple, la compilation des résultats de la figure 13 a pris l'intégralité de la durée du stage.

L'utilisation de lignées cellulaires a ainsi permis de pallier le problème du faible nombre de cellules disponibles et a permis d'effectuer les premiers tests avec les composés A et B. Si les premiers résultats avec la lignée cellulaire HEK293T ont été encourageants et ont démontré que ces deux produits pouvaient induire un signal NOTCH, les résultats obtenus avec la lignée cellulaire HaCaT a démontré les limites de ces résultats. En se rapprochant davantage des conditions physiologiques, à savoir en utilisant une lignée de kératinocytes, qui plus est en cocultures avec des fibroblastes exprimant un ligand de NOTCH, le composé B a montré ses limites en présence de ce ligand. Le composé A en revanche semble bien potentialiser le signal induit par le ligand de NOTCH. L'utilisation de modèles cellulaires permet ainsi de bien cibler un mécanisme en particulier, à savoir ici étudier l'activation du signal NOTCH avec deux composés sur des cellules transfectées, mais est restreinte à une étape de la voie de signalisation. Les kératinocytes du follicule pileux expriment tous NOTCH de façon différente suivant leur stade de différenciation. De même, toutes leurs cellules voisines n'expriment pas les ligands de NOTCH de la même façon. Ainsi, les résultats obtenus avec les composés seront altérés par de nombreux paramètres cellulaires et moléculaires. A ce titre, l'utilisation de modèles cellulaires a permis de faire les premières expériences préliminaires pour tester les deux produits dans la mesure où les cellules primaires sont difficiles à obtenir, mais devront assez rapidement être remplacés par les cellules cibles pour avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques intervenant dans la maladie de Verneuil.

Ce stage de fin d'étude m'a ainsi permis de découvrir une maladie peu connue et moins étudiée que d'autres dermatoses inflammatoires. Si cela limite en partie les connaissances que l'on a sur la maladie de Verneuil, cela laisse une plus grande liberté aux recherches effectuées par rapport à d'autres maladies très étudiées. L'étude des composés thérapeutiques potentiels offre également des perspectives de collaboration avec les industries pharmaceutiques. En effet, un traitement pour l'HS pourra très bien s'adapter à d'autres pathologies voisines. Enfin, la présence de médecins et de chercheurs dans l'équipe permet une collaboration efficace pour étudier à la fois les aspects cliniques et les corrélés avec des analyses cellulaires et moléculaires afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la maladie de Verneuil.

## Bibliographie

- Aasen, T., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 5, 371–382.
- Aubin-Houzelstein, G. (2012). Notch signaling and the developing hair follicle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 727, 142–160.
- Berná-Serna, J.D., and Berná-Mestre, J.D. (2010). Follicular occlusion due to hyperkeratosis: a new hypothesis on the pathogenesis of mammillary fistula. *Med. Hypotheses* 75, 553–554.
- Borggreffe, T., and Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 1631–1646.
- Bray, S., and Bernard, F. (2010). Notch targets and their regulation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 253–275.
- Church, J.M., Fazio, V.W., Lavery, I.C., Oakley, J.R., and Milsom, J.W. (1993). The differential diagnosis and comorbidity of hidradenitis suppurativa and perianal Crohn's disease. *Int. J. Colorectal Dis.* 8, 117–119.
- Dréno, B., Khammari, A., Brocard, A., Moyses, D., Blouin, E., Guillet, G., Léonard, F., and Knol, A.-C. (2012). Hidradenitis suppurativa: the role of deficient cutaneous innate immunity. *Arch. Dermatol.* 148, 182–186.
- Fimmel, S., and Zouboulis, C.C. (2010). Comorbidities of hidradenitis suppurativa (acne inversa). *Dermatoendocrinol.* 2, 9–16.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J.-M. (2005). Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol.* 6, 57–64.
- Harder, J., and Schröder, J.-M. (2005). Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J. Leukoc. Biol.* 77, 476–486.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2013). The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat. Immunol.* 14, 978–985.
- Hofmann, S.C., Saborowski, V., Lange, S., Kern, W.V., Bruckner-Tuderman, L., and Rieg, S. (2012). Expression of innate defense antimicrobial peptides in hidradenitis suppurativa. *J. Am. Acad. Dermatol.* 66, 966–974.
- Hu, X., Chung, A.Y., Wu, I., Foldi, J., Chen, J., Ji, J.D., Tateya, T., Kang, Y.J., Han, J., Gessler, M., et al. (2008). Integrated regulation of Toll-like receptor responses by Notch and interferon-gamma pathways. *Immunity* 29, 691–703.
- Jahns, A.C., Killasli, H., Nosek, D., Lundskog, B., Lenngren, A., Muratova, Z., Emtestam, L., and Alexeyev, O.A. (2014). Microbiology of hidradenitis suppurativa (acne inversa): a histological study of 27 patients. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 122, 804–809.
- Jemec, G.B.E. (2012). Clinical practice. Hidradenitis suppurativa. *N. Engl. J. Med.* 366, 158–164.

- Jinquan, T., Vorum, H., Larsen, C.G., Madsen, P., Rasmussen, H.H., Gesser, B., Etzerodt, M., Honoré, B., Celis, J.E., and Thestrup-Pedersen, K. (1996). Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J. Invest. Dermatol.* *107*, 5–10.
- Jorissen, E., and De Strooper, B. (2010). Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch. *Curr. Top. Dev. Biol.* *92*, 201–230.
- Karanu, F.N., Murdoch, B., Miyabayashi, T., Ohno, M., Koremoto, M., Gallacher, L., Wu, D., Itoh, A., Sakano, S., and Bhatia, M. (2001). Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* *97*, 1960–1967.
- Kelly, G., Sweeney, C.M., Tobin, A.-M., and Kirby, B. (2014). Hidradenitis suppurativa: the role of immune dysregulation. *Int. J. Dermatol.*
- Lange-Asschenfeldt, B., Marenbach, D., Lang, C., Patzelt, A., Ulrich, M., Maltusch, A., Terhorst, D., Stockfleth, E., Sterry, W., and Lademann, J. (2011). Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* *24*, 305–311.
- Liu, Y., Gao, M., Lv, Y., Yang, X., Ren, Y., Jiang, T., Zhang, X., Guo, B., Li, M., Zhang, Q., et al. (2011). Confirmation by exome sequencing of the pathogenic role of NCSTN mutations in acne inversa (hidradenitis suppurativa). *J. Invest. Dermatol.* *131*, 1570–1572.
- Di Meglio, P., Perera, G.K., and Nestle, F.O. (2011). The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity* *35*, 857–869.
- Melnik, B.C., and Plewig, G. (2013a). Impaired Notch-MKP-1 signalling in hidradenitis suppurativa: an approach to pathogenesis by evidence from translational biology. *Exp. Dermatol.* *22*, 172–177.
- Melnik, B.C., and Plewig, G. (2013b). Impaired Notch signalling: the unifying mechanism explaining the pathogenesis of hidradenitis suppurativa (acne inversa). *Br. J. Dermatol.* *168*, 876–878.
- Mendonça, C.O., and Griffiths, C.E.M. (2006). Clindamycin and rifampicin combination therapy for hidradenitis suppurativa. *Br. J. Dermatol.* *154*, 977–978.
- Pan, Y., Lin, M.-H., Tian, X., Cheng, H.-T., Gridley, T., Shen, J., and Kopan, R. (2004). gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev. Cell* *7*, 731–743.
- Pandey, R.K., Yu, F.-S., and Kumar, A. (2013). Targeting toll-like receptor signaling as a novel approach to prevent ocular infectious diseases. *Indian J. Med. Res.* *138*, 609–619.
- Panza, F., Frisardi, V., Imbimbo, B.P., Capurso, C., Logroscino, G., Sancarlo, D., Seripa, D., Vendemiale, G., Pilotto, A., and Solfrizzi, V. (2010). REVIEW:  $\gamma$ -Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: The current state. *CNS Neurosci. Ther.* *16*, 272–284.
- Pink, A.E., Simpson, M.A., Brice, G.W., Smith, C.H., Desai, N., Mortimer, P.S., Barker, J.N.W.N., and Trembath, R.C. (2011). PSENEN and NCSTN mutations in familial hidradenitis suppurativa (Acne Inversa). *J. Invest. Dermatol.* *131*, 1568–1570.
- Pink, A.E., Simpson, M.A., Desai, N., Trembath, R.C., and Barker, J.N.W. (2013).  $\gamma$ -Secretase mutations in hidradenitis suppurativa: new insights into disease pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 601–607.
- Radtke, F., MacDonald, H.R., and Tacchini-Cottier, F. (2013). Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 427–437.

- Van Rappard, D.C., Limpens, J., and Mekkes, J.R. (2013). The off-label treatment of severe hidradenitis suppurativa with TNF- $\alpha$  inhibitors: a systematic review. *J. Dermatol. Treat.* 24, 392–404.
- Reeder, V.J., G Mahan, M., and Hamzavi, I.H. (2014). Ethnicity and Hidradenitis Suppurativa. *J. Invest. Dermatol.*
- Reithmayer, K., Meyer, K.C., Kleditzsch, P., Tiede, S., Uppalapati, S.K., Gläser, R., Harder, J., Schröder, J.-M., and Paus, R. (2009). Human hair follicle epithelium has an antimicrobial defence system that includes the inducible antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) and RNase 7. *Br. J. Dermatol.* 161, 78–89.
- Sabat, R., Ouyang, W., and Wolk, K. (2014). Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 21–38.
- Schlapbach, C., Yawalkar, N., and Hunger, R.E. (2009). Human beta-defensin-2 and psoriasin are overexpressed in lesions of acne inversa. *J. Am. Acad. Dermatol.* 61, 58–65.
- Vazquez, B.G., Alikhan, A., Weaver, A.L., Wetter, D.A., and Davis, M.D. (2013). Incidence of hidradenitis suppurativa and associated factors: a population-based study of Olmsted County, Minnesota. *J. Invest. Dermatol.* 133, 97–103.
- Vinding, G.R., Miller, I.M., Zarchi, K., Ibler, K.S., Ellervik, C., and Jemec, G.B.E. (2014). The prevalence of inverse recurrent suppuration: a population-based study of possible hidradenitis suppurativa. *Br. J. Dermatol.* 170, 884–889.
- Wang, B., Yang, W., Wen, W., Sun, J., Su, B., Liu, B., Ma, D., Lv, D., Wen, Y., Qu, T., et al. (2010). Gamma-secretase gene mutations in familial acne inversa. *Science* 330, 1065.
- Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.-D., Sterry, W., and Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* 36, 1309–1323.
- Wolk, K., Warszawska, K., Hoeflich, C., Witte, E., Schneider-Burrus, S., Witte, K., Kunz, S., Buss, A., Roewert, H.J., Krause, M., et al. (2011). Deficiency of IL-22 contributes to a chronic inflammatory disease: pathogenetic mechanisms in acne inversa. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 1228–1239.
- Van der Zee, H.H., van der Woude, C.J., Florencia, E.F., and Prens, E.P. (2010). Hidradenitis suppurativa and inflammatory bowel disease: are they associated? Results of a pilot study. *Br. J. Dermatol.* 162, 195–197.
- Van der Zee, H.H., de Winter, K., van der Woude, C.J., and Prens, E.P. (2014). The prevalence of hidradenitis suppurativa in 1093 patients with inflammatory bowel disease. *Br. J. Dermatol.*
- Zhang, J., Reeder, V.J., and Hamzavi, I.H. (2014). Use of Biologics in the Treatment of Hidradenitis Suppurativa: A Review of the Henry Ford Hospital Experience. *Br. J. Dermatol.*

## *Sitographie*

[1] User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. 2001. Consulté le 28/03/2014.

Lien URL :

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_040980.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf)

[2] LIVE/DEAD®Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, for 405nm excitation. 2014. Consulté le

4/08/2014. Lien URL : <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/L34957>

[3] Le poil sous tous ses angles. 2008. Consulté le 25/08/2014. Lien URL :

<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dossiers/d/biologie-poil-sous-tous-angles-775/page/7/>

*Annexes*

**Annexe 1 : Amorces utilisées pour les RT-QPCR**

<b>GENE</b>	<b>PROTEINE</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
<b>OAZ1</b>	<b>OAZ1</b>	ACTTATTCTACTCCGATGATC	GAGAATCCTCGTCTTGTC
<b>DEFB1</b>	<b>hBD-1</b>	AGATGGCCTCAGGTGGTAACTTT	CTGCTGACGCAATTGTAATGATCA
<b>DEFB4</b>	<b>hBD-2</b>	TGCCTCTTCCAGGTGTTTTTG	GGCTCCACTCTTAAGGCAGGTA
<b>DEFB103</b>	<b>hBD-3</b>	TGTTCAGGTCATGGAGGAA	CGCCTCTGACTCTGCAATA
<b>S100A7</b>	<b>S100A7</b>	CTTAGTGCCTGTGACAAA	ATCTTCTTATCCTCATTCTTGT

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : BIOTECH (Biologie, Biotechnologies, Santé) Enseignant référent : Mme Dominique FOUQUES
Auteur(s) : Aubin GARCIA  Date de naissance* : 28/01/1992 Nb pages : 50      Annexe(s) : 1 Année de soutenance : 2014	Organisme d'accueil, Adresse :  Hôpital Henri Mondor, Laboratoire INSERM U955, Equipe 16 51, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny 94010 CRETEIL Maître de stage : Dr Sophie HÛE
Titre français : <b>Etude préliminaire de deux composés thérapeutiques potentiels pour le traitement du follicule pileux dans l'Hidradénite Suppurée.</b>  Titre anglais : <b>Preliminary study of two potential therapeutic compounds for the treatment of the hair follicle in Hidradenitis suppurativa.</b>	
Résumé (1800 caractères maximum) : <p>La maladie de Verneuil, ou Hidradénite Suppurée (HS), est une maladie du follicule pileux qui provoque une inflammation cutanée. L'hypothèse d'un déficit immunitaire face à la flore commensale cutanée chez des patients ayant une susceptibilité génétique semble aujourd'hui confirmée. L'étude de la réponse des kératinocytes de la gaine externe des follicules pileux de patients face à des « Pathogen Associated Molecular Patterns » par stimulation de leurs « Pattern Recognition Receptors » a démontré une diminution de la production de peptides antimicrobiens comme la psoriasine par rapport aux individus sains. De plus, des études génétiques effectuées sur des patients ont révélé la présence de mutations de la <math>\gamma</math>-sécrétase, l'enzyme clé dans la voie de signalisation NOTCH. L'équipe a démontré qu'une baisse de ce signal peut induire une diminution de la production de peptides antimicrobiens après stimulation des PRRs des cellules de la gaine externe du follicule pileux. L'objectif était donc de trouver un composé pour restaurer le signal NOTCH chez les patients HS, ce qui devait permettre de restaurer la production de peptides antimicrobiens par les kératinocytes. L'étude sur des lignées cellulaires HEK293T et HaCaT de deux composés A et B sensés restaurer la voie NOTCH a démontré que le composé A pourrait restaurer la voie NOTCH mais pas le composé B. Enfin, les premiers tests de ces composés sur des cellules primaires d'individus sains indiquent que le composé A réprime la production de peptide antimicrobiens, au contraire du composé B.</p>	
Abstract (1600 caractères maximum) : <p>Verneuil's disease or Hidradenitis suppurativa (HS) is a disease of the hair follicle which causes skin inflammation. The hypothesis of an immune deficiency towards skin commensal flora in patients with a genetic susceptibility seems now confirmed. The study of the response of outer root sheath keratinocytes of patient's hair follicles against Pathogen Associated Molecular Patterns by their Pattern Recognition Receptors demonstrated a decreased production of antimicrobial peptides as psoriasin compared to healthy individuals. Moreover, genetic studies performed on patients have revealed the presence of mutations in the <math>\gamma</math>-secretase, a key enzyme in the Notch signaling pathway. The team has demonstrated that this signal defect may induce a decreased production of antimicrobial peptides after stimulation of cells PRRs. The aim was to find a compound to restore the NOTCH signal in HS patients, in order to restore the production of antimicrobial peptides by keratinocytes. The study on HaCaT and HEK293T cell lines with two compounds A and B showed that compound A could restore NOTCH pathway but not compound B. Finally, preliminary results on primary cells from healthy individuals indicate that the compound A inhibits antimicrobial peptides production whereas the compound the compound B does not.</p>	
Mots-clés : Hidradénite suppurée, immunité innée, kératinocytes, peptides antimicrobiens, $\gamma$ -sécrétase, NOTCH, Pattern Recognition Receptors  Key Words: Hidradenitis Suppurativa, innate immunity, antimicrobial peptides, $\gamma$ -secretase, NOTCH, Pattern Recognition Receptors	

\* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires